



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



IÊDA TANAN DA SILVA

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Sideroxylon obtusifolium* (ROEM. &
SCHULT.) T. D. PENN: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E FITOQUÍMICOS**

Feira de Santana – BA
2023

IÊDA TANAN DA SILVA

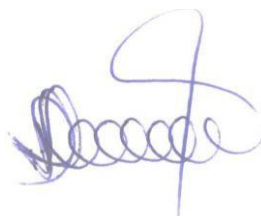
CULTIVO *IN VITRO* DE *Sideroxylon obtusifolium* (ROEM. & SCHULT.) T. D. PENN: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FITOQUÍMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Profº Dr. José Raniere Ferreira de Santana
Coorientadora: Dra. Andressa Priscila Piancó Santos Lima

Feira de Santana - BA
2023

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Alone Lima Brito
(Universidade Estadual de Feira de
Santana)



Prof. Dr. Fábio Ribeiro
Garcia (Instituto Federal
do Pará)



Dra. Andressa Priscila Piancó
Santos Lima (Universidade
Estadual de Feira de Santana)
Co-Orientadora e Presidente
da Banca

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

bb

S578c Silva, Iêda Tanan da
Cultivo *in vitro* de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem.& Schult.) T. D. Penn: aspectos morfológicos, bioquímicos e fitoquímicos / Iêda Tanan da Silva .- Feira de Santana, 2023
73p.: il.
Orientador: José Raniere Ferreira de Santana
Coorientadora: Andressa Priscila Piancó Santos Lima
Dissertação(Mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2023.

1. *Sideroxylon obtusifolium* -Quixabeira - Sapotaceae. 2.Morfogênese. 3. Plantas medicinais I. Santana, José Raniere Ferreira de, orient. II. Lima, Andressa Priscila Pinacó Santos, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 581.41

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha imensa gratidão a Deus, que sempre esteve presente em minha vida, guiando-me e dando-me forças para seguir em frente. Este trabalho foi concluído em meio a uma fase tão turbulenta em minha vida. A pandemia da COVID-19 nos trouxe muitas incertezas e dificuldades, mas com a ajuda de minha família e amigos, consegui enfrentar as adversidades e seguir em frente.

Agradeço imensamente aos meus dois filhos, João Victor e Artur, que sempre me encheram de força e coragem para não desistir e compreenderam a minha ausência em alguns momentos.

Gratidão a minha mãe, sem todo apoio e ajuda não teria conseguido terminar essa etapa da minha vida. Agradeço meu irmão, por toda ajuda de sempre, principalmente pela companhia aos meninos.

Minha imensa gratidão à minha coorientadora, Andressa Piancó cujo apoio, orientação e paciência foram fundamentais durante todo o processo. Sua dedicação e disponibilidade foram imprescindíveis para que eu pudesse superar os desafios que surgiram ao longo do caminho.

Ao meu orientador Professor Raniere, por ter acreditado em mim e ter sido compreensivo durante todo esse tempo, por todos os conselhos e orações. Tenho imensa admiração pelo senhor!

Aos colegas do programa, agradeço pelos bons momentos de conversas, risos e desespero. A todos do LCTV que me acolheram e sempre se propuseram a ajudar, em especial a professora Alone, a quem tenho enorme admiração.

Aos amigos que essa jornada insana me trouxe, Robson, Flávio, Júnior, Isabela, Vanessa, Dinah e Bárbara, minha gratidão por vocês terem deixado essa dura jornada mais leve.

Aos amigos queridos Luana, Del, Jacson, Cilda, que sempre me acolheram e não soltaram minha mão, mesmo com toda minha ausência. Saibam que sou mais forte porque tenho vocês ao meu lado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa e todo fomento concedido.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não podem dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

RESUMO

Sideroxylon obtusifolium é uma frutífera inserida na família Sapotaceae e utilizada na medicina popular de maneira etnofarmacológica. Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento *in vitro* e morfogênese da espécie conhecida popularmente por quixabeira. As sementes foram desinfestadas em diferentes agentes químicos por tempos variados. Posteriormente foi avaliado o tempo de imersão em hipoclorito de sódio. A fim de avaliar a composição do meio para germinação, foram testados o MS ½ e WPM, com e sem adição de carvão ativado. Avaliou-se também o efeito do ácido giberélico na germinação. Para morfogênese foram avaliadas a porcentagem de explante responsivo à formação de broto e de calo sob efeito de BAP combinado com ANA em segmento nodal e hipocótilo, e o efeito de BAP na formação de brotos em segmento apical. Determinou-se o teor de açúcar redutor, açúcar solúvel total, proteínas e aminoácidos, e foi realizada a triagem fitoquímica em calos. Os resultados indicaram que o hipoclorito 2% durante 25 min é eficiente para a assepsia das sementes. Para a germinação o meio mais adequado foi o WPM contendo carvão, e não houve influência do ácido giberélico. Com a adição de 2 µM de BAP foi possível a formação de brotos em segmento nodal. A formação de calos em segmento nodal foi observada utilizando 1 µM de ANA, e em hipocótilo com a combinação de 4 µM de BAP e 2 µM de ANA. A quantificação bioquímica apresentou alto teor de açúcar solúvel total e a análise fitoquímica detectou a presença de alcaloide, cumarinas e saponinas.

Palavras chave: Estabelecimento *in vitro*. Organogênese. Calogênese. Lenhosas. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Sideroxylon obtusifolium is a fruit-bearing plant belonging to the Sapotaceae family and is used in traditional medicine in an ethnopharmacological manner. This study aimed to establish *in vitro* culture and morphogenesis of the species popularly known as quixabeira. The seeds were disinfested using different chemical agents for varying durations. Subsequently, the immersion time in sodium hypochlorite was evaluated. In order to assess the composition of the germination medium, MS ½ and WPM were tested, with and without the addition of activated charcoal. The effect of gibberellic acid on germination was also evaluated. For morphogenesis, the percentage of explants responsive to shoot and callus formation under the influence of BAP combined with NAA in nodal and hypocotyl segments was assessed, along with the effect of BAP on shoot formation in apical segments. The content of reducing sugar, total soluble sugar, proteins, and amino acids was determined, and phytochemical screening was performed on callus tissues. The results indicated that 2% hypochlorite for 25 minutes is effective for seed asepsis. The most suitable germination medium was WPM containing charcoal, and gibberellic acid had no influence. The addition of 2 µM BAP enabled shoot formation in nodal segments. Callus formation in nodal segments was observed using 1 µM NAA, and in hypocotyls with the combination of 4 µM BAP and 2 µM NAA. Biochemical quantification revealed a high content of total soluble sugar, and phytochemical analysis detected the presence of alkaloids, coumarins, and saponins.

Keywords: *In vitro* establishment. Organogenesis. Callogenesis. Woody. Medicinal plants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	13
2.2	Propagação.....	15
2.4	Metabolismo primário e secundário.....	20
3	MATERIAL E MÉTODO.....	23
3.1	Local de coleta e realização dos experimentos.....	23
3.2	Estabelecimento in vitro	23
3.2.1	Desinfestação de sementes com diferentes agentes químicos	23
3.2.2	Desinfestação de sementes com diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio.....	24
3.2.3	Composição do meio de cultura na germinação e crescimento inicial in vitro.....	25
3.2.4	Efeito do ácido giberélico na germinação e crescimento inicial in vitro	26
3.2.5	Obtenção de planta matriz.....	26
4	MORFOGÊNESE IN VITRO	27
4.2	Efeito de BAP e ANA em segmento de hipocótilo	27
4.3	Efeito de BAP na indução de broto em segmento apical	27
4.4	Condições de cultivo in vitro	28
4.5	Análise bioquímica	28
4.5.1	Preparação do extrato.....	28
4.5.2	Quantificação bioquímica.....	28
4.6	Análise fitoquímica.....	29
4.6.1	Preparação do extrato.....	29
4.6.2	Triagem fitoquímica.....	29
4.7	Análise estatística	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1.1	Desinfestação de sementes com diferentes agentes químicos	30
5.1.2	Desinfestação de sementes com diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2%.....	32
5.1.3	Composição do meio de cultura na germinação e crescimento inicial in vitro.....	34
5.1.4	Efeito do ácido giberélico na germinação e crescimento inicial in vitro	37

6	MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i>.....	40
6.1.1	Efeito de BAP e ANA em segmento nodal	40
6.1.2	Efeito de BAP e ANA em segmento de hipocótilo	45
6.1.3	Efeito de BAP na indução de broto em segmento apical	48
6.2	Quantificação bioquímica.....	50
6.3	Análise fitoquímica.....	52
7	CONCLUSÃO.....	55
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	56

1 INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como quixabeira, quixaba, sapotiaba, sacutiaba, coronilha, coca, maçaranduba-da-praia, miri e rompe-gibão (SILVA et al., 2012), *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn é uma frutífera inserida na família Sapotaceae. No Brasil sua distribuição ocorre em áreas úmidas e na beira de rios da caatinga arbórea, nas restingas litorâneas e na mata chaquenha do Pantanal Mato-Grossense (LORENZI, 2002).

