

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Agrárias

Mestrado em Ciências Florestais

Leonardo Máximo Silva

**ANTIOXIDANTES E BALANÇO HORMONAL NO CULTIVO *IN VITRO* DE
ASTRONIUM URUNDEUVA (M. ALLEMÃO) ENGL.**

Montes Claros

2022

Leonardo Máximo Silva

**ANTIOXIDANTES E BALANÇO HORMONAL NO CULTIVO *IN VITRO* DE
ASTRONIUM URUNDEUVA (M. ALLEMÃO) ENGL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais 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

Montes Claros

2022

Silva, Leonardo Máximo.

S586a Antioxidantes e balanço hormonal no cultivo in vitro de *Astronium urundeuva* (M.
2022 Allemão) Engl [manuscrito] / Leonardo Máximo Silva. Montes Claros, 2022.
51 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: Glauciana da Mata Ataíde, Gilvano Ebling Brondani.

Inclui referências: f. 17-21; 32-34; 49-51.

1. Aroeira do sertão -- Teses. 2. Plantas -- Propagação-in vitro -- Teses. 3. Oxidação fenólica -- Teses. 4. Reguladores de crescimento -- Teses. I. Oliveira, Leandro Silva de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 630

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 20 dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e dois, às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Leandro Silva de Oliveira, D. Sc. (Orientador - UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Glauciana da Mata Ataíde, D. Sc. (UFSJ) e Gilvano Ebling Brondani, D. Sc. (UFLA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de Defesa de Dissertação de **LEONARDO MÁXIMO SILVA**, 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: "Antioxidantes e balanço hormonal no cultivo *in vitro* de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl.", 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.

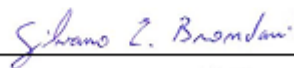
OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 74 do regulamento do Curso de Mestrado em Ciências Florestais, conforme apresentado a seguir:

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 outubro de 2022.

Documento assinado digitalmente
gov.br GLAUCIANA DA MATA ATAÍDE
Data: 25/10/2022 08:29:30 -0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Glauciana da Mata Ataíde
Membro



Gilvano Ebling Brondani
Membro



Leandro Silva de Oliveira
Orientador

ANTIOXIDANTES E BALANÇO HORMONAL NO CULTIVO *IN VITRO* DE

Astronium urundeuva (M. ALLEMÃO) ENGL.

RESUMO

Astronium urundeuva (aroeira do sertão) é uma das espécies nativas com potenciais silviculturais para exploração madeireira. No estabelecimento *in vitro* da espécie, tem-se observado dificuldades como a oxidação fenólica, principalmente a partir de explantes coletados de árvores matrizes adultas. Ademais, há carência de informações sobre o balanço hormonal ótimo para a multiplicação *in vitro* da espécie. Dessa forma, a utilização de explantes seminais, a utilização de antioxidantes e o uso de reguladores de crescimento são alternativas para minimizar a oxidação fenólica e multiplicar *in vitro* a espécie. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de três antioxidantes no controle da oxidação fenólica na fase de estabelecimento *in vitro* de *A. urundeuva*, bem como o balanço auxina/citocinina na sua multiplicação *in vitro*. Para tanto, no estabelecimento e na multiplicação *in vitro*, plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas como explantes. Os mesmos foram inoculados no meio de cultura MS50% suplementado com os antioxidantes, ácido ascórbico (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹), carvão ativado (3,0; 6,0; 9,0 e 12 g.L⁻¹) e polivinilpirrolidona (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g.L⁻¹). Na multiplicação *in vitro*, os explantes foram inoculados no meio de cultura MS50%, suplementado com ácido naftalenoacético (0,0; 0,025 e 0,050 mg L⁻¹) associadas com thidiazuron (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L⁻¹) e 6-benzilaminopurina (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L⁻¹). O ácido ascórbico, carvão ativado e PVP nas concentrações de 0,2 mg.L⁻¹, 12g.L⁻¹ e 1,5g.L⁻¹, respectivamente, foram efetivos no controle de oxidação fenólica obtendo-se a maior sobrevivência. Este tratamento com carvão ativado controlou totalmente a oxidação fenólica dos explantes. Na multiplicação *in vitro*, os tratamentos com BAP proporcionou explantes com maior vigor médio (3,5) e menor valor médio de calejamento (1,0) em comparação a associação de ANA e TDZ. Nenhum tratamento com reguladores de crescimento resultou na multiplicação das brotações. Os resultados deste trabalho, abrem perspectivas para maiores estudos de micropropagação com *A. urundeuva* tanto com materiais genéticos juvenis quanto adultos, principalmente com o carvão ativado, o qual foi o antioxidante recomendado para o cultivo *in vitro* da espécie, bem como novos estudos com reguladores de crescimento para otimização da multiplicação *in vitro*. Isso contribuiria para a sua conservação e auxiliará em trabalhos de melhoramento genético da espécie.

Palavras-Chave: Aroeira do sertão; Micropropagação; Oxidação fenólica; Regulador de crescimento.

ANTIOXIDANTS AND HORMONAL BALANCE IN THE *IN VITRO* CULTURE OF *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl

ABSTRACT

Astronium urundeuva (aroeira do sertão) is one native species with silvicultural potential for logging. *In vitro* establishment of the species has been hampered by phenolic oxidation, primarily from explants collected from adult matrix trees. Furthermore, there is a lack of information on the optimal hormonal balance for *in vitro* multiplication of the species. Thus, the use of seminal explants, the use of antioxidants, and the use of growth regulators are alternatives to minimize phenolic oxidation and *in vitro* multiply species. In this context, the study objective was to evaluate the viability of three antioxidants in controlling phenolic oxidation in the *in vitro* establishment phase of *A. urundeuva*. Also, the auxin/cytokinin balance during their *in vitro* multiplication. Therefore, in the establishment and *in vitro* multiplication processes, seedlings germinated *in vitro* were used as explants. Inoculated them in the MS50% culture medium supplemented with the antioxidants, ascorbic acid (0.2; 0.4; 0.6, and 0.8 mg.L⁻¹), activated charcoal (3.0; 6.0; 9.0, and 12 g.L⁻¹), and polyvinylpyrrolidone (0.5; 1.0; 1.5; and 2.0 g.L⁻¹). For the *in vitro* multiplication, the explants were inoculated in the MS50% culture medium, supplemented with naphthaleneacetic acid (0.0; 0.025; and 0.050 mg L⁻¹), associated with thidiazuron (0.0; 0.25; 0.50; 0.75; and 1.00 mg. L⁻¹), and 6-benzylaminopurine (0.0; 0.25; 0.50; 0.75; and 1.00 mg.L⁻¹). Ascorbic acid, activated charcoal, and PVP at concentrations of 0.2 mg.L⁻¹, 12g.L⁻¹, and 1.5g.L⁻¹, respectively, were effective in controlling phenolic oxidation, obtaining the highest survival. This activated charcoal treatment completely regulated the phenolic oxidation of the explants. *In vitro* multiplication treatments with BAP provided explants with an upper mean vigor (3.5) and a lower mean callus value (1.0) compared to the association of ANA and TDZ. No treatment with growth regulators resulted in shoot multiplication. The results open perspectives for further studies of micropropagation with *A. urundeuva*, both with juvenile and adult genetic materials, especially with activated charcoal, which was the recommended antioxidant for the *in vitro* cultivation of the species, as well as new studies with regulators of growth for optimization of *in vitro* multiplication. It would contribute to *A. urundeuva* conservation and help in its genetic improvement.

Key words: Aroeira do sertão; Micropropagation; Phenol oxidation; Plant growth regulator.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. <i>Astronium urundeuva</i> : aspectos botânicos e fenológicos	11
3.2. Micropropagação.....	12
3.3. Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i>	13
4. REFERÊNCIAS	17
5. CONTROLE DA OXIDAÇÃO FENÓLICA NO CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Astronium urundeuva</i> (M. Allemão) Engl	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
5.1. INTRODUÇÃO	24
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.4. CONCLUSÃO	31
5.5. REFERÊNCIAS.....	32
6. BALANÇO HORMONAL NA MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Astronium urundeuva</i> (M. Allemão) Engl.....	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
6.1. INTRODUÇÃO	37
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	38
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.4. CONCLUSÕES	48
6.5. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui um papel muito importante no cenário das mudanças climáticas em razão do seu potencial de atuar como agente mitigador desses efeitos. Em vista disso, o país estabeleceu algumas metas para reduzir as emissões dos gases causadores do efeito estufa, sendo uma delas a restauração e reflorestamento de 18 milhões de hectares de vegetação nativa até 2030 (BICHARA et al., 2022). Dentre as espécies em potenciais, a *Astronium urundeuva* se destaca com uma espécie promissora para suprir tal demanda.

Nesse contexto, estudos com espécies florestais nativas são escassos, o que reflete na falta de sementes de qualidade e, em quantidade suficiente no mercado (DURIGAN et al, 2010). Ademais, há uma lacuna enorme de informações sobre o comportamento silvicultural de espécies nativas. Já nos casos de aproveitamento econômico, existem problemas como falta de uma silvicultura consolidada para as espécies nativas com a constituição de plantios homogêneos, carência de estudos sobre adaptabilidade das espécies a diferentes ambientes, devido à ausência de programas de melhoramento genético. Diante dessa realidade, há um crescente interesse pela silvicultura clonal uma vez que possibilita contornar problemas relacionados a propagação de espécies florestais nativas de interesse. A adoção da clonagem possibilita a constituição de plantios homogêneos, mais produtivos, com maior resistência a pragas e doenças. Além disso, contribui para a conservação de espécies que se encontram ameaçadas de extinção.

Astronium urundeuva, espécie promissora para as restaurações de áreas no semiárido, pertence à família Anacardiaceae, popularmente conhecida como aroeira-do-sertão. Em virtude das características de sua madeira de grande resistência mecânica e da casca rica em tanino, a espécie foi intensamente explorada e por esse motivo foi incluída na lista oficial de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (lista do IBAMA de 1992 e Instrução Normativa do MMA de 2008). Recentemente, foi reclassificada pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora), como "Pouco Preocupante", apresentando baixo risco de extinção. Contudo, *A. urundeuva* é uma dentre outras espécies que ocorrem no semiárido brasileiro, região que apresenta cerca de 66% de sua área sob intensa degradação ambiental, o que tem ocasionado a redução das populações de espécies vegetais (SÁ et al., 2010). Diante disso, há urgência no desenvolvimento de protocolos de propagação em pesquisas que procuram caracterizar, espécies promissoras, através de sua diversidade genética e em conjunto realizar a conservação em *ex situ*, através de conservação das sementes, propagação e formação de bancos de germoplasma.

A propagação vegetativa é uma importante alternativa de multiplicação, em espécies de difícil reprodução por meio de sementes, tanto para fins produtivos quanto para conservação e formação de bancos de germoplasma (OLIVEIRA; RIBEIRO, 2013). A micropropagação, de maneira geral, pode ser aplicada para todas as espécies, mas estudos são necessários para determinação de metodologias adequadas, em função da particularidade de cada espécie (STUEPP et al., 2018). Apesar da propagação *in vitro* ser uma alternativa economicamente viável em relação a outros métodos de propagação de espécies florestais nativas, é uma técnica que também apresenta problemas como a oxidação dos explantes na etapa de estabelecimento do cultivo *in vitro* (CAMOLESI, 2007). Além disso, as respostas em relação às técnicas de micropropagação são

variáveis e estão associadas a diversos fatores como a espécie, época de coleta do material, origem do explante, e as condições usadas no cultivo *in vitro* (temperatura, meio nutritivo e luminosidade).

A micropropagação pode auxiliar no processo de perpetuação da espécie, visando produzir em larga escala, utilizando pouco espaço e manter a sanidade das plântulas (OLIVEIRA et al., 2013). Os diásporos de aroeira não apresentam dormência, o que facilita a sua propagação *in vitro*. Entretanto, segmento nodais ou brotações epicórmicas de espécies lenhosas, naturalmente liberam fenóis. Essa oxidação fenólica se dá por meio de atividade enzimática que contém íons de cobre e que quando oxidam os fenóis, formam e polimeriza substâncias de coloração amarelada, conhecidas como quinonas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984; MONACO et al., 1977). Dentre os agravantes da oxidação fenólica, está a associação com proteínas das membranas ou enzimas, acarretando a morte celular. Portanto, a oxidação fenólica pode ser minimizada através da utilização de antioxidantes como polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e carvão ativado.

A etapa de multiplicação *in vitro* é muito importante na micropropagação, uma vez que proporciona a indução de múltiplas brotações. Para tanto, se torna fundamental a utilização de reguladores de crescimento, especialmente o balanço hormonal entre auxinas e citocininas no meio de cultura. A maior relação citocinina/auxina favorece a quebra da dominância apical nos explantes e induz o crescimento de novas brotações. Dentre os reguladores de crescimento da classe das auxinas mais comumente utilizado no cultivo *in vitro* está o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB). Em relação às citocininas, os meios de cultura têm sido suplementados com a 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), cinetina (CIN), zeatina (ZEN) e isopenteniladenina (2iP). As respostas *in vitro* aos reguladores de crescimento tem sido variável entre as espécies e os tipos de explantes utilizados. Portanto, é imperativo a avaliação das respostas aos reguladores e crescimento de espécies nativas para otimizar a multiplicação *in vitro*.

