

UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS

DISSERTAÇÃO

Micropropagação de *Apuleia leiocarpa*
(Vogel) J.F. Macbr por meio de gemas axilares

Nathalia de Lima Costa

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J.F. MACBR
POR MEIO DE GEMAS AXILARES**

NATHALIA DE LIMA COSTA

Sob a Orientação da Professor
Dr. José Carlos Arthur Junior
e Coorientação da Professora
Dra. Natane Amaral Miranda

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Silvicultura.

Seropédica, RJ
Novembro de 2021

C838m Costa, Nathalia de Lima, 1993-
Micropropagação de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr por meio de gemas axilares / Nathalia de Lima Costa. - Seropédica, 2021.
53 f.: il.

Orientador: José Carlos Arthur Junior.
Coorientadora: Natane Amaral Miranda.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, 2021.

1. Propagação Vegetativa. 2. Espécies nativas. 3. Biotecnologia florestal. I. Arthur Junior, José Carlos, 1980-, orient. II. Miranda, Natane Amaral, 1990-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS
NATHALIA DE LIMA COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de Concentração em Silvicultura.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/11/2021

Natane Amaral Miranda. Dra. FRRJ
(Coorientadora)

Rogério Gomes Pêgo. Dr. UFRRJ

Evânia Galvão Mendonça Dra. UFSJ

*(Assinado digitalmente em
30/11/2021 10:06)*
NATANE AMARAL
MIRANDA PROFESSOR DO
MAGISTERIO SUPERIOR
DeptSil
(12.28.01.00.00.00.31)
Matrícula: 3056490

(Assinado digitalmente em 30/11/2021 08:15)
ROGERIO GOMES PEGO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptFITO (12.28.01.00.00.00.32)
Matrícula: 2379124

(Assinado digitalmente em 30/11/2021 08:03)
EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 049.192.566-20

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 5, ano: 2021,
tipo: **DECLARATÓRIA**, data de emissão: **29/11/2021** e o código de verificação: **74b7a3324f**

DEDICATÓRIA

*Ao primogênito de toda criação
Ao Renato, Ana Cristina e Rebeca*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao Autor da Vida que me proporcionou a graça, bondade e força de completar esse mestrado mesmo nesses tempos sombrios. Se não fosse por Ele com certeza não teria conseguido.

A minha base, meus maiores incentivadores na vida, Renato, Ana Cristina e Rebeca por serem "Arão e Josué" quando meus braços cansaram. Sou muito grata a Deus por vocês, me faltam palavras pra expressar tamanha gratidão. Ao meu namorado Jonathan por ser um ombro para o descanso, um colo quentinho, pelas palavras de ânimo e coragem e pela frase "vai dar certo amor".

Aos meus familiares de Lima e Costa pelo apoio, por sempre acreditarem em mim e por deixar ser "a guarda belo" da família.

Aos meus queridos orientadores José Carlos Arthur Junior e Natane Amaral Miranda que foram os melhores orientadores que eu pude ter. Obrigada pela paciência, pela dedicação à pesquisa, por entender que cada um tem o seu tempo, ainda mais em tempo de pandemia, por serem empáticos, enfim por acreditar em mim. Meu sincero muito obrigada.

Aos pesquisadores Janaina Rouws e Marcel Abreu pela imensa ajuda nas estatísticas e Juliana Freire pela colaboração e conselhos.

Aos membros da banca Prof. Rogério Pêgo e Profa. Evânia Mendonça, pela contribuição valiosa nesse trabalho.

Ao Tião e os funcionários do Viveiro Florestal Luiz Fernando Oliveira Capellão da UFRRJ por todo suporte, ajuda e companhia durante o verão escaldante de Seropédica nesses anos.

A CEDAE pelo fornecimento das sementes de *Apuleia leiocarpa*, permitindo toda a realização da pesquisa.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela experiência maravilhosa e por proporcionar um ensino público e de qualidade.

As amigas Barbara, Mariane que mesmo de longe sempre torciam por mim. Viva a República Dedo de Moça! Aos amigos Caio, Harrison, Beatriz, Tatiane, Victor e Douglas por todo apoio, carinho e compreensão.

Aos amigos de mestrado, especialmente Jessica que dividiu os perrengues que a pesquisa traz e as longas caminhadas pela Rural.

Agradeço ao PPGCAF/UFRRJ pela oportunidade de aprimoramento dos estudos, assim como a CAPES pela bolsa de mestrado.

RESUMO

COSTA, Nathalia de Lima. **Micropropagação de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr por meio de gemas axilares.** 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Silvicultura, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbr (garapa) é conhecida pelo alto valor madeireiro e seus usos múltiplos, por isso sofreu intensa exploração madeireira ao longo da Mata Atlântica. Por apresentar dificuldades para propagação seminal, a micropropagação pode ser uma alternativa para produção de mudas da espécie. Com isso, o objetivo do estudo foi desenvolver etapas da micropropagação da *A. leiocarpa* utilizando gemas axilares, obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*. No primeiro experimento para a multiplicação *in vitro* foram testadas seis concentrações de BAP (0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0 e 16,0 μM) combinadas com duas concentrações de ANA (0 e 0,5 μM) em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 2. No segundo experimento para a multiplicação, testou-se a troca gasosa pela presença e ausência de membrana nas tampas dos frascos e quatro concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L^{-1}) em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2 x 4. Após 30 dias de cada experimento foram mensuradas variáveis: número e tamanho de brotação, formação e tamanho de calo, número de gemas, oxidação do meio de cultura e vigor visual dos segmentos nodais. No terceiro experimento testou-se o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais submetidos a pulsos de 1, 2, 4 e 8 dias em meio de cultura contendo 100 μM AIB ou ANA. Após 60 dias foram avaliados o número e comprimento de raízes, formação e tamanho de calo. A adição do BAP proporcionou maior número de brotações (7,1 μM) e de gemas (8,0 μM), porém ANA não influenciou na multiplicação dos segmentos nodais. A ausência de membrana promoveu melhores resultados em comparação com a presença de membrana e as diferentes concentrações de sacarose não influenciaram na multiplicação dos segmentos nodais de garapa. O aumento do tempo de pulso de auxina reduziu o tamanho do calo e o uso de ANA proporcionou maior média do número de raízes (3,23), sendo assim recomendado seu uso.

Palavras-chave: Multiplicação, enraizamento, garapa

ABSTRACT

COSTA, Nathalia de Lima. **Micropropagation of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr by means of axillary buds**. 53 p. Dissertation (Master in Environmental and Forest Sciences). Forest Institute, Department of Forestry, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbr (garapa) is known for its high timber value and multiple uses, for that it suffered intense logging along the Atlantic Forest. Because it presents difficulties for seminal propagation, micropropagation can be an alternative for the production of seedlings of the species. Thus, the aim of the study was to develop steps for the micropropagation of *A. leiocarpa* using axillary buds obtained from *in vitro* germinated seeds. In the first experiment for *in vitro* multiplication, six concentrations of BAP (0; 2.0; 4.0; 8.0; 12.0 and 16.0 μM) were tested combined with two concentrations of NAA (0 and 0.5 μM) in a completely randomized design in a 6 x 2 factorial. In the second experiment for the multiplication, the gas exchange was tested by the presence and absence of membrane on the bottle caps and four sucrose concentrations (0, 5, 15 and 30 g L^{-1}) in a completely randomized design in a 2 x 4 factorial. After 30 days of each experiment, variables were measured: number and size of shoot, callus formation and size, number of buds, oxidation of the culture medium and visual vigor of the nodal segments. In the third experiment, the *in vitro* rooting of nodal segments submitted to pulses of 1, 2, 4 and 8 days in culture medium containing 100 μM IBA or NAA was tested. After 60 days, the number and length of roots, callus formation and size were evaluated. The addition of BAP provided a greater number of shoots with the best concentration (7.1 μM) and buds (8.0 μM), but NAA did not influence the multiplication of nodal segments. The absence of membrane promoted better results compared to the presence of membrane and the different concentrations of sucrose did not influence the multiplication of nodal segments of garapa. The increase in auxin pulse time reduced the callus size and the use of NAA provided a greater number of roots mean (3.23), and its use is therefore recommended.

Keywords: Multiplication, rooting, garapa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
	2.1. Objetivo Geral.....	15
	2.2. Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
	3.1. Mata Atlântica.....	15
	3.2. <i>Apuleia leiocarpa</i>	16
	3.3. Micropropagação	17
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
	4.1. Desinfestação, quebra de dormência e germinação das sementes	20
	4.2. Etapa de Multiplicação	21
	4.2.1. Experimento 1 – BAP e ANA.....	21
	4.2.2. Experimento 2 – Sacarose e trocas gasosas	23
	4.3. Etapa de Enraizamento	25
	4.3.1. Experimento 3 – Auxinas e tempo de pulso	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
	5.1. Experimento 1 - BAP e ANA	25
	5.2. Experimento 2 - Sacarose e trocas gasosas.....	32
	5.3. Experimento 3 – Auxinas e tempo de pulso	39
6	CONCLUSÕES.....	45
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de variância para o número médio de gemas emitidas, número de brotações e para oxidação a partir de segmentos nodais de <i>Apuleia leiocarpa</i> , em função das concentrações de ANA e BAP, aos 30 dias após a inoculação.....	26
Tabela 2 - Comprimento médio das brotações emitidas a partir de segmentos nodais de <i>Apuleia leiocarpa</i> , em função das concentrações de BAP aos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i> .	30
Tabela 3 - Comprimento médio das brotações emitidas a partir de segmentos nodais de <i>Apuleia leiocarpa</i> , em função das concentrações de BAP aos 30 dias após a inoculação <i>in vitro</i>	32
Tabela 4 - Análise de variância para o número médio de gemas, vigor das brotações, tamanho médio do calo e oxidação do meio de cultivo na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Apuleia leiocarpa</i> , em função das concentrações de sacarose e da vedação dos frascos, aos 30 dias após a inoculação.....	33
Tabela 5 - Valores de probabilidade das análises não paramétricas em função das auxinas e do tempo de pulso pelo teste de Kruskal-Wallis para o enraizamento, o número de raízes, a porcentagem de calos, o tamanho do calo e o comprimento médio da raiz no enraizamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Apuleia leiocarpa</i> , aos 60 dias após a inoculação.....	40
Tabela 6 - Porcentagem média do enraizamento e o comprimento médio das raízes (cm) no enraizamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Apuleia leiocarpa</i> , aos 60 dias após a inoculação em função das auxinas e do tempo de pulso	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sementes de *Apuleia leiocarpa* em imersão no ácido sulfúrico com concentração de 98,08% por 20 minutos para quebra de dormência e desinfestação..... 21
- Figura 2 - Classificação visual de vigor de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa in vitro* aos 30 dias após a inoculação na etapa de multiplicação, A – baixo, B – médio e C – alto..... 22
- Figura 3 - Formas de vedação do frasco. A- Tampa com membrana B - Tampa sem membrana..... 23
- Figura 4 - Classificação visual de vigor de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa in vitro* aos 30 dias após a inoculação na etapa de multiplicação, A – baixo, B – médio e C – alto..... 24
- Figura 5 - Raiz quadrada do número gemas emitidas em função das concentrações de BAP (A) e de ANA (B) na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 30 dias após a inoculação. Letras diferentes no gráfico de colunas indicam diferenças pelo teste de médias de Scott-Knott à 95% de probabilidade. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t..... 27
- Figura 6 - Raiz quadrada do número brotações emitidas (NBE) (A) e oxidação do meio de cultura (B) em função das concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 30 dias após a inoculação. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t..... 29
- Figura 7 - Brotação de segmento nodal de *Apuleia leiocarpa* em meio WPM oxidado aos 30 dias após a inoculação *in vitro*..... 31
- Figura 8 - Média de vigor das brotações (A), número médio de gemas emitidas (B), porcentagem média de formação de calo (C), tamanho médio do calo (D) e porcentagem média de oxidação do meio de cultura (E) na multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, em função das concentrações de sacarose e de formas de vedação dos frascos, aos 30 dias após a inoculação. n.s: diferença não significativa. Letras diferentes no gráfico de colunas diferem as médias pelo teste de Scott-Knott à 95% de probabilidade. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t..... 35
- Figura 9 - Segmento nodal de *A. leiocarpa* com calo de tamanho reduzido em meio WPM não oxidado (A); Segmento nodal de *A. leiocarpa* com maior tamanho de calo em meio WPM oxidado (B) aos 30 dias após a inoculação com 5 g L⁻¹ de sacarose..... 38
- Figura 10 - Segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* enraizados *in vitro* aos 60 dias após a inoculação. Segmento nodal de *A. leiocarpa* com elevado número de raízes obtido em meio com 100 µM de ANA (A); Segmento nodal de *A. leiocarpa* com baixo número de raízes em meio com 100 µM de AIB (B)..... 39

- Figura 11 - Tamanho médio do calo (TCALO) em função do tempo de pulso em auxinas no enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *A. leiocarpa*, aos 60 dias após a inoculação. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t 41
- Figura 12 - Segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* enraizados *in vitro* aos 60 dias após a inoculação. Segmento nodal de *A. leiocarpa* com menor comprimento de raiz (A); Segmento nodal de *A. leiocarpa* com maior comprimento de raiz (B)..... 44

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, detentora de elevada biodiversidade e alto grau de endemismo, está restrita a aproximadamente 12,4% de sua área original no território brasileiro devido à exploração madeireira, à expansão agropecuária e à expansão urbano-industrial (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INPE, 2019). É considerada um dos mais importantes biomas do mundo e também um dos mais ameaçados, sendo um “hotspot mundial” para conservação (MYERS et al., 2000; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2018). Destaca-se que a Mata Atlântica hospeda uma diversidade de espécies da flora por unidade de área superior da maioria das florestas amazônicas (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014).

