

**MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**Moreno Aguilar Xavier**

**Propagação Vegetativa e conservação *in vitro* de  
*Astronium fraxinifolium* Schott**

**Montes Claros**

**2021**

**Moreno Aguilar Xavier**

**Propagação vegetativa e conservação *in vitro* de  
*Astronium fraxinifolium* Schott**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

**Orientador:** Prof Dr. Leandro Silva de Oliveira

**Coorientadora:** Profª Dra. Rubia Santos Fonseca

Montes Claros

20 de Agosto de 2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Xavier, Moreno Aguilar.

X3p Propagação vegetativa e conservação in vitro de *Astronium fraxinifolium* Schott / Moreno  
2021 Aguilar Xavier. Montes Claros, 2021.

58 f.:il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Ciências Florestais. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Leandro Silva de Oliveira.

Banca examinadora: Rubia dos Santos Fonseca, Gilvano Ebling Brondani, Claudinéia Ferreira Nunes.

Inclui referências: f. 33-38; 56-57.

1. Propagação de plantas. 2. Engenharia florestal. I. Oliveira, Leandro Silva de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 630

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFGM  
Edélzia Cristina Sousa Versiani Bibliotecária - CRB 1349



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 20 dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e um, às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Leandro Silva de Oliveira, D. Sc. (Orientador - UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Rúbia Santos Fonseca, D. Sc. (Coorientadora - UFMG/ICA), Claudinéia Ferreira Nunes, D. Sc. (UFMG/ICA) e Gilvano Ebling Brondani, D. Sc. (UFLA/DCF), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de Defesa de Dissertação de MORENO AGUILAR XAVIER, aluno do Curso de Mestrado em Ciências Florestais. Após a avaliação do referido aluno, a Banca Examinadora procedeu à publicação do resultado da defesa da Dissertação intitulada: "INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EPICÓRMICAS DE MATRIZES ADULTAS DE *Astronium fraxinifolium* Schott VISANDO O CULTIVO *IN VITRO*", sendo o aluno considerado aprovado. E, para constar, eu, Professor Leandro Silva de Oliveira, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 74 do regulamento do Curso de Mestrado em Ciências Florestais, conforme apresentado a seguir:

Art. 74 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do colegiado do Curso, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 20 de agosto de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Leandro Silva de Oliveira, Professor do Magistério Superior, em 25/08/2021, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rúbia Santos Fonseca, Membro, em 25/08/2021, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Claudinéia Ferreira Nunes, Professora do Magistério Superior, em 25/08/2021, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gilvano Ebling Brondani, Usuário Externo, em 25/08/2021, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

## RESGATE VEGETATIVO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE

### *Astronium fraxinifolium* SCHOTT

#### RESUMO

O *Astronium fraxinifolium* é uma espécie florestal de interesse econômico devido às características tecnológicas de sua madeira, com ampla aplicabilidade de usos para diversos fins. Os projetos de reflorestamento com as espécies florestais nativas obterão sucesso somente se atrelados a programas de melhoramento. Além disso, há limitação de disponibilidade de material genético para a propagação seminífera (semente). Nos programas de melhoramento florestal a seleção dos genótipos selecionados realiza-se na idade adulta e para tanto, são necessários métodos empregados no resgate vegetativo. O resgate por meio de estacas lenhosas coletadas da copa da árvore e posterior indução de brotações epicórmicas apresenta-se como uma alternativa promissora, uma vez que mantém a integridade da árvore matriz, podendo ser aplicado para aquelas espécies sob risco de extinção. Neste contexto, o presente estudo objetivou estabelecer um protocolo de resgate vegetativo por meio da indução de brotações epicórmicas a partir de árvores matrizes adultas, visando a conservação *in vitro* de germoplasma de *A. fraxinifolium*. Avaliou-se a eficiência de três agentes desinfestantes no controle da contaminação fúngica e bacteriana de galhos podados, sendo eles: hipoclorito de sódio (NaOCl), fungicida sistêmico (Derosal<sup>®</sup> 500) e desinfestante bactericida (Lysoform<sup>®</sup>). A influência da classe diamétrica (T1: < 8,0; T2: 8-10; T3 >10 cm) dos galhos podados na indução de brotações epicórmicas foi investigada, bem como o sexo das árvores matrizes. A ontogenia das brotações epicórmicas induzidas em galhos podados foi avaliada por meio de cortes histológicos a fresco. E, por fim, avaliou-se diferentes concentrações de NaOCl (0,5; 1,0; 1,5 e 2,5% v/v) na desinfestação de brotações epicórmicas utilizadas como fonte de explante para o estabelecimento *in vitro* de *A. fraxinifolium*. Os galhos tratados com desinfestante bactericida e o fungicida sistêmico apresentaram maior número de brotações epicórmicas, sendo que o nível de contaminação foi menor para o tratamento com fungicida. Os galhos com circunferência maior que 10 cm apresentaram maior número de brotações epicórmicas. O sexo das árvores matrizes doadoras de galhos não influenciou na indução dessas brotações. As brotações epicórmicas originaram-se de gemas axilares dormentes ou formadas a partir de tecidos com menor grau de diferenciação celular. Não se obteve sucesso no estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas em virtude da alta oxidação fenólica dos explantes. O resgate vegetativo por meio da indução de brotações epicórmicas em galhos podados

de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium* comprovou ser efetiva, no entanto, são necessários maiores estudos para o controle da oxidação na introdução *in vitro*.

**Palavras-Chave:** Espécies florestais nativas; Propagação vegetativa; Brotações Epicórmicas; Estabelecimento *in vitro*, Gonçalo Alves.

## VEGETATIVE RESCUE AND *IN VITRO* CONSERVATION OF *Astronium fraxinifolium* SCHOTT

### ABSTRACT

*Astronium fraxinifolium* is a native forest species of great economic interest, but which does not yet have silvicultural exploitation. The success of native species reforestation projects requires the installation of improvement programs. The multiplication of selected materials in these programs, in turn, depends on vegetative rescue techniques, because the selection occurs when the materials are adults. In this respect, rescue through the induction of epicormic shoots in pruned branches is an alternative application for species at risk of extinction, such as *A. fraxinifolium*, as it is a non-destructive method. In this context, the present study aimed to establish a vegetative rescue protocol through the induction of epicormic shoots from mature trees for the *in vitro* conservation of *A. fraxinifolium* germplasm. The efficiency of disinfectants, sodium hypochlorite (NaOCl), fungicide (Derosal<sup>®</sup> 5000) and bactericidal disinfectant (Lysoform<sup>®</sup>) in controlling fungal and bacterial contamination of pruned branches was evaluated. The influence of the diameter class (T1: < 8.0; T2: 8-10; T3 >10 cm) of the pruned branches on the induction of epicormic shoots was investigated, as well as the sex of the trees. The ontogeny of epicormic shoots induced in pruned branches was evaluated by means of fresh histological sections. Finally, NaOCl concentrations (0.5; 1.0; 1.5 and 2.5% v/v) were evaluated for the *in vitro* establishment of epicormic shoots induced in branches of *A. fraxinifolium* mature trees. The bactericidal disinfectant and fungicide showed a higher number of epicormic shoots induced on the branches, and the level of contamination was lower for the treatment with fungicide. Branches with a circumference greater than 10 cm had a greater number of epicormic shoots. The sex of the stem donor trees did not influence the induction of these shoots. The epicormic buds originated from dormant axillary buds or formed from tissues with a lower degree of cell differentiation. The *in vitro* establishment of epicormic shoots was not successful due to the high phenolic oxidation of the explants. The vegetative rescue through the induction of epicormic shoots in pruned branches of *A. fraxinifolium* mature trees proved to be effective, however, further studies are needed to control oxidation in the *in vitro* introduction.

**Key words:** Native forest species; Vegetative propagation; Epicormic buds; Micropropagation; Gonçalo Alves.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
3.1	<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott.....	23
3.2	Resgate vegetativo de árvores adultas de espécies florestais.....	25
3.3	Brotações Epicórmicas.....	28
3.4	Ontogenia das brotações epicórmicas.....	29
3.5	Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes.....	31
3.6	Referências.....	33
<b>4</b>	<b>RESGATE VEGETATIVO E CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Astronium fraxinifolium</i> Schott.....</b>	<b>40</b>
4.1	Introdução.....	41
4.2	Materiais e Métodos.....	43
4.3	Resultados e Discussão.....	46
4.5	Referências.....	56
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>



## INTRODUÇÃO

O Brasil tem o setor florestal como um dos setores da economia que mais cresce, o qual contribuiu com 6,2% do PIB Industrial no país e, também, é um dos segmentos com maior potencial de contribuição para a construção de uma economia verde (IBÁ, 2017). Os resultados são decorrentes da atividade florestal baseada na silvicultura com espécies florestais exóticas, principalmente dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. Por outro lado, a exploração das formações florestais nativas, quer sejam oriundas de planos de manejo ou de extrativismo ilegal, constitui ainda o principal meio de atender ao mercado consumidor quanto à demanda de madeira, especialmente serrada.

Atualmente, no setor florestal brasileiro, tem-se observado a necessidade da diversificação da produção madeireira em detrimento da exploração dos remanescentes florestais nativos. Isso decorre da redução de formações florestais passíveis de exploração silvicultural. Em contrapartida, apesar do Brasil corresponder a um dos principais centros de diversidade genética de espécies florestais do mundo, grande parte desta diversidade genética é pouco explorada. A subutilização deste potencial impede a ampliação da sua capacidade competitiva, tal como ocorre com as espécies exóticas plantadas.

Na região norte de Minas Gerais, o Cerrado e a Caatinga se destacam por serem um dos biomas mais ricos e, ao mesmo tempo, mais ameaçados do planeta. Além disso, a região tem relevância por representar uma área de transição Cerrado-Caatinga e com diversas outras áreas consideradas como ecótono, que se caracterizam por uma transição vegetal regional ou local, encontrando-se ecótonos entre a Mata Atlântica e o Cerrado ou mesmo entre o Cerrado e a Mata Atlântica. Dessa forma, há uma riqueza de espécies florestais nos diferentes gradientes ecológicos, resultado das transições climáticas proporcionadas pela junção dos biomas que propiciam o desenvolvimento de uma grande biodiversidade. Em face dessa riqueza de biodiversidade são encontrados harmoniosamente, no norte de Minas Gerais, espécies florestais pertencentes a cada um dos biomas e, devido à enorme adaptabilidade da natureza, materiais genéticos com enorme potencial para exploração.

Dentre as diversas espécies madeireiras, com aptidão para exploração comercial, que ocorrem naturalmente na região norte de Minas Gerais, podemos destacar o Gonçalves-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott), a qual fez parte deste estudo. É importante mencionar que os critérios utilizados para a escolha desta espécie foi o fato de sua madeira ser reconhecida como de elevada qualidade e tradicionalmente apreciada pela população local, além do potencial medicinal e utilização na recuperação de áreas degradadas. Contudo, a exploração silvicultural da espécie é

inexistente e, conseqüentemente, a mesma se encontra em risco iminente de perda de importantes materiais genéticos, melhores adaptados e mais produtivos.

A exploração silvicultural do *A. fraxinifolium* ainda é inexistente, apesar das suas potencialidades, sendo os plantios desta espécie realizados exclusivamente para fins de recomposição da cobertura florestal nativa para a recuperação de áreas degradadas, restauração de áreas de preservação permanente (APP) e estabelecimento de reservas legais. E, mesmo diante da aparente simplicidade das ações requeridas nesses programas, a disponibilidade de sementes e mudas tem sido um grave problema. Há escassez local de sementes ou de mudas em quantidade suficiente para a implementação desses projetos. Dentre as alternativas propostas, está o estabelecimento de povoamentos com sementes ou mudas coletadas de outros locais, o que representa um alto risco de fracasso. Isso decorre da ausência de um programa de melhoramento florestal que garanta a sustentabilidade das espécies ao longo de gerações representadas por um número efetivo suficiente. Nesse aspecto, se pensarmos na expansão da silvicultura do *A. fraxinifolium* torna difícil, se não impossível, avançar nos programas de reflorestamento.

Dessa forma, estudos de clonagem de árvores matrizes selecionadas fornecem subsídios imprescindíveis para o desenvolvimento de programas de melhoramento florestal de *A. fraxinifolium*, quer sejam para a produção de sementes melhoradas, bem como de clones. Nesse contexto, há a necessidade da clonagem de genótipos adultos em razão de ser impossível na seleção clonal de prever precocemente e com precisão as características tecnológicas da madeira presentes na árvore adulta. Acrescenta-se ainda que especificamente para espécies como *A. fraxinifolium* que está sob risco de extinção que impossibilita o uso de técnicas mais drásticas de resgate vegetativo como de cepa das árvores ou anelamento do tronco para indução de brotações basais para o resgate vegetativo de genótipos de interesse. Portanto, o resgate vegetativo por meio da coleta de galhos podados da copa da árvore e posterior indução de brotações epicórmicas para estabelecimento em cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa promissora, uma vez que mantém a integridade da árvore matriz.