Diante disso, em razão da importância silvicultural do *A. urundeuva*, da escassez de projetos de conservação e melhoramento da espécie e sobretudo a respeito da sua propagação *in vitro*, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de antioxidantes e do balanço hormonal auxina/citocinina na micropropagação da aroeira do sertão.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o controle da oxidação fenólica e a indução de brotações por meio da utilização de antioxidantes e do balanço auxina/citocinia, na micropropagação de *A. urundeuva* (M. Allemão) Engl.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar as melhores concentrações de carvão ativado, ácido ascórbico e PVP para o controle de oxidação fenólica no cultivo *in vitro* de *A. urundeuva*.
- Determinar o balanço hormonal ótimo de ANA conjugada com TDZ ou BAP na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Astronium urundeuva*: aspectos botânicos e fenológicos

A. urundeuva é uma espécie arbórea nativa pertencente à família Anacardiaceae. No Brasil, essa espécie se encontra distribuída geograficamente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (PAREYN, 2018). Os indivíduos de *A. urundeuva*, morfologicamente podem alcançar alturas entre 6 a 14 metros no Cerrado e Caatinga, mas em solos mais férteis podem atingir maiores alturas (LORENZI, 1998). O tronco dessa espécie é geralmente ereto e dependendo do local de ocorrência pode ser curto e tortuoso (CARVALHO, 2003; PAREYN, 2018). O ritidoma é suberoso, sulcado, de coloração castanho-escuro e quando adulto é subdividido em placas escamiformes retangulares. Na fase juvenil o ritidoma apresenta características diferentes sendo ele mais liso, acinzentado e coberto por lenticelas. A casca interna apresenta coloração vermelha (CARVALHO, 2003).

As folhas são compostas, imparipinadas e alternas. Folíolos em quantidade variando de 5 a 7, ovados, opostos, com até 5 cm de comprimento e 3 cm de largura. Os folíolos quando macerados exalam cheiro de manga. As inflorescências são reunidas em panículas com brácteas e bractéolas deltóides, caducas e com até 20 cm de comprimento. As flores são unissexuadas, pentâmeras, actinomorfas e de coloração creme (CARVALHO, 2003; PAREYN, 2018).

Os frutos são do tipo drupa com cálices persistentes, com até 5 mm de diâmetro. O exocarpo é unisseriado e lignificado. O mesocarpo é totalmente aderido ao exocarpo. O endocarpo é lignificado e constituído por quatro camadas (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 1998). As sementes são piriformes (formato de pêra), orbicular, com tegumento membranáceo, desprovida de endosperma, de cor marrom tendendo para preto, com 3,5 a 4,2 mm de comprimento e 3,7 a 4,3 mm de largura e superfície rugosa (FELICIANO, 1989; SOUZA; LIMA, 1982).

Os indivíduos de *A. urundeuva* são considerados dióicos, mas outros trabalhos trazem a existência de indivíduos que apresentam sistemas sexuais monóicos e também indivíduos dióicos com flores hermafroditas (CARVALHO, 1994; CARVALHO, 2003; SANTIN; LEITÃO FILHO, 1991). A reprodução ocorre por meio da fecundação cruzada, sendo a polinização realizada principalmente pelas abelhas e outros insetos pequenos (CARVALHO, 2003). A época de floração é muito ampla e varia de acordo com a distribuição geográfica da espécie, sendo que no estado de Minas Gerais ocorre entre os meses de junho a agosto. A etapa de floração é observada após o processo de perda das folhas, que ocorre na estação seca do ano. A dispersão de frutos e sementes ocorre por anemocória, ou seja, pela ação do vento (CARVALHO, 2003; LORENZI, 1998).

A. urundeuva é uma planta secundária inicial e bastante frequente na vegetação secundária por rebrota (GUARIM NETO, 1986; MOTTA et al. 1997). É considerada uma espécie resistente à seca e populações de *A. urundeuva* se desenvolvem muito bem em solos ricos em cálcio, rasos e em áreas com declive acentuado (HERINGER; FERREIRA, 1973). Em plantios experimentais a espécie tem apresentado melhores resultados em solos com fertilidade elevada e com propriedades químicas adequadas (CARVALHO, 2003). Em trabalho realizado por De Meideiros et al. (2008),

observou-se que em mudas de *A. urundeuva* a aplicação da calagem apresentou resultados positivos, mostrando que é uma espécie que possui exigência maior em cálcio.

Diante das características da *A. urundeuva* e do seu potencial de uso para fins madeireiros a partir de plantios tem-se recomendado a mesma como espécie prioritária para a constituição de povoamentos florestais (ROLIN et al., 2020). No entanto, há gargalos que limitam ou impedem que a espécie seja plenamente explorada, dentre os quais está a propagação vegetativa.

3.2. Micropropagação

Na atividade florestal sempre que há restrições quanto à propagação de uma espécie pelos métodos convencionais, quer seja produção de mudas via seminífera ou através de alguma técnica de propagação, metodologias mais sofisticadas podem ser requeridas. Além disso, os estudos de técnicas que possam auxiliar na multiplicação de espécies florestais nativas são cruciais e, neste caso, para a propagação vegetativa de espécies florestais há várias metodologias, cada qual com suas particularidades e aplicações (XAVIER, 2010). Entretanto, para empregar a clonagem tem-se a necessidade de selecionar genótipos promissores com características desejáveis para determinado ambiente, como por exemplo, produtividade alta, resistência ao estresse hídrico, resistência a pragas e doenças (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2011).

No cultivo *in vitro*, também denominado de micropropagação é necessário um conjunto de técnicas nas quais o explante que é cultivado sob condições controladas com objetivo de propagar a espécie em questão (TORRES et al., 2000). O explante consiste em todo segmento de tecido ou órgão vegetal, quer seja de material jovem ou adulto, que é usado para dar início a uma cultura *in vitro*. Em vista disso, espera-se que esse tecido quando submetido a condições de indução do meio, possa induzir uma resposta morfogênica que resultará na formação de parte aérea, embrião, propágulo ou planta (KULUS et al., 2020). Essa capacidade das células vegetais de serem responsivas aos estímulos induzidos no cultivo *in vitro* deve-se à totipotência, ou seja, a potencialidade de cada célula vegetal de formar um novo indivíduo multicelular completo a partir de uma única célula (FÉHER, 2019).

Neste contexto, a técnica de micropropagação compreende umas das vias de clonagem de genótipos superiores de interesse. Esta técnica de propagação tem como objetivo a rápida multiplicação de espécies e genótipos no ambiente protegido de um laboratório. A sua empregabilidade está voltada tanto para fins comerciais, bem como para os estudos de espécies florestais nativas com dificuldade de propagação (OLIVEIRA et al., 2013)

Na micropropagação alguns procedimentos e técnicas são importantes para a obtenção de explantes adequados para o cultivo *in vitro*. Isso decorre do fato de que a retirada dos explantes, deve ser realizada preferencialmente nas regiões em que se localiza os tecidos mais juvenis sob o ponto de vista de idade ontogenética, uma vez que os tecidos vegetais serão mais responsivos e, conseqüentemente, será mais fácil a emissão de raízes adventícias e brotações novas (HEILAND et al., 2022). Além disso, o tamanho do explante também é importante uma vez que explante menores, tais como os meristemas, diminuem as chances de introdução de contaminantes no meio de cultura no estabelecimento *in vitro*. Porém, propágulos de tamanhos reduzidos podem apresentar desvantagens

como dificuldade ou demora no processo de estabelecimento e multiplicação do material vegetal (RAJPUT et al., 2019).

As plantas matrizes também influenciam nos resultados que serão obtidos *in vitro*, pois os melhores explantes são provenientes de matrizes saudáveis, vigorosas, que tenham crescimento ativo e não apresente sintomas de estresse (SANTOS et al., 2019). Os explantes oriundos de matrizes mantidas no campo são mais propensos a apresentarem fungos, bactérias e vírus, enquanto os explantes provenientes de matrizes mantidas em ambiente protegido tendem a uma menor ocorrência de patógenos (PASQUAL et al., 1998; ROCA; MROGISKI, 1991).

A época de coleta dos explantes também é de extrema importância, sendo que a melhor época corresponde àquela na qual as matrizes produzem brotações novas e vigorosas, evento variável de acordo com a espécie e com o tipo de explante que será utilizado (PASQUAL et al. 1998). O cultivo *in vitro* de propágulos obtidos de genótipos adultos também é influenciado pela época de coleta, pois o clima e as flutuações dos fatores do meio, acabam afetando as condições fisiológicas dos indivíduos no campo (DALPIAZ et al., 2019). A idade ontogenética dos tecidos que integram os propágulos e, portanto, os explantes sofrem alterações ao longo do crescimento da planta matriz doadora de explantes quanto à resposta ao cultivo *in vitro*. Além disso, o nível de contaminação dos explantes, principalmente daqueles coletados de plantas que crescem no campo sofrem variações conforme a estação do ano (PASQUAL et al., 1998).

A utilização de brotações epicórmicas para a produção de mudas realizadas através de partes vegetativas, podem ser consideradas potenciais para o cultivo *in vitro*, onde após a indução e tamanho adequado realiza-se o transplante ao meio de cultura (COLIN, 2010). Porém, cada espécie apresenta uma resposta diferente e isso pode depender de genótipos, época de colheita dos galhos, fisiologia da planta e fitossanidade (WENDLING, 2009).

3.3. Estabelecimento e multiplicação *in vitro*

A fase de estabelecimento *in vitro* é a que apresenta maiores dificuldades na micropropagação, devido as espécies lenhosas possuírem muitos fenóis e de difícil descontaminação dos explantes (CAMOLESI, 2007). Esta fase é responsável por disponibilizar as condições necessárias para o crescimento dos explantes, sendo a solução nutritiva principal fonte de nutrição para os propágulos (PICOLOTTO, 2007).

A solução nutritiva consiste na combinação de macronutrientes e micronutrientes, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Esses componentes são quimicamente definidos e são utilizados, visando o crescimento das células, tecidos ou órgãos *in vitro*. Para tanto, os meios de cultura podem ser utilizados com as soluções nutritivas na forma semi-sólida que em sua composição possui ágar ou outro agente gelificante ou líquida (TORRES et al., 2000). Outras substâncias também podem ser adicionadas ao meio de cultura como fungicidas, antibióticos e antioxidantes.

A temperatura do ambiente onde serão armazenados os recipientes com os explantes já inoculados é muito importante, uma vez que os materiais vegetais e os meios nutritivos possuem uma temperatura ótima para que o processo de desenvolvimento. Essa temperatura pode variar conforme a espécie, mas geralmente a temperatura da sala de crescimento é em torno de 23°C a 27°C (CID, 2014).

Além disso fatores como fotoperíodo, comprimento de onda e a intensidade luminosa no cultivo *in vitro*, também influenciam no crescimento e na morfogênese e assim como a temperatura devem ser regulados com base na espécie (ALI et al., 2019).

Atualmente, um dos principais problemas na condução de experimentos *in vitro* tem sido a contaminação. As principais fontes de contaminação são o explante e o ambiente (PIERIK, 1997). As plantas matrizes localizadas em campo, podem apresentar uma enorme variedade de patógenos que são inofensivos às plantas, mas que quando presentes em meio de cultura se multiplicam rapidamente afetando o desenvolvimento dos explantes inoculados devido à competição pelo mesmo meio de cultura ou pela alteração composição do meio (CARVALHO, 1988). Os principais contaminantes do cultivo *in vitro* são os fungos e bactérias, a ocorrência desses patógenos está muito relacionada também a umidade relativa do ar, uma vez que estes ambientes são mais propícios para o desenvolvimento desses microrganismos (PIERIK, 1997).

O processo de desinfestação é uma das etapas mais importantes e é nessa fase que é realizado a assepsia dos explantes. Atualmente, uma das maiores dificuldades em se propagar *in vitro* uma espécie é a obtenção de explantes livres de vírus, bactéria e fungos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ROCA; MROGINSKI, 1991). Muitos experimentos têm sido afetados pelas altas taxas de contaminação, que acaba diminuindo o número de explantes adequados para o estabelecimento *in vitro* (LOPES, 1996; PASQUAL et al., 1998). As condições fitossanitárias da planta matriz também devem ser observadas, sendo importante a adoção de medidas de controle no campo através da aplicação de fungicidas, inseticidas e bactericidas (PASQUAL et al., 1998).

Os explantes coletados devem ser lavados em água corrente para a remoção superficial de agentes contaminantes. Em seguida, o processo de desinfestação deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, mantido sob condições assépticas. Além disso, o sucesso da desinfestação está associado ao tipo de pré-tratamento e tratamento que será utilizado em cada tipo de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A oxidação fenólica é um problema encontrado no estabelecimento *in vitro* de espécies florestais. As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário, como os polifenóis, substâncias importantes para o metabolismo e defesa, mas no cultivo *in vitro* causam a inibição do crescimento e a morte dos explantes (MONACO et al., 1977; ROSA et al., 2009).

As espécies florestais nativas principalmente as lenhosas, apresentam substâncias que auxiliam no metabolismo para produção de fenois. Para o cultivo *in vitro*, esta oxidação fenólica é um dos principais problemas no início do estabelecimento e durante o cultivo de explante (BASSAN, 2006). Dentre os principais fenóis produzidos pelas plantas estão os flavonóides que são compostos fenólicos derivados da flavona e os taninos. Os taninos podem ser de dois tipos, o tanino hidrolisáveis e condensados, onde o condensado consiste em polímeros de flavonóides com monômeros unidos por uma ligação do tipo carbono-carbono (MONTEIRO et al., 2005). Já taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e de ácido hexa-hidroxi-difênico e glicose, além de outros polióis (COSTA et al., 2000).

Os tecidos vegetais recém cortados, tendem a exsudar elevadas quantidades de fenóis e taninos no meio de cultura, em resposta ao fermento causado. Este processo dificulta a absorção de metabólitos no cultivo *in vitro* (ANDRADE, 2000). A oxidação fenólica é algo natural nos tecidos vegetais, e acarreta no escurecimento do material inoculado (GONÇALVES, 2013). O escurecimento ocorre devido a presença de enzimas que contém íons cobre, que quando oxidam os fenóis formam e polimeriza substâncias de coloração amarelada, conhecidas como quinonas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984; MONACO et al., 1977).