Esta espécie nativa é amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas infecções como: dores no trato gastrointestinal, inflamações crônicas, lesões nas genitais, inflamações nos ovários, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos e diabetes (ALBURQUERQUE et al., 2011; BELTRÃO et al., 2008; LEANDRO et al., 2013; SILVA et al., 2021).

O uso de plantas por comunidades tradicionais é bastante amplo e representado em diversos estudos (BALESTRIN et al., 2020; MAMEDE; PASA, 2019). Dentre os usos da quixabeira por estas comunidades, podemos citar ainda o uso da madeira como cercas em construções rurais, fabricação de móveis e cabo de ferramentas, alimentação humana e animal, obtenção de energia pela queima da lenha e carvão (FERRAZ; MEUNIER; ALBUQUERQUE, 2005; NASCIMENTO et al., 2009).

No entanto, o uso extrativista de sua casca, para fins medicinais, ocasiona a morte dessas plantas, levando a redução de indivíduos desta espécie em seu habitat natural (BARBOSA et al., 2020; SILVA; DANTAS, 2013). Ademais, a *S. obtusifolium* é propagada de forma sexuada, através da germinação de sementes, e esta via apresenta algumas dificuldades, tais como a dormência das sementes, que necessitam de estratégias para superá-las, e a dependência de fatores abióticos como temperatura, umidade e fotoperíodo favoráveis para garantir o sucesso reprodutivo. Sendo assim, são necessários estudos que busquem estratégias que auxiliem a produção de mudas para a exploração dessa espécie de forma sustentável.

Neste contexto, a utilização de ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, tem se mostrado como um importante recurso para auxiliar a conservação de espécies com importância econômica, medicinal e em risco de extinção, produzindo plantas uniformes, saudáveis e com uma velocidade maior do que métodos convencionais (ALMEIDA CANÇADO et al., 2009).

A micropropagação é uma das aplicações da cultura de tecidos de mais larga utilização, pois permite a produção de um elevado número de mudas em um curto período de tempo (WENDLING; DULTRA; GROSSI, 2006) e fornece material botânico de maneira contínua para estudos fisiológicos e biotecnológicos. No entanto, para obtenção de um protocolo adequado de micropropagação é necessário que as fases de estabelecimento *in vitro*, multiplicação *in vitro*, enraizamento e aclimatização sejam realizadas com eficácia (NAVROSKI; REINIGER, 2015; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). A fase de multiplicação pode ocorrer pela organogênese, caracterizada pelo surgimento de órgãos adventícios, como brotos e raízes a partir de uma ou várias células (ANDRADE, 2002; LEMOS, 2015). Ou, pela embriogênese somática, através do desenvolvimento de estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (ZIMMERMANN, 2014). Em ambas as vias, o desenvolvimento pode ocorrer de forma indireta, em que ocorre a formação inicial de aglomerados de células não diferenciadas e com crescimento desordenado denominados de calos, ou de forma direta, caracterizada pelo surgimento de órgãos adventícios, como brotos e raízes sem que ocorra formação inicial de calos (ANDRADE, 2002).

Além disso, para os processos de desdiferenciação e rediferenciação são necessários a utilização de reguladores de crescimento para estimulação da parte aérea e formação de raízes (LEMOS, 2002). Dentre os mais utilizados destacam-se as citocininas que promovem a quebra da dominância apical e as auxinas, utilizadas na indução de raízes (TAIZ; ZEIGER, 2017). Explantes como caules, folhas e raízes, quando cultivados na presença de elevadas concentrações de auxinas, como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o picloram, potencializam a indução de calos, devido ao seu efeito na promoção da divisão celular (CORDEIRO et al., 2007), bem como o balanço entre as concentrações de auxinas e citocininas podem viabilizar a calogênese (CORDEIRO et al., 2007). Dessa forma, além dos reguladores o sucesso do cultivo *in vitro* depende de fatores como o tipo de explante, o meio nutritivo, a assepsia e as condições de luz e temperatura (CID; TEIXEIRA, 2015; GRIMALDI et al., 2016).

Assim, o cultivo *in vitro* de calo representa uma ferramenta valiosa para a produção de metabólitos secundários de interesse, tornando possível o cultivo de exemplares mais produtivos em meios otimizados para o crescimento e acúmulo de metabólitos secundários (RIBEIRO, 2013). Visto que, as plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar padrões morfogenéticos diferentes quando comparadas ao cultivo *in vivo* (RODRIGUES; OLIVEIRA; ARAUJO MARIATH, 2004).

Nesse contexto, a técnica de cultura de tecidos de plantas apresenta uma série de vantagens para a produção desses compostos, a citar: a independência dos fatores ambientais, o aumento no controle da produção, o uso de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, a simplificação dos métodos de processamento e a recuperação do produto alvo, o aproveitamento de novas rotas de síntese a partir de linhagens mutantes, entre outras (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), pois pode proporcionar uma maior potencialização de produção desses bioativos, uma vez que é possível controlar condições do meio de cultivo, temperatura, luz, fontes de carbono, entre outros fatores (MORAES, et al., 2012).

Além da produção de metabólitos secundários, a identificação e comprovação da existência de metabólitos primários no cultivo *in vitro* permite avaliar como as moléculas podem afetar um determinado processo biológico (ALBERTS et al. 2006). Assim, são empregadas técnicas de análises bioquímicas que busquem identificar as vias de metabolismo primário essenciais ao desenvolvimento das plantas (MEIRA, 2019; PASSOS, 1996; SILVA, et al., 2021; SOUZA; RESCAROLLI; NUNES, 2018).

Considerando a falta de estudos com cultivo *in vitro* de quixabeira, este trabalho visa o estabelecimento e morfogênese *in vitro* de *Sideroxylon Obtusifolium* e o estudo de seus metabólitos primários e secundários.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 *Sideroxylon obtusifolium*: Aspectos botânicos e farmacológicos

A família Sapotaceae Juss. contém cerca de 1.250 espécies entre árvores e arbustos (ARMSTRONG, 2010). No Brasil está representada por 13 gêneros e 245 espécies, das quais 107 são endêmicas (ALVES-ARAÚJO, et al., 2020). Distribuídas por todo território nacional, ocupam diferentes domínios fitogeográficos, como Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pampa, Pantanal e Mata Atlântica (CARNEIRO et al, 2015; GOVEARTS; FRODIN; PENNINGTON, 2001). No entanto, algumas espécies da família se encontram ameaçadas de extinção devido à redução de habitats, atividades antrópicas e alta exploração econômica, como extração de látex e madeira (ALMEIDA JÚNIOR; SILVA; ZICKEL, 2018; GOMES et al., 2010; PENNINGTON, 1991).

O gênero *Sideroxylon* L. é composto por cerca de 75 espécies de hábito arbóreo e arbustivo (KIILL; MARTINS; SILVA, 2014). Dentre estas, a espécie *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn, conhecida popularmente como quixaba, quixabeira, sapotiaba, sacutiaba, coronilha, coca, maçaranduba-da-praia, miri e rompe-gibão (SILVA et al., 2012), é uma frutífera não cultivada e frequente em seu habitat natural (LORENZI et al., 2006), ocupando as margens de cursos de água ou as várzeas úmidas de solos aluviais pesados (LACERDA et al., 2005).

Segundo Pennington (1990), essa espécie ocorre especialmente em áreas secas desde o México até a Argentina. No Brasil, ocorre nos domínios da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal, sendo a única representante do gênero no país (CARNEIRO et al., 2015; FABRIS; PEIXOTO, 2013) presente em várzeas úmidas e na beira de rios da Caatinga arbórea, nas restingas litorâneas e na mata chaquenha do Pantanal Mato-Grossense, preferencialmente em solos argilosos e ricos em cálcio, cuja distribuição é predominantemente descontínua ao longo da área que ocupa (LORENZI, 2002).

S. obtusifolium é uma árvore caducifólia, espinescente e possui copa densa e baixa, sendo utilizada com sucesso na arborização de fazendas. Apresenta folhas simples, inteiras, opostas, assimétricas, de limbo completo, cartáceas, glabras, superfície lisa, coloração concolor, de forma elíptica e nervação peninérveas (SILVA et al., 2012).

Suas flores são hermafroditas, com antese diurna e dicogamia protogínica, ou seja, a maturação das flores femininas ocorre antes das flores masculinas e exalam odor forte e adocicado. Apresentam inflorescências em fascículos axilares, com 2-20 flores esbranquiçadas, actinomorfas,

diurnas, odoríferas e gamopétalas. O sistema de reprodução é do tipo autógamo facultativo, e sua floração ocorre entre os meses de outubro e novembro sendo produzidos frutos tanto por autopolinização, quanto por polinização cruzada. Abelhas, vespas, moscas e borboletas são visitantes florais em populações naturais de quixabeira, no entanto, apenas abelhas (*Apis mellifera* Linnaeus) e morfoespécies de dípteros (moscas) são polinizadores (KIILL; MARTINS; SILVA, 2014).