Neste contexto, objetivou-se contribuir para o aperfeiçoamento da técnica de resgate vegetativo de *A. fraxinifolium* via micropropagação utilizando brotações epicórmicas induzidas em galhos podados de árvores adultas. Para tanto, ensaios foram conduzidos para definição do diâmetro mais apropriado dos galhos, bem como para determinar o processo mais adequado de desinfestação destes galhos para a indução das brotações epicórmicas em ambiente protegido, além de avaliar as diferenças no potencial de indução destas brotações em relação ao sexo das árvores matrizes. Investigações anatômicas descritivas também foram utilizadas para melhor caracterizar as diferentes etapas envolvidas nos processos de ontogenia das brotações epicórmicas. E, por

último, avaliou-se a eficiência de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) como desinfestante das brotações epicórmicas induzidas nos galhos para o estabelecimento *in vitro*.

## 1) OBJETIVOS

### 2.1) Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade técnica do resgate vegetativo de *A. fraxinifolium* por meio da indução de brotações epicórmicas em estacas retiradas de árvores adultas e a sua utilização para o cultivo *in vitro*, visando à conservação de germoplasma.

### 2.1) Objetivos Específicos

- Estabelecer protocolo de resgate vegetativo por meio da indução de brotações epicórmicas a partir de árvores matrizes adultas para a conservação de germoplasma de *A. fraxinifolium*.
- Determinar o agente desinfestante mais eficiente no controle da contaminação fúngica e bacteriana dos galhos podados de árvores adultas de *A. fraxinifolium*.
- Determinar a influência da classe diamétrica dos galhos podados de árvores adultas de *A. fraxinifolium* na indução de brotações epicórmicas.
- Determinar a influência do sexo das árvores matrizes de *A. fraxinifolium* na indução de brotações epicórmicas em galhos podados.
- Avaliar anatomicamente a ontogenia das brotações epicórmicas induzidas em galhos retirados de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium*.
- Determinar as melhores concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) para o estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas induzidas em galhos retirados de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium*.

## 2) REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1) *Astronium fraxinifolium* Schott

*A. fraxinifolium* popularmente conhecido como Gonçalo-alves é uma espécie arbórea caducifólia, heliófita, pioneira e seletiva xerófila. A espécie encontra-se predominantemente em terrenos secos e rochosos, formando agrupamentos populacionais descontínuos. O gonçalo-alves tem ocorrência ampla no cerrado brasileiro, principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo geralmente encontrado em solos de boa fertilidade (LORENZI, 1992; BRANDÃO et al., 2002; MMA, 2007). A espécie é comum nas matas secas e pode ser encontrada também em matas de galeria (FELFILI et al., 2000; AQUINO et al., 2009). *A. fraxinifolium* também é encontrado em países da América Central, como Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Trinidad Tobago, e em outros da América do Sul, por exemplo, Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai e Venezuela (SALOMÃO e SILVA, 2006).

Botanicamente, *A. fraxinifolium* é classificada como uma espécie dióica, cuja polinização é entomófila. O florescimento das árvores ocorre entre os meses de agosto e setembro, uma particularidade dessa espécie é a perda de sua folhagem nesse período (LORENZI, 1998). Segundo Reys et al. (2005) a frutificação ocorre entre outubro e novembro, sendo a dispersão anemocórica. A quantidade de sementes produzidas pelas árvores *A. fraxinifolium* é elevada e a principal síndrome de dispersão das mesmas é a anemocórica (ALLEN, 1991).

A qualidade da madeira *A. fraxinifolium* corresponde a um dos principais atrativos para a exploração da espécie (LEITE, 2002). A sua madeira é classificada como pesada (densidade de 1,09 g cm<sup>-3</sup>), compacta, rígida, de grande durabilidade sob condições naturais, apresenta cerne interno rosado e bastante espesso, em tonalidades do marrom claro ao avermelhado. (LEITE, 2002; LORENZI, 2008). Em razão das suas propriedades físicas e químicas, a madeira é considerada adequada para uso na construção civil e naval, na marcenaria, para fabricação de dormentes a portas de fino acabamento (FEITOSA, et al., 2011; LEITE, 2002; LORENZI, 2008), sua casca, rica em taninos, é utilizada também na medicina popular (LEITE, 2002; MACEDO, FERREIRA, 2002), contra diarreias e no tratamento de hemorróidas; as folhas possuem ação anti-séptica, indicadas no tratamento de úlceras da pele; as raízes, quando maceradas, e sob forma de infusão, podem ser usadas no tratamento de reumatismo (LORENZI, 1992). Análises do extrato das cascas de *A. fraxinifolium* mostraram substâncias de atividade antioxidante, gastroprotetora e cicatrizante (MARTINS, 2013).

A produção de madeira corresponde a uma opção de melhor utilização das áreas menos propícias ao cultivo de gêneros alimentícios na propriedade rural e alternativa de renda ao produtor, possibilitando ainda a conservação *in situ* de recursos genéticos. Nesse contexto, dentre as opções sustentáveis para áreas desmatadas e áreas degradadas pelas atividades agropecuárias, está a silvicultura com espécies florestais nativas, podendo estas serem racionalmente exploradas mediante a fiscalização dos órgãos governamentais competentes. *A. fraxinifolium* também é descrita como opção para o paisagismo e arborização urbana por seu porte médio e beleza da copa (FEITOSA et al., 2011; LORENZI, 1998), e indicada como opção para o reflorestamento e manejo de áreas degradadas, uma vez que se encontra naturalmente elevado número de indivíduos nesses ambientes e grande potencial para regeneração (MISSIO et al., 2002; CALGARO et al., 2015).

A ampla distribuição geográfica do *A. fraxinifolium*, sua adaptabilidade às condições de estresse hídrico e sobretudo, a qualidade da sua madeira e potencial medicinal não impediram que a espécie fosse explorada indiscriminadamente, estando ameaçada de extinção segundo a Portaria do IBAMA nº 37- N, de 3 de abril de 1992 (IBAMA, 1992). Trata-se de uma das espécies prioritárias para conservação de recursos genéticos no Brasil, segundo a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LEITE, 2002). Ademais, inexistem projetos de reflorestamento que explorem silviculturalmente a espécie. Diante deste cenário, o avanço da silvicultura com espécies nativas traz uma possibilidade de contornar esta situação, uma vez que a implantação de plantios florestais nativos colabora substancialmente para a preservação e conservação das espécies de interesse.

Os estudos com espécies florestais nativas deverão crescer acentuadamente, principalmente com a assinatura pelo Brasil do Acordo de Paris, na 21ª Conferência das Partes (COP21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC), no qual assume restaurar e reflorestar 12 milhões de hectares de florestas. Este interesse será alavancado pelo financiamento climático, pois o Acordo de Paris determina que os países desenvolvidos deverão investir 100 bilhões de dólares por ano em medidas de combate à mudança do clima e adaptação, em países em desenvolvimento. Nesse âmbito, a silvicultura com espécies florestais nativas terá um importante agente propulsor, haja vista que diversos organismos e entidades públicas e privadas já têm se articulado para avaliar a aplicabilidade de empreendimentos florestais com espécies nativas.

### 3.2) Resgate vegetativo de árvores adultas de espécies florestais

As nomenclaturas “propagação vegetativa” e “resgate vegetativo” são próximas na literatura, pois os dois termos são empregados para referenciar a produção de mudas a partir de genótipos de interesse, seja para fins paisagísticos, comerciais ou conservacionistas. No entanto, alguns autores consideram que as técnicas para induzir a brotação nas plantas configuram o resgate do material no campo e, posteriormente, o enraizamento dos propágulos se daria a partir da aplicação de técnicas de propagação vegetativa (ENGEL, 2017; NAVROSKI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017; PEREIRA et al., 2015). Neste estudo, o termo “resgate vegetativo” é usado para designar o processo de obtenção de propágulos juvenis a partir de material adulto coletado a campo.

Simão, Nakamura e Takaki (2007) indicam que alguns fatores restringem a propagação sexuada de espécies nativas, como a dificuldade na definição da época de colheita das sementes e maturidade ideal para uma germinação uniforme. Por tanto, na produção comercial de mudas, a propagação vegetativa é, por vezes, mais importante que a propagação sexuada, pois, normalmente, é mais rápida que a propagação por semente, o período improdutivo é mais curto quando visa a produção de sementes e frutos, permitindo a exploração da redução da fase juvenil cuja duração é de dois ou mais anos, e ainda promove uma padronização das características das plantas-matrizes previamente selecionadas (FACHINELLO, HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

A literatura reporta viabilidade do uso da micropropagação para o resgate vegetativo para espécies florestais, tais como *Eucalyptus benthamii* (BACCARIN et al, 2015), *E. cloeziana* (OLIVEIRA et al., 2015), *Pinus sylvestris* (DIEGO et al., 2010), *Azadirachta indica* (ARORA et al., 2010). Para mais, a técnica de micropropagação, por sua vez, tem possibilitado o estabelecimento de protocolos para propagação de espécies nativas ameaçadas (OLIVEIRA et al. 2013; INDACOCHEA et al. 2018). Também tem proporcionado a propagação clonal e aumento da produtividade dos plantios de eucalipto nos locais onde a produção em escala comercial (por miniestacas) é limitada pelo ambiente, uma vez que as espécies adaptadas a locais mais secos ou frios geralmente apresentam dificuldade de serem propagadas pelos métodos tradicionais de clonagem, como pela estaquia e miniestquia (TRUEMAN et al. 2018)

A expansão da silvicultura com espécies florestais nativas, além contribuir para o aumento da oferta de madeira de qualidade e de valor econômico elevado, tornando a atividade viável economicamente e com boas perspectivas de retorno ao produtor, terá também impacto na sua preservação e conservação, especialmente para aquelas de ocorrência natural na região norte de Minas Gerais. Os municípios dessa região estão dentre os campeões de desmatamento da Mata

Atlântica no estado (SOS Mata Atlântica e INPE, 2019). Em relação ao bioma Cerrado, em uma década, o desmatamento anual reduziu em 76% no estado de Minas Gerais (MMA e MCTI, 2014). Entretanto, a situação desse bioma é crítica em grande parte da região onde já se constata avançado processo de desertificação das terras. Por sua vez, a Caatinga está localizada no norte do estado de Minas Gerais, é caracterizada por uma vegetação adaptada ao déficit hídrico (BRANDÃO, 1994; FERNANDES, 2002), mas, esse bioma vem sofrendo intensa exploração dos recursos naturais, principalmente para dar lugar à prática da agropecuária e à extração de madeira para produção de carvão vegetal (SANTOS et al. 2011). Além disso, o processo de fragmentação afeta a organização das populações de espécies nativas e potencializa o risco de perda de importantes materiais genéticos com reconhecida aplicabilidade para exploração sustentável.

A viabilidade econômica dos projetos de reflorestamentos corresponde a um dos principais entraves para a concretização de ações dessa natureza com espécies nativas. Os conhecimentos sobre a produção de madeira tropical são ainda muito limitados, o que fomenta a percepção por parte dos proprietários rurais de que plantações florestais de espécies nativas sejam atividades de risco, uma vez que definem investimento de longo prazo (GAREN et al., 2009; LAMB; ERSKINE; PARROTTA, 2005; PLATH et al., 2011) Ademais, a carência de conhecimentos técnico-científicos sobre a propagação vegetativa das espécies florestais nativas quer seja primeiro uma alternativa à escassez de sementes em quantidade suficiente no mercado, e que também permita o avanço dos programas de melhoramento, pela clonagem dos materiais genéticos selecionados, constitui um entrave significativo para a implementação em larga escala de áreas reflorestadas (STUEPP et al., 2018). Nesse aspecto inclui-se a região norte de Minas Gerais, na qual apesar da riqueza de espécies florestais dos biomas que a compõem, ela é pouco estudada.

A utilização de espécies nativas na silvicultura pode ser dividida de acordo com seus objetivos, de maneira genérica, para fins comerciais (produtos madeireiros e não madeireiros) e para fins ambientais (restauração de ecossistemas florestais). No caso específico da silvicultura clonal, alguns aspectos devem ser ponderados para que sua utilização para fins ambientais não seja incoerente (CARPANEZZI; CARPANEZZI, 2006), principalmente a garantia de manutenção de uma variabilidade genética adequada nos plantios clonais.