A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado. Teixeira (2001) ressalva que o uso de explantes jovens (mais herbáceos) oxidam menos que explantes mais velhos (mais lenhosos). Afim de minimizar a quantidade de oxidação fenólica liberada pelo explante, a utilização de antioxidantes é uma alternativa. Os antioxidantes são adicionados ao meio de cultura e dentre os principais encontrados no mercado, estão: ácido cítrico, ácido ascórbico, PVP e carvão ativado (WERNER, 2009).

Os antioxidante atuam na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metabólicos ou na redução dos peróxidos para produtos incapazes de formar radicais livres com potencial para se oxidar. A ação do carvão ativado ocorre por meio de suas cargas residuais, que conseguem aderir as substâncias fenólicas ou os produtos oriundos de sua oxidação (TAIZ; ZEIGER, 2004). O PVP é utilizado para realizar a separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis através de ligações (TEIXEIRA, 2004). Já os ácidos cítrico e ascórbico reagem com metais, impedindo que eles oxidem (ARAÚJO, 1985; TAIZ; ZEIGER, 2004). Outro fator que auxilia na biossíntese e oxidação fenólica é incubar os explantes no escuro, pois as atividades das enzimas são aumentadas pela incidência de luzes (MELO, 2001).

Em pesquisa realizada por Oliveira et al. (2011) o uso do antioxidante PVP na concentração 0,4% foi eficiente na redução da oxidação independente da cultivar de banana utilizada. No trabalho realizado por Handa et al. (2001), com a espécie nativa *Aniba rosaeodora*, também se obteve como resultado que o uso do ácido ascórbico em ápices caulinares e segmentos nodais e de PVP em meio de cultura, foram fundamentais na redução da oxidação dos explantes *in vitro*.

A busca por tentar controlar a oxidação fenolica é de extrema importancia para avançar nas demais etapas da micropropagação. A utilização de antioxidantes se torna fundamental para controlar os fenóis liberados pelos explantes e assim avançar para a etapa de multiplicação *in vitro*.

A fase de multiplicação *in vitro* de espécies vegetais, tem como principal propósito produzir o maior número de plantas em menor espaço de tempo. Para que isso aconteça, a regulação hormonal é imprescindível. Dentre os reguladores vegetais mais utilizados, temos as auxinas, citocininas, giberelina, ácido abscísico e etileno. Os reguladores de crescimento são aplicados diretamente nos materiais vegetais cultivados *in vitro* via meios de cultura. A ação destes reguladores podem inibir, promover ou retardar o crescimento vegetativo.

Os reguladores de crescimento também desempenham um fator determinante nos eventos morfogênicos *in vitro*, sendo que algumas espécies requerem concentrações e tipos específicos dessas substâncias, enquanto outras conseguem sintetizar os hormônios vegetais em quantidades que precisam (PIERIK, 1997). Os reguladores mais utilizados no cultivo *in vitro* são as auxinas e as citocininas, que

tem como função regular o crescimento e o processo de morfogênese dos tecidos e órgãos (QUISEN; ANGELO, 2008).

A citocinina é um hormônio vegetal sintetizado naturalmente pelas plantas em maior proporção. Porém, no cultivo *in vitro* as citocininas sintéticas, como exemplo o 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina(KIN), zeatina (ZEA) e thidiazuron (TDZ). correspondem aos principais reguladores de crescimento empregados na etapa de multiplicação.

Segundo Ribeiro et al., (2021), a medida que se aumentou a concentração de BAP em *Hylocereus undatus*, o número de brotações aumentou gradativamente. Por sua vez, a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP em *Anadenanthera macrocarpa*, proporcionou maiores números de brotações em segmentos cotiledonares (MIRANDA et al., 2020). Em estudos com pessegueiro Grigolo (2020) constatou que a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ proporcionou melhor porcentagens de germinações em embriões.

4. REFERÊNCIAS

- ALI, A. A.; IBRAHIM, M. M.; HASSANIN, A. A. Evaluation two different bananas ecotypes (cv. Grand Nine) under *in vitro* culture conditions. **Sciences**, v. 9, n. 01, p. 201-209, 2019.
- AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Brasília: Proimpress, 2018. 108p.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1985. 355p.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; Flôres, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.) 1. **Ciência Florestal**, v. 16, p. 381-390, 2006.
- BICHARA, J.-P.; BEZERRA, R. DE A. A participação das cidades no combate à mudança climática: a omissão do município de natal. **Revista FIDES**, v. 13, n. 1, p. 60-79, 29 abr. 2022.
- CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T. D.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira 'maçã'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1237-1241, 2007.
- CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. A. Estrutura do pericarpo de *Myracrodruon ururuieuve* Fr. Aliem. (Anacardiaceae). In: **CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA**, 49., 1998, Salvador. Resumos. Salvador: Universidade Federal da Bahia/Instituto de Biologia, 1998. p.53.
- CARVALHO, P. E. R. **Aroeira verdadeira**. Embrapa Florestas - Circular Técnica (INFOTECA-E),. 1.ed. Colombo:Embrapa Florestas,2003,16p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisas Florestais, 1994. 640p.
- CID, L. P. B. **A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v. 19, 2001. p. 16-21.
- COLIN, F.; MECHERGUI, R.; DHÔTE, J. F.; FONTAINE, F. Epicormic ontogeny on *Quercus petraea* trunks and thinning effects quantified with the epicormic composition. **Annals of Forest Science**, v. 67, n. 8, p. 813- 813, 2010.
- COSTA, T. D. S. A.; DOS SANTOS, J. R.; GARRUTI, D. D. S.; FEITOSA, T. **Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de**

caju (*Anacardium occidentale* L.). Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 18, n. 1, 2000.

COSTA FILHO, R. T. **Crescimento de mudas de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. Ali.) Engl. em resposta à calagem, fósforo e potássio**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, n. 1, p. 1-07, 1987.

CRUZ, R. B.; DE SOUZA MARIANO, R.; PEREIRA, M. Inventário de arborização de 12 praças no município de Ituverava-SP. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2008.

DE MEDEIROS, M. L. D.; DOS SANTOS, R. V.; TERTULIANO, S. S. X. Avaliação do estado nutricional de dez espécies arbóreas ocorrentes no semi-árido paraibano. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 3, p. 31-39, 2008.

DURIGAN, G.; ENGEL, V. L.; TOREZAN, J. M.; MELO, A. C. G. D.; MARQUES, M. C. M.; MARTINS, S. V.; REIS, A.; SCARANO, F. R. Normas jurídicas para a restauração ecológica: uma barreira a mais a dificultar o êxito das iniciativas?. **Revista Árvore**, v. 34, p. 471-485, 2010.

FEHÉR, A. Callus. Dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 536, 2019.

FELICIANO, A. L. P. **Estudo da germinação de sementes e desenvolvimento de muda, acompanhado de descrições morfológicas, de dez espécies arbóreas ocorrentes no Semi-Árido nordestino**. 1989. 114f. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1989

FERREIRA, M. **Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal**. Série Técnica IPEF. Piracicaba. n. 45, p. 22-30, 1992.

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

GONÇALVES, T.S.; BARBOSA, W.M.; NANNETTI, D.C.; SANTOS, L.G.M.; CAPRONI, D.T.R.; MELO, F. Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L. In. **IV Jornada Científica e Tecnológica e II Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS**. Inconfidentes - MG. 2013.

GUARIM NETO, G. Plantas do Brasil: angiospermas do Estado de Mato Grosso - Pantanal. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.5, n.1, p. 25-47, 1991.

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

HANDA, L.; SAMPAIO, P. de T. B.; QUISEN, R. **Estabelecimento *in vitro* de explantes de Pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke)**. In. IV Encuentro Latinoamericano De Biotecnologia Vegetal, 2001.

HARTMAN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. D. **Plant propagation: principles and**

practices. Prentice-Hall/Englewood Cliffe, New Jersey. v.5, p.459-521, 1990.

HEILAND, L.; KUNSTLER, G.; RUIZ-BENITO, P.; BURAS, A.; DAHLGREN, J.; HÜLSMANN, L. Divergent occurrences of juvenile and adult trees are explained by both environmental change and ontogenetic effects. **Ecography**, v. 2022, n. 3, p. 17, 2022.

HENAO, L. M. M. **Cultivo de tejidos vegetales**. Medellin: Universidad Nacional de Colômbia, 1991, 77p.

HERINGER, E. P.; FERREIRA, M. B. Aroeira, gonçalo e gibatão: o gênero *Astroníum* e sua importância florestal. **Cerrado**. Brasília, v.s. n.2, p.24-33, 1973.

KULUS, D.; WOŹNY, A. Influence of light conditions on the morphogenetic and biochemical response of selected ornamental plant species under *in vitro* conditions: a mini-review. **BioTechnologia**, v. 101, n. 1, p. 75-83, 2020.

LOPES, C. A. **Contaminacao bacterianas em culturas de tecidos: o que sao e como controlar**. EMBRAPA-CNPQ, Brasilia, DF: Embrapa . p. 6 ,1996.

LOPES, E.C.S.; SANTOS, D.S.B. dos; VIEIRA, SANTOS FILHO, B.G. dos; VIANA, A.M; MANTELL, S.H. Efeito do hipoclorito de sódio e benlate na assepsia de embriões de ucuúba (*Virola surinamensis* (Rol) Warb), visando a germinação *in vitro*. In: **Seminário de Iniciação Científica da FCAP,7.; Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental**, 1. Resumos. Belém: FCAP. p.280-282, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, v.1.p. 385,1992.

MELO, B. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento de plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira *Syagrus oleracea* (MART.) BECC. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301–1306, 2001

MIRANDA, J. S.; SANTANA, A. D. L. B.; NASCIMENTO, A. R.; DIDOLANVI, O. D.; SANTOS, E. N.; MENEZES, A. C. P.; DE SOUZA, A. V. V. Tipos de explantes e concentração de BAP (6-benzilaminopurina) no estabelecimento *in vitro* de angico-vermelho. **Revista Ouricuri**, v. 10, n. 1, p. 1- 8, 2020.

MONACO, L. C.; SUNDAHL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. Berlin: **Springer-Verlag**, p.109-126. 1977.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P. D., ARAÚJO, E. D. L.; AMORIM, E. L. C. D. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MOTTA, M. L.; BENVENUTI, R. D.; ANTUNES, E. C. Aplicação dos estudos fitossociológicos ao reflorestamento ciliar do Vale do Rio Turvo-GO. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE**

ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto. Do substrato ao solo: trabalhos voluntários. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.558-571, 1997.

OLIVEIRA, H. S. D.; LEMOS, O. F. D.; MIRANDA, V. S.; MOURA, H. C. D. P.; CAMPELO, M. F.; SANTOS, L. R. R. D. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa spp.*)**. Acta Amazonica, v. 41, p. 369-376, 2011.

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

OLIVEIRA, M.C.; RIBEIRO, J.F. Enraizamento de estacas de *Euplassa inaequalis* (Pohl) Engl. de mata de galeria em diferentes estações do ano. **Bioscience Journal**, v.29, p.991-999, 2013.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; DOS SANTOS, P. E. T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas**. Colombo: Embrapa Florestas- Documentos (INFOTECA-E), p. 67, 2011.

PAREYN, F.; ARAUJO, E. D. L.; DRUMOND, M.; MIRANDA, M. D. A.; SOUZA, C., SILVA, A. D. S.; MARQUES, K. ***Myracrodruon urundeuva*: Aroeira**. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E),p.766-772, 2018.

PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de embriões**. Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, Brasília, v.9. p. 2-12, 1988.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMAN, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações — meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE. p.127, 1998.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; DE SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2007.

PIERIK, R. L. M.. ***In vitro* Culture of Higher Plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 348p, 1997.

QUISEN, R. C.; ÂNGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus : Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E),p 48,2008.

RAJPUT, R. S.; JANI, M. D.; SASIKUMAR, J. K.; MANOKARI, M.; SHEKHAWAT, M. S. An improved micropropagation protocol for manga bamboo - *Pseudoxytenanthera stocksii* (Munro) TQ Nguyen. **World News of Natural Sciences**, v. 25, p 141-154, 2019.

RIBEIRO, C. H. M.; CARLOS, R. P.; BONIFÁCIO, T. C.; DE SOUZA, M. M.; DA PAZ, J. I. V.; TAVARES, Q. G.; PONTES, D. S.; DIAS, M. V.; ABRANCHES, M. D. O.; CURTI, P. N. Indução *in*

in vitro de brotações em explantes de pitaia vermelha em diferentes concentrações de BAP. **Revista Científica Rural**, v. 23, n. 2, p. 80.

ROCA, W. M.; MORGINSKI, L. A. **Cultivo de tecidos em la agricultura: Fundamentos e aplicações**. Cali: CIAT. 1991, 970p.

ROSA, F. C. **Superação da dormência de sementes e cultivo *in vitro* de bracatinga (*Mimosa scabrella Benth.*)**. Dissertação(Mestrado em engenharia florestal)-Santa maria,Rio Grande do Sul, p. 52,2009.

SANTIN, D. A.; LEITÃO FILHO, H. F. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Alemão (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.14, n.2, p.133-145, 1991.

SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes.**Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 152-157, 2011.

SOUZA, S. M.; LIMA, P. C. F. Caracterização de sementes de algumas espécies florestais nativas do Nordeste. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p.1156-1167. Publicado na Silvicultura em São Paulo, 1982, v.16 A, parte 2, 1982.

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**, v. 53, p. 985-1002, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. e. 4. p. 848, 2004.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia,p. 38, 2001.