A crescente fragmentação da floresta tropical tem causado impacto negativo no ecossistema provocando o isolamento de comunidades biológicas, reduzindo a biodiversidade e alterando os processos biológicos, a distribuição e a estrutura populacional de espécies florestais em diferentes ambientes (MORETTI et al., 2020). Além disso, causa alteração na quantidade de animais que fazem a dispersão de sementes, o que reduz consequentemente a abundância de plantas que dependem desses animais para transportar suas sementes (BENITEZ-MALVIDO, 1998). A baixa disponibilidade de sementes de diversas espécies nativas florestais somada à dificuldade de obtenção e de coleta são fatores que contribuem para o aumento da vulnerabilidade destas espécies (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). Dentre as espécies florestais encontradas na Mata Atlântica que apresentam potencial de uso econômico e de restauração de áreas degradadas está a leguminosa *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr., popularmente conhecida como garapa, essa espécie é conhecida pelo alto valor madeireiro e seus usos múltiplos (FREIRE et al., 2020).

A germinação de sementes de *A. leiocarpa* ocorre de forma lenta e irregular. Sem qualquer tratamento das sementes, a média de germinação da espécie, de acordo com Castro et al. (2019) é de 27,0% em comparação com 76,1% com tratamento químico. Fabris, Gerber e Sartoretto (2016) encontraram resultado parecido com melhor resultado em sementes germinadas após o uso de tratamento químico com média de 92% e 58% sem tratamento. Além disso, a espécie apresenta tegumento resistente sendo fundamental a quebra de dormência na germinação das sementes. Com a utilização de métodos artificiais pode-se aumentar e acelerar a germinação das sementes (CASTRO et al., 2019). De acordo com Felippi et al. (2012) a variabilidade genética entre matrizes e a influência

ambiental também são fatores que podem influenciar a qualidade fisiológica das sementes de garapa. Portanto, essas características da espécie são complicadoras para a produção de mudas. A propagação vegetativa de espécies florestais constitui alternativa à propagação seminal, pois a propagação vegetativa proporciona o resgate e a conservação de recursos genéticos florestais cuja germinação por vias tradicionais é limitante (DIAS et al., 2012; DIAS; BRONDANI, 2013; HARTMANN et al., 2014).

Entre as técnicas de propagação vegetativa, a micropropagação, tem sido considerada aquela que mais se difundiu nas últimas décadas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2021), é uma ferramenta que mantém plantas com fidelidade genética e limpeza clonal (produção de plantas livres de doenças) armazenamento de germoplasma e propagação clonal (CARDOSO; GERALD; SILVA, 2018; VIDAL-LIMON et al., 2018). Dependendo das espécies e condições culturais e o objetivo da reprodução, a propagação *in vitro* pode ser alcançada pelos seguintes métodos básicos: proliferação de gemas axilares (cultura de brotos), multiplicação via embriogênese somática e multiplicação mediante a indução de gemas adventícias através da organogênese.

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares baseia-se de gemas pré-formadas. Essa técnica segue um protocolo que vai desde o isolamento do explante estimulado ao crescimento por reguladores de crescimento até a obtenção da muda micropropagada (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2021), no protocolo temos as fases: 1) seleção do explante podendo ser por indução de brotações ou por sementes 2) desinfestação dos explantes e estabelecimento *in vitro* 3) multiplicação e alongamento das brotações e 4) enraizamento e aclimação para a obtenção das plântulas micropropagadas (HARTMANN, et al. 2014). Estes estudos constituem uma alternativa promissora para solucionar o problema da produção de mudas de garapa. É importante destacar que estudos anteriores obtiveram sucesso para a etapa de desinfestação e germinação de garapa obtendo os melhores resultados com hipoclorito de sódio, onde foi possível a obtenção de 84,3% de sementes germinadas (LENCINA et al., 2014). No entanto, Castro et al. (2019) encontraram resultados mais expressivos utilizando ácido sulfúrico para a desinfestação e quebra de dormência das sementes também desta espécie. Dessa forma, pode-se considerar essa etapa superada para a espécie em questão.

Estudos voltados para a propagação vegetativa, especificamente a micropropagação da espécie nativa garapa, são escassos na literatura. Portanto, a importância desse estudo vem de encontro com a necessidade de avanço em conhecimento da técnica de micropropagação da *Apuleia leiocarpa*, espécie que possui

vulnerabilidade de extinção, valor econômico, potencial para restauração ambiental, ciclo de vida longo e dificuldade na produção de sementes.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver etapas do protocolo de micropropagação da *Apuleia leiocarpa* utilizando gemas axilares oriundas da germinação de sementes.

2.2. Objetivos Específicos

- Induzir a multiplicação de segmentos nodais com gemas axilares da *Apuleia leiocarpa* sob influência de concentrações de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA);
- Induzir a multiplicação de segmentos nodais com gemas axilares da *Apuleia leiocarpa* sob influência de concentrações de sacarose e da troca gasosa (tipo de vedação da tampa) por meio de uso de membrana;
- Induzir o enraizamento de segmentos nodais com gemas axilares da *Apuleia leiocarpa* sob influência das auxinas ácido indol-butírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) em função do tempo de pulso.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mata Atlântica

Com a intensa perda de habitat, muitas vezes devido às expansões urbana, agrícola e industrial, as florestas continuam a serem desmatadas com o intuito da exploração ilegal de madeira e do uso não sustentável da prática agropecuária (TABARELLI; SILVA; GASCON, 2004; VITOUSEK et al., 2008; CROUZEILLES et al., 2019). Essa realidade também se aplica à Mata Atlântica, uma das florestas mais ricas em biodiversidade de espécies e ameaçadas do planeta, que abriga um dos lugares no mundo de maior biota florestal decorrente dos seus níveis excepcionais de endemismo de espécies (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2004; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA e INPE, 2019). O bioma abrange cerca de 15% da área total do território brasileiro e, restam apenas 12,4% da floresta que existia originalmente (FUNDAÇÃO SOS MATA

ATLÂNTICA, 2019), representando atualmente 28% da sua área original, com uma cobertura vegetal remanescente de 32 milhões de hectares (REZENDE et al., 2018; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2019).

O acelerado ritmo de redução e fragmentação da flora provoca a perda da biodiversidade dos ecossistemas, comprometendo a disponibilidade de recursos ambientais. Estas perturbações representam os principais fatores que levam à extinção de espécies (VALIENTE-BANUET et al., 2015). Mesmo com a perspectiva positiva demonstrada pelo trabalho de Rezende et al. (2018) em que foram detectadas áreas maiores de cobertura florestal em relação a trabalhos anteriores, esse bioma permanece como um dos “hotspot” de biodiversidade e, portanto, altamente ameaçado. Cerca de 1544 espécies vegetais e 380 espécies animais estão ameaçadas, o que equivale a 60% do total da lista de espécies ameaçadas da flora e fauna brasileira (PAGLIA; FONSECA; SILVA, 2008; MARTINELLI et al., 2018).

Dentre as diversas espécies arbóreas encontradas no bioma Mata Atlântica, que apresentam importância econômica, social e ambiental, destaca-se a espécie *Apuleia leiocarpa* (garapa) que se encontra em situação de vulnerabilidade, pertencente à família Fabaceae que é reconhecida por sua diversidade de usos e pelo elevado valor econômico madeireiro e não-madeireiro (LIMA, 2015).

3.2. *Apuleia leiocarpa*

A garapa, grápia, ou amarelão, pertence à família Fabaceae - Caesalpinioideae, possui distribuição natural nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2019). Típica do Rio Grande do Sul, possui aproximadamente 35 m de altura e 100 cm de diâmetro a altura do peito (DAP), a espécie é reconhecida pela qualidade da madeira, potencial apícola, medicinal, paisagístico e florestal (FELIPPI, 2010).

A garapa é classificada como semi-heliófila, que tolera sombreamento entre 50% e 70% de intensidade, indicando um melhor desempenho da espécie em condições de fechamento de dossel, portanto é uma espécie clímax que raramente ocorre em formações secundárias abertas (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003).

A madeira da garapa é moderadamente pesada (densidade 0,83 g cm⁻³), fácil de trabalhar, de longa durabilidade, podendo ser atacada por cupins e é bastante utilizada na construção civil (LORENZI, 1992). Além da madeira, a garapa apresenta potencial para

a produção apícola, para propriedades medicinais e para produção de substâncias tanantes (CARVALHO, 2003).

Os relatos existentes sobre a produção de mudas de garapa abordam, em sua maioria, a propagação por sementes (LENCINA et al., 2014), apesar da germinação ocorrer de forma lenta e irregular. A espécie apresenta tegumento resistente sendo fundamental a quebra de dormência na germinação das sementes. Sem a quebra de dormência, a indução à germinação é inviável pelo método tradicional (NICOLOSO et al., 1998), a média de germinação da espécie, de acordo com Castro et al. (2019) é de 27,0% em comparação com 76,1% com tratamento químico. Fabris, Gerber e Sartoretto (2016) encontraram resultado parecido com melhor resultado em sementes germinadas após o uso de tratamento químico com média de 92% e 58% sem tratamento. De acordo com Felippi et al. (2012) a variabilidade genética entre matrizes e a influência ambiental também são fatores que podem influenciar a qualidade fisiológica das sementes de garapa. Portanto, essas características da espécie são complicadoras para a produção de mudas.

Freire et al. (2020) concluíram que o uso de auxina AIB não influenciou o enraizamento de garapa por meio da miniestaquia. E, Silva et al. (2021) encontraram bons resultados para *A. leiocarpa* por miniestaquia, sem o uso de auxina, promovendo mudas vigorosas com alta taxa de sobrevivência, chegando a 95% de sobrevivência das miniestacas derivadas de minicepas produzidas com sementes, que apresentaram capacidade de rebrota durante um ano.

A garapa possui frutificação irregular e as árvores atingem altura de até 35 m, o que dificulta a coleta das sementes (CARVALHO, 2003). Por isso, estudos indicam que há a necessidade de utilizar o tratamento químico para potencializar a germinação de sementes desta espécie, chegando a até 92% de germinação (FABRIS; GERBER e SARTORETTO, 2016; CASTRO et al., 2019). Além disso, devido à intensa exploração para extração de madeira e à fragmentação de seu habitat, suspeita-se que, em 100 anos, a população tenha sofrido uma redução de pelo menos 30% (CNC Flora, 2012).

3.3. Micropropagação

Na área florestal, dentre as técnicas de cultura de tecido, a micropropagação tem sido a mais difundida e com aplicações práticas comprovadas, fazendo parte de programas de melhoramento que objetivam a maximização ou manutenção do valor genético do material vegetal a ser propagado (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). É utilizada

para regenerar (propagar) novas plantas (HARTMANN et al., 2014), sendo uma alternativa ao método de propagação convencional. A técnica é baseada na totipotencialidade da célula vegetal, ou seja, na sua capacidade de, por si só, originar uma nova planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação possui uma série de vantagens, dentre as quais pode-se citar a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, a produção de mudas em curto espaço de tempo e em área reduzida do laboratório, obtenção de plantas livres de patógenos e o fornecimento contínuo de plantas ao longo do ano (PAIVA; GONÇALVES, 2012; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). O uso de gemas axilares permite a propagação clonal em larga escala de cultivares e resulta na aceleração do processo de melhoramento em leguminosas (DEO et al., 2010).

As etapas da propagação *in vitro* seguem um protocolo, no qual propágulos que foram coletados no campo passam por uma desinfestação prévia e inoculação no meio de cultura. Após o estabelecimento, os explantes são multiplicados, alongados, e enraizados para finalmente, serem aclimatados em ambiente *ex vitro* (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). A desinfestação e o estabelecimento *in vitro* do explante corresponde à fase de maior desafio para a maioria das plantas lenhosas (FERMINO-JUNIOR; PEREIRA-SCHERWINSKI, 2009), principalmente quando se utiliza matrizes adultas selecionadas no campo, devido aos propágulos apresentarem altas taxas de contaminação, tornando a desinfestação uma etapa determinante no estabelecimento (COUTO et al., 2004; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). O uso de sementes pode facilitar o processo de desinfestação e obtenção de propágulos assépticos *in vitro* para o desenvolvimento do protocolo de propagação de plantas lenhosas (ANDRADE, 2002). Outra dificuldade encontrada no processo de desinfestação é a perda de material vegetal por toxidez, que é dependente principalmente do agente desinfetante utilizado e sua concentração. O uso de substâncias como álcool, hipoclorito de sódio (NaClO) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) é comumente relatado (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013; FABRIS; GERBER; SARTORETTO, 2016; CASTRO; AMARO; ARAUJO, 2019).

A escarificação com ácido sulfúrico concentrado apresentou como o tratamento mais indicado para a quebra de dormência de sementes de *Apuleia leiocarpa* (SOUZA; VARELA; BATALHA, 1994; LOUREIRO, 2005). Além da superação na quebra de dormência, o ácido sulfúrico aumenta e acelera a germinação das plântulas, reduzindo o

gasto de sementes e o tempo para a formação das mudas e, conseqüentemente, seu custo de produção (CASTRO; AMARO; ARAUJO, 2019).

Na fase da multiplicação, o objetivo é produzir o maior número de gemas ou brotos possíveis, no menor intervalo de tempo e mantendo a estabilidade genética (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; HARTMANN et al., 2014). Os explantes oriundos da fase de estabelecimento são inoculados em meio de cultivo contendo regulares de crescimento, principalmente auxinas e citocininas. A multiplicação está relacionada com a capacidade dos tecidos vegetais sofrerem rápidas divisões celulares, liberando as gemas da dominância apical (BOTIN e CARVALHO, 2015).