Na seleção dos genótipos na idade adulta há um acentuado decréscimo na capacidade de propagação dos materiais genéticos, principalmente da resposta dos propágulos ao enraizamento, haja visto que a transição juvenil-adulta é acompanhada de várias modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas espécies florestais, refletindo diretamente sobre a capacidade de clonagem dos materiais genéticos selecionados (GIRI, et al. 2004; WENDLING e XAVIER, 2001). Muitos fatores influenciam no sucesso da utilização dos métodos de propagação vegetativa,



dentre estes, destaca-se a qualidade da planta fornecedora do material vegetal. Poucas espécies são facilmente propagadas utilizando propágulos maduros, principalmente tratando-se de espécies lenhosas. Essa dificuldade está diretamente ligada ao processo de maturação, sendo necessário rejuvenescer as matrizes antes de iniciar qualquer trabalho de propagação (ALFENAS et al. 2009; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; XAVIER et al., 2013). Possivelmente, este fato esteja relacionado com a avançada idade ontogenética da planta, com o aumento no teor de inibidores e com a diminuição de cofatores correlacionados à atividade celular, à medida que aumenta a idade da planta (FACHINELLO et al., 2005).

As matrizes selecionadas e multiplicadas assexuadamente constituem os clones, e o processo de multiplicação se inicia com o resgate do material superior. Para tanto, o primeiro passo após a seleção da matriz é a promoção de seu rejuvenescimento e/ou revigoramento, por meio da indução de brotações juvenis, que são fisiologicamente mais aptas ao enraizamento e têm maior vigor de crescimento. A indução de brotações basais, por meio do corte raso da planta matriz é apontada como a forma mais eficiente de rejuvenescimento e revigoramento de árvores adultas (WENDLING et al., 2014) como em *Eucalyptus cloeziana* (Almeida et al. 2007), *Vochysia bifalcata* (Rickli et al. 2015), *Calophyllum brasiliense* (Kratz et al. 2016) e *Ilex paraguariensis* (Stuepp et al. 2015), mas não é uma opção para o *A. fraxinifolium*, por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção (CNCFLora, 2012). Então, busca-se o uso de técnicas que não prejudiquem a sobrevivência da árvore e que possam rejuvenescer o material a ser propagado, como por exemplo, a técnica de ramos destacados.

Na micropropagação, a utilização de explantes com características juvenis têm relevante importância para o seu sucesso, em razão do menor grau de diferenciação dos tecidos vegetais que são mais responsivos às técnicas de cultivo *in vitro* (XAVIER et al., 2013). Desse modo, para a escolha da fonte de explantes, um dos principais pré-requisitos considerados encontra-se na coleta de propágulos de partes da planta com características juvenis. Portanto, a proposta do projeto de pesquisa que busca o estabelecimento *in vitro* dos propágulos visando, futuramente, o estudo do uso da técnica de micropropagação como alternativa para o resgate vegetativo de árvores adultas das espécies florestais e, conseqüentemente, para a conservação *in vitro*, apresenta-se como ponto chave para dar suporte a programas de melhoramento florestal e contornar problemas relacionados à produção insuficiente de sementes, o que limita a produção de mudas.

Xavier et al. (2013) abordaram o tema e esclareceram que a indução de brotações é uma forma de se obter o revigoramento dos propágulos vegetativos, o que segundo os autores proporciona aumento no vigor fisiológico das brotações, de modo a serem mais responsivas ao enraizamento adventício durante a propagação clonal. A maturação em espécies florestais traz

consigo várias alterações nas características de crescimento, morfologia foliar, além de alterações fisiológicas e bioquímicas (WENDLING et al., 2014), sobretudo na transição da fase juvenil para adulta, interferindo na capacidade de enraizamento adventício (FERREIRA et al., 2010).

### 3.3) Brotações Epicórmicas

O resgate vegetativo por meio da indução de brotações epicórmicas é um método utilizado no resgate de plantas adultas por meio de injúrias mecânicas às raízes, poda drástica ou aplicação de reguladores vegetais (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Essa técnica tem apresentado resultados satisfatórios na produção de estacas, com maior potencial de enraizamento adventício, em espécies como *Ilex paraguariensis* (BITENCOURT et al. 2009; STUEPP et al.2017), *Vochysia bifalcata* (RICKLI et al.2015) e em *Eucalyptus* spp. (ALMEIDA et al. 2007; BACCARIN et al. 2015).

Desde a década de 70, o uso de brotações epicórmicas vem sendo estudado como alternativa potencial para o resgate de material adulto (SOUZA JÚNIOR, WENDLING E ROSA, 2003). Essa técnica tem apresentado boa eficácia na indução de brotações epicórmicas em espécies arbóreas, sendo importante para a obtenção de propágulos viáveis na multiplicação clonal (ALMEIDA et al. 2007; BACCARIN et al. 2015; STUEPP et al. 2018).

O uso de brotações epicórmicas é uma alternativa potencial, por meio da realização de podas ou coleta de galhos mantidos em condições ambientais adequadas para a emissão das brotações que, ao atingirem tamanho adequado, são estaqueadas ou, enxertadas para a formação de mudas (XAVIER; SANTOS, 2002; ROSA et al., 2003; XAVIER; SILVA, 2010). A eficiência do método é dependente da espécie, do genótipo, da época do ano, das condições ambientais e fisiológicas da planta, assim como da intensidade e da praticidade do anelamento realizado (XAVIER, et al., 2013).

O balanço auxina/citocinina determina a formação de raízes ou brotações nos vegetais (HARTMANN et al., 2011), de modo que a maior quantidade de auxina estimula a formação de raízes enquanto maior quantidade de citocinina estimula a emissão de brotações (TAIZ; ZEIGER, 2009). O processo de indução de brotações epicórmicas está relacionado com as concentrações de hormônios vegetais na planta no qual, aparentemente, as auxinas estão envolvidas no plagiotropismo (MUDAY, 2001), juntamente com outros hormônios vegetais como giberelinas, citocininas e ácido abscísico (COX et al., 2004). É um método pouco utilizado em relação a outros (decepa ou anelamento do caule), porém, tem como vantagem, menos danos à planta matriz, garantindo a manutenção e sobrevivência da árvore adulta (WENDLING et al. 2013; STUEPP et

al. 2018). O principal fator limitante da técnica é o enraizamento de estacas provenientes das brotações dos ramos.

O uso de estacas oriundas de brotações de galhos destacados de *Paulownia fortunei* apresentou melhor taxa de enraizamento em comparação com propágulos provenientes de brotações de decepta (STUEPP et al., 2014). A técnica não se mostrou apropriada para *Araucaria angustifolia* (WENDLING et al., 2009). Para *Eucalyptus cloeziana*, Almeida et al. (2007) obtiveram êxito na emissão de brotações epicórmicas para fornecimento de estacas, porém, constataram que a aptidão delas ao enraizamento adventício não é tão eficiente quando comparado a outras técnicas, devido a ação determinante da idade ontogenética. Baccarin et al. (2015) recomendam a técnica de galhos destacados para o resgate vegetativo de árvores adultas de *Eucalyptus benthamii*. Todavia, o sucesso no enraizamento adventício das estacas formadas a partir dessas brotações tem apresentado resultados variáveis (WENDLING et al. 2009). Para as espécies do gênero *Eucalyptus*, a técnica de resgate vegetativo já está bem estabelecida, utilizando-se a decepta de árvores para a obtenção de brotações juvenis para a propagação por estaquia (ALMEIDA et al.; 2007; XAVIER; SILVA, 2010). Para as espécies nativas ainda faz-se necessário o aprofundamento de pesquisas nessa área.

### 3.4) Ontogenia das brotações epicórmicas

As brotações epicórmicas são brotações juvenis originadas a partir de gemas axilares latentes, denominadas gemas epicórmicas, com a finalidade de recompor a copa da planta (SEITZ, 1996). O resgate vegetativo de propágulos de árvores na impossibilidade de ser realizado pela decepta da árvore, como, por exemplo, anelamento ou mesmo semi-anelamento do tronco tem a indução de brotações epicórmicas em galhos podados da base da copa (ALFENAS et al., 2009). A indução de brotações epicórmicas em galhos podados corresponde à técnica de mais simples aplicação e menor custo de realização. Houve sucesso no uso dessa técnica de resgate vegetativo para a micropropagação de materiais adultos de *Ocotea odorífera* (JANKOWSKI; GRAÇA, 1993), *Ilex paraguariensis* (WENDLING; SOUZA JUNIOR et al., 2003), *E. cloeziana* (ALMEIDA et al., 2007), *Arbutus unedo* (GOMES; CANHOTO, 2009), *Cupressus lusitanica* (KRATZ et al., 2010), *E. benthamii* (BACCARIN, 2012).

De maneira geral, estudos ainda são escassos para a compreensão do desenvolvimento das brotações epicórmicas em espécies florestais nativas. A elucidação de questões sobre a formação das brotações epicórmicas contribuirão para a maior aplicação prática dessa técnica de resgate. A melhor compreensão do processo de ontogenia de brotações epicórmicas em

galhos podados de árvores adultas de *A. fraxinifolium* pode auxiliar no aperfeiçoamento do resgate vegetativo e conservação *in vitro* de genótipos de interesse, possibilitando a viabilidade da exploração dos mesmos em futuros programas de melhoramento.

As espécies apresentam amplas diferenças anatômicas e morfológicas do meristema e tecidos relacionados dos quais se desenvolvem as brotações epicórmicas (BURROWS et al., 2008). Decombeix; Taylor e Taylor (2010), analisando brotações epicórmicas de gimnospermas, observaram que as brotações são constituídas exclusivamente por células parenquimáticas. Há divisões nas células do câmbio vascular, originando as brotações epicórmicas. Meier et al. (2012) descreveram que a presença de grupos de células meristemáticas na casca das árvores são responsáveis pela produção contínua, porém, efêmera de brotações epicórmicas nas espécies da família Myrtaceae, correspondendo ao evento de formação de brotações epicórmicas em galhos de *Eucalyptus* spp.. As células meristemáticas conferem às árvores a capacidade de produzir gemas continuamente, por um longo período de tempo (CREMER, 1972; BURROWS, 2002), podendo persistir por toda a vida das mesmas (MEIER et al., 2012).

Os centros meristemáticos são formados de uma matriz de células, principalmente, parenquimáticas, muitas com compostos fenólicos, nas quais foram inseridas radialmente células consideradas meristemáticas, por serem pequenas, isodiamétricas, organizadas, de paredes finas, com núcleos grandes e citoplasma denso (WATERS et al., 2010). Todavia, os estudos a respeito das brotações epicórmicas ainda são escassos, quando comparados àqueles para brotações apicais ou axilares.

### **3.5) Estabelecimento *in vitro* de explantes**

A propagação *in vitro* é constituída de fases que incluem desde a seleção dos explantes para a introdução *in vitro* até a aclimatização *ex vitro* das mudas. Todavia, diversos fatores influenciam as diferentes etapas da micropropagação, desde a seleção da planta matriz, estabelecimento do explante *in vitro*, multiplicação de brotações, alongamento e enraizamento, até a aclimatização, e além disso, os materiais genéticos apresentam especificidades quanto ao cultivo *in vitro* (BORGES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), exigindo a adequação de metodologias para os genótipos estudados, de forma a realizar com sucesso o cultivo *in vitro*.

A primeira fase de um protocolo de micropropagação a partir de brotações epicórmicas, como explantes é a seleção do material de onde serão retirados os explantes, levando em

consideração critérios como: taxa de crescimento e conservação das características da espécie (ROCHA, 2005).

A resposta *in vitro* é dependente do vigor fisiológico do material vegetal. Este vigor altera-se ao longo das estações do ano, e também com a idade da planta matriz. O efeito das estações do ano no estabelecimento *in vitro* foi reportado para *Eucalyptus tereticornis* (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000), *Tectona grandis* (TIWARI et al., 2002), *Eucalyptus globulus* spp. *maidenii* (SOTELO; MONZA, 2007). O estabelecimento *in vitro* é considerado uma das fases mais críticas, principalmente quando se trata de material adulto de espécies lenhosas, em razão das dificuldades de respostas dos propágulos e da descontaminação dos explantes (XAVIER et al., 2009). Dessa forma, o uso de explantes retirados da parte apical do indivíduo é recomendado em situações em que a contaminação endógena dos tecidos é muito alta, pois esses explantes apresentam menores taxas de contaminação por serem partes mais jovens e distantes da área já contaminada (BORGES et al., 2012). Por sua vez, para o resgate de genótipos adultos no campo, brotações epicórmicas têm sido utilizadas como explantes.

A desinfestação é uma etapa problemática, pois o desinfestante deve eliminar ou reduzir os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. Alguns microrganismos podem ser endógenos ou estarem latentes tanto em sementes como em brotações. Por essa razão, muitas vezes a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos é difícil. Porém, se apenas os meristemas forem retirados, esses geralmente estão livres de microrganismos (BONGA e DURZAN, 1985). De acordo com ROCHA (2005) a desinfestação do material juvenil geralmente não é difícil; entretanto, também são utilizados explantes de material adulto ou de plantas mantidas em campo, tornando difícil a desinfestação do material juvenil proveniente dessa condição, devido a elevada contaminação preexistente. A desinfestação de explantes coletados no campo é mais complicada, pois as percentagens de contaminação são frequentemente altas, quando comparadas com as de explantes juvenis ou retirados de mudas mantidas em casa de vegetação. A contaminação pode ser reduzida por pulverizações com inseticidas e fungicidas, envolvendo as brotações das plantas em sacos plásticos ou mantendo-os em casa de vegetação (HARTMANN et al., 2012).