De acordo com Kiill, Martins e Silva (2014) *S. obtusifolium* poderia ser considerada como uma planta de dispersão generalista/oportunista, utilizando várias espécies da avifauna para a disseminação das sementes, podendo ser considerada como uma importante fonte alimentar para a avifauna da região. Os frutos, apelidados de quixabas, são comestíveis, possuem formato que variam de globuloso a elipsoide, de coloração verde quando imaturos e coloração roxo-escuro quando maduros, conforme apresentado na Figura 1 (SILVA; DANTAS, 2017). Amadurecem entre os meses de janeiro a fevereiro, produzindo anualmente abundante quantidade de sementes viáveis (GARRIDO et al., 2007). Os frutos da quixabeira são do tipo baga, lisos, indeiscentes, monospermicos, com polpa succulenta e de sabor doce, com látex viscoso e sementes com tegumento endurecido de coloração castanho-claro (SILVA et al., 2012).

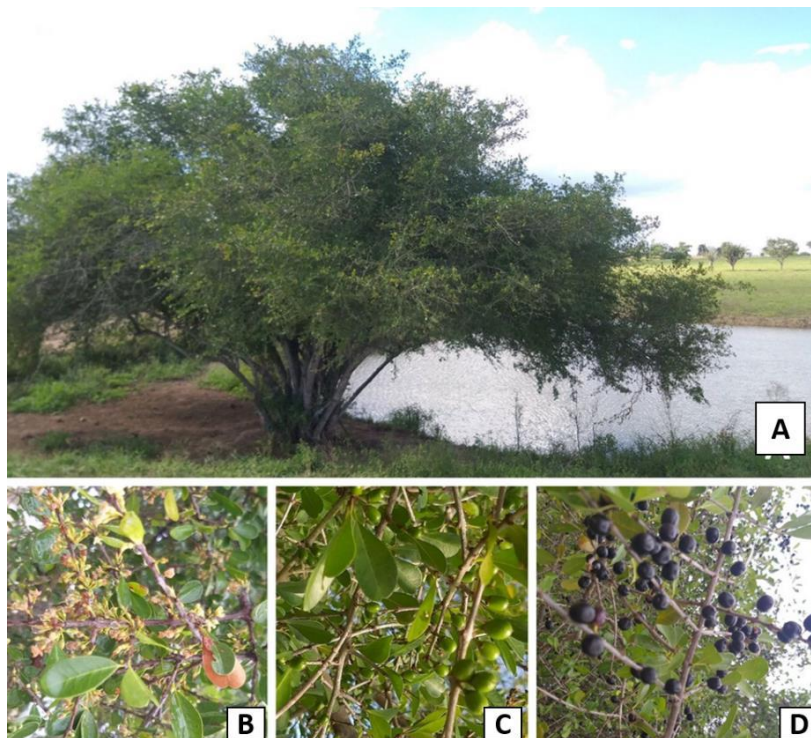


Figura 1. Exemplar de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn. (A) Floração (B) Fruto imaturo (C) Fruto maduro (D) Fonte: Autora, 2020

Suas sementes apresentam dispersão zoocórica e possuem dormência tegumentar, sendo necessário o desenvolvimento de métodos que visam a superação da mesma, tais como a escarificação mecânica e química, e tratamentos com altas temperaturas (REBOUÇAS et al., 2012). Além da barreira tegumentar, fatores abióticos como temperatura, umidade e fotoperíodo, afetam a produção de flores e frutos interferindo no sucesso da reprodução sexuada dessa espécie.

A quixabeira é uma das espécies mais utilizadas na medicina popular no sertão nordestino. Dentre as formas de uso nessas comunidades, destacam-se a ingestão por via oral, em que a casca é colocada na água para retirar as substâncias medicinais; a garrafada, preparada com água ou cachaça adicionando folhas de outras espécies; e o lambedor, que consiste no cozimento da casca com açúcar (ALBURQUERQUE et al., 2011; BARBOSA, 2018).

Estudos realizados nas cascas, folhas e nos frutos, com extrações metanólicas e etanólicas, já comprovaram a eficácia farmacológica para dor, cicatrização, anti-inflamatório e antioxidante, devido à presença de metabólitos secundários tais como fenóis, taninos, xantonas, flavonoides, alcaloides, catequinas, esteroides, triterpenóides e heterosídeos saponinicos que foram identificados a partir de prospecção fitoquímica (AQUINO et al., 2015; ARAUJO-NETO et al., 2010; LEITE et al., 2015; SILVA et al., 2021). Os frutos possuem antocianinas com alto potencial na eliminação de radicais livres, apresentando capacidade elevada com o aumento da concentração e do tempo de reação (FIGUEIREDO; LEMA, 2015).

Embora seja amplamente utilizada por comunidades tradicionais, alto poder farmacológico e ambiental, para recuperação de áreas degradadas e manutenção do equilíbrio ecológico (LORENZI, 2002), estudos apontam a diminuição dessa espécie em áreas naturais, devido principalmente à perda de habitat e extração da casca para fins medicinais (BELTRÃO et al., 2008; SÁ, 2017). Dessa forma, Paulino et al. (2011) apontam a escassez de estudos sobre a espécie e indicam a necessidade de métodos que busquem a propagação e produção de mudas da quixabeira.

2.2 Propagação

A propagação de plantas é vista como o conjunto de práticas, que visam a perpetuação das espécies e pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. Espécies vegetais que se propagam de forma sexuada, encontram diversos fatores que irão influenciar a sua reprodução. Dentre eles, a dormência de sementes é apontada como uma das principais dificuldades na produção de mudas (ROCHA et al., 2018; SMIDERLE; SOUSA, 2003). Além disso, a produção irregular de sementes,

somado a baixa quantidade disponível, proporcionam um longo período para obtenção de mudas de espécies nativas (OLIVEIRA; DIAS; BRODANI, 2013).

A propagação de quixabeira é feita através de sementes, e apresenta dormência tegumentar (PAULINO, 2011), o que dificulta a presença de novos indivíduos em áreas naturais. Assim, a propagação de mudas em viveiros tem buscado alternativas que alcancem um índice satisfatório de emergência, crescimento e desenvolvimento de plantas, a fim de manter a eficiência da manutenção de recursos naturais. Em razão da necessidade de produção de mudas das espécies, de forma rápida e com qualidade, estudos que busquem alternativas para realização da propagação assexuada são relevantes, tanto por assegurar a multiplicação de espécies florestais nativas, quanto a conservação destes recursos genéticos (OLIVEIRA; DIAS; BRODANI, 2013).

A propagação vegetativa consiste na multiplicação assexuada de partes da planta, como caule, folhas ou raízes, a fim de gerar um indivíduo geneticamente idêntico à planta mãe, sem ocorrência de recombinação gênica (PARAJARA, 2015). Nesse contexto, ferramentas biotecnológicas, como a cultura de células e tecidos vegetais tem se mostrado promissora na resolução de questões ligadas à propagação de espécies nativas, com importância econômica e passíveis de extinção (COSTA, 2018). Visto que, o método de cultivo *in vitro* baseia-se na produção de plantas uniformes, sadias e com uma velocidade maior do que métodos convencionais, e tem sido utilizado no melhoramento genético de plantas e na recuperação de genótipos livres de vírus e outros agentes patogênicos, formação de germoplasma, produção de sementes sintéticas, microenxertia, estudo de biologia vegetal, dentre outros (ALMEIDA CANÇADO et al., 2009; CID; TEIXEIRA, 2015).

2.3 Cultivo *in vitro*

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos vegetais de mais larga utilização, pois permite um elevado número de mudas sadias e geneticamente uniformes, em um curto período de tempo. Devido ao princípio da totipotência das células, a micropropagação estabelece que qualquer parte do vegetal, tenha capacidade de originar uma nova planta sob condições adequadas (WENDLING; DULTRA; GROSSI, 2006).

Esse processo pode ocorrer pela organogênese, caracterizada pelo surgimento de órgãos adventícios, como brotos (cauligêneses) e raízes (rizogêneses) a partir de uma ou várias células (ANDRADE, 2002; LEMOS, 2015). Ou, pela embriogênese somática, através do desenvolvimento

de estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (ZIMMERMANN, 2014).

A micropropagação consiste nas etapas de estabelecimento *in vitro*, multiplicação *in vitro*, enraizamento e aclimatização, sendo que para um bom resultado final, todas as etapas devem ser realizadas com atenção e eficiência, pois o sucesso de uma influencia diretamente a próxima etapa (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

O estabelecimento *in vitro* abrange a escolha do explante, que vai depender entre outros fatores da disponibilidade do material, juvenilidade do tecido e nível de contaminação (CID; TEIXEIRA, 2015). Seguido pela escolha do método de desinfestação, pois o uso de protocolos eficientes são essenciais nessa etapa, uma vez que a presença de microorganismos representa limitações na obtenção de culturas assépticas (SALLES, 2017).

O processo para o estabelecimento de espécies lenhosas encontra obstáculos como a contaminação, que ocorre normalmente em razão do crescimento de microorganismos que não foram eliminados durante a desinfestação do material ou por falhas na assepsia de equipamentos e meio de cultura, por exemplo (ESPOSITO-POLESI, 2020). Deste modo, estabelecer um protocolo de assepsia eficaz é fundamental no processo de micropropagação, visto que a contaminação ocasiona perdas consideráveis de material vegetal (THOMAS; ASWATH, 2014), por isso se recomenda a utilização de agentes químicos, como o etanol (70%), hipoclorito de sódio e fungicidas nesta etapa, considerando que as concentrações e o tempo de exposição variam a depender da espécie. É recorrente ainda, a adição de algumas gotas de detergente neutro à solução de hipoclorito para reduzir a tensão superficial da água e proporcionar melhor contato com os tecidos, facilitando a assepsia (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013; SALLES, 2017).