Os reguladores vegetais são adicionados ao meio de cultura para auxiliar o crescimento e também são importantes no direcionamento da resposta do desenvolvimento dos propágulos, além de controlar a maior parte das atividades meristemáticas (HARTMANN et al., 2014). O balanço entre auxina e citocinina é essencial para o equilíbrio entre a taxa de divisão celular e diferenciação celular permitindo o crescimento contínuo das raízes e mantendo o tamanho adequado do meristema (SCHALLER; BISHOPP; KIEBER, 2015). A auxina, ácido naftalenoacético (ANA) e a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) são os reguladores de crescimento mais usados na cultura de tecidos (BOTIN; CARVALHO, 2015; SCHALLER; BISHOPP; KIEBER, 2015).

Com a mesma espécie do presente estudo, Lencina et al. (2018) verificaram que com a concentração de 8,8 μM da citocinina BAP promoveu maior número de brotações de garapa. Javed et al. (2013) observaram que o melhor resultado para a multiplicação de *Acacia ehrenbergiana* foi com a concentração de 0,1 μM de ANA combinada com 10 de μM BAP, a qual foi suficiente para promover um maior número de brotações. Porfírio et al. (2019) observaram que a maior taxa de multiplicação da espécie *Xylopia aromática*, foi nas concentrações de 3,55 μM de BAP e 0,054 μM de ANA. Miranda et al. (2016) estudando a micropropagação de *Eremanthus incanus* obtiveram melhor taxa de multiplicação a partir da combinação de 1,0 mg L^{-1} de BAP e 0,5 mg L^{-1} de ANA.

Na cultura de tecido, a sacarose é a fonte mais comum de entrada de carboidrato no meio de cultura e é usualmente adicionada a concentração de 30 g L^{-1} . No entanto, otimizar a concentração de sacarose é fundamental para um bom desenvolvimento do explante para obter sucesso na micropropagação. Em sistemas convencionais de propagação *in vitro*, a umidade elevada dentro do frasco reduz as taxas de transpiração e pode reduzir o transporte de íons dependente do fluxo de massa (SALDANHA et al.,

2012). E, essas condições podem diminuir o desempenho fotossintético e a absorção de nutrientes (XIAO; NIU; KOZAI, 2011). O uso de membranas na tampa dos frascos permite a troca gasosa em sistemas de cultura *in vitro*. Esse método pode efetivamente reduzir as limitações de baixa difusão de gás através do frasco de cultura (FORTINI et al., 2021).

Na fase de enraizamento, um dos principais fatores relacionados refere-se ao componente regulador de crescimento, em que o balanço hormonal entre citocinina e auxina é fundamental para o sucesso do desenvolvimento do sistema radicular (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Lencina et al. (2020) obtiveram melhor resultado com 45,5% de média de enraizamento para a espécie *Apuleia leiocarpa* com a auxina ANA. A aclimatização é realizada em ambiente sombreado e, posteriormente, levadas para a rustificação e o crescimento (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Logo, o sucesso da aclimatização é dependente do controle de fatores, como temperatura, luminosidade, umidade, substrato, nutrientes e a espécie (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Biotecnologia Florestal (NBF), localizado no Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica/RJ. Os segmentos nodais utilizados nos estudos foram oriundos de sementes germinadas *in vitro*, procedentes de matrizes localizadas no município de Paracambi, RJ.

Esses segmentos nodais possuíam tamanho médio de 2 cm de comprimento, contendo em média 2 gemas axilares, com 1 par de folhas.

4.1. Desinfestação, quebra de dormência e germinação das sementes

As sementes de mesmo tamanho e coloração foram selecionadas, sendo na sequência submetidas à quebra de dormência e à desinfestação com ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado (98,08%) por 20 minutos, agitadas a cada 5 minutos, (Figura 1), conforme metodologia descrita por (CASTRO et al., 2019). No fluxo laminar, as sementes foram lavadas por 5 minutos em água destilada e autoclavada.

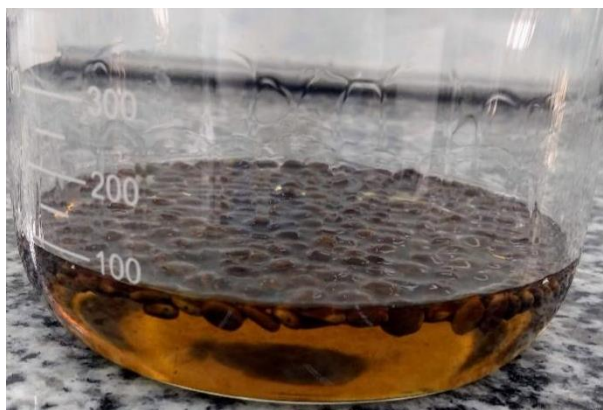


Figura 1 - Sementes de *Apuleia leiocarpa* em imersão no ácido sulfúrico com concentração de 98,08% por 20 minutos para quebra de dormência e desinfestação.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas *in vitro* em frascos de vidro de 250 mL previamente esterilizados, contendo 30 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) o qual foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) e 2,3 g L⁻¹ de phytigel, com pH ajustado para 5,8±0,02. O meio foi anteriormente autoclavado por 20 minutos à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

Foram inoculadas quatro sementes por frasco, o qual foi vedado com tampa plástica e mantido em sala de cultura com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹, até a plântula germinada atingir cerca de 5 cm de altura.

As plântulas germinadas *in vitro*, conforme descrito acima, foram utilizadas para a etapa de multiplicação no primeiro experimento.

4.2. Etapa de Multiplicação

4.2.1. Experimento 1 – BAP e ANA

Utilizou-se como explantes segmentos nodais de 2 cm de comprimento contendo de uma a duas gemas axilares, provenientes de plântulas germinadas *in vitro* da desinfestação com ácido sulfúrico. Em seguida, estes segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura WPM suplementado com BAP (0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0 e 16,0 μM) e duas concentrações de ANA (0 e 0,5 μM) em todas as combinações possíveis. Ao meio de cultivo foram adicionados 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 g L⁻¹ de phytigel. O pH do meio

foi ajustado para $5,8 \pm 0,02$ e em seguida autoclavado por 20 minutos à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

O delineamento experimental foi conduzido inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6×2 sendo seis concentrações de BAP (0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0 e $16,0 \mu\text{M}$) e duas concentrações de ANA (0 e $0,5 \mu\text{M}$), totalizando 12 tratamentos, com cinco repetições, sendo três frascos por repetição e um segmento nodal por frasco. Após inoculação em meio de cultura, os frascos foram mantidos em sala de cultura com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após 30 dias foram realizadas avaliações quanto ao número de brotações emitidas por segmento nodal, tamanho das brotações emitidas (cm), número de gemas obtidas, formação de calos (%), oxidação visual do meio de cultura (%) e vigor visual dos segmentos nodais, sendo na escala 1 – vigor baixo, 2- vigor médio e 3 – vigor alto (Figura 2).

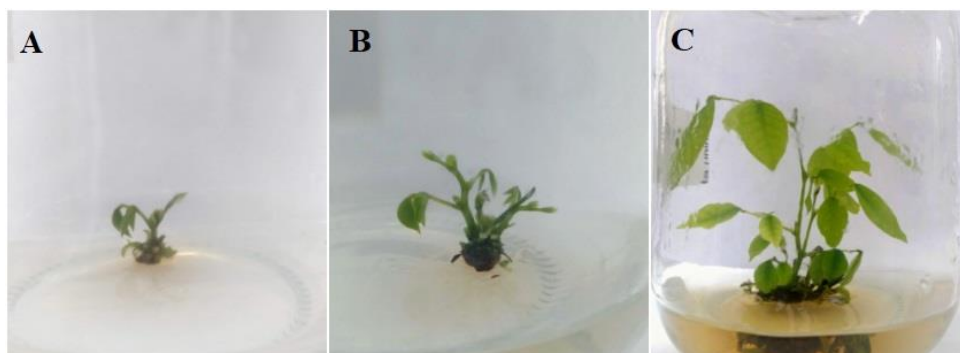


Figura 2 - Classificação visual de vigor de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa in vitro* aos 30 dias após a inoculação na etapa de multiplicação, A – baixo, B – médio e C – alto.

A análise dos dados foi realizada por meio dos testes de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk e o teste de análise da variância de Scott-Knott a 5% de significância e de regressão polinomial pelos softwares SISVAR (FERREIRA, 2011) e R versão 3.0.1 utilizando o pacote *Agricolae* (R Core Team, 2013). Para atender aos pressupostos da normalidade, as médias das variáveis de número de brotações e número de gemas emitidas foram transformadas para \sqrt{x} e $\arcseno \sqrt{x}/100$, respectivamente e, submetidas à análise de variância.

4.2.2. Experimento 2 – Sacarose e trocas gasosas

Os explantes utilizados foram segmentos nodais com pelo menos duas gemas axilares, 2 cm de comprimento e um par de folhas, com idade de 30 dias provenientes de plântulas germinadas *in vitro* em meio WPM, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de PVP e 2,3 g L⁻¹ de phytigel, acrescido de 8 µM de BAP. Estes segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 30 mL de meio de cultura WPM previamente preparado e autoclavado, suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP e 2,3 g L⁻¹ de phytigel.

Para avaliar o efeito de trocas gasosas, testou-se duas formas de vedação dos frascos de cultivo, utilizando tampas de polipropileno com um orifício (10 mm) coberto com membrana (SALDANHA et al., 2012) (taxa de troca de CO₂ de 21 µL L⁻¹ s⁻¹) (Figura 3A) e tampas rígidas (sem membrana) de polipropileno (taxa de troca de CO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹) (Figura 3B) que foram combinadas com quatro concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L⁻¹), totalizando oito tratamentos, com cinco repetições, sendo três frascos por repetição e um segmento nodal por frasco. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4.

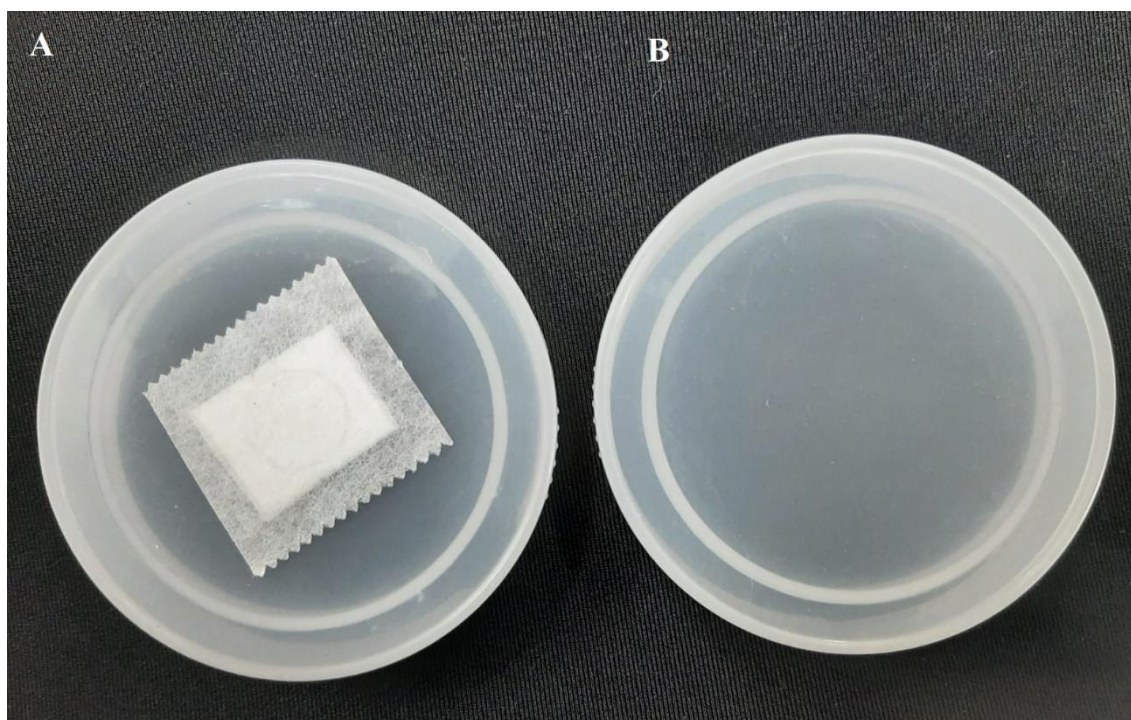


Figura 3 – Formas de vedação do frasco. A- Tampa com membrana B - Tampa sem membrana

Após inoculação em meio de cultura, os frascos foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 30 dias foram realizadas avaliações quanto as variáveis: brotações por segmento nodal, tamanho das brotações emitidas (%), formação de calo (%), tamanho dos calos (cm), número de gemas, oxidação visual no meio de cultura e vigor visual dos segmentos nodais sendo na escala 1 – vigor baixo, 2- vigor médio e 3 – vigor alto (Figura 4).