Os desinfetantes mais comumente utilizados são o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio. O hipoclorito em pH 8,0 perde a sua eficiência e pode prejudicar o tecido vegetal provocando sua oxidação, porém em pH próximo de 6,0 é mais efetivo (BONGA e DURZAN, 1985). Geralmente, um surfactante como Tween<sup>®</sup>, ou um detergente, é adicionado à solução de hipoclorito para facilitar a sua ação, aumentando o contato da solução com os tecidos (TORRES et al., 1998). Porém, a adição deste pode, além de diminuir a contaminação, aumentar a toxicidade do hipoclorito para o tecido vegetal (ROCHA, 2005). Geralmente, no início da desinfestação, é

utilizado etanol a 70% durante alguns segundos, para quebrar a tensão superficial, aumentando assim o contato do desinfestante com o material vegetal e aumentar sua ação. Depois, o explante é mergulhado em hipoclorito de sódio em uma concentração que varia de 1 a 2% durante 10 a 30 minutos, com gotas de Tween<sup>®</sup> 20 ou 80, e em seguida são realizados enxágües em água estéril (ROCHA, 2005).

Brotações de plântulas de goiabeira (*Psidium guajava*) foram desinfestados em etanol 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos. O resultado foi 70% de explantes desinfestados e baixa necrose (KHATTAK *et al.*, 1990, citado por ROCHA, 2005). Explantes da mesma espécie, com 2 anos de idade, mantidos em casa de vegetação, produziram brotos e esses foram desinfestados com 70% de etanol por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e enxágüe com água destilada e esterilizada (ALI e LÜDDERS, 2001).

Galhos podados de *Azadirachta excelsa*, com idade de 5 meses, foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 1,35% acrescido de Tween<sup>®</sup>-20 (2 gotas) por 25 minutos. Em seguida, as gemas axilares foram retiradas e desinfestadas novamente em 1,05% (v/v) de hipoclorito por 15 minutos (LIEW e TEO, 1998). ALMEIDA *et al.* (2008) avaliaram a desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* por meio de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) e observaram que os explantes submetidos às concentrações de 1,5% e 2,0% de NaClO responderam melhor ao estabelecimento *in vitro*, com menor porcentagem de contaminação.

A oxidação fenólica, a contaminação por fungos e bactérias e a recalcitrância de alguns materiais genéticos têm sido os principais problemas encontrados no estabelecimento *in vitro* (GEORGE, 2008). Os tratamentos aplicados à planta matriz, doadora dos explantes relacionados às melhorias nas suas condições fisiológicas e fitossanitárias, bem como na otimização no uso das substâncias desinfestantes e nas condições ambientais de cultivo *in vitro* são determinantes para reduzir perdas no estabelecimento *in vitro* de espécies florestais nativas como *A. fraxinifolium* e obter sucesso nas demais fases da micropropagação (XAVIER *et al.*, 2009).

### 3.6) Referências

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. 500 p.
- ALLEM, A. C. **Estudo da biologia reprodutiva de duas espécies florestais (aroeira e gonçalo-alves) da região do cerrado**. Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1991. p. 1-5.
- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.
- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2.ed. rev. e atual. Viçosa: UFV, 2006. 438p.
- AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; PASSOS, F. B. **Módulos para recuperação de Cerrado com espécies nativas de uso múltiplo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.
- ARORA, K.; SHARMA, M.; SHARMA, A. K. Control of pattern of regenerant differentiation and plantlet production from leaflet segments of *Azadirachta indica* Juss. (neem). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 371–378, 2009.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. **Enraizamento de plantas lenhosas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, p.261-296, 1998.
- BACCARIN, F. J. B.; BRONDANI, G. E.; ALMEIDA, L. V.; VIEIRA, I. G.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 4, p.465–483, 2015.
- BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H.S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.277-281, 2009.
- BITENCOURT, J. de. **Otimização do enraizamento de estacas de plantas adultas de erva-mate**. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná: Curitiba, 2009.
- BRANDÃO, M. Área Mineira do Polígono das Secas/Cobertura vegetal. **Informe Agropecuário**, v.17, n.181, p.5-9, 1994.
- BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 528 p., 2002.
- CALGARO, H. F.; BUZETTI, S.; SILVA, L.R.; STEFANINI, L.; MIRANDA, L.P.M.; MORAES, M.A.; MORAES, M.L.T. Distribuição natural de espécies arbóreas em áreas com diferentes níveis de antropização e relação com os atributos químicos do solo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.39, n.2, p.233-243, 2015.
- CARPANEZZI, A. A.; CARPANEZZI, O. T. B. **Espécies nativas recomendadas para recuperação ambiental no Estado do Paraná, em solos não degradados**. Colombo: Embrapa Florestas, 52 p. (Embrapa Florestas. Documentos 136), 2006.

CARRODUS, B.B.; BLAKE, T.J. Studies on the lignotubers of *Eucalyptus obliqua* L'Herit. I. The nature of the lignotuber. **New Phytology**, v.69, n.4, p. 1069- 72, 1970.

COX, M. C. H.; BENSCHOP, J. J.; VREEBURG, R. A. M.; WAGEMAKERS, C. A. M.; MORITZ, T.; PEETERS, A. J. M.; VOESENEK, L. A. C. J. The roles of ethylene, auxin, abscisic acid, and gibberellin in the hyponastic growth of submerged *Rumex palustris* petioles. **Plant Physiology**, n. 136, p. 2948-2960, 2004.

DECOMBEIX, A.L; TAYLOR, E.L.; TAYLOR, T.N. Eepicormic shoots in a permian gymnosperm from Antarctica. **International Journal of Plant Sciences**, n. 171, p.772-782, 2010.

DE DIEGO, N.; MONTALBÁN, I. A.; FERNANDEZ, L. E.; MONCALEÁN, P. In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. **Canadian Journal of Forest Research**, v.38, n. 10, p. 2607–2615, 2008.

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

ENGEL, M. L. **Resgate e propagação vegetativa por estaquia e mini estaquia de *Acacia mearnsii* De Wildeman (ACACIA NEGRA)**. Curitiba: UFPR, 2017. 130p.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1995. 179 p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2005. 221 p.

FEITOSA, D.G.; MALTONI, K.L.; CASSIOLATO, A.M.R.; PAIANO, M.O. Crescimento de mudas de Gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n.3, p. 401-411, 2011.

FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J. F.; FAGG, C. W.; MACHADO, J. W. B. **Cerrado: manual para recuperação de Matas de Galeria**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2000.

FERNANDES, A. Biodiversidade da caatinga. In: ARAJO, E.L. et al. (Ed.). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da florado Brasil**. Recife: UFRPE e SBB, p.42-43, 2002.

FERREIRA, B. G. A. et al. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax com o uso de ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, p. 19-31, 2010.

FERRI, C. P. Enraizamento de estacas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 19, n. 1, p. 113-121, 1997.

FRANZON, R. C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J. C. S. **Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 56p.

GAREN, E.J.; SALTONSTALL, K.; SLUSSES, J.L.; MATHIAS, S.; ASHTON, M.S.; HALL, J.S. An evaluation of farmer's experiences planting native trees in rural Panama: implications for reforestation with native species in agricultural landscapes. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 219-236, 2009.



GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, Berlin, v. 18, p. 115-135, 2004.

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

HARTMANN, H.T.; KERSTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: principles and practices**. 8. ed. Boston: Prentice Hall, 2011, 915p.

IBAMA - **Portaria N° 37-N, 3 de abril de 1992**. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/legislacao/federal/portarias/1992\\_Port\\_IBAMA\\_37.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/legislacao/federal/portarias/1992_Port_IBAMA_37.pdf)

IBÁ. **Relatório IBÁ 2017**. Industria Brasileira de Árvores. 2017. Disponível em: [iba.org.br](http://iba.org.br).

INDACOCHEA, B.; PARRALES, J.; HERNÁNDEZ, A.; CASTRO, C.; VERA, M.; ZHINDÓN, A.; GABRIEL, J. Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. **Agronomía Costarricense**, 42: 63-89, 2018.

JANICK. J. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: USAID, 1966. 485p.

KRATZ, D.; WENDLING, I.; STUEPP, C.A.; KALIL FILHO, A.N. Epicormic shoots induction and rooting cuttings of *Calophyllum brasiliense*. **Cerne**, 22: 365-372, 2016.

LAMB, D.; ERSKINE, P.D.; PARROTTA, J.A. Restoration of Degraded Tropical Forest Landscapes. **Science**, Washington, v. 310, n. 5754, p.1628-1632, 2005.

LEITE, E. J. **State of knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil**. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, v. 5, n. 1, p. 63-77, 2002.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 368p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1. 368p.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 40-44, 2004.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. R. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**. 27(4):787-796, 2004.

MARTINS, A.O.B.P.B. **Identificação do perfil químico e avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex. Spreng.** 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional do Cariri, Crato, 2013.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade do Cerrado e do Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação.** Brasília:MMA, 2007. 540 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **PPCerrado - Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado.** Brasília:MMA, 2014. 132 p.

MISSIO, R.F.; LINS, V. S.; BALERONI, C.R.S.; ANTON, C. S.; SILVA, A.M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M.L.T. Ocorrência de *Astronium fraxinifolium* em associação com outras espécies na ocupação de áreas degradadas em Selvíria-MS. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE ÁREAS DEGRADADAS: água e biodiversidade -trabalhos voluntários, 5, 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa : Folha de Viçosa, 2002. p. 425-427.

MUDAY, G. K. Auxins and tropisms. **Journal of Plant Growth Regulation**, n. 20, p. 226-243, 2001.

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

NAVROSKI, M. C. et al. Resgate e propagação vegetativa de *Sequoia sempervirens*. **Floresta**, v. 45, n. 2, p. 383-392, 2015.

OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, B.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 33: 439-453, 2013.

OLIVEIRA, L.S.; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees, **Australian Forestry**, v.78, n.4, p.219-231, 2015.

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

PAIVA, H.N.; GOMES, J.M. **Propagação vegetativa de espécies florestais.** Viçosa: Imprensa Universitária UFV, 1993. 40 p.

PEREIRA, M. O. et al. Resgate vegetativo e propagação de Cedro australiano por estaquia. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 50, n. 4, p. 282-289, 2015.

PLATH, M.; MODY, K.; POTVIN, C.; DORN, S. Establishment of native tropical timber trees in monoculture and mixed-species plantations: small-scale effects on tree performance and insect herbivore. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 261, n. 3, p. 741-750, 2011.

REYS, P.; GALETTI, M.; MORELLATO, P. C. L.; SABINO, J. Fenologia reprodutiva e disponibilidade de frutos de espécies arbóreas em mata ciliar no rio Formoso, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropical**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 309-318, 2005.

RICKLI, H. C.; BONA, C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Origem de brotações epicórmicas e aplicação de ácido indolilbutírico no enraizamento de estacas de *Vochysia bifalcata* Warm. **Ciência Florestal**, v.25, n.2.p.385-393, 2015.

ROSA, L. S.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Brotações epicórmicas no resgate vegetativo de árvores selecionadas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: Congresso Sulamericano Da Erva-Mate, 3., 2003, Chapecó. Anais. **Chapecó: EPAGRI**, 2003.

SANTOS, R.M.; BARBOSA, A.C.M.C; ALMEIDA, H.S.; VIEIRA, F.A.; SANTOS, P.F.; CARVALHO, D.A; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Structure and floristics of a remnant of arboreous Caatinga in Juvenília, northern Minas Gerais, Brazil. **CERNE**, Lavras, v.17, n.2, p. 247-258, 2011.

SEITZ, R. A. **Manual de Poda de Espécies Arbóreas Florestais**. Disponível em: <[http://www.ipef.br/publicacoes/curso\\_arborizacao\\_urbana/cap08.pdf](http://www.ipef.br/publicacoes/curso_arborizacao_urbana/cap08.pdf)>. Acesso em: 29 Ago 2019.

SOUZA JÚNIOR, L.; WENDLING, I.; ROSA, L.S. da. Brotações epicórmicas no resgate vegetativo de indivíduos adultos de *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL DORIO GRANDE DO SUL, 9., Nova Prata. **Anais...**Santa Maria: UFSM, p. 68-76. 2003.

STUEPP, C.A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H.S; BONA, C. Vegetative propagation of mature dragon trees through epicormic shoots. **Bosque**, 35: p. 337-345. 2014.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Indução de brotações epicórmicas por meio de anelamento e decepa em erva-mate. **Ciência Florestal**, v.26, n.3, p.1009-1022, 2016.