O meio nutritivo irá fornecer macro e micronutrientes, compostos orgânicos como vitaminas, e água, necessários para o desenvolvimento da plântula (CID; TEIXEIRA, 2015). Tradicionalmente o meio nutritivo é composto por sacarose, que atua como fonte de energia, regulador osmótico e esqueleto de carbono para biossíntese das células (CID; TEIXEIRA, 2015; FLORES et al., 2013; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Contudo, apesar de sua importância, altas concentrações de sacarose pode remover a água intracelular por meio do gradiente osmótico, resultando em alterações no crescimento e nas respostas fisiológicas dos vegetais (FLORES et al., 2013). Outro componente presente no meio nutritivo é o ágar, utilizado

para gelificar o meio. Entretanto, pode provocar resistência a difusão de nutrientes para o explante devido ao aumento do potencial osmótico quando em altas concentrações (REZENDE et al., 2008).

A multiplicação via organogênese induz a diferenciação de órgãos vegetais a partir de uma ou mais células totipotentes, e ocorrerá de forma direta ou indireta, a depender do tipo e concentração do regulador vegetal utilizado (ANDRADE, 2002). Geralmente, concentrações elevadas de citocininas e auxinas induzem a formação de brotos pela via direta, enquanto o equilíbrio entre os dois reguladores promove a formação de calos (GUERRA; NODARI, 2016). Na organogênese direta, a proliferação das gemas ocorre sem que haja a desdiferenciação dos tecidos dos explantes (GUERRA; NODARI, 2016), tornando-se possível a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta mãe, assegurando a uniformidade das culturas de interesse comercial e mantendo características morfológicas desejáveis (LIMA-BRITO, 2009; MASCARENHAS; SANTANA; BRITO, 2019). Já na organogênese indireta, ocorre a indução de calos por meio de uma etapa de desdiferenciação, seguida por uma rediferenciação para a formação dos novos tecidos e órgãos (GUERRA; NODARI, 2016).

A formação de calos, também denominada calogênese, ocorre a partir de explantes como raízes, caules, folhas, entre outros, a partir da intensa divisão celular, quando cultivadas na presença de elevadas concentrações de auxinas, assim o uso de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram são consideradas mais potentes para a indução de calos, devido ao seu efeito na promoção da divisão celular (CORDEIRO et al., 2007). Nesse processo, as células do explante são induzidas a retornarem ao estado inicial meristemático e ocorre em três etapas: a indução, na qual ocorre a preparação do tecido isolado com a ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular, a divisão propriamente dita, onde as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor, iniciando pelas periféricas e posteriormente ocupando a região central do explante e a desdiferenciação, o tecido perde sua identidade histológica, as células tornam-se maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão diminui e então ocorre o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular (SOUZA; RESCAROLLI; NUNES, 2018). O tipo de calo formado, seu grau de diferenciação celular e o potencial morfogenético, dependem do explante e dos constituintes do meio de cultura, diferindo também em textura e coloração, observando-se que alguns são compactos e crescem vagarosamente, enquanto outros são friáveis e se desintegram facilmente quando manipulados (CORDEIRO et al., 2007; GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Como visto, o sucesso dessa etapa depende de características intrínsecas da espécie e do tipo de regulador utilizado, visto que pode ser necessária a suplementação hormonal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Dessa forma, para a obtenção de um protocolo de regeneração eficiente, além da escolha do explante mais adequado, é necessário a indução dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, responsáveis pela formação de tecidos e órgãos, através do uso de reguladores de crescimento, capazes de estimular a formação de parte aérea e raízes (KIELSE, 2009; LEMOS, 2002). Deste modo, a indução de brotações em explantes pode ser realizada por meio da utilização de citocininas exógenas, como 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), e thidiazuron (TDZ) promovendo o crescimento inicial das gemas axilares pela quebra da dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2017). Pesquisas na área tem mostrado resultados satisfatórios na multiplicação *in vitro* via organogênese direta utilizando a citocinina BAP em diversas espécies florestais (CANATTO; ALBINO; CORDEIRO, 2016; MIRANDA, et al., 2020; PAIVA PORFÍRIO et al., 2020).

Além disso, diferentes auxinas, como o ácido indol-3-butírico (AIB), o ácido indol-3-acético (AIA), o ácido 1-naftaleno acético (ANA), e o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), são comumente utilizados neste processo, buscando estimular o desenvolvimento da parte aérea, em concentrações que variam de acordo com a espécie em estudo, pois promovem a divisão, diferenciação e alongamento celular e são responsáveis pela dominância apical. Embora seja requerido em concentrações menores, quando comparadas às citocininas, é importante o balanço hormonal entre esses reguladores, uma vez que elevadas concentrações de auxinas podem estimular a produção de calos e promover o enraizamento, afetando a produção de brotos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TAIZ; ZEIGER, 2017). Dentro da classe de giberelinas, o ácido giberélico (GA3) é o mais utilizado na indução do desenvolvimento de nós, crescimento de gemas, inibição na formação de raízes e rompimento da dormência de embriões (CARVALHO; VIDAL, 2003).

A rizogênese se destacapor ser uma etapa chave na produção de mudas micropropagadas, já que para o crescimento e a sobrevivência das microplantas durante o processo de aclimatização, a formação de um sistema radicular bem definido é importante, assim como alternativas que minimizem a perda de água (PASA et al., 2012; ROCHA et al., 2008). O tipo de auxina e suas concentrações, influenciam diretamente a etapa de enraizamento, e variam conforme a cultivar (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009).

No que se refere ao controle do crescimento e divisão celular, o papel das auxinas na indução e desenvolvimento das raízes tem sido amplamente estudado (KERBAUY, 2008). Assim sendo, diversos trabalhos realizados com espécies lenhosas, têm demonstrado que o uso de AIB em baixas concentrações é eficaz no processo de enraizamento (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009; RIVERA CURI; CABRERA PINTADO; BULNES SORIANO, 2020;).

Ainda no processo de enraizamento, um dos fatores físicos necessários para o crescimento e desenvolvimento de raízes é a ausência de luz (ZANELLA et al., 2020), por isso o carvão ativado tem sido utilizado em meios de cultura para estimular o enraizamento, devido a sua alta habilidade em reduzir a luz do meio e também por adsorver compostos fenólicos liberados pelos tecidos, uma vez que esses compostos podem inibir o enraizamento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Após a etapa de enraizamento, as mudas micropropagadas passam pelo processo de aclimatização. Nesse período, as microplantas sofrem mudanças nas condições ambientais, uma vez que serão transferidas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (ROCHA et al., 2008), sendo necessário o desenvolvimento de estratégias fisiológicas como o controle da transpiração e condutância estomática (DIAZ-PEREZ; SUTER; SHACKEL, 1995), controle da perda de água pelas células (SUTTER, 1988) e aumento da taxa fotossintética (VAN TELGEN; VAN MIL; KUNNEMAN, 1992). Além disso, as condições físicas e nutricionais dos substratos irão interferir na sobrevivência das mudas aclimatizadas (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001). Portanto, para o sucesso na etapa da aclimatização, é necessário que os fatores ambientais estejam adequados para uma boa resposta fisiológica da planta.

Com o propósito de obter-se mudas de quixabeira de forma sustentável, este trabalho poderá contribuir para a conservação da espécie através de programas de reflorestamento, bem como fornecer material asséptico para diversos estudos, a citar os farmacológicos e conservação de germoplasma, visto que não há trabalhos dessa natureza relatados na literatura.

2.4 Metabolismo primário e secundário

Os processos bioquímicos conhecidos como metabolismo primário englobam moléculas que desempenham funções vitais do organismo, como aminoácidos, açúcares e proteínas. Nesse sentido, os carboidratos fornecem esqueletos de carbono e energia para a biossíntese de compostos orgânicos, envolvidos no metabolismo celular (PASSOS, 1996). Os aminoácidos são precursores de vários compostos bioquímicos, como os ácidos nucleicos e as substâncias nitrogenadas do metabolismo secundário, como os fitorreguladores, além de componente básico na formação de

proteínas, importantes para o metabolismo (MEIRA, 2019; ORTIZ-LOPEZ et al. 2000; SKOKUT, et al., 1985). Já as proteínas podem desempenhar funções enzimáticas e estruturais (PASSOS, 1996), além de atuarem no transporte de substâncias para dentro e para fora das células, na resistência e adaptação da planta a estresses abióticos, no acúmulo de compostos de reserva e na manutenção do crescimento das células, tecidos e órgãos vegetais (MEIRA, 2019). Nesse contexto, o conhecimento dos níveis destes compostos do metabolismo primário durante o desenvolvimento de calos, contribui potencialmente para o conhecimento da fisiologia morfogenética.