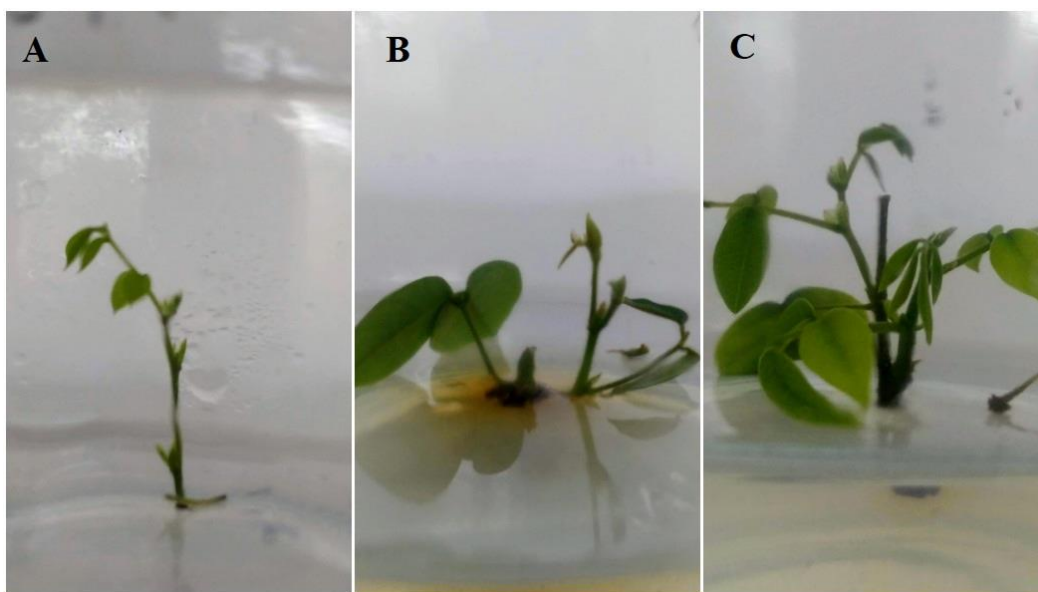


Figura 4 - Classificação visual de vigor de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* *in vitro* aos 30 dias após a inoculação na etapa de multiplicação, A – baixo, B – médio e C – alto.

Foi utilizado o teste de Bartlett para analisar as pressuposições de homogeneidade de variância e o teste de Shapiro-Wilk para normalidade de resíduos por meio do software SISVAR (FERREIRA, 2011). Para as variáveis paramétricas utilizou-se o teste de Scott – Knott nos testes de média e para as variáveis não-paramétricas foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e de regressão polinomial pelos softwares R versão 3.0.1 utilizando o pacote (R Core Team, 2013) e SISVAR.

As variáveis segmentos nodais que emitiram brotação (%), comprimento médio das brotações (cm), e formação de calo (%) foram analisadas por meio de testes não paramétricos. As variáveis emitidas número de gemas, oxidação do meio de cultura (%) tamanho do calo (cm) e vigor foram analisadas por meio de testes paramétricos. A variável tamanho do calo foi transformada pela função $\log x$.logarítmica para garantir a normalidade da variável.

4.3. Etapa de Enraizamento

4.3.1. Experimento 3 – Auxinas e tempo de pulso

Foram utilizados como explantes segmentos nodais de 2 cm contendo 2 gemas axilares e um par de folhas provenientes de plântulas germinadas *in vitro* em meio WPM, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de PVP e 2,3 g L⁻¹ de phytigel.

Os explantes foram submetidas a tratamentos de pulso em meio de cultura WPM, adicionado de 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,3 g L⁻¹ de phytigel e, contendo 100 µM de ANA ou AIB, onde permaneceram por 1, 2, 4 e 8 dias. Após o período de permanência em meio de cultura com auxina, os explantes foram transferidos para frascos de vidro de 250 ml de capacidade contendo 30 ml de meio WPM suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 g L⁻¹ de phytigel. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 sendo dois tipos de auxina (AIB e ANA), quatro tempos de exposição ou pulso (1, 2, 4 e 8 dias). Foram realizadas cinco repetições, sendo dois frascos por repetição e um segmento nodal por frasco. Após inoculação, os frascos foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 60 dias foram realizadas avaliações quanto ao número de raízes, enraizamento (%), comprimento das raízes (cm), formação de calo (%), tamanho dos calos (cm).

Como os dados das variáveis avaliadas não atenderam as pressuposições de homogeneidade de variância, mesmo após transformação, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e por meio de regressão polinomial utilizando-se o software R (R Core Team, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1 - BAP e ANA

As concentrações de BAP e ANA no meio de cultura influenciaram significativamente a indução das brotações de segmentos nodais *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Tabela 1). Houve efeito da concentração dos reguladores para o número de gemas emitidas, porém sem efeito da interação entre os reguladores (Tabela 1). Para o número de brotações emitidas e para oxidação houve efeito apenas para as concentrações de BAP (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise de variância para o número médio de gemas emitidas, número de brotações e para oxidação a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, em função das concentrações de ANA e BAP, aos 30 dias após a inoculação

FV	GL	SQ	QM	Fc	VALOR P
Número de gemas					
ANA	1	1,291	1,249	4,727	0,035
BAP	5	3,710	0,742	2,715	0,038
ANA*BAP	5	1,057	0,211	0,773	0,573
Resíduo	44	12,022	0,273		
CV (%)	28,9				
Número de brotações					
ANA	1	0,428	0,425	2,099	0,153
BAP	5	3,049	0,610	3,008	0,020
ANA*BAP	5	0,579	0,115	0,571	0,721
Resíduo	44	8,919	0,202		
CV (%)	41,6				
Oxidação					
ANA	1	590	590,5	0,592	0,445
BAP	5	376	75,32	0,075	0,000
ANA*BAP	5	436	87,33	0,875	0,505
Resíduo	44	438	997,5		
CV (%)	44,2				

FV – fontes de variação; GL – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fc – valor F calculado; Valor P – probabilidade do valor P.

Houve variação do número de gemas entre as concentrações de BAP, sendo ajustado uma regressão quadrática (Figura 5). A concentração de 8 μ M foi a que proporcionou maior média para o número de gemas (Figura 5A). Para as concentrações de ANA, a raiz quadrada do número de gemas foi superior na ausência (1,96) do que na concentração de 0,5 μ M (1,66) (Figura 5B). Resultado similar foi justificado por Souza et al. (2020) em *Myrcianthes pungens*, uma vez que o desenvolvimento dos meristemas laterais é inibido pela dominância apical devido à presença de auxina nos meristemas das gemas apicais e ainda, essa dominância pode atuar como dreno de nutrientes e citocinina.

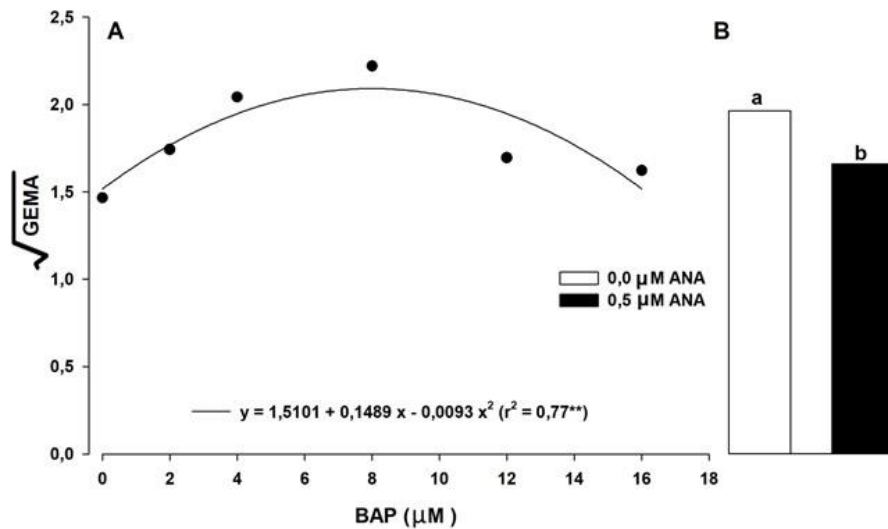


Figura 5 - Raiz quadrada do número gemas emitidas em função das concentrações de BAP (A) e de ANA (B) na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 30 dias após a inoculação. Letras diferentes no gráfico de colunas indicam diferenças pelo teste de médias de Scott-Knott à 95% de probabilidade. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t.

Lencina et al. (2018), avaliando a qualidade dos segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa in vitro* observaram que a concentração de 8,8 µM de BAP foi benéfica para a multiplicação dos segmentos nodais, promovendo o aumento do número de brotações, apesar de não diferir do tratamento com 6,6 µM. Segundo os próprios autores, essa ação ocorreu devido à adição de BAP, que apresenta a função de estimular fortemente os processos morfogênicos, como a divisão e diferenciação celular (TAIZ e ZEIGER, 2004). Além disso, as citocininas podem especificar o destino das células das brotações a partir de diferentes tipos de células (WYBOUW e DE RYBEL, 2019).

A relação entre citocinina e auxina é explorada na multiplicação *in vitro* de variadas espécies florestais pois a interação entre esses reguladores de crescimento controla a atividade no meristema apical promovendo o desenvolvimento vascular e do floema (SCHALLER; BISHOPP; KIEBER, 2015; SILVA et al., 2020). Devido a sintetização da citocinina ocorrer na raiz e se deslocar para a parte aérea através do xilema (TAIZ; ZEIGER, 2004) e a sintetização da auxina suceder da região mais próxima ao nó cotiledonar para a região mais distante, ou seja, o transporte da auxina é realizado no ápice caulinar até as raízes, resultando no equilíbrio hormonal (SILVA et al., 2020). Alguns trabalhos observaram a interação entre esses reguladores, em espécies como *Cassia angustifolia* (PARVEEN; SHAHZAD, 2010), *Cedrela fissilis* (ARAGÃO et al., 2016; BONFÁ; NASCIMENTO; WERNER, 2021) e *Melanoxylon brauna* (SILVA et al.,

2020). Nesses trabalhos, a interação promoveu aumento na taxa de multiplicação dos brotos e, segundo Hartmann et al. (2014) uma proporção de baixa concentração de auxina e alta de citocinina tende a favorecer a formação de brotações e o contrário dessa proporção, ou seja, alta concentração de auxina e baixa de citocinina favorece a formação de raízes. No entanto, a relação desses reguladores deve ser observada em cada espécie. Para Bonfá, Nascimento e Werner (2021) o equilíbrio dos reguladores atua sobre a dominância apical exercida pela razão endógena e permite maior número e comprimento de brotações de *Cedrela fissilis*.

No trabalho de Rout (2005) onde foram testadas diferentes concentrações (0,0; 2,22; 4,44; 6,66; 8,9; 11,1; 13,3; 15,5 e 17,8 μM) de BAP para a espécie *Clitoria ternatea*, a melhor concentração de BAP para a formação de brotações e número de brotações por explante *in vitro* foi de 8,9 μM de BAP. Já Silva et al. (2020) em *Melanoxylon brauna in vitro* observaram que a citocinina BAP não favoreceu o aumento do número de segmentos nodais, concluindo que a aplicação desse regulador de crescimento na fase de multiplicação da braúna é ineficaz. Os autores justificaram que esse resultado se deu pela alta quantidade de citocinina endógena encontrada nessa espécie e, portanto, foi suficiente para causar o crescimento dos segmentos.

Assim como na braúna, em *Myrcianthes pungens* Souza et al. (2020) observaram que o resultado do teste contendo BAP associado ao ANA (1,77 e 0,177 μM respectivamente) não apresentou diferença significativa para a porcentagem de brotações, comprimento e número de folhas dos segmentos nodais, podendo ser utilizado apenas o BAP.

A regressão ajustada para as concentrações de BAP resultou num modelo quadrático, onde o ponto máximo da raiz do número de brotos (NBE) foi obtida na concentração de 7,1 μM de BAP. As altas concentrações de BAP foram inversamente proporcionais ao número de brotações emitidas, ou seja, altas concentrações de BAP proporcionaram um declínio quanto ao número de brotações emitidas (Figura 6A).

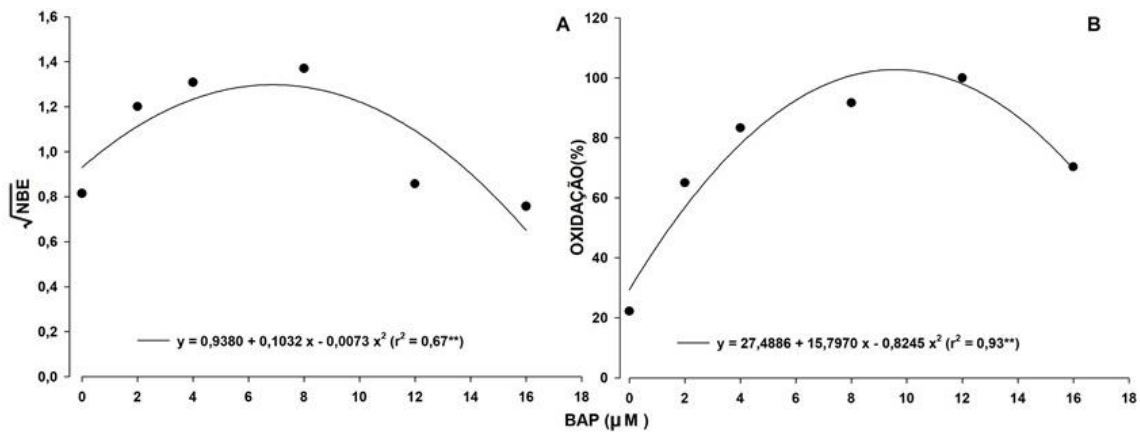


Figura 6 - Raiz quadrada do número brotações emitidas (NBE) (A) e oxidação do meio de cultura (B) em função das concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 30 dias após a inoculação. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t.

Para a oxidação, a regressão ajustada para as concentrações de BAP resultou num modelo quadrático onde o ponto máximo da oxidação ocorreu na concentração de 9,6 μM de BAP (Figura 6B). Abahmane (2011) relatou que as substâncias responsáveis pelo escurecimento do tecido são altamente tóxicas para o tecido cultivado e que consequentemente pode ocorrer efeito negativo na qualidade do explante.

Bezerra et al. (2014) verificaram que o aumento na taxa de multiplicação em *Mimosa caesalpinifolia* foi diretamente relacionado ao incremento da concentração de BAP até determinada concentração considerada ótima, seguida por decréscimo a concentrações superiores.