TORRES, A. C., FERREIRA, A. T., DE SÀ, F. G., BUSO, J. A., CALDAS, L. S., NASCIMENTO, A. S., ROMANO, E. **Glossario de biotecnologia vegetal**,e. 1. p. 131, 2000.

WENDLING, I., DUTRA, L. F., HOFFMANN, H. A., BETTIO, G., & HANSEL, F. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**.v. 33. p. 309-319, 2009.

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, KAMILA, V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

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

5. CONTROLE DA OXIDAÇÃO FENÓLICA NO CULTIVO *in vitro* DE *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl

RESUMO

Astronium urundeuva (aroeira do sertão) é uma das espécies nativas com potenciais silviculturais para exploração madeireira. No cultivo *in vitro* da espécie tem-se observado dificuldades como a oxidação fenólica, principalmente a partir de explantes coletados de árvores matrizes adultas. Dessa forma, a utilização de explantes originários de sementes é uma alternativa para a propagação da espécie, afim de minimizar a oxidação. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a ação de ácido ascórbico, carvão ativado e polivinilpirrolidona no controle da oxidação fenólica no cultivo *in vitro* de *A. urundeuva*. Brotações apicais obtidas a partir de plântulas de *A. urundeuva* germinadas *in vitro* foram utilizadas como explantes. Estes foram subcultivados em meio de cultura MS50%, acrescido dos antioxidantes ácido ascórbico (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹) carvão ativado (3,0; 6,0; 9,0 e 12 g.L⁻¹) e polivinilpirrolidona (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g.L⁻¹). Transcorridos 31 dias de cultivo *in vitro*, o ácido ascórbico, carvão ativado e PVP nas concentrações de 0,2 mg.L⁻¹, 12 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹ respectivamente, foram efetivos no controle de oxidação fenólica. O carvão ativado nesta concentração controlou totalmente a oxidação fenólica das plântulas. Os resultados deste trabalho demonstram a viabilidade dos antioxidantes na minimização dos efeitos da oxidação fenólica, especialmente com o uso do carvão ativado e abre perspectivas para maiores estudos de micropropagação de *A. urundeuva*, tanto de materiais genéticos juvenis quanto adultos, contribuindo para a sua conservação e auxiliando em trabalhos de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: Aroeira do sertão; Brotações juvenis; Antioxidante.

CONTROL OF PHENOLIC OXIDATION IN THE *in vitro* CULTURE OF *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl

ABSTRACT

Astronium urundeuva (aroeira do sertão) is one native species with silvicultural potential for logging. In the *in vitro* cultivation of the species, difficulties such as phenolic oxidation have been observed, mainly from explants collected from adult matrix trees. Thus, the explants originating from seeds are an alternative for the propagation of the species to minimize oxidation. In this context, the study aimed to evaluate the action of ascorbic acid, activated charcoal, and polyvinylpyrrolidone in controlling phenolic oxidation in the *in vitro* culture of *A. urundeuva*. Apical shoots obtained from seedlings of *A. urundeuva* germinated *in vitro* were used as explants. They were cultivated in MS50% culture medium plus ascorbic acid (0.2; 0.4; 0.6, and 0.8 mg.L⁻¹) and activated charcoal (3.0; 6.0; 9.0, and 12 g.L⁻¹) and polyvinylpyrrolidone (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 g.L⁻¹). After 31 days of *in vitro* culture, ascorbic acid, activated charcoal, and PVP at concentrations of 0.2 mg.L⁻¹, 12 g.L⁻¹ and 1.5 g.L⁻¹, respectively, were effective in controlling phenolic oxidation. At this concentration, activated charcoal completely regulated the phenolic oxidation of the seedlings. The results of this work demonstrate the feasibility of antioxidants in minimizing the effects of phenolic oxidation, especially with the use of activated charcoal, and open perspectives for further studies of micropropagation of *A. urundeuva*, both in juvenile and adult genetic materials, contributing to its conservation and assisting in the genetic improvement of the species.

Keywords: Aroeira do sertão; Juvenile shots; Antioxidant.

5.1.INTRODUÇÃO

A aroeira (*Astronium urundeuva*) é uma espécie arbórea nativa da família Anacardiaceae, com distribuição geográfica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sul, sendo encontrado em formações vegetais dos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORA DO BRASIL, 2022; SILVA-LUZ; PIRANI, 2014). A aroeira é uma espécie de importância econômica em razão da sua madeira de grande valor agregado, das propriedades farmacológicas e também do mel obtido a partir da sua florada (BRASIL et al., 2016; DEMIER, 2018). Apesar dos múltiplos usos da espécie e do interesse econômico em torno da espécie, a exploração ainda ocorre de forma unicamente extrativista, o que resultou em uma severa redução nas populações naturais (MONTEIRO et al., 2005; PACHECO et al., 2006). Em decorrência disso, com o eminente risco de extinção da *A. urundeuva*, a mesma foi incluída na lista oficial brasileira de espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 2008; MMA, 2008). Assim, os estudos sobre a sua propagação são necessários, a fim de garantir estratégias de conservação e exploração sustentável desta espécie em longo prazo.

A produção comercial de mudas de *A. urundeuva* é realizada exclusivamente via seminífera, porém a utilização de técnicas de propagação assexuada é uma importante ferramenta para a manutenção de genótipos superiores e a obtenção de plantas sadias (XAVIER et al., 2013). Nesse contexto, a micropropagação é uma ferramenta potencial que auxiliaria e/ou substituiria os métodos de propagação já utilizados, visto que o cultivo *in vitro* permite a produção de mudas (HUNG et al., 2016; ISAH, 2016). Para que a micropropagação seja bem-sucedida depende-se dos fatores inerentes ao tecido vegetal (BORGES et al., 2012; SCHUCH et al., 2008;), como também do meio de cultura, dos reguladores de crescimento e das condições do microambiente *in vitro* (BASSAN et al., 2006; GOLLE et al., 2012; JARDIM et al., 2010). Diante disso, para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação para uma determinada espécie, é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro*.

A introdução de culturas *in vitro* é muitas vezes um passo desafiador na micropropagação, especialmente para espécies nativas e lenhosas que apresentam oxidação fenólica e contaminação fúngica e/ou bacteriana (ALFENAS et al., 2009; YOSHIKO; TEIXEIRA, 2001). Os compostos fenólicos são substâncias que fazem parte do metabolismo secundário da planta e normalmente servem para proteger os tecidos da planta contra injúria, insetos e ataque de animais (VIZZOTTO et al., 2010). Por definição química, os compostos fenólicos são as substâncias que possuem pelo menos um anel aromático em que pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esses compostos são sintetizados a partir das rotas metabólicas do ácido chiquímico e do ácido mevalônico, sendo a última menos significativa (VIZZOTTO et al., 2010). No cultivo *in vitro*, os danos causados nas células durante a excisão dos propágulos vegetativos estimulam o processo de oxidação das substâncias fenólicas resultando no escurecimento do meio de cultura e morte do explante (AHMAD et al., 2013; CASSELLS; CURRY, 2001). Alguns métodos para redução da oxidação fenólica podem ser utilizados, incluindo o uso de substâncias antioxidantes, redução de danos mecânicos e químicos, lavagem dos propágulos vegetativos em água corrente, o uso de meios básicos mais diluídos, remoção de substâncias fenólicas, entre outros (XAVIER et al., 2009).

Os antioxidantes agem na inativação dos radicais livres, na complexação dos íons metabólicos ou na redução dos peróxidos para produtos incapazes de formar radicais livres com potencial de oxidar

(ARAÚJO, 1985). Na micropropagação, dentre as substâncias adicionadas ao meio de cultura com função antioxidante temos o ácido ascórbico, a polivinilpirrolidona (PVP) e o carvão ativo (LAL et al., 2021). Essas substâncias podem atuar inibindo a síntese ou a atividade de enzimas ligadas à oxidação de polifenóis ou atuando como adsorventes dessas substâncias.

Com isso, este trabalho tem como objetivo determinar as melhores concentrações de carvão ativado, ácido cítrico e PVP para o controle de oxidação fenólica na fase de estabelecimento *in vitro* de *A. urundeuva*.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Melhoramento Florestal, situado no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA) do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), no município de Montes Claros, Minas Gerais (latitude 16°40'59,7" S, longitude 43°50'21,9" W, altitude 680 m).

Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes

Os diásporos de *A. urundeuva* coletados no mês de setembro, a partir de 21 matrizes localizadas num fragmento de Cerrado localizado no município de Montes Claros/MG, foram encaminhados ao laboratório para beneficiamento manual, que consistiu na remoção dos cálices dos diásporos e a seleção daqueles que não apresentavam visualmente fruto-semente vazios (ausência dos tecidos), danos físicos e/ou causados por insetos. Na assepsia, os diásporos selecionados foram colocados em água corrente por 10 minutos e, em seguida, foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0 - 2,5% (v/v) de cloro ativo por 15 minutos. Ao final da assepsia, foram enxaguados com água deionizada e autoclavada por três vezes e inoculados verticalmente em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais (MS50%), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8 h (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2 °C.

Controle da oxidação fenólica

Plântulas com 25 dias de idade, contados a partir da emergência da radícula, foram utilizadas como fonte de explantes. Para tanto, a raiz foi excisada das plântulas e somente a parte aérea foi utilizada como explante e inoculados em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 mL do meio de cultura MS com metade da concentração de sais, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8 h (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2 °C.

Diferentes concentrações de três agentes antioxidantes foram adicionados separadamente ao meio de cultura básico de multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva* (TABELA 1).

TABELA 1. Descrição das concentrações dos antioxidantes ácido ascórbico (AA), carvão ativado (CA) e polivinilpirrolidona (PVP) visando o controle da oxidação fenólica na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*.

Tratamento	Ácido Ascórbico (mg/L)	Carvão Ativado (g/L)	Polivinilpirrolidona (g/L)
1	0,2	-	-
2	0,4	-	-
3	0,6	-	-
4	0,8	-	-
5	-	3,0	-
6	-	6,0	-
7	-	9,0	-
8	-	12,0	-
9	-	-	0,5
10	-	-	1,0
11	-	-	1,5
12	-	-	2,0

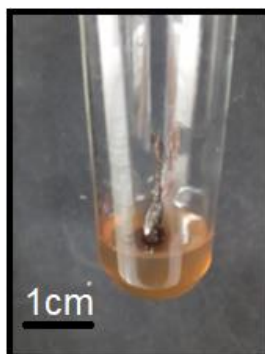
Transcorridos 30 dias após o início do experimento, realizou-se a avaliação do número de brotações e sobrevivência dos explantes. Na avaliação considerou-se explantes sobreviventes aqueles sem quaisquer distúrbios fisiológicos e/ou necroses parcial ou total da parte aérea.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, contendo 12 tratamentos, cada um composto por 16 repetições. Os dados mensurados foram analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade ($P > 0,05$), respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão polinomial ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote ExpDes.pt do software estatístico RStudio®, versão 3.5.3.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A micropropagação de espécies florestais a partir de material maduro coletado de árvores matrizes selecionadas é um dos meios de propagação de genótipos superiores para um determinado fim, especialmente aqueles oriundos programas de melhoramento (SILVA et al., 2021). Entretanto, para espécies florestais nativas há uma enorme carência de estudos a respeito da propagação *in vitro* de genótipos adultos. Diante disso, pesquisas dentro desse tema são essenciais para superar obstáculos à expansão da silvicultura de nativas no Brasil. Inicialmente estudos preliminares foram conduzidos com brotações epicórmicas oriundas de matrizes adultas de *A. urundeuva*. No cultivo *in vitro* destas brotações, houve intensa oxidação do meio e dos explantes em meio de cultura MS meia força, com sua morte após 2 dias de inoculação (FIGURA 1). Neste contexto, frente à escassez de informações na literatura e os entraves na micropropagação de explantes de material adulto, optou-se por investigar o efeito dos antioxidantes na multiplicação *in vitro* de explantes seminais de *A. urundeuva*.

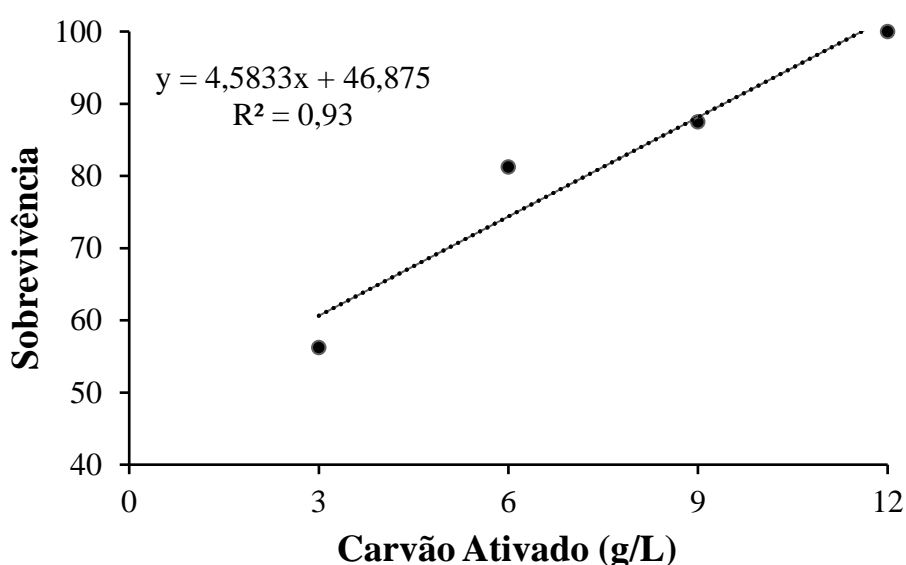
FIGURA 1. Oxidação fenólica de brotações epicórmicas de *A. urundeuva* após 2 dias de inoculação em meio de cultura MS50%, suplementado com antioxidantes. Barra = 1 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

A utilização do carvão ativado como agente antioxidante na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva* foi eficiente no controle da oxidação fenólica. Houve redução drástica da oxidação fenólica com o aumento das concentrações de carvão ativado utilizadas, obtendo-se 100% de sobrevivência dos explantes na concentração de 12 g L⁻¹ (FIGURA 2). Ademais, o fato dos explantes serem de origem seminal pode ter contribuído para a minimização da oxidação fenólica. A rota metabólica do chiquimato, responsável pela produção de fenóis em plantas, provavelmente é ativada com maior intensidade em tecidos maduros das árvores (OLIVEIRA et al., 2013). Nos tecidos juvenis, as células ainda não passaram por um processo de diferenciação tão pronunciado, com a expressão gênica responsável pela ativação das rotas metabólicas de produção de fenóis e, conseqüentemente irão apresentar problemas menores quanto à oxidação fenólica.