Além disso, os princípios ativos presentes nas plantas são capazes de provocar algum tipo de atividade biológica quando introduzidos por qualquer via no organismo animal, inclusive no homem (BOSCOLO; SENNAVALLE, 2008). *Sideroxylon obtusifolium* é considerada uma espécie importante no uso da terapia tradicional mediante a ação comprovada por diversos estudos (ARAÚJO-NETO et al., 2010; BELTRÃO et al., 2008; PEDROSA et al., 2012) da atividade antibacteriana, atividade antioxidante e antiinflamatória, devido aos metabólitos presentes em suas células (AQUINO et al., 2015).

Substâncias não essenciais para a sobrevivência celular, mas que são fundamentais para a propagação e perpetuação das espécies nos ecossistemas, são chamados de metabólitos secundários ou especiais (RIBEIRO, 2013). As funções fisiológicas ou bioquímicas dos metabólitos secundários estão associadas à propriedade dessas substâncias de proteção contra predadores e patógenos, devido à sua toxicidade e pela capacidade de repelir herbívoros e microrganismos, funcionando como sinais químicos, envolvidos na atração de polinizadores, na proteção contra competidores, em estresses biótico e abiótico, como inseticidas e na forma de conhecidas drogas para uso humano, como a penicilina, atropina, nicotina, quinina, morfina e cafeína (GOTTLIEB et al., 1998; TAIZ; ZEIGER, 2017).

A síntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, como sazonalidade, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, composição atmosférica, ritmo circadiano, temperatura, composição do solo, idade da planta, herbivoria e ataque de patógenos (CHAVES, 2012; COELHO et al., 2021; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além disso, condições de coleta, estabilização e estocagem, podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, influenciando na qualidade e, conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os vários compostos provenientes do metabolismo das plantas, como os flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos (SILVA, et al., 2021) dentre outros, são comercialmente importantes nos setores alimentício, agrônômico, de perfumaria e principalmente por sua potencialidade terapêutica (CHAVES, 2012). Dessa forma, a vasta variedade de metabólitos secundários vegetais vem despertando o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência (BRISKIN, 2000). Apesar de possuírem um grande potencial biossintético, o percentual deste, utilizado atualmente é insuficiente para demanda, principalmente das propriedades terapêuticas (FOGLIO, et al., 2006). Além disso, a produção de fármacos provenientes de plantas, principalmente espécies de arbóreas, é dificultada por diversos fatores, tais como: qualidade da matéria prima utilizada, acessibilidade, e espécies encontradas em áreas de extinção (MORAES, et al., 2012; SOUZA; RESCAROLLI; NUNES, 2018).

Assim, para a identificação e comprovação da existência de metabólitos secundários os estudos fitoquímicos são responsáveis pela análise dos princípios ativos nos vegetais, com o objetivo de avaliar os ativos, poder extraí-los, isolá-los, purificá-los e determinar a estrutura química dos constituintes presentes em extratos de plantas com atividade biológica (CELLOTO et al., 2003; SILVA, et al., 2021).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local de coleta e realização dos experimentos

Os frutos de quixabeira foram coletados no município de Ipirá, Bahia (Lat. 12° 9' 14" S; Long. 39° 44' 42" W), e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) alocado na Unidade Experimental Horto Florestal (UEHF), pertencentes à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

3.2 Estabelecimento in vitro

3.2.1 Desinfestação de sementes com diferentes agentes químicos

Após retirada do tegumento, as sementes foram lavadas em água corrente durante 10 minutos e levadas para câmara de fluxo laminar, onde foram imersas em álcool 70% durante 1 minuto. Em seguida as sementes foram submetidas a diferentes tratamentos: controle sem adição de agentes químicos; imersão em solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (0,2%, 0,5% e 2%), acrescido de três gotas de detergente neutro durante 10 minutos; imersão em dióxido de cloro (Tcsa-clor®) em diferentes concentrações (1%, 3% e 5%) de princípio ativo durante 10 minutos; imersão em solução de Carbendazim (Bendazol®) em diferentes concentrações (1ml L⁻¹, 3ml L⁻¹ e 5ml L⁻¹) durante 30 minutos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 2% de princípio ativo, acrescido de 3 gotas de detergente neutro durante 10 min, conforme apresentado na tabela 1.

Ao final da imersão nos agentes químicos, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Woody Plant Medium) de Lloyd & McCown (1980), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (meio básico).

Tabela 1. Diferentes concentrações e agentes químicos utilizados na desinfestação de sementes de *Sideroxylon obtusifolium*.

Tratamento	Agente Químico	Concentração	Tempo de Imersão
T1	Controle	0	0
T2	Hipoclorito de sódio	0,20%	10 min
T3	Hipoclorito de sódio	0,50%	10 min
T4	Hipoclorito de sódio	2%	10 min
T5	Dióxido de cloro	1%	10 min
T6	Dióxido de cloro	3%	10 min
T7	Dióxido de cloro	5%	10 min
T8	Carbendazin + hipoclorito de sódio 2%	1ml.L ⁻¹	30 min
T9	Carbendazin + hipoclorito de sódio 2%	3ml.L ⁻¹	30 min
T10	Carbendazin + hipoclorito de sódio 2%	5ml.L ⁻¹	30 min

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) contendo 10 tratamentos com 5 repetições e 10 parcelas, totalizando 50 sementes por tratamento. A contaminação das sementes foi avaliada após 40 dias, determinada pela análise visual das sementes e expressa em porcentagem.

3.2.2 Desinfestação de sementes com diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio

As sementes foram imersas em hipoclorito de sódio 2% durante 10, 15, 20 e 25 min antes da retirada do tegumento. Após esse processo, retirou-se o tegumento com tesoura e as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% durante 1 min. Em seguida, foram imersas em hipoclorito de sódio durante 10, 15, 20 e 25 min acrescido de 3 gotas de detergente neutro. Ao final de cada tempo de imersão as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 ml do meio básico (Tabela 2).

Tabela 2. Diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio
Hipoclorito de sódio 2%

Tratamento	Tempo (min.)
T1	25
T2	20
T3	15
T4	10

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) contendo 4 tratamentos com 30 repetições. A contaminação das sementes foi avaliada após 30 dias, determinada pela análise visual das sementes e expressa em porcentagem.

3.2.3 Composição do meio de cultura na germinação e crescimento inicial *in vitro*

Inicialmente as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (2%) durante 25 min. Após esse período, retirou-se o tegumento com tesoura e as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% durante 1 min. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito de sódio durante 25 min acrescido de 3 gotas de detergente neutro. Em seguida as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 mL de diferentes tipos de meio de cultura: WPM e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais (MS ½), acrescidos de diferentes concentrações de carvão ativado (0 e 1g L⁻¹), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Tabela 3).

Tabela 3. Diferentes tipos de meio de cultura no estabelecimento *in vitro* de *Sideroxylon obtusifolium*.

Tratamento	Tipo de meio
T1	WPM com Carvão ativado
T2	WPM sem Carvão ativado
T3	MS ½ com Carvão ativado
T4	MS ½ sem Carvão ativado

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 2 x 2 (dois tipos de meio de cultura e duas concentrações de carvão ativado), totalizando 4 tratamentos

com 40 repetições. A germinação das sementes foi avaliada após 30 dias, determinada pela protrusão da radícula e expressa em porcentagem, e após 45 dias foi avaliado o comprimento da parte aérea, número de folhas verdes e de segmentos nodais.

3.2.4 Efeito do ácido giberélico na germinação e crescimento inicial *in vitro*

Para a desinfestação, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (2%) durante 25 min, após esse período retirou-se o tegumento com tesoura e as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% durante 1 min. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito de sódio 2% durante 25 min acrescido de 3 gotas de detergente neutro. Em seguida as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio básico acrescido de diferentes concentrações de ácido giberélico – GA₃ (0,00; 1,50; 3,00; 4,5; 6,0; 7,5 µM). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, cada um composto por 5 repetições com 5 amostras cada, totalizando 25 sementes por tratamento.

A germinação das sementes foi avaliada após 20 dias, determinado pela protrusão da radícula e expresso em porcentagem. Após 45 dias foram avaliados o comprimento da parte aérea, número de folhas verdes e de segmentos nodais das plantas.

3.2.5 Obtenção de planta matriz

As sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (2%) durante 25 min, após esse período retirou-se o tegumento com tesoura e as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% durante 1 min. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito de sódio 2% durante 25 min acrescido de 3 gotas de detergente neutro. Em seguida foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio básico. Após 45 dias da germinação *in vitro* as plantas foram utilizadas como fonte de material vegetal asséptico para os experimentos de morfogênese *in vitro*.

4 MORFOGÊNESE *IN VITRO*

4.1 Efeito de BAP e ANA em segmento nodal

Foi utilizado como explante o segmento nodal, proveniente das plantas germinadas *in vitro* e inoculados em meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar, e acrescido da citocinina benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 µM), combinada com ácido naftaleno acético (ANA) em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0 µM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial 5 x 3 (cinco concentrações de BAP x três concentrações de ANA) totalizando 15 tratamentos com 5 repetições e 4 amostras cada. Após 45 dias foi avaliado a porcentagem de explantes responsivos com broto, explantes responsivos com calo, textura e coloração dos calos.