O número baixo de brotos nas maiores concentrações de BAP pode ser explicado pelo fato de altas concentrações de citocininas poderem reduzir o tamanho do broto e estimular a ocorrência de botões malformados, folhas anormais e hiperidricidade, causando alguma toxicidade ao tecido vegetal (MAZRI, 2015). A citocina promove a divisão celular e a indução de multibrotações a partir de gemas axilares, portanto, esse regulador de crescimento favorece a formação de partes aéreas das plantas (TAIZ et al., 2017).

Não houve diferença entre as concentrações de ANA e BAP, e da interação entre os reguladores para o comprimento das brotações emitidas. O valor médio para as concentrações de BAP variaram de 0,40 a 0,77 cm (Tabela 2). Já para as concentrações de ANA o valor médio foi de 0,63 cm para ambas as concentrações, 0 μM e 0,5 μM.

Tabela 2 - Comprimento médio das brotações emitidas a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, em função das concentrações de BAP aos 30 dias após a inoculação *in vitro*.

BAP (μM)	Comprimento (cm)
0	0,40
2	0,77
4	0,75
8	0,65
12	0,55
16	0,63
Média	0,63
CV (%)	48,15

Lencina (2013) observou que o comprimento das brotações de *A. leiocarpa* apresentou tendência decrescente em relação ao aumento das concentrações de BAP, no entanto, no presente trabalho não foi observado efeito significativo. Canatto, Albino e Cordeiro (2016) com a espécie *Pterodon emarginatus* (sucupira-branca) e Albino et al. (2019) em *Cariniana estrellensis* (jequitibá-branco) atestaram que o aumento da concentração de BAP com o meio MS estimulou a diminuição do comprimento das brotações nas espécies citadas, atestando que o BAP não favorece o alongamento caulinar dos brotos. No entanto, no presente estudo e no trabalho de Lencina (2013) com a mesma espécie e o mesmo meio de cultura WPM, esse comportamento observado pelos outros autores não ficou tão evidente, embora se observe que os valores maiores foram nas concentrações de 2 e 4 μM , e acima desses valores as brotações tiveram redução no comprimento. Essa redução pode ocorrer devido à exposição dos explantes a maiores concentrações de citocinas ao longo da fase de indução, inibindo o crescimento de brotos adicionais devido ao acúmulo de citocinina (MALIK; CHAUDHURY; KALIA, 2005; HARTMANN, et al., 2014) além de ocasionar a quebra de dominância apical das gemas axilares, inibindo o crescimento dos brotos (TAIZ et al., 2017).

A oxidação do meio de cultura foi avaliada visualmente por meio da observação do escurecimento do meio de cultura (Figura 7). Observou-se que à medida que houve emissão de calos na parte basal do segmento nodal, ocorreu a oxidação do meio.



Figura 7 - Brotação de segmento nodal de *Apuleia leiocarpa* em meio WPM oxidado aos 30 dias após a inoculação *in vitro*.

A formação de calos na base do segmento nodal é comum em espécies lenhosas, mas é considerada desfavorável ao processo de micropropagação, visto que sua formação em zona de enraizamento pode afetar a qualidade da raiz, principalmente no que diz respeito às ligações vasculares, formação da raiz e conseqüentemente a absorção de nutrientes (SEKELI et al., 2013).

Assim como neste trabalho, Máximo et al. (2020) em *Handroanthus impetiginosus* observaram que a maioria dos segmentos nodais após 60 dias de cultivo *in vitro* com meio contendo citocinina apresentou formação de calo na base do caule e esses calos apresentaram tamanhos maiores e meios de cultura mais escuros em comparação aos segmentos inoculados em meio que não continha citocinina. Bezerra et al. (2014) observaram que na concentração de 8,8 μM de BAP, a presença de calo no segmento nodal de *Mimosa caesalpinifolia* foi superior às demais concentrações. Altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura são um dos fatores responsáveis pela oxidação das brotações (RIBEIRO et al., 2012).

5.2. Experimento 2 - Sacarose e trocas gasosas

Para as variáveis analisadas pelos testes não paramétricos, não houve efeito significativo das concentrações de sacarose e das trocas gasosas para número de segmentos nodais que emitiram brotação e tamanho das brotações (Tabela 3). Para a variável porcentagem de frascos com formação de calo houve efeito da concentração de sacarose (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de probabilidade das análises não paramétricas em função das concentrações da sacarose e trocas gasosas pelo teste de Kruskal-Wallis para os segmentos nodais que emitiram brotação, o tamanho das brotações e o calo na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 30 dias após a inoculação

Fontes de variação	Valor P
Brotação	
Sacarose	0,1984
Trocas gasosas	0,3130
Tamanho das brotações	
Sacarose	0,6437
Trocas gasosas	0,2326
Calo	
Sacarose	0,0502*
Trocas gasosas	1,0000

*Valores com diferença significativa a 95% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis

Para as variáveis analisadas pelos testes paramétricos, o número de gemas emitidas e o vigor do segmento nodal apresentaram efeito apenas para o fator trocas gasosas (Tabela 4). O tamanho do calo foi influenciado pela interação entre os fatores sacarose e trocas gasosas, e a oxidação apenas pela concentração de sacarose (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância para o número médio de gemas, vigor das brotações, tamanho médio do calo e oxidação do meio de cultivo na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, em função das concentrações de sacarose e da vedação dos frascos, aos 30 dias após a inoculação

FV	GL	SQ	QM	Fc	VALOR P
Gema					
Sacarose	3	3,893	1,298	0,953	0,426
Trocias gasosas	1	6,939	6,939	5,094	0,031
Sacarose*Trocias gasosas	3	0,567	0,189	0,139	0,935
Resíduo	32	43,589	1,362		
CV (%)	37,9				
Vigor					
Sacarose	3	0,826	0,275	1,488	0,236
Troca gasosas	1	2,097	2,097	11,32	0,002
Sacarose* Troca gasosas	3	0,256	0,085	0,462	0,710
Resíduo	32	5,926	0,185		
CV (%)	21,9				
Tamanho do calo					
Sacarose	3	1,046	0,348	9,437	0,001
Troca gasosas	1	0,194	0,194	5,264	0,028
Sacarose* Troca gasosas	3	0,414	0,138	3,737	0,020
Resíduo	32	1,183	0,037		
CV (%)	37,6				
Oxidação do meio					
Sacarose	3	9722,9	3240,9	4,301	0,011
Troca gasosas	1	2777,5	2777,5	3,686	0,064
Sacarose* Troca gasosas	3	1722,2	574,0	0,762	0,524
Resíduo	32	24113	753,5		
CV (%)	65,9				

FV – fontes de variação; GL – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; Fc – valor F calculado; Valor P – probabilidade do valor P.

Quanto a emissão de brotações, na ausência de membrana (frascos inteiramente vedados) ocorreu em 62,5% e na presença em 52,5% dos explantes, não havendo efeito dos fatores testados. Resultado diferente do encontrado no presente estudo foi relatado por Martínez et al. (2017) estudando *Quercus ilex* onde observaram que a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose promoveu melhor resultado para a multiplicação *in vitro* da espécie. Em *Goji Berry* multiplicado *in vitro*, Dias (2017) observou que a concentração 30 g L⁻¹ também permitiu maior média de número de brotações.

No presente estudo a porcentagem de brotação não foi influenciada pela troca gasosa, diferente do observado para a espécie *Eremanthus incanus* que apresentou melhores médias de brotações com o uso de membrana na concentração 30 g L⁻¹

(MIRANDA et al., 2016). Já para a espécie *Ruta graveolus*, Rios (2014) observou que a melhor indução de brotação ocorreu sem a presença de membrana. A autora pressupõe que seja necessária pequena quantidade de gás etileno em ambiente sem membrana para que haja indução de brotação e que possivelmente, o acúmulo desse gás seja benéfico para o desenvolvimento da planta.

O tamanho das brotações é uma variável de grande importância pois quanto maior for o tamanho das brotações emitidas, melhor chance de sucesso para a próxima fase da micropropagação que é o enraizamento/aclimação (LENCINA et al., 2018). No presente estudo, o tamanho médio da brotação variou entre 0,78 e 0,90 cm para as concentrações de sacarose. Na ausência de membrana o tamanho foi de 0,83 cm e na presença 0,88 cm, muito menor do que os valores encontrados para *Tectona grandis* no estudo de Fernandes et al. (2013) que observaram o melhor resultado com uso de membrana (4,1 cm) do que sem a membrana (3,8 cm). Essa diferença sugere que a resposta de crescimento sob condições de uso de membrana no cultivo *in vitro* é variável entre espécies.

Assim como neste estudo, Lencina et al. (2014) estudando *Apuleia leiocarpa* observaram que não houve efeito significativo das concentrações de sacarose para tamanho médio de brotações. As concentrações de sacarose no meio de cultivo promoveram diferentes respostas nas espécies estudadas. Em *Handroanthus impetiginosus* o fator sacarose influenciou o comprimento da parte aérea, com o menor valor observado na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose. No entanto, em *Jacaranda brasiliana* não houve diferença significativa no comprimento das brotações (SOUZA et al., 2020).

Para as variáveis vigor (Figura 8A), número de gemas (Figura 8B), a ausência de membrana, ou seja, a menor taxa de troca gasosa permitiu a obtenção de maiores médias. A porcentagem média de formação de calo (Figura 8C) apresentou ajuste para modelo quadrático, onde o máximo valor obtido foi na concentração de 21 g L⁻¹ de sacarose. A interação entre sacarose e trocas gasosas influenciou o tamanho do calo (Figura 8D), de forma que o tamanho do calo tende a aumentar de forma linear com o aumento da concentração da sacarose em frascos com ausência de membrana (ou seja, menor troca gasosa). Na avaliação da variável oxidação do meio de cultura, observa-se aumento linear em função do aumento da concentração de sacarose (Figura 8E).

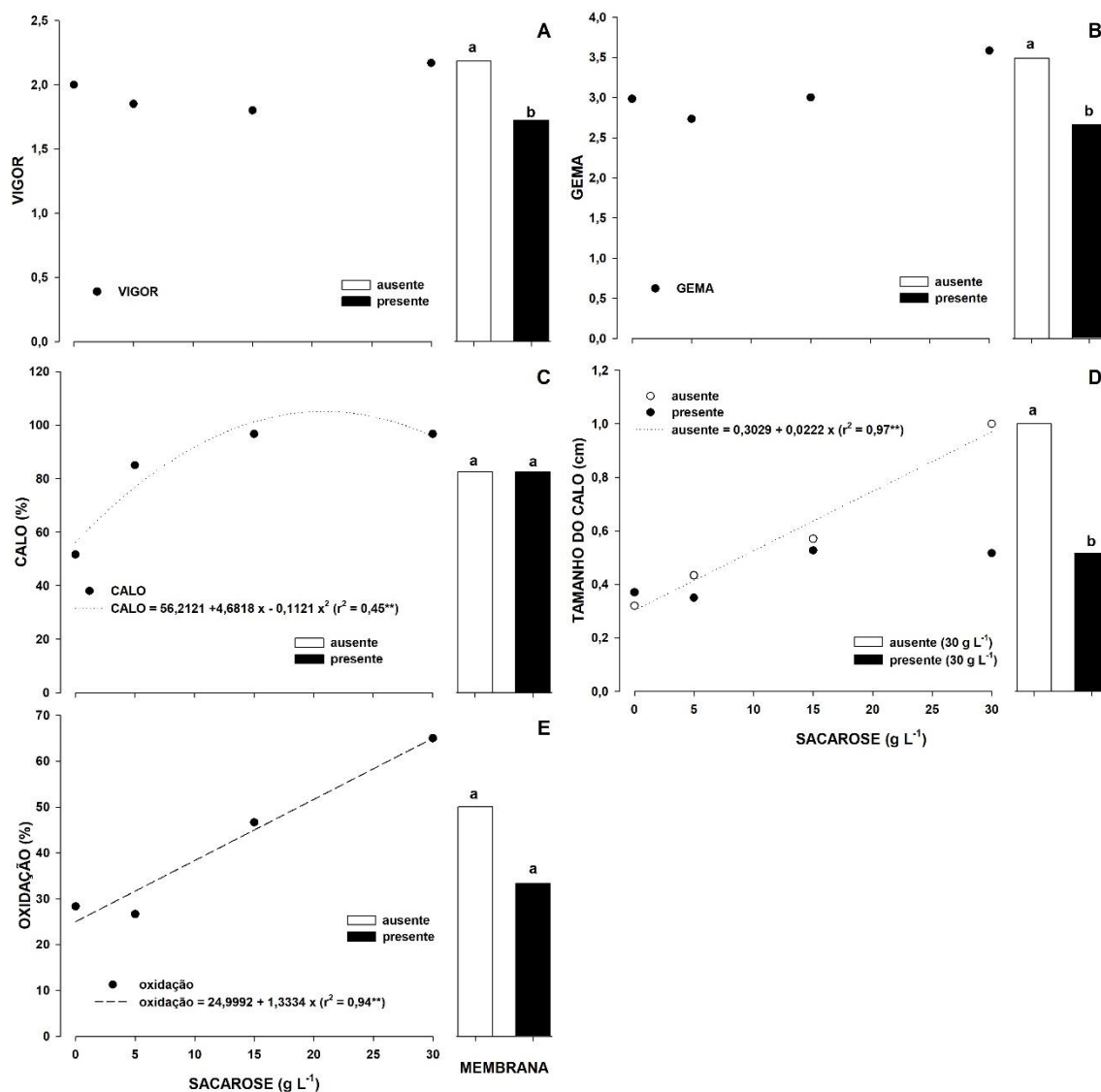


Figura 8 - Média de vigor das brotações (A), número médio de gemas emitidas (B), porcentagem média de formação de calo (C), tamanho médio do calo (D) e porcentagem média de oxidação do meio de cultura (E) na multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, em função das concentrações de sacarose e de formas de vedação dos frascos, aos 30 dias após a inoculação. n.s: diferença não significativa. Letras diferentes no gráfico de colunas diferem as médias pelo teste de Scott-Knott à 95% de probabilidade. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t.