FIGURA 2. Porcentagem de explantes sobreviventes (%) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS50%, suplementado com diferentes concentrações de carvão ativado.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

As brotações de *A. urundeuva* desenvolvidas no meio de cultura suplementado com carvão ativado apresentaram bom vigor vegetativo (FIGURA 3), resultado semelhante ao encontrado para *Swietenia macrophylla* (LAMEIRA et al., 2001), *Sequoia sempervirens* (MENEGUZZI et al., 2020) e *Khaya ivorensis* (AZEVEDO, 2018). Por outro lado, apesar da eficiência do carvão ativado no controle da oxidação, altas concentrações do mesmo no meio de cultura poderá ser um empecilho. Isso decorre do fato de que o carvão ativado atua como adsorvente no meio de cultura, fazendo com que se adsorva tanto substâncias fenólicas quanto componentes no meio, como os nutrientes e reguladores (LENCINA et al., 2018). Em decorrência disso, no cultivo *in vitro* pode ocasionar nos explantes deficiências nutricionais (MENEGHETTI, 2020). Recomenda-se então realizar o subcultivo das brotações para um novo meio de cultura no tempo máximo de 30 dias, afim de minimizar possíveis efeitos sobre as brotações com a utilização de altas concentrações de carvão ativado.

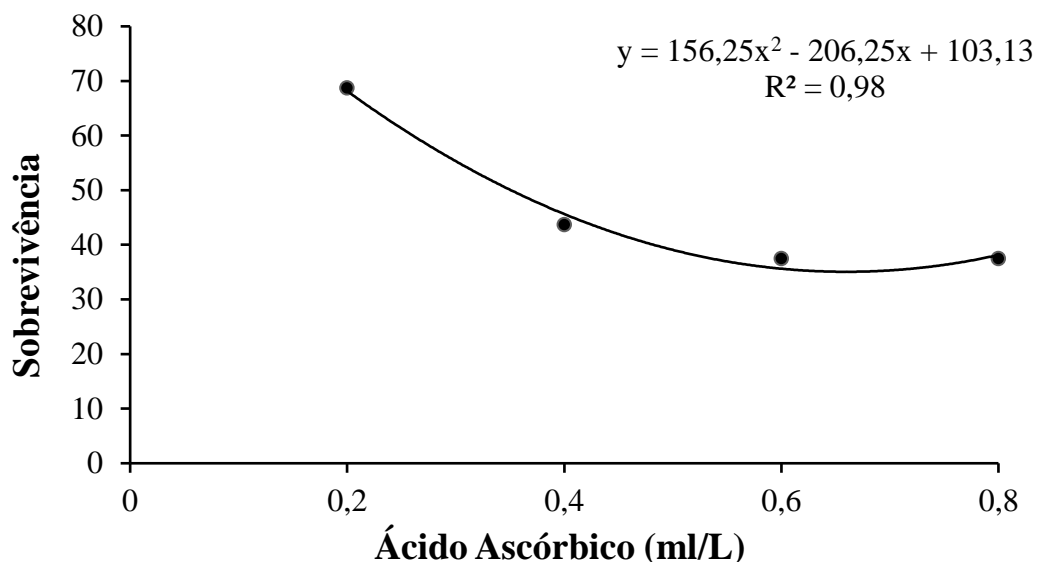
FIGURA 3. Aspecto visual de brotação de *A. urundeuva* apresentando adequado vigor fisiológico no meio de cultura MS meia força, suplementado com 12 g L⁻¹ de carvão ativado, após 30 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

O ácido ascórbico atua no controle da oxidação fenólica pela inativação dos radicais de oxigênio. Esses radicais são liberados pelo explantes e potencializados na presença de luz. Quando se efetua o corte do segmento o ácido ascórbico atua na inibição dos radicais liberados no fermento causado (VERDE et al., 2021). Na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*, houve um decréscimo na efetividade do controle de oxidação fenólica das brotações, na medida em que aumentou-se a concentração de ácido ascórbico (FIGURA 4).

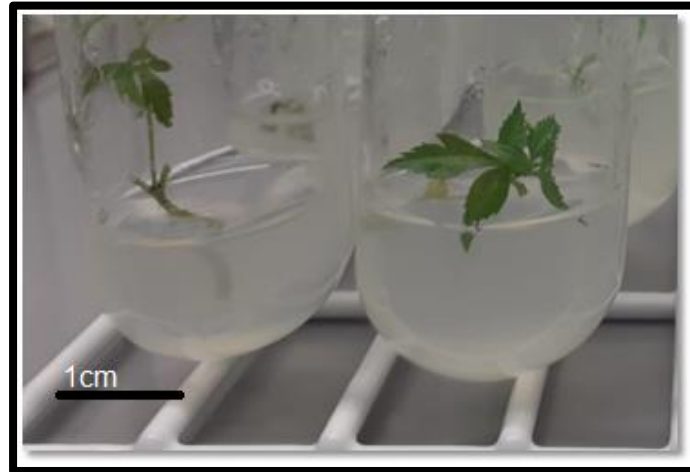
FIGURA 4. Porcentagem de explantes (%) sobreviventes após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS50%, suplementado com diferentes concentrações de ácido ascórbico.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

O ácido ascórbico no meio de cultura é absorvido pela planta e atua diretamente nas rotas metabólicas de síntese dos fenóis (TAIZ; ZEIGER, 2004). O resultado obtido para a multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva* com o uso do ácido ascórbico, pode estar ligado ao fato de o mesmo não ser eficaz como agentes antioxidantes dos fenóis liberados pelas brotações. Ressalta-se ainda que atrelado a ineficácia do ácido ascórbico, altas concentrações também não foram eficientes em *Malus domestica* Borkh (SCHUCH, 2003). *Astronium urundeuva* pode ser sensível ao ácido ascórbico e as concentrações utilizadas podem ter ultrapassado o limite aceitável da espécie, ocasionando a morte das brotações. Porém, as brotações sobreviventes na concentração de 0,2 mg/L, apresentaram um bom vigor fisiológico (FIGURA 5). Além disso, é importante frisar que as brotações são de origem seminal e, portanto, apresentam uma variabilidade genética, proporcionando respostas diferentes ao antioxidante e, conseqüentemente, à sua sobrevivência.

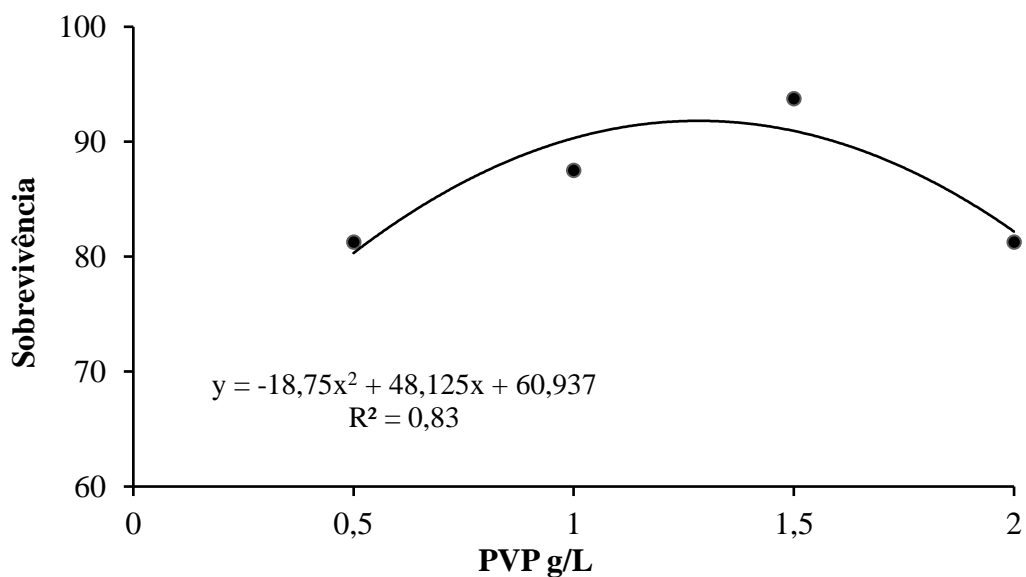
FIGURA 5. Aspecto visual de brotação de *A. urundeuva* apresentando adequado vigor fisiológico no meio de cultura MS meia força, suplementado com 0,2 g L⁻¹ de ácido ascórbico, após 30 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

O PVP inibe a liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, agindo nos tecidos em contato com o mesmo (CYD; TEIXEIRA, 2014). A oxidação fenólica das brotações de *A. urundeuva* foi reduzida à medida que se elevou as concentrações de PVP até a concentração de 1,5 g/L, a partir da qual houve um decréscimo na sobrevivência (FIGURA 6). A redução da sobrevivência das brotações de *A. urundeuva* com o PVP em dosagens elevadas, pode estar relacionada à redução da absorção de nutrientes pelos explantes, uma vez que o antioxidante forma uma espécie de camada protetora e isolante dos tecidos em contato com o meio de cultura (OLIVEIRA et al., 2018).

FIGURA 6. Porcentagem de explantes sobreviventes após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS meia força, suplementado com diferentes concentrações de PVP.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

Com isso, o acréscimo de antioxidantes a segmentos nodais, favoreceram o controle da oxidação fenólica em *Astronium urundeuva* e estabelecer a espécie *in vitro*, proporcionando assim, conduzir futuros estudos com as demais etapas da micropropagação.

5.4. CONCLUSÃO

Os antioxidantes carvão ativado, ácido ascórbico e PVP nas concentrações de 12 g/L, 0,2 mg/L e 1,5g/L, respectivamente, proporcionaram maior estabelecimento *in vitro* das brotações de *A. urundeuva*.

5.5. REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEES, M.; MARYAM, R. M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; DE ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças de eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1985. 355p.

AZEVEDO, M. L. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev)**. Dissertação (Mestrado em ciência florestal). Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. p. 111, 2018.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. D.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K.; MELO, L. A. D. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: **Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste** / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade; Vieira, R. F.; Camillo, J.; Coradin, L– Brasília, DF: MMA, 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº. 006 de 23 de setembro de 2008** Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/MMA_IN_N_6.pdf. Acesso em 20 Set. 2022.

CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145-147, 2001.

CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. - **Explante, meio nutritivo, luz e temperatura**. In: Cid, L.P.B. (Ed.) - Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: EMBRAPA. e. 1, p. 325, 2014.

DEMIER, A. D. M. **Doces matas do Norte de Minas: atores, Instituições e a obtenção do registro de indicação geográfica do mel de aroeira**. Dissertação (Mestrado em sociedade, ambiente e território). p. 134,2018.

DURIGAN, G.; ENGEL, V. L.; TOREZAN, J. M.; MELO, A. C. G. D.; MARQUES, M. C. M.;

MARTINS, S. V.; REIS, A.; SCARANO, F. R. Normas jurídicas para a restauração ecológica: uma barreira a mais a dificultar o êxito das iniciativas? **Revista Árvore**, v. 34, p. 471-485, 2010.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

HUNG, C.D.; HONG, C.H.; KIM, S.K.; LEE, K.H.; PARK, J.Y.; NAM, M.W.; CHOI, D.H.; LEE, H.I. Led light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.38, n.6, article 152, 2016.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 1-22, 2016.

JARDIM, L. S.; SAMPAIO, P. D. T. B.; COSTA, S. D. S.; GONÇALVES, C. D. Q. B.; BRANDÃO, H. L. M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

LAL, M., JAMWAL, M., BAKSHI, P., JASROTIA, A. SHARMA, N., SHARMA, M., SINGH, P., SHARMA, S. AND KUMAR, S. **Influence of Antioxidants on *in vitro* Culture Establishment of Clonal Apple Rootstocks**. Biological Forum – An International Journal, v.13, p.381-385, 2021.

LAMEIRA, O.; LOPES, S. D. C.; NOGUEIRA, R.; PINTO, J.. Micropropagação de mogno. In: Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL**, 4., 2001, Goiânia. [Trabajos presentados]. Goiânia: REDBIO, 2001. Não paginado., 2001.

LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A.; PIMENTEL, N.; KIELSE, P.; MELLO, U. S. D. Produtividade de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 150-159, 2018.

MENEGHETTI, E C. **Propagação clonal de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea***.. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. p. 100, 2020.

MENEGUZZI, A.; KONZEN, E. R.; NAVROSKI, M. C.; CAMARGO, S. S.; PEREIRA, M. D. O.; RUFATO, L.; LOVATEL, Q. C. Shoot multiplication of two *Sequoia sempervirens* genotypes with addition of small concentrations of kinetin. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo. Vol. 39 (2020), p.8, 2019.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.338-344, 2006.

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

PACHECO, M. V.; MATOS, V. P.; FERREIRA, R. L. C.; FELICIANO, A. L. P.; PINTO, K. M. S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, v. 30, n.3, p.359-367, 2006.