4.2 Efeito de BAP e ANA em segmento de hipocótilo

Plantas cultivadas *in vitro* serviram como fonte de material asséptico para obtenção dos segmentos de hipocótilo, que foram inseridos em meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar, e acrescido da citocinina benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 µM), combinada com ácido naftaleno acético (ANA) em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0 µM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial 5 x 3 (cinco concentrações de BAP x três concentrações de ANA) totalizando 15 tratamentos com 5 repetições e 4 amostras cada. Após 45 dias foi avaliado a porcentagem de explantes responsivos com brotos, explantes responsivos com calos, textura e coloração de calos.

4.3 Efeito de BAP na indução de broto em segmento apical

Foi utilizado como explante o segmento apical, proveniente das plantas germinadas *in vitro* e inoculados em meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar, e acrescido da citocinina benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), totalizando 5 tratamentos com 10 amostras cada. Após 120 dias foi avaliada a porcentagem de explantes responsivos com brotos e explantes responsivos com calos.

4.4 Condições de cultivo in vitro

O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a temperatura de 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, as amostras foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 14 horas sob lâmpadas de led branca e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.5 Análise bioquímica

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Germinação (LAGER), localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

4.5.1 Preparação do extrato

Os extratos foram preparados utilizando 500 mg de calos obtidos a partir do segmento nodal cultivado em meio contendo $1,0\ \mu\text{M}$ de ANA, e do hipocótilo cultivado em meio contendo $4,0\ \mu\text{M}$ de BAP e $2,0\ \mu\text{M}$ de ANA, os quais foram homogeneizados em almofariz com 10 mL de solução tampão fosfato. Essas amostras foram submetidas a centrifugação a $12000\ \text{g}$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido em eppendorf e armazenado em ultrafreezer para análise posterior.

4.5.2 Quantificação bioquímica

A quantificação dos açúcares solúveis totais, foi realizada pelo método da antrona proposto por Yemm e Willis (1954), utilizando o ácido sulfúrico como padrão; para os açúcares redutores, utilizou-se o método do dinitrosalicilato (DNS) proposto por MILLER, (1959), com glicose como padrão; empregando o soro de albumina bovina como padrão foi realizada a quantificação do teor de proteínas (BRADFORD, 1976); e para determinação de aminoácidos foi utilizado o método da Ninhidrina segundo Yemm e Coccking (1955).

Para realização de todas as análises bioquímicas foram utilizadas três repetições, com três amostras cada. A leitura das absorbâncias foi realizada utilizando cubetas de quartzo em um espectrofotômetro de feixe duplo a um comprimento de onda $\lambda = 595\ \text{nm}$ para proteínas, $\lambda = 540\ \text{nm}$ para açúcares redutores, $\lambda = 620\ \text{nm}$ para açúcares solúveis totais e $\lambda = 570\ \text{nm}$ para aminoácidos.

4.6 Análise fitoquímica

As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Extração (LAEX) localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

4.6.1 Preparação do extrato

Para essa análise foram utilizados calos obtidos a partir do segmento nodal cultivado em meio contendo 1,0 μM de ANA, e do hipocótilo em meio com 4,0 μM de BAP e 2,0 μM de ANA. Os calos foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 40°C, por duas semanas e, posteriormente triturados em almofariz com auxílio de pistilo.

O material seco foi submerso em 20 mL de álcool metílico por 7 dias. A solução foi filtrada e concentrada por eliminação do solvente orgânico em ambiente, resultando nos extratos brutos metanólicos da quixabeira.

4.6.2 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada através do método colorimétrico por meio da junção de reagentes aos extratos. Para a identificação de flavonoides foi adicionado o cloreto de alumínio; para alcaloides foi usado o reagente Dragendorff; os esteroides e taninos foram identificados com a incorporação do reagente Liebermann-Burchard; já para cumarinas foi realizado o teste de fluorescência e colorimetria, para tanto foram feitos dois círculos em discos de papel filtro aos quais foram adicionadas gotas do extrato, e em um dos círculos foi acrescido hidróxido de sódio. Posteriormente os discos foram colocados em cabine de luz UV para visualização da fluorescência.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento *in vitro*

5.1.1 Desinfestação de sementes com diferentes agentes químicos

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) dos tratamentos de desinfestação em relação à porcentagem de contaminação, após 40 dias de cultivo *in vitro* das sementes (Tabela 4).

Sementes de *Sideroxylon obtusifolium*, cultivadas *in vitro* apresentaram bactérias e fungos (Figura 2B e C), o que atesta a contaminação como um dos maiores obstáculos no estabelecimento de plantas *in vitro* (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2015). Por outro lado, como evidenciado na Figura 2A, algumas sementes não apresentaram qualquer sinal de contaminação.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para diferentes tratamentos na desinfestação de sementes de *Sideroxylon obtusifolium*, aos 40 dias de cultivo *in vitro*.

FV	GL	QM
Tratamento	9	56444,44*
Resíduo	490	
CV	97,31	

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação; *Valor significativo ao nível de 5% de significância.

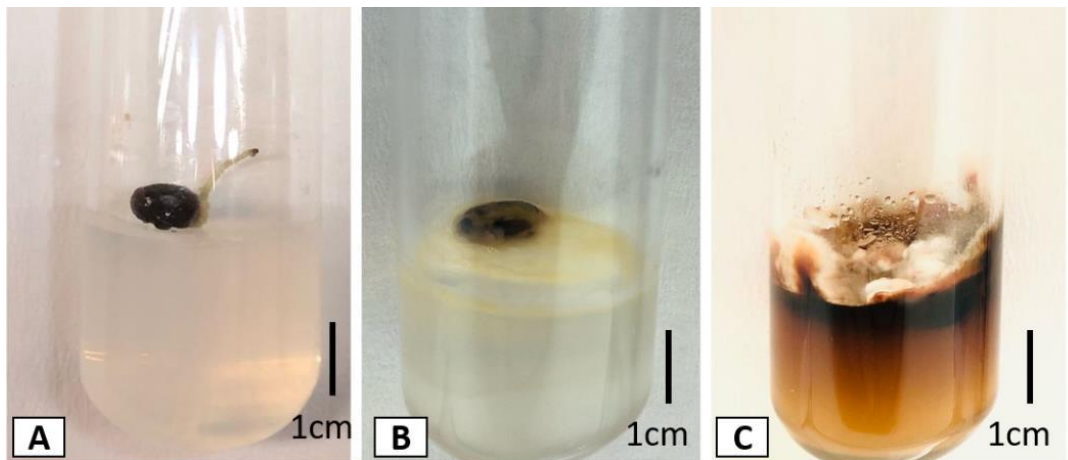


Figura 2. Aspecto da semente de *S. obtusifolium* 40 dias após a inoculação: (A) semente sem contaminação; (B) contaminação por bactérias; (C) contaminação por fungos.

No controle (sem desinfestação) e no tratamento com hipoclorito de sódio a 0,2%, observou-se as maiores porcentagens de contaminação, 88 e 100% respectivamente. Já os tratamentos com dióxido de cloro 3% e 5%, fungicida na concentração de 5 mL e hipoclorito de sódio a 2% apresentaram porcentagem de contaminação com 2%, 6%, 10% e 18% respectivamente, estatisticamente inferiores ao controle e hipoclorito 0,2% (Tabela 5).

O sucesso da assepsia depende, dentre outros fatores, da concentração, do tempo de imersão na solução e do agente desinfestante. Assim, baixas concentrações associadas a curto tempo de imersão podem não ser eficientes na desinfestação (CID; ZIMMERMANN, 2006), como observado neste estudo, em que a solução de hipoclorito de sódio a 0,2% apresentou a maior porcentagem de contaminação (100%), enquanto a maior concentração utilizada deste agente, a 2%, registrou uma redução na porcentagem de contaminação para 18% (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de contaminação em sementes de *Sideroxylon obtusifolium*, sob ação de diferentes agentes químicos.

Agentes químicos	Contaminação %
Controle	88a
Hipoclorito de sódio 0,2%	100a
Hipoclorito de sódio 0,5%	46b
Hipoclorito de sódio 2%	18c
Dióxido de cloro 1%	42b
Dióxido de cloro 3%	2c
Dióxido de cloro 5%	6c
Carbendazin 1ml.L⁻¹ + hipoclorito de sódio 2%	44b
Carbendazin 3ml.L⁻¹ + hipoclorito de sódio 2%	24bc
Carbendazin 5ml.L⁻¹ + hipoclorito de sódio 2%	10c

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferiram entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

A escolha de um tratamento eficiente para desinfestação é de grande importância no cultivo *in vitro*, pois permite manter os explantes livres de microrganismos (SOUZA et al., 2018). O hipoclorito de sódio é bastante utilizado para esse fim, pois além de não apresentar valor elevado, oferece resultados satisfatórios para diversas espécies.

Em estudo realizado por Souza et al. (2011) utilizando hipoclorito de sódio nas concentrações de 2, 4, 6 e 8%, para desinfestação de sementes de *Myrcianthes pungens* foi

observado eficácia na desinfestação, com resultado de 2 a 14% de contaminação, sem diferença significativa entre os tratamentos. Pinheiro et al. (2016) também constataram que a assepsia com hipoclorito de sódio a 2% durante 1 min é eficiente para sanidade das sementes das espécies florestais *Bauhinia forficata*, *Cedrela fissilis*, *Parapiptadenia rigida* e *Senegalia bonariensis*. Já Pereira et al. (2011), com o objetivo de estabelecer *in vitro* a bananeira “Grande Naine” a partir de explantes, obtiveram sucesso na desinfestação dos mesmos com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.