A média de gemas emitidas nos frascos sem membrana foi superior (3,50 gemas segmento⁻¹) a média das gemas nos frascos com membrana (2,67 gemas segmento⁻¹). Para a sacarose, sob todas as concentrações testadas observou-se bons resultados para emissão de gemas, inclusive na ausência da sacarose. A alta multiplicação das gemas constitui fator significativo para produção de mudas em larga escala (FERNANDES et al., 2013). No entanto, vários fatores podem interferir nos resultados da multiplicação *in vitro* da espécie. Altas concentrações de sacarose reduziram o número de gemas, comprimento de brotos e folhas de *Solanum tuberosum* (BANDINELLI et al., 2013).

Na espécie *Quercus ilex*, Martínez et al. (2017) observaram que na concentração de 30 g L⁻¹ proporcionou melhor resultado para número de gemas do que as concentrações 10 e 20 g L⁻¹. De modo semelhante, Bandeira et al. (2007) trabalhando com *Thymus vulgaris* relataram que a média para o número de gemas foi superior na concentração 30 g L⁻¹ quando comparada a concentrações maiores de 40 e 50 g L⁻¹.

No entanto, nem sempre maiores concentrações de sacarose resultarão em melhor desenvolvimento *in vitro* da espécie. O excesso de açúcares no meio pode ocasionar efeitos deletérios tais como, a diminuição da absorção de água, sais minerais e assim interferir no crescimento da plântula, pois maiores concentrações de sacarose alteram negativamente o potencial hídrico do meio de cultura, promovendo assim a degradação da cultura *in vitro* (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013; LEMES et al., 2016; CAVUSOGLU e BOZKURT, 2020). A sacarose é um sinal para vários processos metabólicos da planta, por exemplo, o excesso de sacarose pode causar estresse diferente, porém respostas similares em mudas pela alta intensidade luminosa e de baixas temperaturas (SANTOS et al., 2020).

A sacarose é considerada uma importante fonte de carbono e energia, por ser o carboidrato mais comum na seiva do floema e, está envolvido no controle dos processos de desenvolvimento (HUH et al., 2016). Além de influenciar diretamente o balanço osmótico da planta, devido a abertura e fechamento do estômato (ŠEVČÍKOVÁ et al., 2019). No entanto, quando há um desequilíbrio causado pela concentração de sacarose adicionada externamente, as plantas podem reagir de forma imprevisível, pois podem interpretar o status de carboidrato resultante como disponibilidade de carbono de luxo ou carga de estresse (ŠEVČÍKOVÁ et al., 2019) além, da toxicidade da sacarose em altas dosagens para algumas espécies de plantas (SCHMILDT et al., 2015).

Em relação as trocas gasosas, resultados similares ao presente estudo foram reportados por Pinheiro et al. (2013) para *Olea europaea*, cultivar ‘Maria da Fé’, a qual produziu maior número de gemas em frascos sem membrana quando comparadas aos frascos com membrana. É provável que para haver algum dano no desenvolvimento na indução de brotos de garapa, devam ser necessárias altas quantidades de etileno nos recipientes de cultivo.

Taiz e Zeiger (2004) relataram que a síntese de etileno pode ser elevada pelas condições de estresse, como por exemplo, seca, resfriamento, excesso de água ou ferimento mecânico e, o acúmulo do gás etileno na micropropagação, por ser um ambiente *in vitro*, pode ser prejudicial para os explantes devido a redução do seu crescimento e

desenvolvimento e a ocorrência da hiperhidricidade, queda foliar, senescência e oxidação fenólica (BUDDENDORF-JOOSTEN; WOLTERING, 1994; PELL; SCHLAGNHAUFER; ARTECA, 1997). Em relação ao acúmulo de etileno proveniente da vedação sem membrana dos frascos, é provável que não houve nocividade causado pelo acúmulo em *A. leiocarpa*, embora a concentração desse hormônio não tenha sido quantificada.

Na ausência da membrana o vigor médio dos segmentos nodais foi de 2,18 sendo este superior ao resultado na presença da membrana, onde o valor médio foi de 1,73 (Figura 9A).

Para *Eremanthus incanus* assim como neste trabalho, Miranda et al. (2018) observaram que não houve efeito significativo para o vigor nas diferentes concentrações de sacarose. Ainda com a mesma espécie Miranda et al. (2016) observaram que a presença de membrana apresentou resultados superiores quando se comparou a ausência de membrana. Para Fernandes et al. (2013) a maior concentração de sacarose no meio de cultivo promove aumento do teor de carboidratos foliares e conseqüentemente o maior vigor vegetativo em plantas de *Tectona grandis*.

Em ambas as situações, com e sem membrana, a formação de calo apresentou a mesma média, 82,5%. Pode-se observar que o aumento da concentração de sacarose elevou a porcentagem de calo na presença de membrana, chegando à média de 100% nas concentrações de 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹. Resultado diferente foi encontrado por Rios (2014) em seu estudo com *Ruta graveolens* o qual foi concluído que a concentração de 15 g L⁻¹ na ausência de membrana promoveu maior formação de calo.

A formação de calos na base do segmento nodal é comum em espécies lenhosas, mas é considerada desfavorável ao processo de micropropagação na fase anterior ao enraizamento pois pode afetar a qualidade da raiz, principalmente no que diz respeito às conexões vasculares, formação da raiz e conseqüentemente a absorção de nutrientes (SEKELI et al., 2013).

A sacarose estimula a formação de calos nas bases das brotações dos explantes, portanto, em meio de cultura sem sacarose, geralmente não há formação de calo (XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Além disso, Lemos e Baker (1998) em seu estudo com *Annona muricata* observaram que comparada a outras fontes de carbono (glicose, galactose e sorbitol) a sacarose foi que apresentou maior formação de calo, provavelmente por ser uma fonte de carbono prontamente disponível.

A regressão ajustada para a oxidação resultou num modelo linear (Figura 8E), e a oxidação na ausência da membrana (50,0%) foi igual na presença da mesma (33,3%). Apenas na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, a oxidação foi superior na ausência de membrana (83,34%) do que na presença (46,68%).

Foi observado maior oxidação no meio de cultura nas mesmas concentrações de sacarose, à medida que aumentava o tamanho do calo no segmento nodal (Figura 9). Quando o segmento possuía baixo metabolismo e pouco gasto de energia para se desenvolver, o tamanho do calo foi reduzido e menor oxidação do meio (Figura 9A), ao passo que o segmento nodal que possuía maior tamanho de calo (Figura 9B), possivelmente maior metabolismo e conseqüentemente maior gasto de energia, a oxidação do meio foi mais significativa.

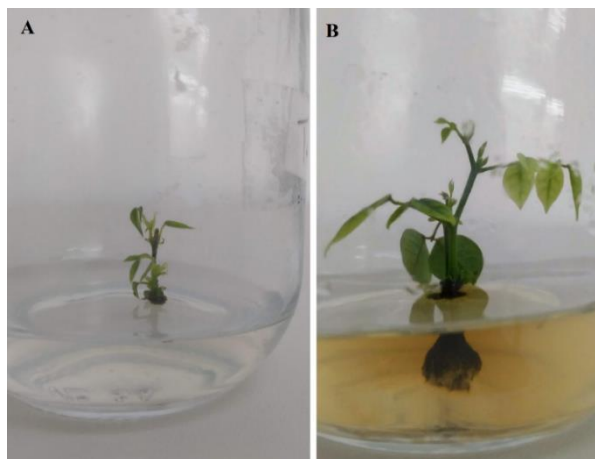


Figura 9 - Segmento nodal de *A. leiocarpa* com calo de tamanho reduzido em meio WPM não oxidado (A); Segmento nodal de *A. leiocarpa* com maior tamanho de calo em meio WPM oxidado (B) aos 30 dias após a inoculação com 5 g L⁻¹ de sacarose.

Tecidos recém-excisados de espécies lenhosas, tendem a secretar pigmentos escuros no meio de cultura em resposta ao ferimento (XAVIER; WENDLING e SILVA, 2021). Esses pigmentos escuros, causadores da oxidação, quando tóxicos, podem causar necrose apical e, eventualmente, morte dos explantes. A severidade do escurecimento varia dependendo da espécie, idade e posição do tecido, idade da planta mãe e local da excisão do explante na etapa da multiplicação, bem como do meio (HUANG et al., 2002; SANDHU; WANI; JIMÉNEZ, 2018). Foi observado que quanto maior é o calo e desenvolvimento do explante, maior é a oxidação do meio de cultura, tendo em vista que a oxidação é a exsudação dos compostos fenólicos dos explantes para o seu desenvolvimento (CID, 2014).

Um recurso utilizado para minimizar o efeito da oxidação fenólica no meio de cultura é a transferência sucessiva dos explantes em novos meios e frascos com maior frequência, assim possibilitaria maior multiplicação de brotações e de gemas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2021). Lencina et al. (2018) evidenciaram que melhores resultados foram observados após a segunda coleta em *A. leiocarpa* e o uso de carvão ativado também foi eficiente para a diminuição da oxidação. O carvão ativado é antioxidante e tem efeito adsorvente, que imobiliza parte das substâncias presentes no meio de cultura, incluindo compostos fenólicos produzidos pelos segmentos nodais. No entanto, apesar da alta ocorrência de oxidação no meio, a oxidação não foi associada a efeitos negativos na espécie *A. leiocarpa*.

Vários pesquisadores indicaram que as plantas às vezes têm um mecanismo de defesa contra a oxidação, reduzindo sua concentração de clorofila para reduzir simultaneamente a absorção de luz e conseqüentemente, o desenvolvimento da planta (TAÏBI et al., 2016).

Logo, foi concluído neste experimento que na ausência de membrana, para a maioria das variáveis avaliadas, a média dos resultados foi superior do que na presença de membrana. Dessa forma, não se justifica modificar a forma de vedação da tampa para a espécie em questão, nas mesmas condições testadas. E ainda, as concentrações de sacarose não apresentaram diferença significativa para a indução de multiplicação de brotações.

5.3. Experimento 3 – Auxinas e tempo de pulso

Todas as variáveis do experimento de enraizamento foram analisadas pelos testes não paramétricos. O número de raízes emitidas e a porcentagem de calos dos segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* foram significativos para a auxina utilizada, porém não houve efeito significativo para o tempo de pulso (Tabela 5). Já o tamanho do calo apresentou efeito para o tempo de pulso apenas (Tabela 5). As variáveis enraizamento, comprimentos das raízes não foram influenciadas pelos fatores testados (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de probabilidade das análises não paramétricas em função das auxinas e do tempo de pulso pelo teste de Kruskal-Wallis para o enraizamento, o número de raízes, a porcentagem de calos, o tamanho do calo e o comprimento médio da raiz no enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 60 dias após a inoculação

Fontes de variação	Valor P
Enraizamento	
Auxinas	0,356
Tempo de pulso	0,793
Número de raízes	
Auxinas	0,004*
Tempo de pulso	0,793
Calo	
Auxinas	0,047*
Tempo de pulso	0,299
Tamanho do calo	
Auxinas	0,132
Tempo de pulso	0,019*
Comprimento médio da raiz	
Auxinas	0,791
Tempo de pulso	0,787

* Valores com diferença significativa a 95% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis

A média do número de raízes emitidas foi superior quando se utilizou ANA, sendo o valor médio de raízes por segmento nodal de 3,23 e 1,33 para ANA e AIB, respectivamente (Figura 10).

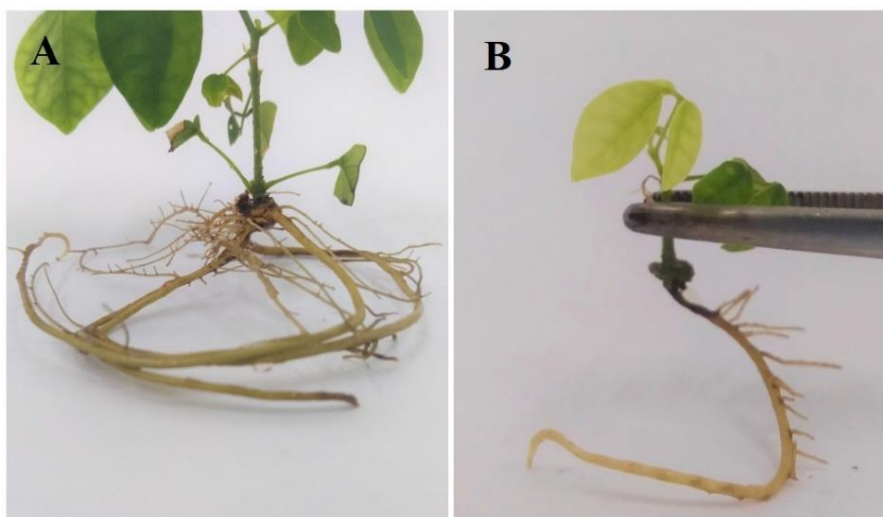


Figura 10 - Segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* enraizados *in vitro* aos 60 dias após a inoculação. Segmento nodal de *A. leiocarpa* com elevado número de raízes obtido em meio com 100 μ M de ANA (A); Segmento nodal de *A. leiocarpa* com baixo número de raízes em meio com 100 μ M de AIB (B).