OLIVEIRA, B. A. S.; MOREIRA, R. M. ;SILVA, J. B. ; MACIEJEWSKI, P. ;SCHUCH, M. W .Polivinilpirrolidona no estabelecimento *in vitro* de oliveira 'Grappolo 541'. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa - Congrega Urcamp**, p. 1378-1389, 2018.

OLIVEIRA, G. L. **Topoquímica e abordagem sobre a estrutura e a conectividade lignina-fenol-parede celular em *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae)**. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e florestais).Seropedica. p. 58, 2013.

SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L. C. D.; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Climax. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. **Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4394>. Acesso em: 18 set. 2022.

SILVA, K. B. da; REINIGER, L. R. S.; RABAIOLLI, S. M. dos S.; ZIEGLER, A. C. F.; STEFANEL, C. M. Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de brotações de *Luehea divaricata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S. l.], v. 41, 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E)**, e. 1, p. 16, 2010.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 272, 2009.

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

YOSHIKO, A. S.; TEIXEIRA, H. C. D. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

6. BALANÇO HORMONAL NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl.

RESUMO

Aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*) apresenta aplicabilidade para fins terapêuticos devido às suas características farmacológicas e para uso madeireiro em razão da sua resistência e com grande durabilidade. Isso acarretou a intensa exploração da espécie, levando-a a ser incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção. Em decorrência desta situação, a micropropagação é tida como um ferramenta em potencial para a propagação e conservação *in vitro* da espécie. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ANA associada com TDZ e BAP na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*. Segmentos nodais, obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, foram utilizados como explantes. Os mesmos foram inoculados no meio de cultura MS50%, suplementado com as seguintes concentrações de ANA (0,0; 0,025 e 0,050 mg.L⁻¹) associadas com TDZ (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L⁻¹). Transcorridos 31 dias, foi avaliado o vigor dos explantes, calejamento e número de brotações. O percentual de germinação *in vitro* das sementes de *A. urundeuva* foi de 61%, demonstrando a viabilidade da técnica para iniciar a micropropagação. O maior vigor dos explantes foi obtido no meio de cultura suplementado somente com BAP, por sua vez, o TDZ induziu distúrbios fisiológicos nos explantes, como intenso calejamento e posterior necrose dos tecidos. Os resultados obtidos indicam a necessidade de maiores estudos em razão do balanço hormonal auxina/citocinas não foi favorável para a multiplicação *in vitro* da espécie. Assim, maiores investigações afim de determinar as melhores concentrações de reguladores de crescimento e também outros tipos, são necessários para a otimização da multiplicação *in vitro* de aroeira de *A. urundeuva*.

Palavras-chave: Aroeira do sertão; Micropropagação; Regulador de crescimento.

HORMONAL BALANCE IN THE *in vitro* MULTIPLICATION OF *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl.

ABSTRACT

Aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*) has applicability for therapeutic purposes due to its pharmacological characteristics and the wood used due to its resistance and excellent durability. Due to the intense exploitation, *A. urundeuva* is included on the endangered species list. A micropropagation is a potential tool for *in vitro* propagation and species conservation. Therefore, this work aims to evaluate the effect of different concentrations of NAA associated with TDZ and BAP on the *in vitro* multiplication of *A. urundeuva*. Explants were nodal segments obtained from seedlings germinated *in vitro*. They were inoculated in MS50% culture medium, supplemented with the concentrations of NAA (0.0; 0.025, and 0.050 mg.L⁻¹), TDZ (0.0; 0.25; 0.50; 0.75, and 1.00 mg.L⁻¹) and BAP (0.0; 0.25; 0.50; 0.75, and 1.00 mg.L⁻¹). After 31 days, we evaluated the vigor of explants, calluses, and the number of sprouts. The *in vitro* germination of *A. urundeuva* seeds was 61%, demonstrating that micropropagation is a feasible technique to initiate. The explants supplemented only with BAP showed greater vigor. However, TDZ induced physiological disorders in the explants, such as intense callosities and subsequent tissue necrosis. The auxin/cytokine hormonal balance was not favorable for the *in vitro* multiplication of the species. Thus, further investigations are needed to determine the best concentrations of growth regulators to optimize the *in vitro* multiplication of *A. urundeuva*.

Keywords: Aroeira do sertão; Micropropagation; Plant growth regulator.

6.1.INTRODUÇÃO

A flora vegetal do Cerrado é uma das maiores do mundo, possuindo mais de 6.000 espécies (BRASIL, 2010; MENDONÇA et al., 1998). Além de possuir um alto grau de endemismo e ocupar mais de 23,3% do território brasileiro e 54% do estado de Minas Gerais (IBGE, 2019), o Cerrado é um domínio que presta uma variedade de Serviços Ecossistêmicos (SE), incluindo serviços culturais, provisórios e regulatórios (JOLY et al., 2019). Apesar de sua importância, muitos de seus ecossistemas deram lugar à agricultura e pecuária extensiva, em detrimento de uma diversidade biológica até então desconhecida e não alterada (BRASIL, 2015; MARTINELLI et al., 2014; STRASSBURG et al. 2017). A pressão sobre a flora do Cerrado fez com que diversos ecossistemas fossem alterados por áreas com pastagens degradadas, e muitas espécies nativas foram se extinguindo devido à exploração desordenada.

Tendo em vista o cenário atual, onde as preocupações com as mudanças climáticas são crescentes, o governo brasileiro assumiu um novo compromisso na Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas 2021 (COP26), que concluiu com o Acordo de Glasgow, no qual o país se comprometeu a restaurar e reflorestar 18 milhões de hectares de floresta até 2030 e restaurar 30 milhões de hectares de pastagens degradadas (BICHARA et al., 2022). Com isso, estudo com espécies nativas vem sendo feitas a fim de auxiliar e cumprir essa meta proposta. Dentre as espécies em potenciais para recuperação e restauração do Cerrado, está a aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*).

A. urundeuva é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae e endêmica de áreas de Cerrado, ocorrendo nas regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste, Sudeste e Sul (SILVA-LUZ & PIRANI, 2016). Em virtude das suas características como a madeira de grande resistência mecânica, foi intensamente explorada e por esse motivo foi incluída na lista oficial de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (MMA, 2008). A espécie também possui grande potencial medicinal, segundo Nobre-Junior et al. (2009) as chalconas, um flavonoide encontrado em *A. urundeuva* juntamente a outras terapias, podem proporcionar benefícios ao tratamento de pacientes com lesões neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Além disso, entre os tipos de méis comercializados no Brasil, o mel de aroeira, produzido na região do norte de Minas Gerais, tem sido bastante estudado e valorizado por suas características marcantes, como sua cor escura e sabor acentuado (DEMIER, 2018). Apesar dos múltiplos usos da espécie e do interesse econômico sobre a espécie, a exploração ainda ocorre de forma unicamente extrativista, comprometendo a conservação dos recursos genéticos e a sustentabilidade das cadeias produtivas (BRASIL, 2016).

Neste contexto, a recuperação e restauração das áreas degradadas, bem como a exploração silvicultural de *A. urundeuva* depende da obtenção de sementes e mudas. Atualmente, a propagação da espécie ocorre exclusivamente de forma seminal e o mercado não tem disponível a quantidade de mudas e nem a diversidade exigida pelas normas ambientais (DURIGAN et al, 2010). Diante disso, a busca por protocolos de estabelecimentos de sementes *in vitro* podem auxiliar na dificuldade da propagação natural da espécie. O avanço no aprimoramento da propagação vegetativa pode facilitar a rápida multiplicação de genótipos de interesse, com a obtenção de mudas de qualidade e uniformes em quantidade suficiente para atender a demanda do mercado (XAVIER, 2007). A Diante das dificuldades encontradas na propagação sexuada da aroeira-do-sertão, uma alternativa para a obtenção de mudas da espécie encontra-se a micropropagação. As vantagens da micropropagação incluem a capacidade de

produzir materiais livres de doenças em larga escala e por períodos de tempo mais curtos (AITKEN-CHRISTIE et al., 1995; ARRIGONI-BLANK et al., 2011). Além disso, as técnicas de cultivo *in vitro* desempenham um papel crucial na manutenção e compartilhamento de germoplasma com genes de maior qualidade (BRAUN et al., 2010). O cultivo *in vitro* frequentemente emprega reguladores de crescimento com o objetivo de promover a proliferação das plantas.

Dentre os vários tipos de reguladores, destacam-se a classe das citocininas, que são utilizadas para promover o crescimento das plantas, estimulando a divisão celular, controlando a síntese de proteínas diretamente relacionadas à formação de fibras mitóticas e inibindo o crescimento dos sistemas aéreo e radicular, exemplos de reguladores dessa classe são o BAP (6-Benzilaminopurina) e o TDZ [thiadizurum (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)] (CASTRO et al., 2007). Outra classe importante é a das auxinas que apoiam a divisão, diferenciação e alongamento celular e estão correlacionados à dominância apical, tendo como exemplo o uso de ANA (ácido naftaleno acético), que tem auxiliado a produção *in vitro* de espécies florestais nativas.

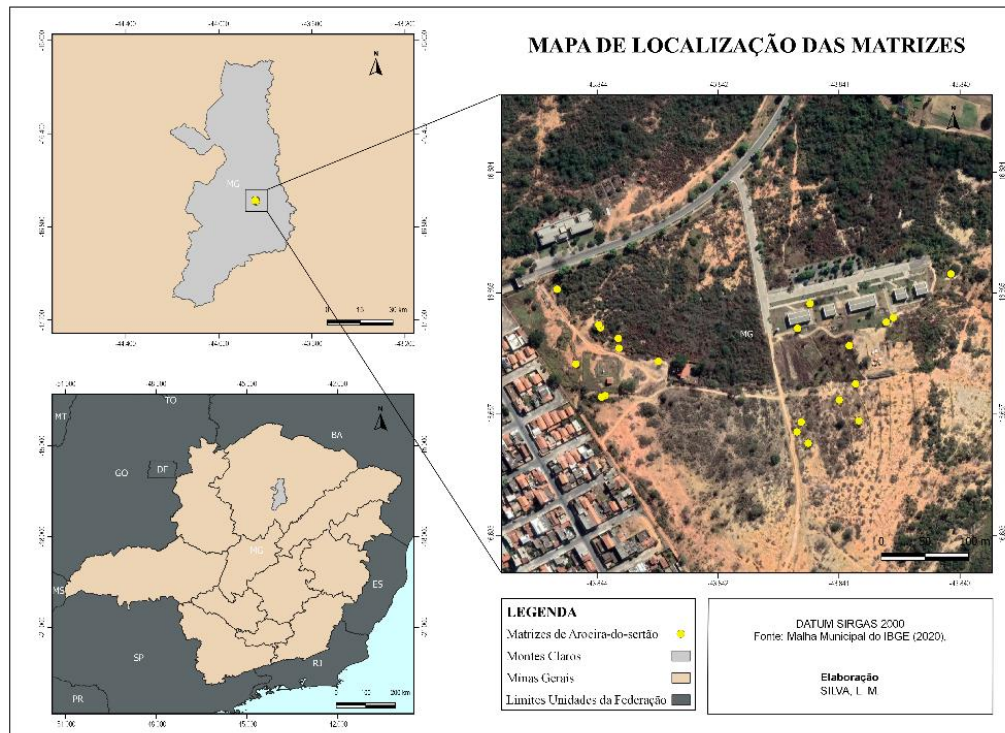
O estabelecimento de material vegetativo maduro coletado de árvores matrizes adultas apresenta altos índices de contaminação fúngica e bacteriana, além da oxidação fenólica. Nesse sentido, uma alternativa viável tem sido o cultivo *in vitro* de plântulas obtidas a partir de sementes. O material propagativo de origem juvenil apresentar maior capacidade de resposta *in vitro* em razão do menor grau de diferenciação celular e maior vigor fisiológico (STUEPP et al., 2018). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar: (1) a germinação *in vitro* de *Astronium urundeuva*, e; (2) a multiplicação de brotações de origem seminal sob diferentes concentrações de ANA em associação com BAP e TDZ afim de estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação a espécie.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Melhoramento Florestal situado no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA) no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), localizado no município de Montes Claros, Minas Gerais. A coleta dos diásporos de *A. urundeuva* foram realizadas no mês de setembro, a partir de 21 matrizes localizadas num fragmento de Cerrado localizado no município de Montes Claros/MG (latitude 16°40'59,7"S, longitude 43°50'21,9"W e altitude 680 m) (FIGURA 7). De acordo com a classificação climática Köppen (ALVARES et al., 2013) a região é caracterizada por apresentar um clima seco tropical, com precipitação anual entre 1000 - 1300 mm, inverno seco e temperatura média de 23,1°C.

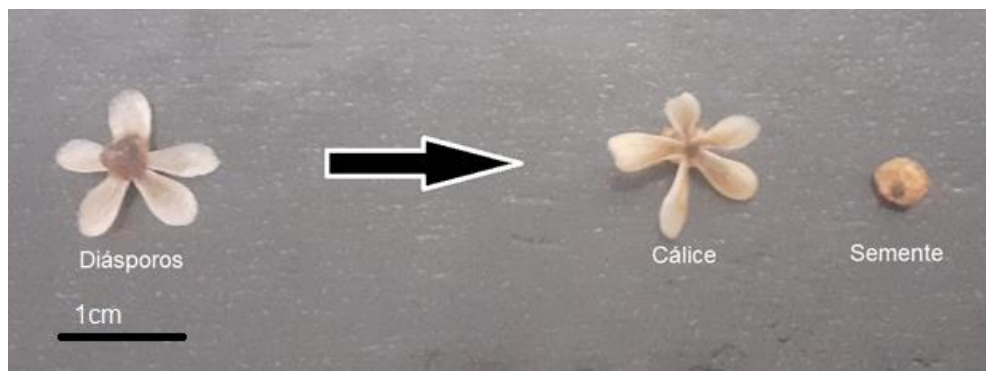
FIGURA 7. Mapa de localização das matrizes de *A. urundeuva*, utilizadas neste estudo para a coleta dos diásporos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Os diásporos coletados foram encaminhados ao laboratório, para beneficiamento manual, que consistiu na remoção dos cálices dos diásporos e a seleção daqueles que não apresentavam visualmente fruto-semente vazios (ausência dos tecidos), danos físicos e/ou causados por insetos (FIGURA 8).