STUEPP, C.A.; WENDLING, I.; XAVIER, A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Vegetative propagation and application of clonal forestry in Brazilian native tree species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 53: 985-1002, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation: Technology and application**. Dordrecht: Kluwer, p. 311-336, 1991.

TRUEMAN, S.J.; HUNG, C.D.; WENDLING, I. Tissue Culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, 9: 1-45, 2018.

XAVIER A., SANTOS G. A. Clonagem em espécies florestais nativas. In: M.G.B. Rocha. **Melhoramento de espécies arbóreas nativas**. Belo Horizonte: Instituto Estadual de Florestas, 2002. 171p.

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

XAVIER, A.; DA SILVA, R. L. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Ed. UFV, Viçosa-MG, 2013.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Seropédia, v. 8, n. 1, p. 187-194, jan./dez. 2001.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; BIASSIO, A. de; DUTRA, L.F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v.35, p.117-125, 2013.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v.45, p.473-486, 2014.

ZUFFELLATO-RIBAS, K.C; RODRIGUES, J.D. **Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos**. Curitiba: [K. C. Zuffellato-Ribas]. 2001. 39 p.

## Resgate vegetativo e conservação *in vitro* de *Astronium fraxinifolium* Schott

### RESUMO

A propagação vegetativa representa uma ferramenta em potencial para a multiplicação de espécies florestais nativas de destacada importância silvicultural, como *A. fraxinifolium* que ainda se apresenta sem um efetivo programa de melhoramento e sob risco de extinção. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do diâmetro dos galhos podados, do sexo das árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium* e diferentes desinfestantes na indução de brotações epicórmicas, bem como investigar a ontogenia anatômica das mesmas. Ademais, avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio no estabelecimento *in vitro* das brotações. As matrizes foram selecionadas com base do diâmetro a altura do peito (DAP) do tronco, altura das árvores, fuste retilíneo, copa pouco densa e sem visível ataque de pragas e doenças. O desinfetante bactericida (Lysoform<sup>®</sup>) e o fungicida sistêmico (Derosal<sup>®</sup> 500) corresponderam aos tratamentos com maior número de brotações epicórmicas sendo este último o que proporcionou o menor nível de contaminação fúngica e bacteriana. Os galhos com circunferências de galhos superior a 10 cm apresentaram maior número de brotações epicórmicas, porém não houve diferença quanto ao sexo das árvores matrizes doadoras. As brotações epicórmicas originaram-se a partir de gemas axilares dormentes ou da regeneração de tecidos com menor grau de diferenciação celular. O estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas não teve êxito em razão da alta oxidação fenólica dos explantes. Portanto, o estudo demonstrou a viabilidade do uso da técnica de resgate vegetativo pela indução de brotações epicórmicas em galhos podados de árvores matrizes adultas, contudo havendo necessidade de controle da oxidação na introdução *in vitro*.

**Palavras-chave:** Brotações epicórmicas; Idade ontogenética; Espécie florestal nativa; Estabelecimento *in vitro*

## Vegetative rescue and *in vitro* conservation of *Astronium fraxinifolium* Schott

### ABSTRACT

The vegetative propagation represents a potential tool for the multiplication of native forest species of outstanding silvicultural importance, but without an effective breeding program and under risk of extinction, such as *A. fraxinifolium*. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of the diameter of pruned branches and the sex of adult trees of *A. fraxinifolium* on the induction of epicormic shoots, as well as to investigate their anatomic ontogeny. Furthermore, to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite in the *in vitro* establishment of shoots. The bactericidal disinfectant (Lysoform<sup>®</sup>) and the fungicide (Derosal<sup>®</sup> 500) corresponded to the treatments with the highest number of epicormic shoots, the latter being the one that provided the lowest level of fungal and bacterial contamination. The branches with circumferences greater than 10 cm had a greater number of epicormic shoots, but there was no difference regarding the sex of the adult trees. The epicormic shoots originated from dormant axillary buds or from tissue regeneration with a lower degree of cell differentiation. The *in vitro* establishment of epicormic shoots was not successful due to the high phenolic oxidation of the explants. Therefore, the study demonstrated the feasibility of using the vegetative rescue technique by inducing epicormic shoots in pruned branches of adult trees, however, there is a need to control oxidation in the *in vitro* culture.

**Keywords:** Epicormic shoots; Ontogenetic age; Phenolic oxidation; Micropropagation

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a silvicultura com espécies florestais nativas ainda é incipiente, especialmente em comparação à área ocupada com plantios de espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. O país apresenta aproximadamente 390 mil hectares plantados com outras espécies, dentre as quais nativas como a *Hevea brasiliensis* (seringueira) e o *Schizolobium parahyba* (paricá) (IBA, 2020). Entretanto, o plantio de outras espécies nativas brasileiras tem sido colocado em destaque, uma vez que com a assinatura pelo governo brasileiro do Acordo de Paris, na 21ª Conferência das Partes (COP21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC) assumiu-se a responsabilidade de restaurar e reflorestar 12 milhões de hectares de florestas. O financiamento climático permitirá a implementação dos empreendimentos florestais com espécies nativas. Nesse contexto, as espécies florestais de interesse serão aquelas cuja madeira e os seus produtos florestais não madeireiros sejam aplicáveis para diversos fins. E, dentre estas espécies está o *A. fraxinifolium*, principalmente pelas características tecnológicas de sua madeira, com ampla aplicabilidade de usos.

A implantação de projetos de reflorestamento com espécies florestais nativas somente será efetivo se acompanhado de um programa de melhoramento das mesmas. Atualmente, há limitação de disponibilidade de material genético para a propagação seminífera (semente) e os futuros plantios apresentaram larga variabilidade genética. Dessa forma, os programas de melhoramento florestal proporcionarão o desenvolvimento de materiais mais específicos tanto para uma maior adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, quanto para qualidades diversas da madeira. Nesse sentido, a clonagem é imprescindível para que os ganhos potenciais da seleção clonal sejam capturados e propagados vegetativamente por meio dos genótipos selecionados. A ausência de uma técnica eficiente de clonagem das espécies florestais limita a produção dos futuros plantios ou até mesmo inviabiliza a sua recomendação para plantio.

Nos programas de melhoramento florestal a seleção dos genótipos selecionados realiza-se na idade adulta, fase essa em que se observa um acentuado decréscimo na capacidade de propagação desses materiais genéticos. A transição da fase juvenil para a adulta é acompanhada de várias modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas espécies florestais, refletindo diretamente sobre a capacidade de clonagem dos materiais genéticos selecionados. Portanto, a escolha de propágulos com características juvenis é um dos principais pré-requisitos a serem considerados para obter sucesso na clonagem.

Os métodos empregados no resgate de brotações de árvores adultas são destrutivos, onerosos e sua aplicabilidade é limitada para várias espécies florestais nativas. Isso se deve às dificuldades de rebrota das matrizes, ou ainda, pela impossibilidade de corte das árvores em vista

de serem preservadas em razão do grande valor genético ou de estarem sob risco de extinção, como no caso de *A. fraxinifolium*, de serem exemplares raros, históricos, presentes em áreas de proteção e de produção e coleta de sementes. Neste contexto, o resgate por meio da coleta de galhos podados da copa da árvore e a posterior indução de brotações epicórmicas apresenta-se como uma alternativa promissora, uma vez que mantém a integridade da árvore matriz.

Os estudos referentes à indução de brotações epicórmicas em galhos ainda são escassos para a maioria das espécies nativas brasileiras, sendo relatadas apenas para *Araucaria angustifolia* (Wendling et al., 2009) e *Ilex paraguariensis* (Rosa et al., 2003, Wendling et al., 2013). Portanto, há grande carência de estudos relacionados aos fatores bióticos diretamente relacionados à indução das brotações em galhos podados, como o diâmetro dos mesmos. No caso particular, de espécies como *A. fraxinifolium* que são dióicas, a interferência do sexo da planta matriz nessa capacidade de indução de brotação ainda é uma incógnita. Acrescenta-se ainda a lacuna sobre a ontogenia das brotações epicórmicas induzidas nos galhos. A compreensão destas questões são pontos-chaves para o desenvolvimento da técnica e sua efetiva utilização no resgate vegetativo das espécies florestais.

As brotações epicórmicas por se tratarem de material juvenil aumentam o sucesso na propagação vegetativa das espécies. No entanto, a estaquia de *A. fraxinifolium* utilizando este tipo de propágulos não repercutiu em resultados satisfatórios. Dessa forma, a micropropagação apresenta-se como alternativa viável. Para tanto, a assepsia dos galhos podados das árvores matrizes é imprescindível para diminuir a contaminação fúngica e bacteriana das brotações e assim obter sucesso no posterior estabelecimento *in vitro*. A desinfestação é uma etapa problemática, pois o agente desinfestante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. Dentre os desinfetantes comumente utilizados, o principal que tem sido utilizado é o hipoclorito de sódio (NaOCl). A definição de concentrações ótimas dos agentes desinfestantes são determinantes para o sucesso do estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo: (1) definir um protocolo de desinfestação destes galhos, (2) avaliar a influência do diâmetro dos galhos podados e do sexo das árvores matrizes adultas na indução de brotações epicórmicas, (3) investigar a ontogenia anatômica das brotações e (4) determinar as concentrações ótimas de hipoclorito de sódio no estabelecimento *in vitro* de *A. fraxinifolium* por meio da micropropagação.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem, seleção de propágulos vegetativos

Árvores matrizes de *A. fraxinifolium* foram selecionadas em remanescentes de vegetação nativa na região norte de Minas Gerais, no município de Montes Claros, no campus do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG). A seleção das matrizes ocorreu com base na mensuração do diâmetro à altura do peito (DAP) do tronco e da altura das árvores. Além disso, foram selecionadas árvores com fuste retilíneo e livre de defeitos, com a copa com menor número de galhos e sem visível de ataque de pragas e doenças.

O resgate das árvores matrizes selecionadas no campo foi realizado conforme relatado por Almeida et al. (2007), pela retirada de galhos situados na posição mais baixa da copa, com o intuito de minimizar os efeitos da idade ontogenética. A metodologia foi aplicada entre março e setembro, com temperatura média de 23,6 °C.

Foi aplicado fungicida sistêmico do grupo químico Benzimidazol (IMPERADOR BR<sup>®</sup>) sete dias antes da retirada dos galhos. Os galhos foram retirados e seccionados utilizando uma moto poda costal.

### Experimento 1: Desinfestação dos galhos podados para indução das brotações epicórmicas

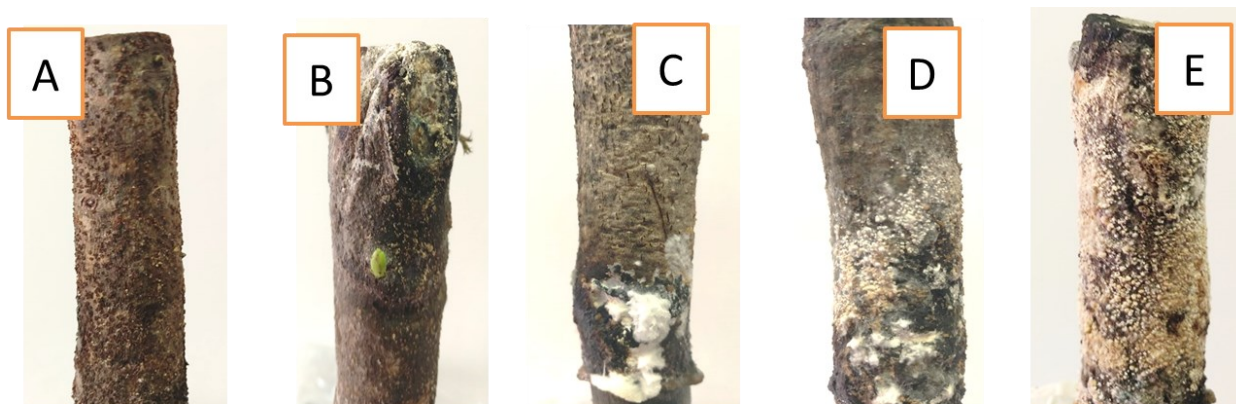
Os galhos podados das copas das árvores matrizes de *A. fraxinifolium* foram seccionados para a confecção de estacas, com aproximadamente 10 centímetros de comprimento. No processo de desinfestação das estacas, as mesmas foram imersas por 10 minutos em diferentes tipos de agentes químicos, que compuseram os seguintes tratamentos:

- T1 - hipoclorito de sódio (Santa Clara<sup>®</sup>, 50% v/v);
- T2 - desinfetante bactericida (Lysoform<sup>®</sup>, 100% v/v);
- T3 - fungicida sistêmico (Derosal<sup>®</sup> 500 SC, 1,5% v/v)
- T4 - testemunha.