Sobre o número de raízes emitidas *in vitro*, Lencina et al. (2017) estudando a mesma espécie, observaram que o melhor resultado para o número de raízes, utilizando AIB na concentração de 4,9 μ M por 60 dias no meio de cultura, foi de 1,80. No entanto, as respostas para o enraizamento utilizando diferentes auxinas é variável entre as espécies.

Em *Aniba rosaeodora*, o cultivo em meio com 13,3 μM de ANA foi mais eficiente para induzir maior número de raízes, atingindo uma média de 2,50 após 90 dias (JARDIM et al., 2010). Em *Cattleya* híbrida Dewir et al. (2015) observaram que 10,66 μM de AIB favoreceu a emissão de raízes (com média de 5,70) em comparação com uso de 2,66 μM de ANA (média de 4,4 raízes). Em *Leucospermum cordifolium*, Suárez et al. (2018) verificaram que a melhor média para o número de raízes foi obtida sob pulso de 1 dia em meio com 25 μM de AIB.

A formação de calo foi maior quando se utilizou a auxina ANA, com uma média de 64,7%, superior aos 47,5% de emissão de calo quando se utilizou a auxina AIB. Houve redução linear do tamanho de calo em função do aumento do tempo de exposição dos segmentos nodais aos meios de cultura contendo auxinas (Figura 11). As médias de tamanho dos calos foram de 0,35 cm para ANA e 0,27 para AIB, não sendo significativas.

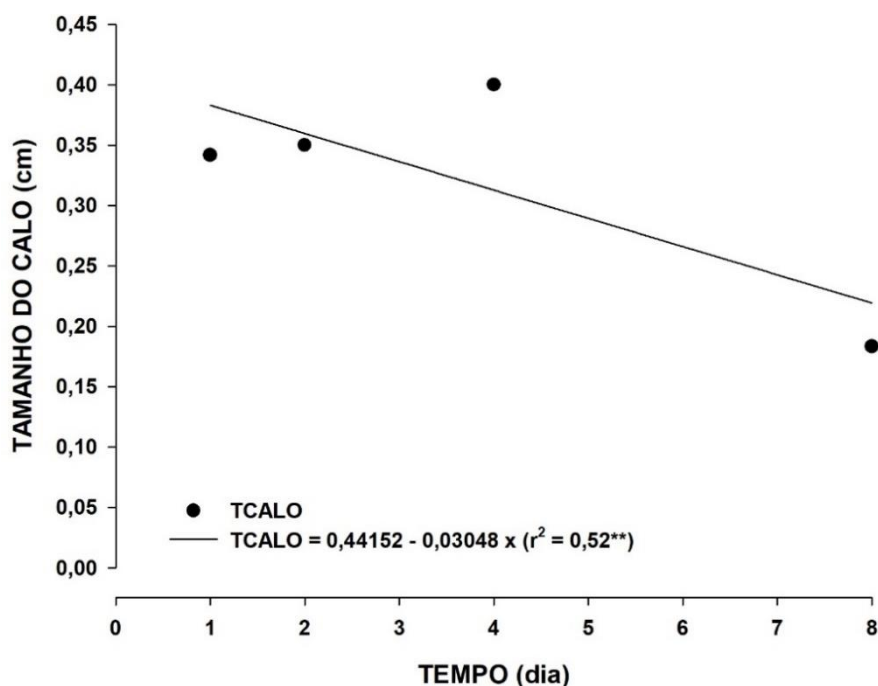


Figura 11 – Tamanho médio do calo (TCALO) em função do tempo de pulso em auxinas no enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *A. leiocarpa*, aos 60 dias após a inoculação. ** Equação e parâmetros significativos à 99% de probabilidade pelo teste t.

A formação de calo é uma resposta do material vegetal ao tratamento e é comum em espécies lenhosas. Porém é considerada desfavorável ao processo de micropropagação, pois sua formação na zona de enraizamento pode afetar a qualidade da raiz, principalmente no que diz respeito às conexões vasculares (SEKELI et al., 2013). Rocha et al. (2008) não observaram influência negativa da formação de calos na rizogênese *in vitro* de *Genipa americana*. Mas em alguns casos, o calo pode inibir a formação de raiz, embora seja essencial para tal (SUÁREZ et al., 2018). Portanto é

necessário que haja equilíbrio entre o desejado e o que pode se tornar desvantagem para a rizogênese.

Em outros estudos com *A. leiocarpa* o uso da auxina ANA também proporcionou maior calogênese do que a auxina AIB, uma média de 97,2% e 48,4% respectivamente (LENCINA et al., 2020). Os mesmos autores afirmam que a calogênese não influenciou negativamente a rizogênese de garapa, assim como Máximo et al. (2020) também afirmaram para *Handroanthus impetiginosus*. No entanto, para *Eucalyptus grandis* foi observado que a produção de calos na base do caule, indicou um excesso de auxina exógena retardando a formação da raiz (NAKHOODA; WATT; MYCOCK, 2011).

A indução de calos ocorre frequentemente em cultura de tecidos e não envolve necessariamente a desdiferenciação celular para criar uma massa de células, mas representa uma forma de organogênese (XU; HUANG, 2014). Além disso o calo é composto por células com características semelhantes às células que formam o meristema radicular. Vários genes e processos envolvidos, bem como a capacidade do próprio tecido da planta responder a esses estímulos na formação das raízes laterais, também ocorrem na formação do calo (XAVIER; WENDLING e SILVA, 2021). Para *A. leiocarpa*, foi observado que a maior indução radicular acompanhou a maior média para formação de calos, ambos sob o uso da auxina ANA, o que sugere não haver prejuízo da calogênese no enraizamento *in vitro* desta espécie. Embora seja necessária a avaliação na aclimatação para a análise da capacidade das raízes na absorção de água e nutrientes.

Mesmo sem efeito significativo das auxinas e do tempo de pulso para o enraizamento, a porcentagem média de enraizamento foi de 40,5%, sendo de 52,9% para ANA e de 30% para AIB (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem média do enraizamento e o comprimento médio das raízes (cm) no enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 60 dias após a inoculação em função das auxinas e do tempo de pulso

Tempo Auxina	AIB	ANA	Média	AIB	ANA	Média
dia	Enraizamento (%)			Comprimento raiz (cm)		
1	20,0	25,0	22,2	4,34	1,75	3,48
2	20,0	50,0	35,0	23,15	3,88	11,59
4	10,0	75,0	38,9	5,20	8,29	7,67
8	70,0	62,5	66,7	7,79	11,64	9,44
Média	30,0	52,9	40,5	10,15	7,41	8,64

No trabalho desenvolvido por Lencina et al. (2020) a auxina ANA em comparação com AIB promoveu melhor resultado para o enraizamento de *A. leiocarpa*, com médias

de 45,5% e 28,9%, respectivamente. De acordo com os autores, os segmentos nodais da espécie em geral respondem bem ao estímulo de auxina ANA independentemente da concentração.

Lencina et al. (2017) também trabalhando com a *A. leiocarpa* obtiveram maior porcentagem de enraizamento (26,4%) utilizando AIB, sem diferença significativa entre as concentrações testadas (0, 4,9, 9,8, 14,7 e 19,6 μM). Silva et al. (2019) estudando a espécie *Luehea divaricata* relataram que a porcentagem de raízes adventícias primárias, aos 30 dias de cultivo com AIB foi de 25,18% e, considerada baixa.

No entanto, outros trabalhos obtiveram sucesso avaliando pulsos em meio de cultura com AIB, como por exemplo Suárez et al. (2018) com a espécie *Leucospermum tango* em que foi alcançado no pulso de 2 dias, 100% de enraizamento independentemente das concentrações de AIB (55,5 e 111,11 μM). Estes autores apontam que a problemática da toxicidade dos explantes pela auxina no meio de cultura com altas concentrações, pode ser solucionada pela transferência destes explantes para um meio sem auxina, o que melhorou significativamente as porcentagens de enraizamento. Do mesmo modo Quambusch et al. (2017) observaram em *Prunus avium* quando realizaram um pulso em meio com 49 μM de AIB por 48h, resultando em uma porcentagem de enraizamento 86%, que foi considerada alta. Segundo Lencina et al. (2017) a espécie *A. leiocarpa* possui dificuldade no enraizamento *in vitro*, quando se compara com a porcentagem de outras espécies, o que reforça os resultados encontrados neste trabalho.

Para o comprimento de raízes foi observada grande variação no experimento, independentemente do tratamento testado (Figura 12). O comprimento médio de segmentos enraizamento após exposição a meio com AIB foi de 10,15 cm, e de 7,41 cm em ANA (Tabela 6).

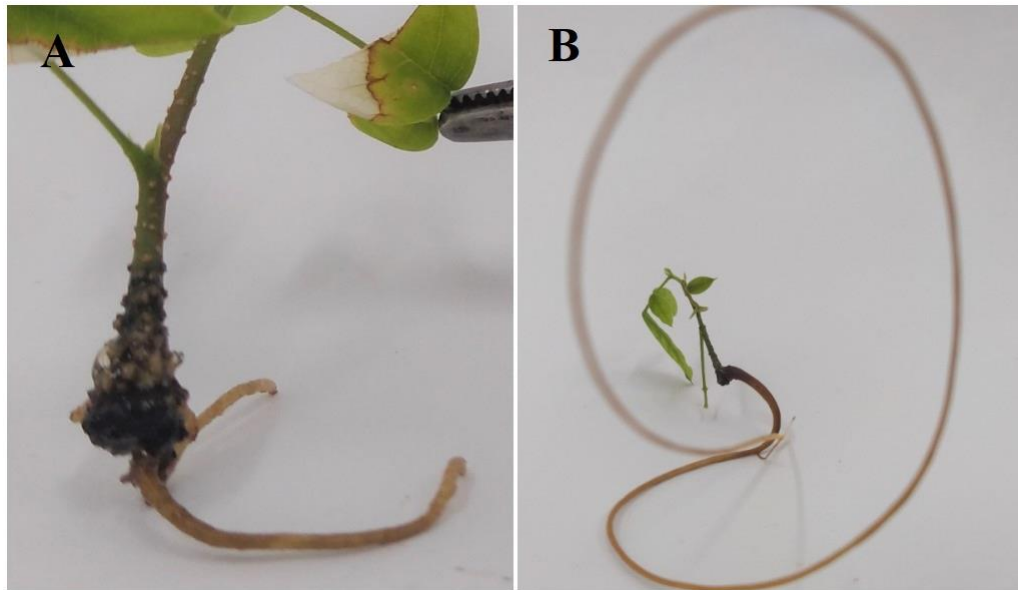


Figura 12 - Segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* enraizados *in vitro* aos 60 dias após a inoculação. Segmento nodal de *A. leiocarpa* com menor comprimento de raiz (A); Segmento nodal de *A. leiocarpa* com maior comprimento de raiz (B).

Cabe salientar que outros fatores externos, de natureza física e química também podem influenciar a rizogênese *in vitro*, estimulando-a ou inibindo-a. Além disso, o genótipo da planta-matriz, entre outros aspectos podem, igualmente, interferir no desenvolvimento *in vitro* de plantas (SILVA et al., 2019; XAVIER; WENDLING e SILVA, 2021).

O tipo de auxina influencia a capacidade de enraizamento em muitas espécies da família Fabaceae e a escolha desse regulador pode variar de espécie para espécie (DEWIR et al., 2016). Sendo assim, o uso da auxina ANA para o enraizamento *in vitro* de *A. leiocarpa* é a melhor opção em comparação com a auxina AIB no tratamento através do pulso de auxina, o que coincide com resultados encontrados por Lencina et al. (2017) também no enraizamento *in vitro* da espécie. Deve-se destacar também que o enraizamento adventício é essencial para o sucesso da propagação vegetativa, sendo um processo de grande complexidade que depende tanto de fatores endógenos quanto exógenos que ainda não foram totalmente elucidados.

6 CONCLUSÕES

Foram elucidados aspectos para o desenvolvimento de um protocolo para a micropropagação de *Apuleia leiocarpa* por meio da proliferação de gemas axilares, para as fases de multiplicação e de enraizamento *in vitro*.

Para a multiplicação *in vitro* de *A. leiocarpa* observando as concentrações de reguladores de crescimento, o uso da auxina ANA não afetou a multiplicação, porém a citocinina BAP influenciou positivamente na emissão de brotações, com a concentração de 8,0 μM , apresentando melhores resultados de média para o número de gemas emitidas e 7,1 μM para o número de brotações. A citocinina foi fundamental para o sucesso da multiplicação.

As diferentes concentrações de sacarose não influenciaram a multiplicação *in vitro* da *A. leiocarpa*, no entanto a troca gasosa (tipo de vedação) foi um fator importante a ser considerado. A ausência de membrana proporcionou melhores resultados do que a presença de membrana.

De forma geral, o tempo de pulso das auxinas não influenciou a rizogênese. A auxina ANA favoreceu o número de raízes dos segmentos nodais, com média de 3,23 raízes, logo, para o enraizamento *in vitro* de *A. leiocarpa* é indicado o uso de ANA.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Apuleia leiocarpa* ao longo do tempo vêm sofrendo pressão devido ao seu elevado valor comercial madeireiro, chegando à Lista Vermelha de espécies Ameaçadas em Extinção. Diante disso, a micropropagação torna-se uma possibilidade para propagação da espécie. No entanto, para a produção de um protocolo completo que permita a produção eficiente de mudas de *A. leiocarpa* por meio da micropropagação, variados aspectos sobre o cultivo *in vitro* da espécie precisam ser abordados e melhorados.