Conforme demonstrado na análise dos resultados deste experimento, as menores médias da porcentagem de contaminação das sementes foram obtidas utilizando o dióxido de cloro a 3 e 5%, fungicida na concentração de 5mL e hipoclorito de sódio a 2%. Assim, devido à eficácia e facilidade de aquisição do hipoclorito de sódio, novos testes foram realizados a fim de verificar diferentes tempos de imersão das sementes para maior controle da contaminação.

5.1.2 Desinfestação de sementes com diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2%

Através dos resultados obtidos pela análise de variância, verificou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os diferentes tempos de imersão na solução de hipoclorito de sódio a 2% em relação à porcentagem de contaminação (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para porcentagem de contaminação de sementes de *Sideroxylon obtusifolium* aos 30 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio.

FV	GL	QM
Tempos de imersão	3	5777.77*
Resíduo	87	
CV	202.48	

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação; * Valor significativo ao nível de 5% de significância.

Conforme observado na Figura 3, o aumento do tempo de imersão na solução de hipoclorito de sódio proporcionou redução significativa da presença de microorganismos no meio de cultura. Quando submetidas a 10 min de imersão em hipoclorito de sódio, a porcentagem de contaminação foi de 36%, estatisticamente superior ao tratamento com 25 min de imersão que apresentou apenas

3% de contaminação. Indicando assim, a eficiência do hipoclorito de sódio na assepsia de sementes de *Sideroxylon obtusifolium*.

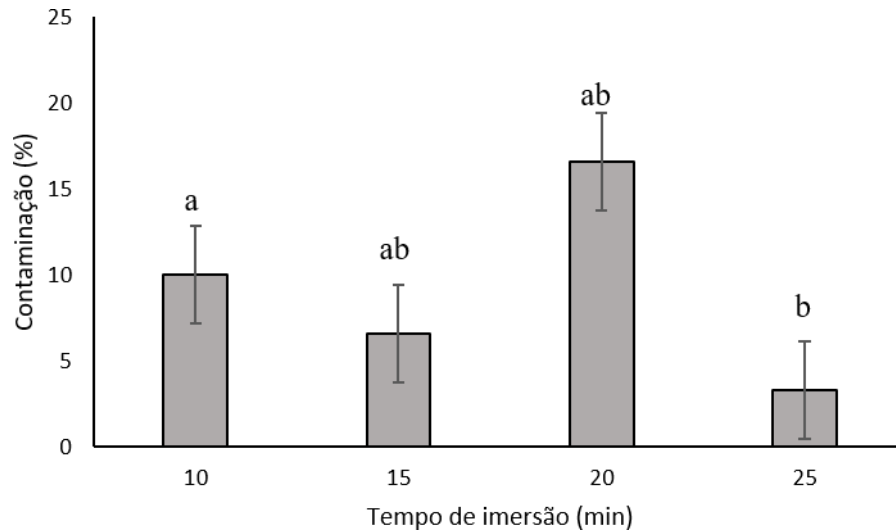


Figura 3. Porcentagem de contaminação de sementes de *Sideroxylon obtusifolium*, sob diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras indicam o desvio padrão.

Estes resultados corroboram os obtidos por Couto et al. (2004) cujo melhor tratamento para assepsia de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) foi a exposição durante 30 e 20 min em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e 5%, respectivamente. Em pesquisa realizada com as sementes de acácia (*Cassia multijuga*), angico-vermelho (*Parapiptadenea rigida*), canafístula (*Peltophorum dubium*), maricá (*Mimosa bimucronata*) e timbaúva (*Entereolobium contortisiliquum*), Muniz, Silva e Blume (2007) constataram a eficiência da assepsia das sementes com hipoclorito de sódio a 1% durante 5 min de imersão.

O uso de hipoclorito de sódio demonstrou ser eficaz também para a assepsia das sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), reduzindo a incidência de fitopatógenos e promovendo incremento na germinação em estudo realizado por Menegais et al. (2021). Estes autores observaram que a imersão das sementes de cártamo em hipoclorito de sódio 2,5% apresentou 17% de contaminação, enquanto a imersão em princípio ativo de 5% durante 30 min registrou 12% de sementes infestadas por microrganismos.

Para a assepsia de sementes de quixabeira, Souza et al. (2014) utilizaram fungicida sistêmico, deixando-as em imersão durante 1 hora sob rotação de 80 rpm, seguidas de imersão em

hipoclorito de sódio a 2% por 20 min, e obtiveram 96% de plantas sem contaminação, no entanto após 20 e 30 dias observaram a presença de bactérias no meio de cultura, demonstrando a ineficácia desse protocolo. Em contrapartida, no presente estudo o tratamento com hipoclorito de sódio a 2% durante 25 min mostrou-se como protocolo eficiente para a desinfestação de sementes de *S. obtusifolium* e obtenção de plantas livre de patógenos.

5.1.3 Composição do meio de cultura na germinação e crescimento inicial *in vitro*

A análise de variância apresentada na Tabela 7 mostra que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para as variáveis porcentagem de germinação, planta matriz, número de segmentos nodais e massa seca nos diferentes tratamentos: meio WPM e MS ½ combinados ou não com carvão ativado. Já as variáveis comprimento da parte aérea, número de folhas e comprimento da raiz foram significativas ($p \leq 0,05$) para a adição de carvão ativado ao meio de cultura (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância para as variáveis porcentagem de germinação (G%), planta matriz (PM%), comprimento da parte aérea (CPA), número de segmentos nodais (NS), número de folhas (NF), comprimento da raiz (CR) e massa seca (MS) de *Sideroxylon obtusifolium*, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos.

FV	GL	Quadrado médio						
		G (%)	PM (%)	CPA	NS	NF	CR	MS
Meio	1	0,025 ^{ns}	0.5062 ^{ns}	3,6602 ^{ns}	0,5062 ^{ns}	8,5562 ^{ns}	0,0390 ^{ns}	0,000040 ^{ns}
Carvão	1	0,000 ^{ns}	0.0562 ^{ns}	30,2760*	6,0062 ^{ns}	37,0562*	282,2265*	0,000975 ^{ns}
Meio*Carvão	1	0,000 ^{ns}	0.0562 ^{ns}	8,5562 ^{ns}	0,1562 ^{ns}	13,8062 ^{ns}	28,9850 ^{ns}	0,000127 ^{ns}
Resíduo	156							
CV (%)		11,32	153.58	36,82	74,45	29,44	40,67	27,23

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação;

^{ns}Valor não significativo ao nível de 5% de significância. *Valor significativo ao nível de 5% de significância.

As sementes de quixabeira apresentaram altas taxas de germinação em todos os tratamentos testados. O tratamento contendo meio MS ½ apresentou 100% de germinação das sementes sem adição de carvão e 97% de germinação na presença de carvão ativado, sendo que não foi observado diferença significativa entre os tratamentos. Em ambos os tratamentos com meio MS ½ ocorreu a formação de 57% de planta matriz (Figura 4 A e B). No cultivo em meio WPM com adição de carvão foi observado 95% de sementes germinadas, e 97% de germinação no meio WPM sem adição de carvão. No entanto, a presença de carvão ativado ao meio resultou em média 73% de

planta matriz, com bom crescimento e desenvolvimento, fornecendo explantes para multiplicação *in vitro* (Figura 4C) contrastando com a planta cultivada no meio com carvão como observado na Figura 4D.

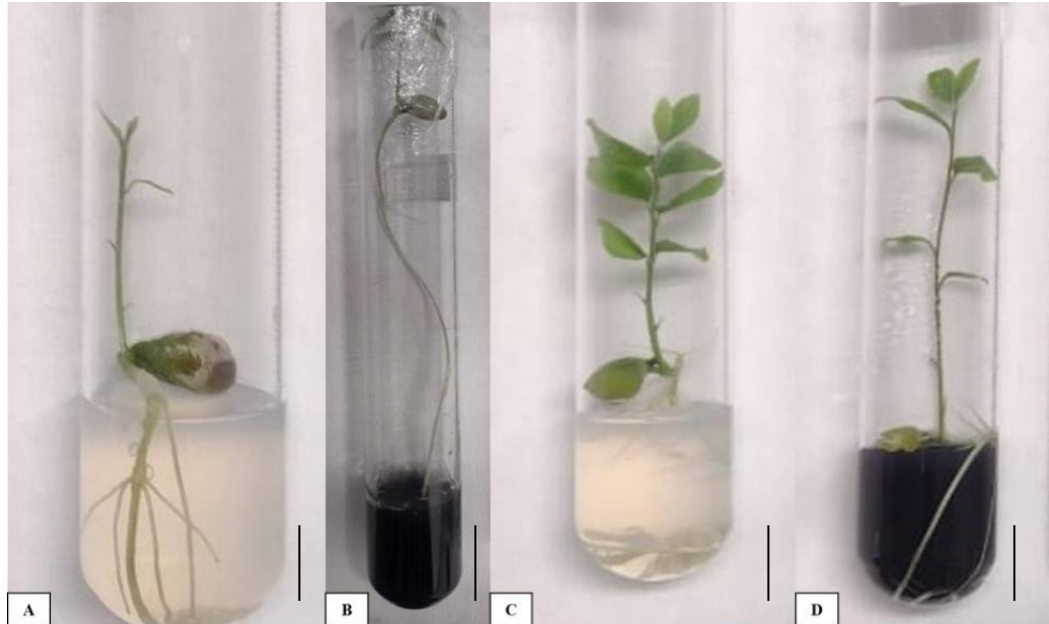


Figura 4. Planta matriz de *Sideroxylon obtusifolium* aos 30 dias de cultivo: (A) planta matriz pouco desenvolvida em meio MS 1/2 sem carvão; (B) planta matriz pouco desenvolvida em meio MS 1/2 com carvão; (C) planta matriz em meio WPM sem carvão; (D) planta matriz em meio WPM com carvão. Barra equivale a 1cm.