FIGURA 8. Diásporos de *A. urundeuva* coletadas na cidade de Montes Claros - Minas Gerais.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

Germinação *in vitro*

Os diásporos selecionados foram colocados em água corrente por 10 minutos e, em seguida, foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0 - 2,5% (v/v) de cloro ativo por 15 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados com água deionizada e autoclavada por três vezes e inoculados verticalmente em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8 hs (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2°C.

Na germinação de *A. urundeuva* foram realizadas 9 avaliações em um período de 31 dias após a inoculação. Durante as avaliações determinou-se o número protrusão radicular, número de plântulas e sementes não germinadas. A protrusão radicular foi definida como a emissão da radícula igual ou superior a 1 mm. As plântulas foram classificadas como aquelas que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e apresentaram todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e saudáveis. Já as sementes não germinadas corresponderam àquelas que apresentaram ausência do embrião ou algum tipo de dano.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, contendo 390 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 1 semente. Os dados mensurados foram analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade ($P > 0,05$), respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão polinomial ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote ExpDes.pt do software estatístico RStudio®, versão 3.5.3.

Multiplicação *in vitro*

Na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*, as brotações foram obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*. Para tanto, as sementes foram colocadas em água corrente por 10 minutos e, em seguida, foram imersos em uma solução de álcool (70%) por 30 segundos e em sequência em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0 - 2,5% (v/v) de cloro ativo por 15 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados com água deionizada e autoclavada por três vezes e inoculados em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, suplementado com sacarose (30 g/L), PVP (1,5 g/L) e ágar (6 g/L). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC® (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8 hs (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2 °C.

Transcorridos 25 dias, as plântulas germinadas *in vitro* foram excisadas para a retirada da raiz e a parte aérea sem o meristema apical foi utilizada como explante. As brotações foram inoculadas em meio de cultura em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 mL do meio de cultura MS com metade da concentração de sais, suplementado com diferentes concentrações de ANA associadas com BAP e TDZ (TABELA 2), sacarose (30 g L⁻¹), PVP (1,5 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado

para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC® (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8 hs (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2 °C.

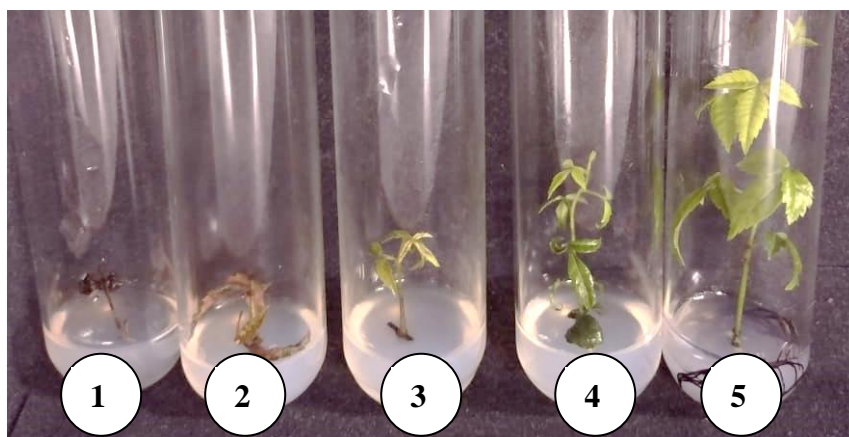
Tabela 2. Descrição das concentrações dos reguladores de crescimento, ácido naftaleno acético (ANA), benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) utilizadas na multiplicação *in vitro* de brotações de *A. urundeuva*.

Tratamentos	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)	TDZ (mg/L)
T1	-	0,00	-
T2	-	0,25	-
T3	-	0,50	-
T4	-	0,75	-
T5	-	1,00	-
T6	0,025	0,00	-
T7	0,025	0,25	-
T8	0,025	0,50	-
T9	0,025	0,75	-
T10	0,025	1,00	-
T11	0,050	0,00	-
T12	0,050	0,25	-
T13	0,050	0,50	-
T14	0,050	0,75	-
T15	0,050	1,00	-
T16	-	-	0,00
T17	-	-	0,25
T18	-	-	0,50
T19	-	-	0,75
T20	-	-	1,00
T21	0,025	-	0,00
T22	0,025	-	0,25
T23	0,025	-	0,50
T24	0,025	-	0,75
T25	0,025	-	1,00
T26	0,050	-	0,00
T27	0,050	-	0,25
T28	0,050	-	0,50
T29	0,050	-	0,75
T30	0,050	-	1,00

Transcorridos 30 dias após o início do experimento, procedeu-se a avaliação das brotações quanto ao seu vigor vegetativo, grau de calejamento e o número de brotações emitidas. O vigor

vegetativo das brotações e o seu grau de calejamento foram avaliados com base em uma escala de notas (FIGURA 9 e 10).

FIGURA 9. Escala de notas de classificação do vigor vegetativo das brotações de *A. urundeuva* multiplicadas *in vitro* em meio de cultura MS50% suplementado com diferentes concentrações de ANA associadas com concentrações de BAP e TDZ. 1-explante morto; 2- explante em processo de necrose; 3-explante pouco vigoroso; 4- explantes desenvolvidos, porém com distúrbios fisiológicos; 5- explantes vigorosos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

FIGURA 10. Escala de notas de classificação do grau de calejamento das brotações de *A. urundeuva* multiplicadas *in vitro* em meio de cultura MS50% suplementado com diferentes concentrações de ANA associadas com concentrações de BAP e TDZ. 1-explante morto; 2- explante com grande área de calos; 3-explante com pouca presença de calos; 4- explantes desenvolvidos, porém com distúrbios fisiológicos; 5- explantes vigorosos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 30 tratamentos, cada qual composto por 10 repetições, com 1 brotação por unidade amostral. Os dados mensurados foram

analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade ($P>0,05$), respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão polinomial ($P<0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote ExpDes.pt do software estatístico RStudio®, versão 3.5.3.

6.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

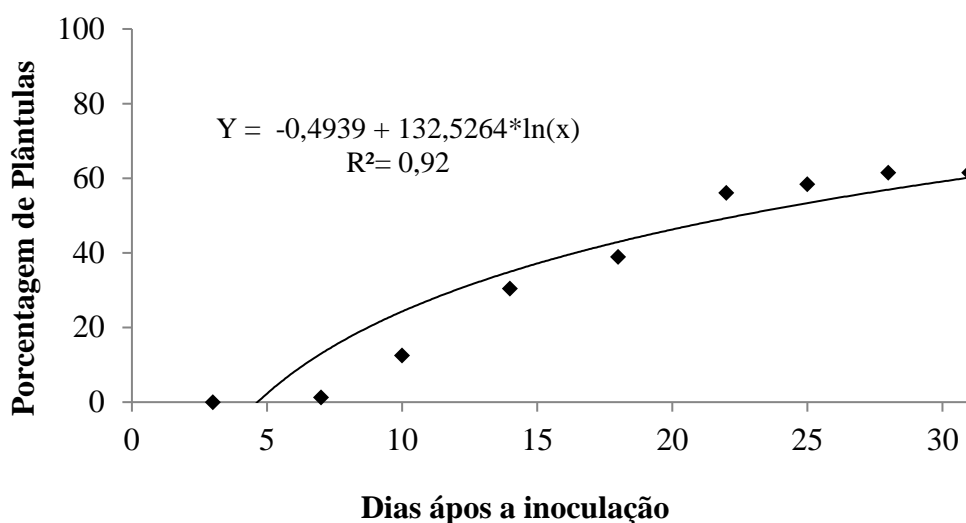
Germinação *in vitro*

As espécies florestais nativas, tais como a *A. urundeuva* que ainda estão em um estágio de pré-melhoramento, apresentam dificuldades quanto à sua propagação quer seja seminal ou clonal. Na maioria das nativas, a baixa taxa de germinação é um fator que prejudica sua perpetuação. Com isso, os resultados obtidos de germinação *in vitro* no presente estudo foram satisfatórios quando comparado ao método de propagação por sementes (DE SOUZA NASCIMENTO et al., 2022). No final dos 31 dias de cultivo *in vitro* foi observada uma porcentagem de 61,53% de plântulas; 34,10% de sementes não germinadas e 4,37% de sementes com protusão radicular.

O início do processo germinativo foi observado a partir do terceiro dia de cultivo *in vitro*, onde houve um total de 14,35% de sementes com presença de radícula. A rápida germinação *in vitro* das sementes de *A. urundeuva* é decorrente da sua adaptabilidade às condições ambientais dos locais de ocorrência natural da espécie. Para tanto, há rápida absorção de água e fisiologicamente um acentuado aumento na intensidade respiratória, que é responsável pela produção de energia que vai ser utilizada nas reações bioquímicas. Dentre as reações bioquímicas, temos a degradação das substâncias de reserva, que vão nutrir o eixo embrionário até o desenvolvimento do sistema radicular (ALONSO, 2018)

No processo germinativo das sementes de *A. urundeuva* para as plântulas ditas normais houve um pico após 7 dias de cultivo *in vitro* que se estendeu até ao 23º, no qual observou uma estabilização de germinação, totalizando 240 de plântulas (FIGURA 11). Tal comportamento pode ser explicado devido aos diásporos de aroeira possuírem um índice médio de emergência de plântulas após 5 dias de semeadura (DE PAULA et al., 2022). No decorrer do tempo, os diásporos que não são viáveis, mesmo que proporcionada todas as condições ideais, não há formação de plântulas.

FIGURA 11. Porcentagem de plântulas (%) de *A. urundeuva* germinadas *in vitro* em meio de cultura MS50%, após 31 dias de inoculação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

A germinação *in vitro* de *A. urundeuva* está atrelada a alguns fatores, dentre os quais a variabilidade genética das sementes. A literatura reporta que os diásporos germinados de *A. urundeuva* variam de 20% a 80% (DORNELES et al., 2005). No presente estudo, 34,10% dos diásporos foram classificados como inviáveis e este fator genético dificulta determinar as possíveis causas dessa inviabilidade, pois cada semente responderá de uma forma independente. Além disso, outro fator decisivo que pode afetar diretamente as condições dos diásporos é a sanidade da planta matriz na época de frutificação. As condições edafoclimáticas do local das plantas matrizes podem alterar o transporte de nutrientes para toda a planta e conseqüentemente impactar na formação de sementes de qualidade.

TABELA 3. Percentuais de protrusões radiculares e de diásporos não germinados de *A. urundeuva* germinadas *in vitro* em meio de cultura MS50%, após 31 dias de inoculação.

Dias de avaliações	Protrusão radicular (%)	Diásporos não germinados (%)
3	14,35	85,64
7	41,28	57,43
10	34,35	53,07
14	31,28	38,20
18	23,07	37,94
22	8,71	35,12
25	6,41	35,12
28	4,35	34,10
31	4,35	34,10

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

A protrusão radicular é uma variável de suma importância uma vez que é indicativo de que as sementes ao emitirem raízes apresentam alta probabilidade de desenvolverem plântulas completas.

Geralmente, baixas porcentagens para esse índice estão atreladas à dormência ou incapacitação das raízes romperem os tegumentos, o que rotineiramente ocorre em espécies nativas. Porém, Dorneles (2005) testando diferentes métodos de superações de dormência em *A. urundeuva*, observou que os principais métodos que auxiliam neste processo, reduziram a viabilidade da semente e conseqüentemente a redução de sua taxa germinativa, não sendo recomendado para esta espécie o uso de quaisquer métodos de quebra de dormência, conforme constatou-se no presente estudo. Neste contexto, mesmo aqueles diásporos (4,35%) que emitiram radícula após 28 dias de cultivo *in vitro* desenvolveram a parte aérea em sequência (Tabela 3).

Os resultados obtidos para a germinação *in vitro* de *A. urundeuva* demonstrou que a sua propagação *in vitro* é factível, com um percentual de obtenção de plântulas normais satisfatório (61%). Isso demonstra que a micropropagação da espécie a partir de material juvenil é uma ferramenta em potencial para maiores estudos, quer seja para a multiplicação de genótipos ou para a conservação de germoplasma.

Multiplicação *in vitro*

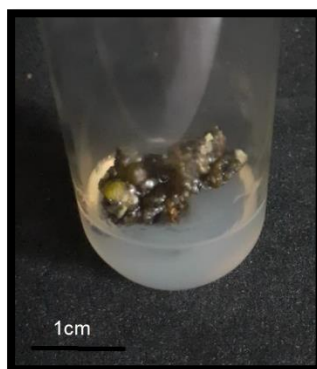
A multiplicação *in vitro* almeja a proliferação do material vegetal em uma acentuada taxa de crescimento, com a emissão do maior número de brotações em cada subcultivo. Entretanto, diversas espécies lenhosas, especialmente as florestais nativas, têm apresentado problemas nessa etapa (CHOUDHARY, 2020). Diversos fatores podem estar ligados à reduzida taxa multiplicativa das brotações, tais como o genótipo, o meio de cultura, as condições de cultivo *in vitro* (GONCALVES et al., 2022). No presente estudo, o acompanhamento do experimento através de observações periódicas abriu um indício que *A. urundeuva* apresenta uma dominância apical proeminente. Portanto, a alteração do balanço hormonal auxinas/citocininas dos explantes pela suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento pode ser decisivo para a quebra dessa dominância e induzir a multiplicação de novas brotações.