Tendo em vista que a micropropagação florestal de espécies particularmente nativas da Mata Atlântica ainda é uma lacuna a ser preenchida, esperamos que este estudo contribua com trabalhos posteriores, elevando a importância da propagação dessa espécie.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAHMANE, L. Date Palm Biotechnology via Organogenesis. In: JAIN, S.; AL-KHAYRI, J.; JOHNDON, D. (eds); **Date Palm Biotechnology**. Springer: Dordrecht, 2011, p. 69–90.
- ALBINO, B. É. S. et al. Propagação in vitro de Jequitibá branco (*Cariniana estrellensis*): uma alternativa para programas de reflorestamento. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 13, n. 2, p. 88–99, 2019.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v. 58, p. 9, 2002.
- ARAGÃO, V. P. M. et al. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 13, n. 2, p. 41–50, 2018.
- BANDEIRA, J. M. et al. **Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L.** v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007.
- BANDINELLI, M. G. et al. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação in vitro e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, p. 242–247, 2013.
- BENITEZ-MALVIDO, J. Impact of forest fragmentation on seedling abundance in a tropical rain forest. **Conservation Biology**, v. 12, n. 2, p. 380–389, 1998.
- BEZERRA, R. M. F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação in vitro de *Mimosa caesalpiniiifolia* benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 771–778, 2014.
- BONFÁ, Y. S.; NASCIMENTO, V. L.; WERNER, E. T. In vitro multiplication of *Cedrela fissilis* Vell.: A threatened brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 17, n. 165, 2021.
- BOTIN, A. A.; CARVALHO, A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, MT, n. 1, p. 83–96, 2015.
- BUDDENDORF-JOOSTEN, J. M. C.; WOLTERING, E. J. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. **Plant Growth Regulation**, v. 15, p. 1–16, 1994.
- CANATTO, R. A. et al. Propagação in vitro de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel): uma espécie florestal nativa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 12, n. 3, p. 76–88, 2016.
- CARDOSO, J. C.; GERALD, L. T. S.; SILVA, J. A. T. Micropropagation in the Twenty-First Century. 2018. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) **Plant Cell Culture Protocols**. Methods in Molecular Biology, vol. 1815. Humana Press, New York. p. 17–46.
- CARVALHO, P. E. **Circular Técnica 77-** Gráphia, Embrapa, Colombo, PR, 2003.

CASTRO, D. S. et al. Superação de dormência em sementes de garapa (*Apuleia leiocarpa* (VOGEL)) J. F. MACBR. *Colloquium Agrariae*. v,15 n. 4, p. 51–59, 2019.

CAVUSOGLU, A.; -BOZKURT, D. Plant stress induced by excessive sucrose and agar concentration on in vitro germination and plantlet growth of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae). *Applied Ecology and Environmental Research*, v. 18, n. 5, p. 7445–7455, 2020.

CID, L. Pedro Barrueto. **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. Brasília. v. 1 Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1077494/cultivo-in-vitro-de-plantas>. Acesso em: 27 nov. 2020.

CNCFlora. *Apuleia leiocarpa* in **Lista Vermelha da flora brasileira** versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apuleia leiocarpa](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apuleia_leiocarpa)>. Acesso em 13 novembro 2021.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). *Revista Árvore*, v. 28, n. 5, p. 633–642, 2004.

CROUZEILLES, R. et al. There is hope for achieving ambitious Atlantic Forest restoration commitments. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 17, n. 2, p. 80–83, 2019.

DEO P. C. et al. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, v. 28, p. 27-40, 2010.

DEWIR, Y.H. et al. Micropropagation of *Cattleya*: Improved In Vitro Rooting and Acclimatization Introduction. *Hort. Environ. Biotechnol*, v. 56, n. 1, p. 89–93, 2015.

DEWIR, Y. H. et al. In vitro rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, v. 57, n. 4, p. 311–322, 2016.

DIAS, C. S. **Propagação de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.)** 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade de Pelotas, RS, 2017. 60f.

DIAS, Poliana Coqueiro; OLIVEIRA, Leandro Silva De; XAVIER, Aloisio; WENDLING, Ivar. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 32, n. 72, p. 453–462, 2012.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, n. 58, p. 49–60, 2009.

FABRIS, D.; GERBER, T.; SARTORETTO, L. M. Desinfestação, germinação e micropropagação in vitro de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride. *Scientific Electronic Archives*, v. p, n. 3, n. Id, p. 17–26, 2016.

FELIPPI, M. et al. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. MacBr. *Ciência Florestal*, v. 22, n. 3, p. 477–491, 2012.

FERMINO-JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia forestalis**, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FERNANDES, D. et al. Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. **Revista de Agricultura**, v. 88, n. 3, p. 218–228, 2013.

FERREIRA, Daniel Furtado. **Sisvar: a computer statistical analysis system REVIEW SISVAR: A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM Sisvar: um sistema computacional de análise estatística.**

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 03 set. 2019.

FORTINI, E. A. et al. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 144, v.3, p. 593–605, 2021.

FREIRE, C. G. et al. Micropropagation's Complete Protocol of Red Araçá (*Psidium cattleianum*, Myrtaceae) from Germinated Seeds *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 2, 2018.

FREIRE, J. M. et al. Vegetative propagation of *Hymenaea courbaril* L. and *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. MacBr. By mini-cutting. **Revista Árvore**, v. 44, p. 1–11, 2020.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório Anual 2018 da SOS Mata Atlântica.** São Paulo. Disponível em: < https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2019/07/RA_SOSMA_2018_DIGITAL.pdf >. Acesso em: 16 ago. 2019.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – Relatório Técnico.** Período 2017–2018. São Paulo: Fundação, SOS Mata Atlântica, 35 pp. 2019. Disponível em <https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2019/05/Atlas-mata-atlantica_17-18.pdf>. Acessado em: 08 set. 2019.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127–134, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa- CNPH, v.1, p. 183-260, 1998.

HARTMANN, H.T. et al. **Plant Propagation Principles and Practices Hartmann.** 8 edition ed.: Pearson New International Edition, 2014.

HUANG, L.C et al. HIGH POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY AND LOW TITRATABLE ACIDITY IN BROWNING BAMBOO TISSUE CULTURE. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 38, p. 358–365, 2002.

HUH, Y. S. et al. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on in vitro germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. **J Plant Biotechnol**, v. 43, p. 132-137, 2016.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 275–279, 2010.

JAVED, S. B. et al. In vitro regeneration and multiplication for mass propagation of *Acacia ehrenbergiana* Hayne: A potential reclament of denude arid lands. **Agroforestry Systems**, v. 87, n. 3, p. 621–629, 2013.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: Ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459–473, 2014.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 27, p. 47–51, 1991.

LEMES, C. S. et al. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial in vitro de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 499–505, 2016.

LEMONS, E. E. P.; BAKER, D. A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 105–112, 1998.

LENCINA, Kelen Haygert. **GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Área de concentração em Silvicultura, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.

LENCINA, Kelen Haygert. **Micropropagação e diversidade genética em *Apuleia leiocarpa*. (VOGEL) J. F. MACBRIDE**. 2016. Santa Maria, 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Área de concentração em Silvicultura, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2016.

LENCINA, K. H. et al. Introduction of nodal segments and *in vitro* rooting of *Apuleia leiocarpa*. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 4, p. 1290–1298, 2020.

LENCINA, K. H. et al. Estabelecimento e crescimento in vitro de plantas de grápiá. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1025–1030, 2014.

LENCINA, K. H. et al. ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF *Apuleia leiocarpa* PLANTLETS ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE *Apuleia leiocarpa*. **Agrociência**, v. 51, p. 909–920, 2017.

LIMA, H.C. de 2015. *Apuleia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22796>>. Acessado em: 22 mai. 2020.

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

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

LOUREIRO, M. B. **Conservação de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. garapa (Leguminosae-Caesalpinoideae)**. 2005. Tese. (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2005.

MALIK, S. K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R. K. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 4, p. 539–553, 2005.

MARTÍNEZ, M. T. et al. C. Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, n. 3, p. 499–512, 2017.

MÁXIMO, W. P. F.; et al. Multiplication and *in vitro* rooting of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex dc.) Mattos. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 658–668, 2020.

MAZRI, M. A. Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve in vitro shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 268–275, 2015.

MIRANDA, N. A. et al. Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação in vitro de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia forestalis**, v. 44, n. 112, p. 1009–1018, 2016.

MIRANDA, N.A. Antioxidants, sucrose and agar in the in vitro multiplication of *Eremanthus incanus*. **Floresta**, v. 48, n. 3, p. 311–320, 2018.

MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots Revisited**: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. Washington, DC: Cemex, 2004. 390p.

MORETTI, M. S. et al. Dinâmica espaço-temporal da extração seletiva de madeiras no estado de Mato Grosso entre 1992 e 2016. **Ciência Florestal**, Santa Maria – RS, v. 30, n. 3, p. 796 – 808, 2020.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3 p.473-497, 1962.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.

NAKHOODA, M.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. Auxin stability and accumulation during in vitro shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 2, p. 263–271, 2011.

NICOLOSO, F.T. et al. Efeito de métodos de escarificação na superação da dormência de sementes e de substratos na germinação e no desenvolvimento da grápia (*Apuleia leiocarpa*), **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 419-424, 1998.

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.

PAIVA, H.N.; GONÇALVES, W. **Produção de mudas para arborização urbana**. Ed. Aprenda Fácil, Viçosa - MG, p. 169, 2012.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. from root explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 789-796, 2010.

PELL, E. J.; SCHLAGNHAUFER, C. D.; ARTECA, R. N. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 264-273, 1997.

PORFÍRIO, K. P. et al. Multiplicação *in vitro* de *Xylopia aromatica* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, n. 1, 2019.

QUAMBUSCH, M. et al. Improved *in vitro* rooting of *Prunus avium* microshoots using a dark treatment and an auxin pulse. **Scientia Horticulturae**, v. 220, p. 52-56, 2017.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 21 jul. 2013.

RIBEIRO, J. M. et al. Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa* spp.) cv. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 293-298, 2012.

RIOS, A. M. R. **Cultivo *in vitro* de *Ruta graveolens* (Rutaceae): efeito de trocas gasosas, de irradiâncias e de fitorreguladores na morfoanatomia e no metabolismo secundário**. 2014. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Faculdade de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2014. 131f.

ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 8, p. 769-774, 2008.

ROMERO, A. C. et al. Effects of urban sprawl on forest conservation in a metropolitan water source area. **Revista Árvore**, v. 42, n. 1, 2018.

ROUT, G. R. Micropropagation of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae) - An important medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 4, p. 516-519, 2005.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SANDHU, M.; WANI, S. H.; JIMÉNEZ, V. M. In vitro propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Springer Netherlands, 2018.

SANTOS, G. C. et al. Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulata*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 4, p. 1353–1367, 2020.

SCHALLER, G. E.; BISHOPP, A.; KIEBER, J. J. The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. **The Plant Cell**, v. 27, p. 44–63, 2015.

SCHMILDT, O. et al. Photosynthetic capacity, growth and water relations in “Golden” *Papaya* cultivated in vitro with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theor. Exp. Plant Physiol.**, v. 21, p. 7–18, 2015.

SEKELI, R. et al. Better Rooting Procedure to Enhance Survival Rate of Field Grown Malaysian Eksotika Papaya Transformed with 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase Gene. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 10, 2013.

ŠEVČÍKOVÁ, H. et al. Mixotrophic in vitro cultivations: the way to go astray in plant physiology. **Physiologia Plantarum**, v. 167, n. 3, p. 365–377, 2019.

SILVA, E. R. et al. In vitro of *Melanoxydon brauna* schott. Morphogenesis: Responsiveness of explants to permanent and temporary immersion growth regulators. **Cerne**, v. 26, n. 1, p. 26–36, 2020.

SILVA, J. G. S. et al. Vegetative propagation of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. **Journal of Forestry Research**, p. 1-8, 2021.

SILVA, K. B. et al. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1282–1295, 2019.

SOUZA, L. A. G.; VARELA, V. P.; BATALHA, L. F. P. Tratamentos pré-germinativos em sementes florestais da amazônia: VI - Muirajuba *Apuleia leiocarpa* (vog.) MacBride var. *molaris* SPR. *ex benth.* (Leguminosae). **Acta Amazonica**, v. 24, n. 1–2, p. 81–89, 1994.

SOUZA, L. S. et al. In vitro rooting and multiplication of *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand. **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 1, p. 1–8, 2020.

SUÁREZ, E. et al. Structural and ultrastructural variations in in vitro and ex vitro rooting of microcuttings from two micropropagated *Leucospermum* (Proteaceae). **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 300–307, 2018.

TABARELLI, M. S., CARDOSO, J. M.; GASCON, E. CLAUDE. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, n. 7, p. 1419–1425, 2004.

TAÏBI, K. et al. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 306–312, 2016.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720p.
- TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 858p.
- VALIENTE-BANUET, A. et al. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. **Functional Ecology**, v. 29, n. 3, p. 299–307, 2015.
- VIDAL-LIMON, H. et al. Taxus cell cultures: an effective biotechnological tool to enhance and gain new biosynthetic insights into taxane production. **Reference Series in Phytochemistry**, p. 295-316, 2018.
- VITOUSEK, P. M.; et al. Human domination of Earth's ecosystems. **Urban Ecology: An International Perspective on the Interaction Between Humans and Nature**, v. 277, n., p. 3–13, 2008.
- WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. **Embrapa Florestas**, PR, Colombo, 2006.
- 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*. **Agronomia Costarricense**, v. 2, p. 309-319, 2009.
- WYBOUW, B.; RYBEL, B. Cytokinin – A Developing Story. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 2, p. 177–185, 2019.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed., Editora UFV, Viçosa, MG, 2013, 279p.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 3. ed., Editora UFV, Viçosa, MG, 2021, 275p.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149–158, 2011.
- XU, L.; HUANG, H. Genetic and Epigenetic Controls of Plant Regeneration. *In: Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc., 2014. v. 108p. 1–33.