Em seguida, as estacas foram lavadas em água corrente, por cerca de 30 segundos e dispostas verticalmente em bandejas com areia lavada autoclavada e acondicionadas dentro de sacos plásticos transparentes de 30 litros. Os galhos foram dispostos na posição vertical dentro de bandejas de polipropileno (A: 7 cm, L: 26 cm, C: 36,5 cm; 7 L). Nessa condição, o ambiente do interior das estufas apresentou umidade relativa do ar em torno de 80%, com a temperatura

oscilando entre 26 e 30 °C. O experimento foi conduzido no Laboratório de Melhoramento Florestal do Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias - ICA/UFMG.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com estacas por tratamento. No experimento foram avaliados o nível de contaminação (ausente; 1-25%; 26-50%; 51-75%; 76-100%) (Figura 1) e o número de brotações por estaca. As avaliações aconteceram semanalmente durante um período de 35 dias.



**FIGURA 1.** Níveis de contaminações fúngicas e bacterianas em estacas obtidas a partir de galhos podados de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium*. **A.** Classificação 1 - ausente; **B.** Classificação 2 - 1% - 25%; **C.** Classificação 3 - 26% - 50%; **D.** Classificação 4 - 51% - 75%; **E.** Classificação 5 - 76%-100%.

Os dados coletados foram analisados pelos testes de Hartley ( $P < 0,05$ ) e de Lilliefors ( $P < 0,05$ ) e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) ( $P < 0,05$ ) no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM). A ausência de significância da ANOVA repercutiu na análise dos dados por meio das médias e desvio padrão da média.

### **Experimento 2: Efeito do diâmetro dos galhos podados e do sexo das árvores matrizes adultas na indução de brotações epicórmicas**

Os galhos podados das copas das árvores matrizes de *A. fraxinifolium* foram divididos em três diferentes classes, conforme sua circunferência. Classe 1: circunferências até 8 cm. Classe 2: circunferências acima de 8 centímetros até 10 cm. Classe 3: circunferências acima de 10 centímetros. Estes mesmos galhos também foram separados conforme o sexo da árvore matriz.

A indução das brotações epicórmicas foi realizada em condições de estufa adaptada no Laboratório de Melhoramento Florestal. Previamente à sua disposição nestas estufas adaptadas, os galhos permaneceram em solução de fungicida sistêmico de contato dos grupos químicos Benzimidazol e Dimetilditiocarbama (DEROSAL PLUS®) por 10 minutos.

A avaliação do experimento foi realizada a cada 3 dias durante um período de 31 dias de permanência dos galhos na estufa adaptada. Para tanto, foi avaliado o número de brotações epicórmicas induzidas nos galhos podados das árvores matrizes de acordo com a classe de circunferência definida para os galhos e o sexo das árvores matrizes.

A avaliação histológica foi realizada nas brotações induzidas nas estacas podadas. Para tanto, cortes transversais das brotações foram feitos à mão livre. No corte transversal do material vegetal, a amostra foi mantida com firmeza entre um suporte (isopor) seccionado longitudinalmente. Por meio de uma lâmina de barbear, cortou-se a superfície superior do material. Os cortes delgados foram transferidos, por meio de um pincel fino, para um vidro de relógio contendo água destilada para análise sob lupa binocular.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, testando-se a resposta das brotações da espécie para 3 tratamentos (classes de diâmetro) e o sexo da planta matriz adulta (masculino e feminino) com 7 repetições compostas cada por 1 galho.

Os dados coletados foram analisados pelos testes de Hartley ( $P < 0,05$ ) e de Lilliefors ( $P < 0,05$ ) e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) ( $P < 0,05$ ) no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM). Os parâmetros dos modelos de regressão foram estimados pelos softwares TABLE CURVE 3D (Systat Software Inc., versão 3, Richmond – CA, USA). Na ausência de significância da ANOVA a análise dos dados foi realizada por meio das médias e desvio padrão da média.

### **Experimento 3: Estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas**

As brotações epicórmicas emitidas nos galhos podados de *A. fraxinifolium* foram utilizadas como explantes, sendo padronizados com  $\pm 3,0$  cm de comprimento.

Os explantes foram lavados em água corrente juntamente com duas gotas de detergente (Tween 20) por 10 minutos. Após esse tempo, em câmara de fluxo, imersos em álcool 70 % por 30 segundos, em seguida foram colocados em diferentes concentrações de NaOCl por 5 minutos. Ao término do tratamento foram lavados com água destilada autoclavada por cinco vezes e inoculados individualmente em tubo de ensaio contendo 5mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 5,0 g L<sup>-1</sup> de ágar.

As avaliações foram realizadas conforme os parâmetros: sobrevivência dos explantes, contaminação fúngica e bacteriana, e oxidação. Para contaminação e oxidação as avaliações foram feitas a partir da visualização de tecidos oxidados e presença de culturas bacterianas que surgiram

no início do estabelecimento in vitro dos explantes, principalmente na superfície do meio de cultura.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a  $26 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de  $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas-frias, por 30 dias.

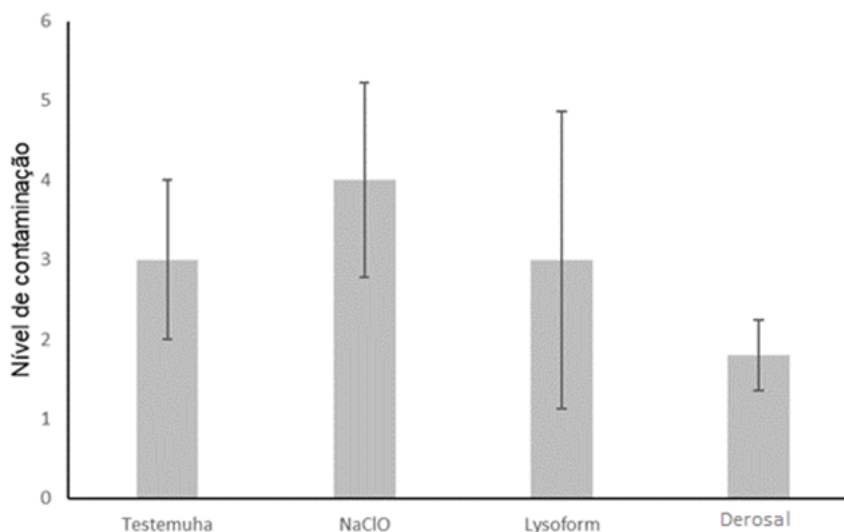
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos (5 doses de cloro ativo presente no hipoclorito de sódio, com concentração de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,5% v/v), com 15 repetições para cada tratamento, composta por 1 explante por tubo de ensaio.

Os dados coletados foram analisados pelos testes de Hartley ( $P < 0,05$ ) e de Lilliefors ( $P < 0,05$ ) e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) ( $P < 0,05$ ) no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM). Os dados foram analisados por meio das médias e desvio padrão da média em razão da ausência de significância da ANOVA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desinfestação dos galhos podados para indução das brotações epicórmicas

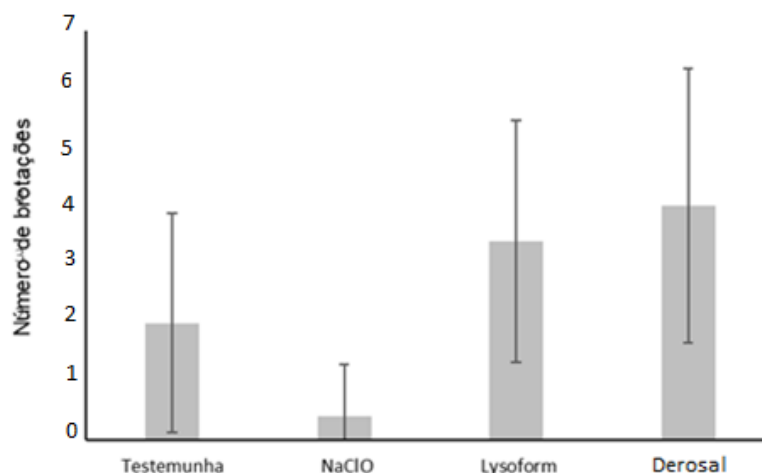
Os melhores resultados encontrados em relação ao controle da contaminação fúngica e bacteriana dos galhos podados das matrizes adultas de *A. fraxinofolium* foi para o tratamento com fungicida sistêmico (Derosal<sup>®</sup> 500). Este tratamento apresentou a menor média do nível de contaminação dentre todos os tratamentos, considerado como médio de acordo com a classificação adotada (Figura 2).



**FIGURA 2.** Nível médio de contaminação fúngica e bacteriana para diferentes tratamentos de desinfestação de galhos podados de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium*. Barras indicam o desvio padrão da média.

O efeito positivo do fungicida sistêmico (Derosal<sup>®</sup> 500) no controle da contaminação indica que o tratamento fitossanitário preventivo é importante no que diz respeito a redução da contaminação dos propágulos vegetativos. Isso assume maior relevância no presente estudo onde a indução das brotações epicórmicas ocorre em ambiente protegido (estufa adaptada) com alta umidade e temperatura que são propícias para o desenvolvimento de patógenos. Entretanto, maiores estudos podem ser conduzidos para otimizar este protocolo de desinfestação dos galhos podados. Da mesma forma, os demais desinfetantes podem ser melhor investigados pois a não adequação de um protocolo de desinfestação, não o invalida, desta forma torna-se necessário a utilização de diferentes concentrações e tempo de imersão (Grattapaglia e Machado, 1998)

Os tratamentos com o fungicida e o desinfetante bactericida apresentaram os maiores números de brotações epicórmicas induzidas nos galhos de *A. fraxinifolium* (Figura 3).



**FIGURA 3** Número médio de brotações epicórmicas para diferentes tratamentos de desinfestação de galhos podados de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium*. Barras indicam o desvio padrão da média.

### **Indução de brotações epicórmicas de acordo com diâmetro das estacas podadas e do sexo das árvores matrizes adultas**

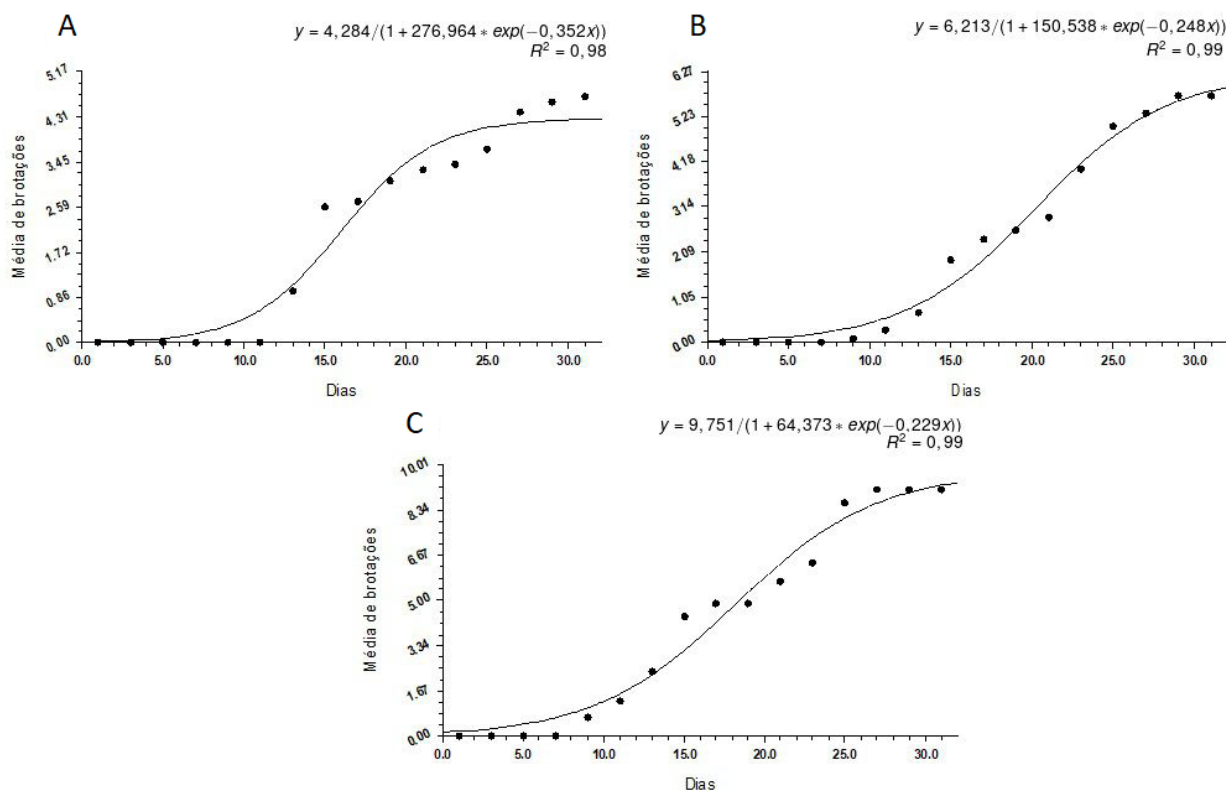
A indução de brotações epicórmicas nos galhos das matrizes de *A. fraxinifolium* variou de acordo com o diâmetro dos mesmos. Em todas as classes de diâmetro avaliadas verificou-se indução de brotações. Os resultados encontrados permitiram as melhores dimensões dos galhos podados para o resgate vegetativo de matrizes adultas de *A. fraxinifolium*, abrindo novas perspectivas para a clonagem de genótipos adultos. Além disso, comprovou-se a viabilidade desta técnica para o resgate de propágulos vegetativos de árvores que necessitam da manutenção da sua integridade.