Em relação ao número de brotações, os melhores resultados foram obtidos naqueles tratamentos com a presença de ANA (TABELA 13A). O efeito positivo do ANA para a multiplicação das brotações de *A. urundeuva* provavelmente está ligada à sua contribuição para a manutenção de um balanço endógeno nos explantes que favoreceu a quebra da dominância apical e a indução da multiplicação das brotações axilares (DE SOUZA NASCIMENTO et al., 2020). A associação de ANA e BAP promoveu a multiplicação das brotações apenas nos tratamentos T11 e T9. No âmbito geral, a associação de BAP e ANA não foi eficaz na proliferação de brotações de *A. urundeuva*.

Os resultados referentes à multiplicação das brotações no meio de cultura suplementado com ANA associado com TDZ foram insatisfatórios, visto que na maioria dos tratamentos houve intenso calejamento dos explantes (FIGURA 12). A maioria dos explantes apresentaram morte ou inibição do desenvolvimento do meristema apical. Esta resposta provavelmente deve-se ao efeito hormonal do TDZ que induz uma intensa desdiferenciação celular, o que contribuiu para a inibição do desenvolvimento do ápice dos explantes, promovendo a quebra da dominância apical (MÁXIMO et al., 2020). Por outro lado, o intenso calejamento promovido pela ação do TDZ no meio de cultura proporcionou a formação de estruturas bem características de tecidos meristemáticos, havendo a formação de uma brotação, muito

provavelmente adventícia. Assim, este resultado abre perspectivas para a utilização do TDZ como indutor de organogênese e/ou embriogênese somática em *A. urundeuva*. O potencial morfogênico do TDZ já foi comprovado para diferentes espécies florestais (DHIMAN et al., 2018).

FIGURA 12. Aspecto visual do calejamento induzido em segmento nodal no tratamento com ANA associado com TDZ, em meio de cultura MS50%, após 31 dias de inoculação de *A. urundeuva*.



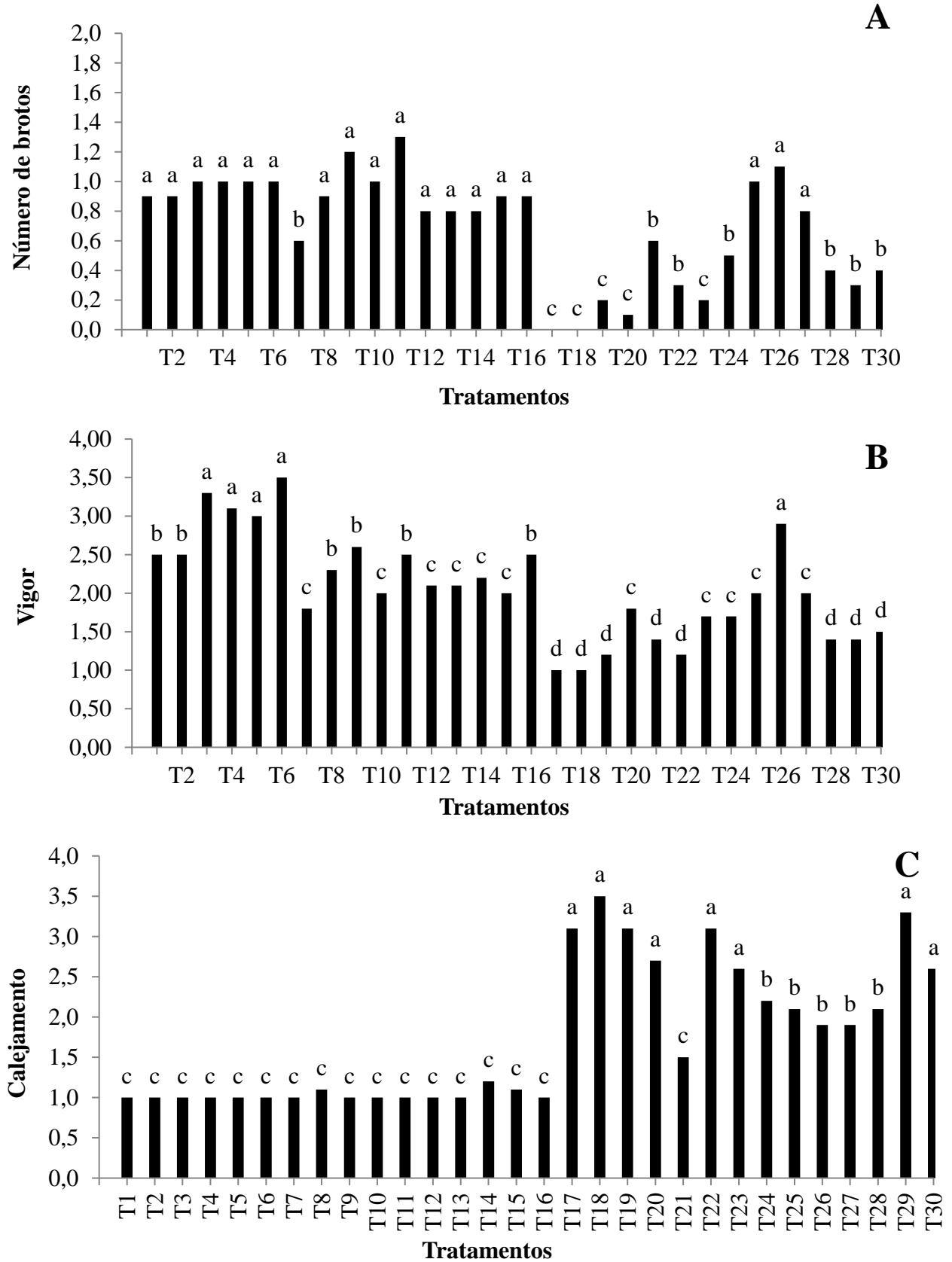
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

Ressalta-se que os tratamentos nos quais o ANA foi associado com BAP, não houve calejamento das brotações (FIGURA 13C). Portanto, na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*, o tipo de citocinina utilizada como regulador de crescimento tem efeito diferenciado sobre a morfogênese dos explantes. O BAP é a principal citocinina utilizada nos meios de cultivo *in vitro* de espécies florestais (SANT'ANA et al., 2018).

O vigor vegetativo das brotações foi obtido para aqueles tratamentos nos quais apenas o BAP foi suplementado ao meio de cultura (FIGURA 12B). Por sua vez, os tratamentos com TDZ todos apresentaram na sua maioria a morte das brotações, em razão do intenso calejamento observado.

De maneira geral, as brotações que se desenvolveram apresentaram leves sintomas de deficiência nutricional, com o amarelecimento do limbo das folhas de algumas brotações. Tais resultados revelam a necessidade de maiores estudos relacionados à nutrição *in vitro*, como avaliação de meios de cultura e concentrações dos componentes dos mesmos. Como alternativa ao meio MS, a utilização do meio de cultura WPM pode mostrar bons resultados em espécies nativas brasileiras como: *Hancornia speciosa* e *Dalbergia nigra* (PIRES et al., 2019; DOS SANTOS PESSANHA et al., 2022)

FIGURA 13. Valores médios do número de brotações (A), vigor (B) e calejamento (C) de *A. urundeuva* na fase de multiplicação *in vitro*.



Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.

De modo geral, com base nos resultados obtidos no presente estudo, recomenda-se maiores investigações na micropropagação de *A. urundeuva*, especialmente com modificações do meio de cultura, conforme encontrado para *Rubus sp* e *Eucalyptus Globulus Labill.* (VILLA et al., 2010; CORDEIRO et al., 2014). Novos estudos afim de determinar a concentração ideal de reguladores de crescimento para a multiplicação *in vitro* de brotações de *A. urundeuva* com a associação de ANA x BAP corresponde à melhor alternativa para otimizar a produção de propágulos *in vitro*. Ademais, em razão dos resultados obtido com intenso calejamento dos explantes nos tratamentos com TDZ, o mesmo poderá ser utilizado em novas pesquisas com organogênese e/ou embriogênese da espécie afim de determinar possíveis alterações em sua taxa de germinação e multiplicação *in vitro*.

6.4. CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* de *A. urundeuva* é uma alternativa aos métodos convencionais de propagação, obtendo-se 61% de plântulas viáveis para etapas subsequentes de micropropagação.

O balanço hormonal estabelecimento entre ANA x BAP e ANA x TDZ em nenhum dos tratamentos testados foi efetivo para induzir a multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*.

6.5. REFERÊNCIAS

ALONSO, C. V. **Germinação múltipla e sequencial de sementes como estratégia de propagação em espécies de Eugenia (Myrtaceae)**. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. São Paulo, Instituto de Botânica. p. 74, 2018

ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; COSTA, A. S.; FONSECA, V. O.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Micropropagação, aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 175-184, 2011

BICHARA, J.-P.; BEZERRA, R. DE A. A participação das cidades no combate à mudança climática: a omissão do município de natal. **Revista FIDES**, v. 13, n. 1, p. 60-79, 29 abr. 2022.

BRAUN, H.; LOPES, J. C.; DE SOUZA, L. T.; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-545. 2010

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: **Plantas para o Futuro**: Região Centro-Oeste / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade; Vieira, R. F. (Ed.). Camillo, J. (Ed.). Coradin, L. (Ed.). – Brasília, DF: MMA, 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº. 006 de 23 de setembro de 2008** Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/MMA_IN_N_6.pdf. Acesso em 20 Set. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA, SDA, 2009. 395p.

CASTRO, P. R. de C.; PITELLI A. M. de C. M.; PERES L. E. P.; ARAMAKI, P. H. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Ciências Exatas Terra, Ciências Agronômicas e Engenharia** v. 13, n. 3, p. 25-29, 2007.

CORDEIRO, G. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S. DE; ALMEIDA, M. de. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus Labill*. **Scientia Forestalis**, v. 103, p.337-344. 2014.

CHOUDHARY, M.; ARYA, I. D.; ARYA, S. Problems Encountered during *In vitro* Culture Establishment in *Terminalia arjuna*. **Annual Research & Review in Biology**,v.35, p. 154-160, 2020.

DE PAULA, J. C. B.; GUARIZ, H. R.; JÚNIOR, W. A. R.; SHIMIZU, G. D.; DE FARIA, R. T.; DE OLIVEIRA, H. C. Criopreservação de sementes da espécie nativa do Brasil aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* M. Allemão Engl.). **Revista Caatinga**, v. 35, n. 4, p. 915-924, 2022.

DE SOUZA NASCIMENTO, A. V.; DAS CHAGAS MENDONÇA, A. M.; ALVES CAMPOS, J.; CRUZ DE SANTANA, M.; ALMEIDA SANTOS, P. A. Seed germination of *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in different substrates. **Colloquium Agrariae**.v.18, n. 1. P 64- 73, 2022.

DE SOUZA NASCIMENTO, A. V. S.; MENDONÇA, A. M. C.; SILVA JÚNIOR, C. D.; SANTANA, M. C.; SANTOS, P. A. A. *In vitro* germination and micropropagation of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 16, n. 16, p. e156, 2020.

DHIMAN, N.; GAUTAM, N.; SAREEN, B.; KUMARI, P.; RAJOURIA, S.; BHATTACHARYA, A. ***In vitro* morphogenesis of some Himalayan Flora using TDZ: a potential plant growth regulator.** In: Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator. Springer, Singapore, p. 247-271, 2018.

DORNELES, M. C.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Germinação de diásporos recém-colhidos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) ocorrente no cerrado do Brasil Central. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, p. 399-408, 2005.

PESSANHA, L. S.; ARAGÃO, V. P. M.; DE OLIVEIRA, T. D. R.; DE SOUSA, K. R.; SILVEIRA, V.; Benzyladenine Effects on polyamine contents and proteomic profiles during *in vitro* shoot development and on *ex vitro* rooting in *Dalbergia Nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae). **Reserch Square**, p. 25, 2022.

DURIGAN, G.; ENGEL, V. L.; TOREZAN, J. M.; MELO, A. C. G. D.; MARQUES, M. C. M.; MARTINS, S. V.; REIS, A.; SCARANO, F. R. Normas jurídicas para a restauração ecológica: uma barreira a mais a dificultar o êxito das iniciativas? **Revista Árvore**, v. 34, p. 471-485, 2010.

BRONDANI, G. E.; MOLINARI, L. V.; FARIA, J. C. T.; SOUZA, D. M. S. C.; TEIXEIRA, G. C.; GONÇALVES, D. S. Emission of epicormic shoots and *in vitro* establishment of *Cordia trichotoma* selected adult trees. **Revista Bosque**, v. 43, n. 2, p. 169-177, 2022.

LORENZI, Harri et al. **Árvores brasileiras**. 1992.

MÁXIMO, W. P. F.; SANTOS, B. R.; MARTINS, J. P. R.; BEIJO, L. A.; BARBOSA, S. Multiplication and *in vitro* rooting of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 658-668, 2020.

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

PIRES, D. C. M.; DE MATOS TRENTO, S.; DE PAULA, M. S. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q.; DE SOUZA, A. V. V. *In vitro* conservation of mangaba native to Brazilian Cerrado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 15, n. 2, p. 33-39, 2019.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/> FB4394. Acesso em: 18 set. 2022.

SANT'ANA, C. R. D. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V. D.; SILVA, D. P. C. D.; SILVA, L. C. *In vitro* propagation of *Campomanesia rufa*: an endangered fruit species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, p. 372-380, 2018.

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**, v. 53, p. 985-1002, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 888p

VILLA, F. V., PASQUAL, M., DAS GRAÇAS SOUZA, A.; VILELA, X. M. D. S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, v.11(2), p. 109-117, 2010.