O número de brotações epicórmicas induzidas nos galhos cresceu no decorrer dos dias de avaliação, principalmente para a classe de maior diâmetro, conforme sugerido por Kozłowski (1992) que apontam que maiores volumes de alburno apresentam maiores reserva de carboidratos para uma maior produção de número de brotações. O crescimento de brotações epicórmicas promove uma forte competição por carboidratos. (Pernice *et al.*, 2006). As primeiras brotações epicórmicas foram constatadas a partir do 9º dia de avaliação, nas classes 2 e 3. Por sua vez, na classe de diâmetro 1 as primeiras brotações epicórmicas foram constadas apenas no 13º dia, confirmando a importância da quantidade de reserva na promoção da resposta fisiológica. (Figura 4).

A estabilização do processo de indução das brotações epicórmicas na classe 3 foi constatada a partir do 27º dia, enquanto para a classe de número 2, tal fato ocorreu após o 29º

dia de experimentação. Porém, na classe 1 de diâmetro, novas brotações epicórmicas foram contabilizadas até o último dia de avaliação (Figura 4).

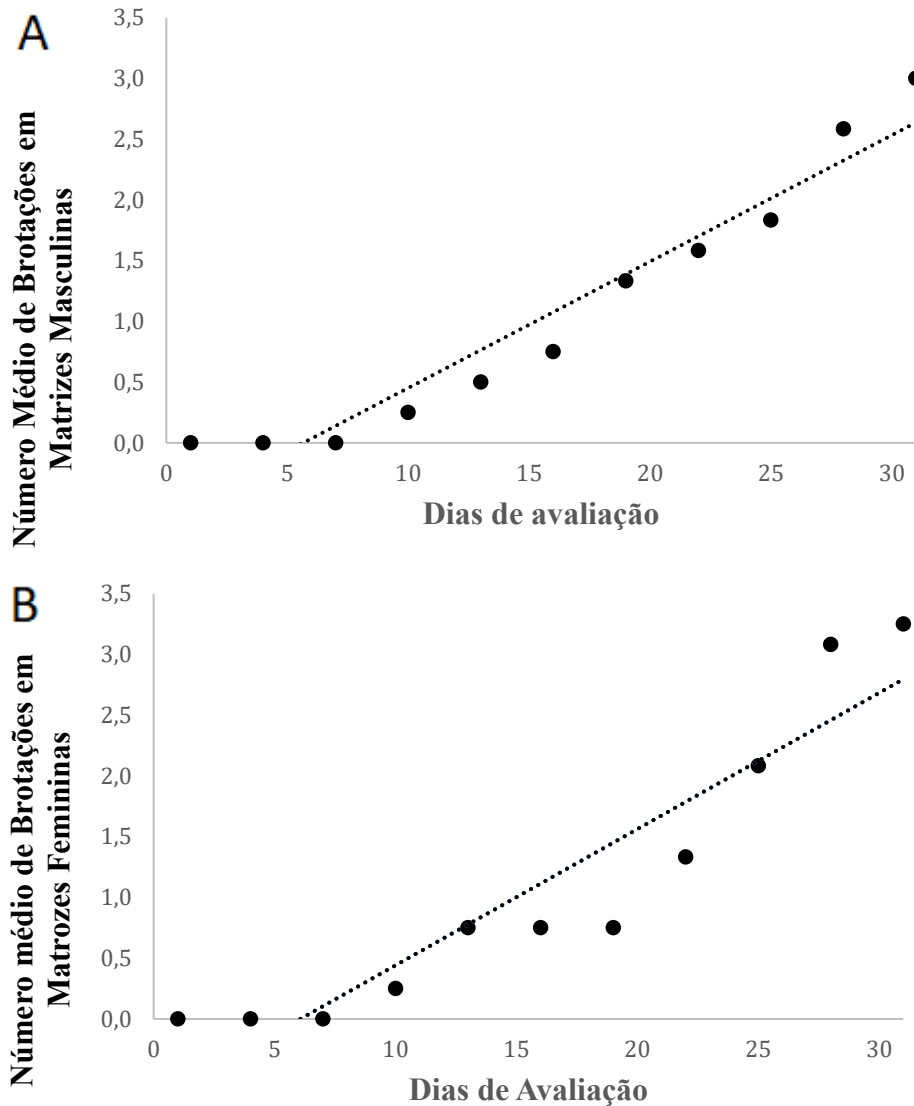
A indução das brotações epicórmicas não ocorre de forma imediata, nota-se que a mesma se inicia a partir do 10º dia. Com o aparecimento das primeiras brotações, há um aumento gradativo no número médio de brotações até que ocorre uma estabilização na indução próximo ao 25º dia de experimento (Figura 4).



**FIGURA 4.** Valores médios do número de brotações epicórmicas de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium* de acordo com a classe de circunferências dos galhos podados no decorrer de 31 dias de avaliação. **A.** Classe de circunferências de galhos de 0-8 cm; **B.** Classe de circunferências de galhos de 8-10 cm; **C.** Classe de circunferências de galhos acima de 10 cm.

O número de brotações epicórmicas induzidas nos galhos podados das árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium* não foi influenciado pelo sexo das mesmas (Figura 5). O número médio de brotações induzidas em estacas para os dois sexos foi similar durante todo o período experimental. Provavelmente, um dos principais fatores que contribuiu na indução e desenvolvimento das brotações epicórmicas de *A. fraxinifolium* corresponde às substâncias de reserva presente nos galhos podados. Portanto, independentemente do sexo das árvores matrizes, esta reserva energética dos propágulos vegetativos foi o principal responsável pelo suprimento da

sua demanda metabólica das brotações induzidas, garantindo sua sobrevivência e consequentemente o seu crescimento.

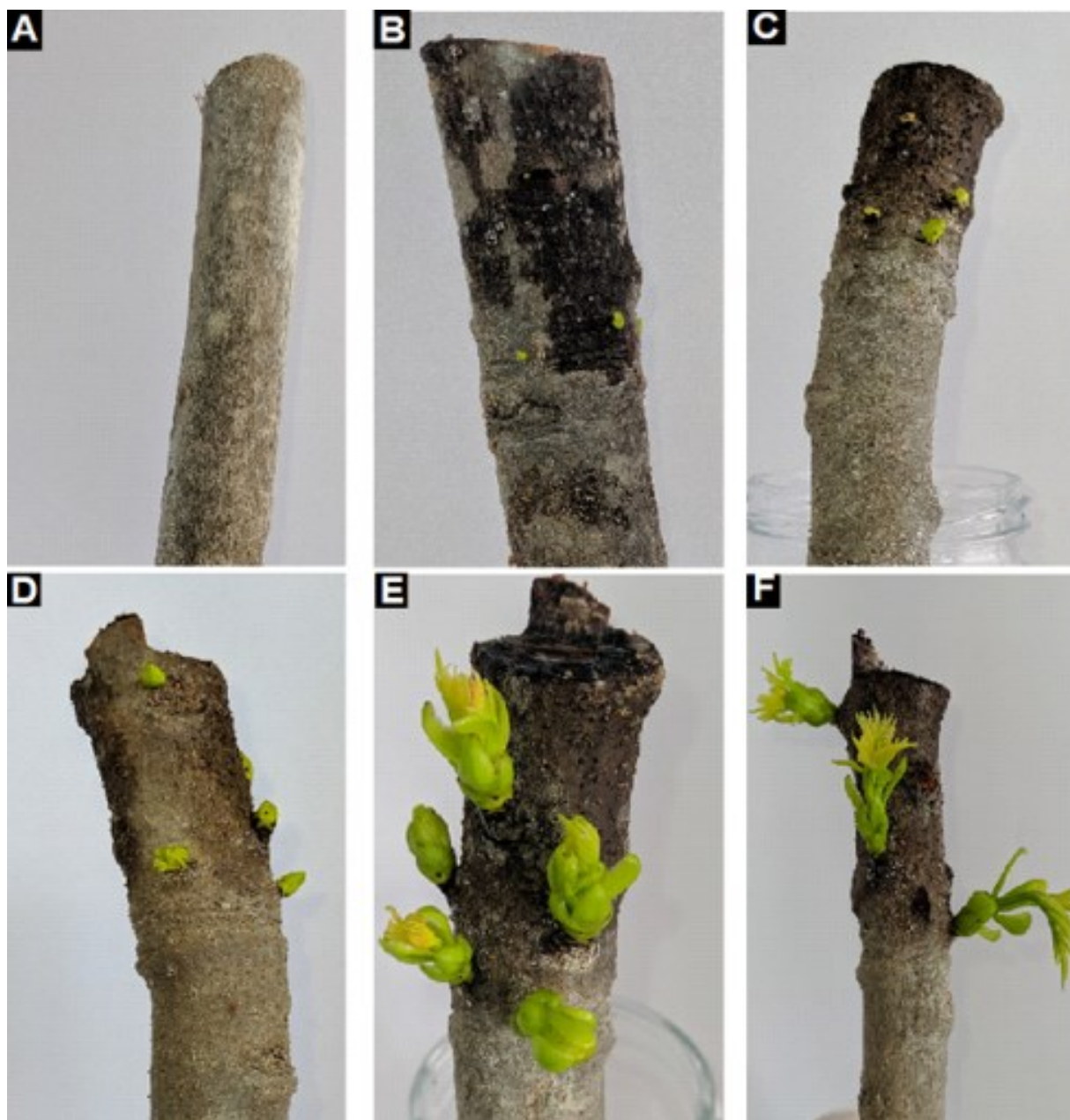


**FIGURA 5.** Valores médios do número de brotações epicórmicas induzidas nas estacas podadas de *A. fraxinifolium* de acordo com o sexo das árvores matrizes (masculinas e femininas) no decorrer de 31 dias de avaliação.

No processo ontogênico de formação das brotações epicórmicas foi constatado um intumescimento inicial na superfície da casca, antes da sua emissão, sendo este o indício do local de sua formação (Figuras 6 A-B). A partir desse intumescimento houve a formação de uma protuberância em decorrência do rompimento da casca nos galhos, onde posteriormente ocorre a emergência dos meristemas apicais e consequente formação das brotações epicórmicas (Figura 6 C). A indução das brotações epicórmicas ocorreu ao longo de toda a superfície dos galhos das matrizes de *A. fraxinifolium* e as mesmas foram



induzidas em vários pontos próximos uns dos outros (Figuras 6 D-F). Após o surgimento das brotações, ocorre o seu alongamento e posterior desenvolvimento da parte aérea. (Figura 6).



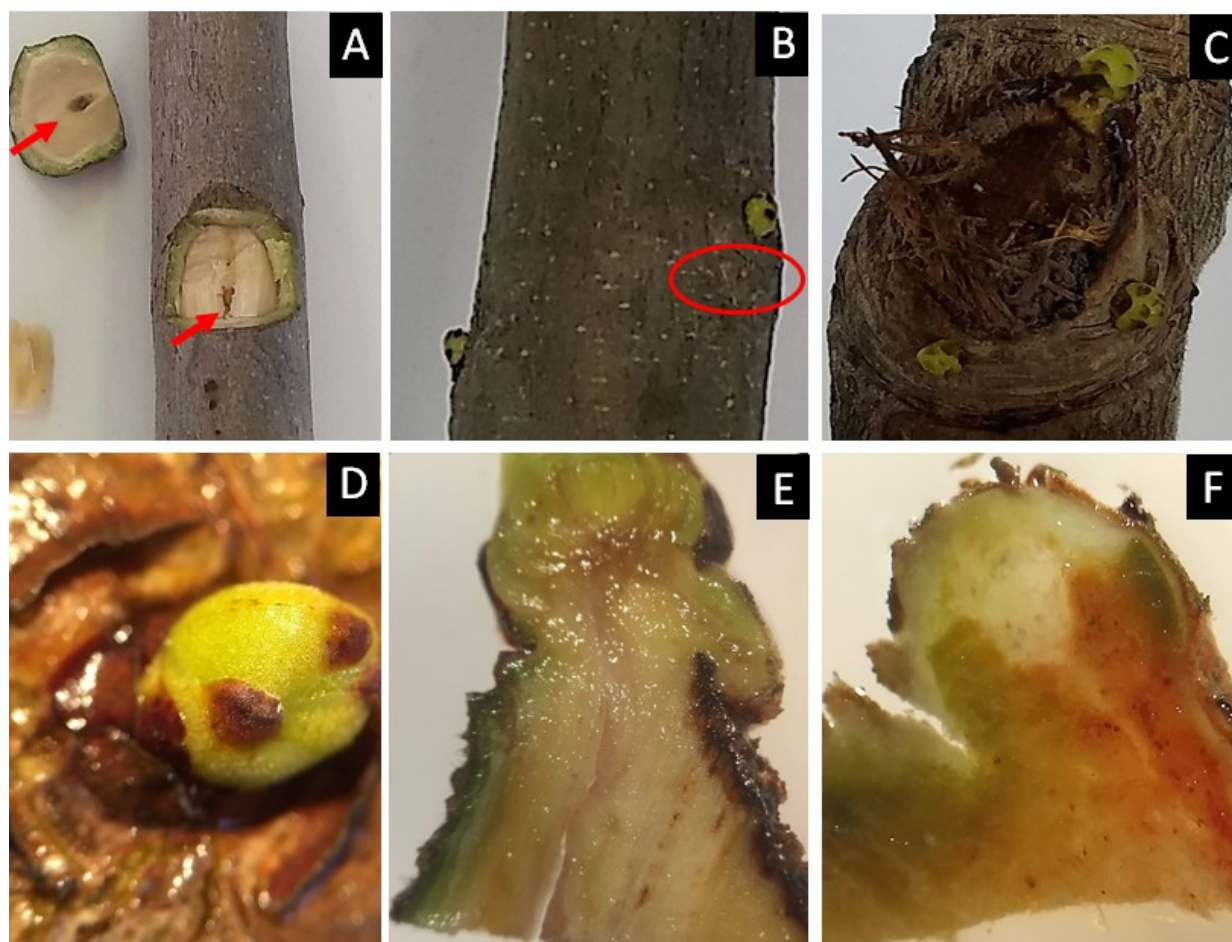
**FIGURA 6.** Brotações epicórmicas induzidas em galhos podados de árvores matrizes adultas de *A. fraxinifolium* em diferentes estágios de desenvolvimento. **A.** Galho com ausência de brotação epicórmica. **B.** Início da emergência das brotações epicórmicas (pontuações verdes). **C; D; E e F:** crescimento das brotações epicórmicas induzidas até o estágio de expansão foliar.

A origem das brotações epicórmicas induzidas em *A. fraxinifolium* não foi bem definida, havendo a sua formação em diversos pontos dos galhos podados. De maneira geral, as brotações surgiram a partir de células próximas ao câmbio vascular (Figura 7A), porém

com seu desenvolvimento em pontos identificados como de gemas axilares de folhas antigas (Figura 7B) ou ainda em regiões que apresentavam a casca menos espessa e com a formação de uma periderme necrofilática ou de cicatrização em razão de alguma injúria (Figura 7C).

A formação das brotações epicórmicas ocorreu com a indução de uma única gema por ponto de origem na superfície do galho (Figura 7D) e as mesmas, após a sua emissão, apresentaram expansão foliar e rápido crescimento em altura. As brotações induzidas apresentaram desenvolvimento considerado normal, sem indícios aparentes de anormalidades, muito provavelmente em razão das condições ambientais de indução na estufa adaptada.

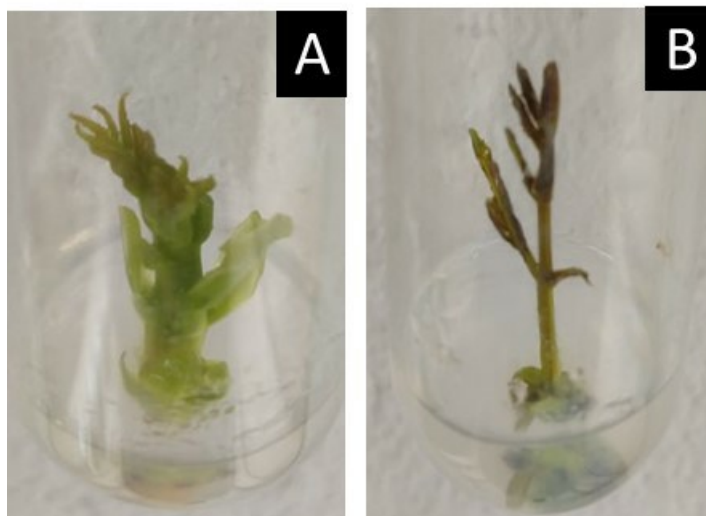
Os cortes anatômicos a fresco não possibilitaram a identificação clara da ontogenia das brotações epicórmicas. A evidência detectada da conexão vascular estabelecida com o galho foi indicada pelos feixes vasculares entre a região meristemática da brotação epicórmica com o tecido materno (Figura 7E). Detalhe importante observado nos cortes a fresco foi a rápida exsudação de compostos fenólicos logo após a sua realização (Figura 7F). A presença desta oxidação dificultou a análise histológica mais precisa sobre a ontogenia das brotações epicórmicas.



**FIGURA 7.** Detalhe das brotações epicórmicas induzidas em estacas podadas de *A. fraxinifolium*. **A.** Corte da brotação epicórmica induzida no galho, com indicação da conexão com tecido vascular (seta vermelha). **B.** Brotação epicórmica induzida no galho a partir de gema axilar dormente, constatada pela cicatriz da folha anteriormente existente (círculo vermelho). **C.** Brotações epicórmicas induzidas no galho a partir de periderme necrofilática. **D.** Detalhe da brotação epicórmica induzida no galho. **E.** Detalhe da conexão vascular entre a região meristemática da brotação epicórmica com o tecido do galho. **F.** Exsudação fenólica com coloração avermelhada nos tecidos da brotação epicórmica.

### Estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas

Os explantes, em sua totalidade, já apresentavam oxidação, após uma semana de estabelecidos *in vitro* (Figura 8A). O aspecto visual dos propágulos era de um escurecimento pronunciado na base dos mesmos, que progredia rapidamente de todo o explante (Figura 8B). Portanto, não se obteve sucesso nessa fase da micropropagação de *A. fraxinifolium*.



**FIGURA 8:** Estabelecimento *in vitro* de brotações epicórmicas induzidas em galhos podados de matrizes adultas de *A. fraxinifolium*. **A:** Explante recém-introduzido *in vitro*. **B:** Aspecto do explante após 1 semana de cultivo *in vitro*.

Durante o processo de estabelecimento *in vitro*, as excisões feitas nos explantes podem ter estimulado uma resposta fisiológica das células, nestas regiões que foram cortadas, em razão dos danos mecânicos causados nas células, estimulando assim a liberação de compostos fenólicos, os quais são oxidados por enzimas polifenases (ANDRADE et al., 2000). Dessa forma, a alta oxidação dos explantes nos diferentes tratamentos foram provavelmente as causas detectadas como o principal motivo causal da morte dos indivíduos.

Bezerra et al, (2014) verifica relação da oxidação relacionada ao BAP, sendo que a menor quantidade do mesmo no meio de cultura resulta em uma maior oxidação. Visto que no presente estudo o BAP não foi utilizado, pode ter ocorrido contribuição no auto índice de oxidação. Ademais, Yoshiko et al, (2001) relata que quando a espécie apresenta tendência de oxidação, independentemente do tempo de lavagem com água, ocorrerá a oxidação. Todavia, a maior quantidade de lavagem influencia a distribuição de fungos que estariam em locais que o hipoclorito não havia alcançado.

Embora tenha ocorrido um insucesso no estabelecimento *in vitro* de brotações epicórmicas de *A. fraxinifolium*, maiores investigações em relação ao controle da oxidação fenólica, utilizando agentes antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico no tratamento dos explantes e no meio de cultura, bem como do carvão ativado possibilitará o aprimoramento da técnica e a obtenção de resultados mais satisfatórios.

## CONCLUSÕES

O maior número de brotações epicórmicas foi obtido no tratamento de desinfestação com o desinfetante bactericida (Lysoform®) e o fungicida (Derosal® 500), sendo que neste último o nível de contaminação foi o mais baixo.

Por sua vez, na classe de circunferências de galhos acima de 10 cm foi contabilizado maior número de brotações epicórmicas, porém não houve diferença quanto ao sexo das árvores matrizes doadoras de galhos para a indução dessas brotações.

E, na investigação da ontogenia das brotações epicórmicas constatou-se que as mesmas podem ter sua origem a partir de gemas axilares dormentes ou formadas de tecidos com menor grau de diferenciação celular.

Entretanto, não obteve sucesso no estabelecimento *in vitro* em virtude da alta oxidação fenólica dos explantes.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.
- KOZLOWSKI, T.T. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. **Botanical Review** 58: 107–222; 1992.
- PERNICE F.; SOLARI L.; DEJONG T.M. Comparison of growth potentials of epicormic shoots of nectarine trees grown on size-controlling and vigorous rootstocks. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 81:211–218; 2006.
- AGUIAR, A. V.; BORTOLOZO, F. R.; MORAES, M. L. T.; SÁ, M. E. Determinação de parâmetros genéticos em população de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) através das características fisiológicas da semente. **Scientia Forestalis**, p.89-97, 2001.
- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n.3, p.445-453,2007.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174- 180, 2000.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Embrapa**: Planaltina, 2002. 14p. Documento 58.
- BEZERRA, R. M. D. F., ALOUFA, M. A. I., FREIRE, F. A. D. M., & SANTOS, D. D. D. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.(Fabaceae). **Revista Árvore**, 2014, 38.5: 771-778.
- CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; ARAÚJO, M. D. F. V.; CONCEIÇÃO, T. T. M. M.; CONCEIÇÃO, M. A. M. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena** ,v. 7, n. 12, 2011.
- DUTRA, L. F., WENDLING, I., BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49, 2009.
- LEITE, B.; MASCARENHAS, G.; CRUZ FILHO, J. R.; MENDES, P.; BRITO, R. **Plantio de Florestas Comerciais**. Editora IABS: Brasília – DF, 2017. 65p. (Documento 14).
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, 1992, 352p,.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3 p.473-497, 1962.
- NAUE, C.R.; BENITIZ, L.B.; MEDEIROS, C. V. Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* L. In: CONGRESSO INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2007, Pelotas. **Resumos...** Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2007. p. 1-5.

SANTOS, M. R. A. DOS; CHAGAS, S. E. DA S.; GUIMARÃES, M. DE C. M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, v. 4, n. 2, p. 15-23, 2015.

YOSHIKO, A. S.; TEIXEIRA, H. C. D.; ALVES, L. A.; CAMELLO, V. S.; Micropropagação de *Celtis sp*: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, 2001, 7.2: 117-123.

### 3) CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo realizado para a definição de um protocolo de resgate vegetativo e conservação *in vitro* de *A. fraxinifolium* comprovou a viabilidade do uso da técnica de propagação vegetativa pela indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados de árvores matrizes adultas. Os resultados demonstraram a eficiência do tratamento com fungicida na desinfestação dos galhos no controle da sua contaminação fúngica e bacteriana para a obtenção de brotações com menor nível de contaminação possível.

Houve constatação da correlação entre a indução das brotações epicórmicas e o maior diâmetro dos galhos podados, sendo indicativo que os mesmos deverão ser utilizados preferencialmente para a indução de maior número de brotações. Por outro lado, não houve diferença na indução de brotações epicórmicas para o sexo das árvores matrizes adultas doadoras de galhos. Este resultado trouxe à tona questionamento para maiores estudos para maior investigação a respeito do processo de indução das brotações epicórmicas, se o mesmo está diretamente correlacionado à sanidade, estado nutricional, anatomia, idade ontogenética ou vigor fisiológico dos propágulos vegetativos.

A investigação da ontogenia das brotações epicórmicas permitiu inferir que as mesmas podem ter sua origem a partir de gemas axilares dormentes ou formadas de tecidos com menor grau de diferenciação celular. Tais evidências abrem perspectivas para maiores pesquisas relacionadas à anatomia por meio da microscopia de luz ou de varredura. Estes estudos contribuirão para a elucidação desse processo de formação das brotações epicórmicas e otimização da técnica de resgate vegetativo e produção de explantes para a micropropagação de *A. fraxinifolium*.

A alta oxidação fenólica foi um fator determinante para o insucesso no estabelecimento *in vitro* das brotações epicórmicas utilizadas como explantes. A metodologia de indução das brotações a partir de galhos desinfestados em ambiente protegido foi determinante para o controle da contaminação fúngica e bacteriana na introdução *in vitro*. No entanto, o fator intrínseco à espécie, que é a produção de compostos fenólicos, acarretou a morte dos explantes. Portanto, requer-se maiores estudos relacionados à supressão ou controle da oxidação fenólica dos explantes, quer sejam com seu tratamento ou com aplicação de substâncias antioxidantes para avançar nesta etapa e assim viabilizar a propagação *in vitro* de *A. fraxinifolium*.