A composição dos meios para o cultivo *in vitro* influencia vários processos metabólicos, exercendo efeito sobre o crescimento e a diferenciação dos tecidos (MALDANER et al., 2006). Para a germinação *in vitro* de sementes de grápia (*Apuleia leiocarpa*), uma espécie ameaçada de extinção devido ao uso intenso da madeira, os meios WPM e WPM ½ foram os mais efetivos, favorecendo 100% de germinação (FABRIS; GERBER; SARTORETTO, 2016), assim como o meio WPM ½ apresentou superioridade na germinação de sementes de ingazeiro, uma espécie nativa do Cerrado (STEIN et al., 2007). Na germinação *in vitro* de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson), Nery et al. (2008) não observaram diferença significativa para o efeito dos meios de cultura MS e WPM. Sementes de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), uma espécie medicinal do Cerrado, foi cultivada em meio MS e WPM, apresentando 92% de germinação, independentemente do tipo de meio (CASTRO et al., 2007), corroborando com os resultados desse estudo, em que se obteve alto índice de germinação de quixabeira para ambos os tipos de meios de cultura, não havendo diferença estatística para os meios MS½ e WPM.

Alguns estudos mostram que a utilização de meios com menor concentração de sais tem apresentado melhores resultados na germinação e desenvolvimento de plântulas de espécies lenhosas, como o baruzeiro (*Dipteryx alata*) (PINHAL et al., 2017) e o jenipapeiro (*Genipa americana* L.) (ALMEIDA et al., 2013), nos quais os autores obtiveram maior porcentagem de plântulas completas, com a utilização do meio MS com diminuição da concentração de sais.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo in vitro (NOGUEIRA et al., 2004). Nesse sentido, Fermino Junior e Scherwinski-Pereira (2012) apontam que apesar de não existir formulação padrão para germinação in vitro, o meio MS, com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Para espécies lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos, e composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor desempenho (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A adição de carvão ao meio de cultura mostrou melhores resultados no comprimento da parte aérea, número de folhas e comprimento da raiz em comparação à ausência de carvão ativado, conforme observado na tabela 8.

Tabela 8. Efeito do carvão ativado no comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF) e comprimento da raiz (CR) de *Sideroxylon obtusifolium*, após 45 dias de cultivo in vitro.

Carvão (g L ⁻¹)	CPA (cm)	NF	CR (cm)
0	4,19b	8,53b	11,13b
1	5,06a	9,50a	13,78a

*Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Segundo Paulino et al. (2021), o carvão ativado tem sido muito utilizado no meio para cultivo in vitro, pois auxilia no desenvolvimento da plântula e na germinação, retirando a toxidade liberada por sementes e por possuírem atividades relacionadas ao pH, controlando a acidez do meio.

No presente estudo, a adição de carvão ao meio proporcionou plantas com maior comprimento da parte aérea (5,06cm) em comparação ao meio sem carvão. Esse efeito também foi observado no cultivo de mangabeira, em que os autores constataram que, embora não tenha diferido estatisticamente, a adição de carvão ao meio aumentou em 55% o comprimento da parte aérea,

demonstrando o efeito benéfico do carvão ativado no sistema radicular, proporcionando um maior alongamento da parte aérea (LÉDO et al., 2007).

Após 45 dias, as plantas de quixabeira cultivadas na presença de carvão ativado apresentaram maior crescimento da raiz (13,78cm) quando comparadas as plantas cultivadas na ausência do carvão (11,13cm). No cultivo in vitro de mangabeira, Lédo et al. (2007) também observaram que o comprimento da raiz principal apresentou maior comprimento no meio acrescido com 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Isso pode ser associado ao fato de o carvão estimular condições de escuro, no qual as raízes se desenvolvem melhor devido a redução da incidência de luz na zona de crescimento do sistema radicular, além de adsorver substâncias tóxicas que podem afetar o desenvolvimento do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

5.1.4 Efeito do ácido giberélico na germinação e crescimento inicial in vitro

De acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa das concentrações do ácido giberélico (GA₃) nas variáveis porcentagem de germinação e planta matriz (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (G%) e de planta matriz (PM) de *Sideroxylon obtusifolium*, aos 20 dias de cultivo in vitro em diferentes tratamentos.

FV	GL	Quadrado Médio	
		G (%)	PM (%)
Tratamento	5	0,0960 ^{ns}	0,0546 ^{ns}
Resíduo	24		
CV (%)		75,28	261,75

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação; *Valor significativo ao nível de 5% de significância.

Os resultados demonstram que embora não tenha existido influência do GA₃ na germinação, esta apresentou alta porcentagem, que variou de 52 a 68% aos 20 dias de cultivo in vitro de sementes de *S. obtusifolium*. Para a variável presença de planta matriz, também não foi observado efeito do GA₃, com porcentagens variando de 8 a 20% (Tabela 10). Em todos os tratamentos foi possível obter plantas com desenvolvimento satisfatório para retirada do explante (Figura 7A-F).

Tabela 10. Efeito do ácido giberélico na porcentagem de germinação (G%) e de planta matriz (PM) de *Sideroxylon obtusifolium*, cultivadas in vitro por 20 dias em diferentes meios de cultura.

Concentração de GA ₃ (μM)	G%	PM (%)
0,0	68a	20a
1,5	68a	08a
3,0	52a	12a
4,5	64a	08a
6,0	68a	12a
7,5	64a	08a

*Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



Figura 7. Plântulas de *Sideroxylon obtusifolium* aos 20 dias de cultivo in vitro na presença de ácido giberélico (A) 0,0 μM; (B) 1,5 μM; (C) 3,0 μM; (D) 4,5 μM; (E) 6,0 μM; (F) 7,5 μM. Barra equivale a 1cm.

Embora as concentrações utilizadas no presente estudo não tenham sido eficientes para quixabeira, o efeito benéfico do ácido giberélico em baixas concentrações na germinação e emissão de plântula têm sido demonstrado em diversos estudos (GENEROSO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2001; SOARES et al., 2007), uma vez que seu uso na fase de germinação tem sido utilizado por melhorar o desempenho das plântulas e acelerar a velocidade de emergência para sementes de diversas espécies.

Em estudo da germinação de sementes de mangabeira em condições in vitro, sob diferentes concentrações de GA₃, Soares et al. (2007) obtiveram 90% de sementes germinadas em meio de

cultura WPM, suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose e $0,578 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 , no entanto o aumento das concentrações levou à redução na germinação de sementes. Efeito semelhante também foi observado por Pinheiro et al. (2001) em que concentrações superiores a $0,867 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 provocaram redução na germinação de sementes de mangaba. No entanto esse efeito inibitório não foi observado para sementes de quixabeira, uma vez que se obteve 64% de germinação na presença de $7,5 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 . Isso ocorre porque as giberelinas têm papel chave na germinação de sementes, estando envolvidas tanto na superação da dormência como no controle de hidrólise das reservas, como o amido, exercendo ação positiva na síntese da enzima α -amilase, responsável pelo desdobramento dos carboidratos na germinação (BRAUN et al., 2010; WILLIAMS; PETERSON, 1973).

Além disso, as giberelinas são essenciais para o metabolismo de glicídios, que fornecem energia às células, contribuindo para tornar o potencial osmótico celular mais negativo, fazendo com que ocorra maior fluxo de água para o interior da célula, favorecendo sua expansão (BRAUN et al., 2010; DAYKIN et al., 1997; HUTTLY; PHILLIPS, 1995)

Dessa forma, sementes que apresentam diminuição na concentração de giberelina, quando tratadas com ácido giberélico na concentração adequada, apresentariam maior taxa e uniformidade de germinação, principalmente pela sua atuação no alongamento celular, fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem o seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2017). Sendo assim, o ácido giberélico é considerado ativador enzimático endógeno, que promove a germinação e sua aplicação exógena influencia o metabolismo proteico, podendo dobrar a taxa de síntese de proteínas das sementes (BRAUN et al., 2010).

6 MORFOGÊNESE *IN VITRO*

6.1.1 Efeito de BAP e ANA em segmento nodal

Conforme demonstra a análise de variância, a variável porcentagem de explante responsivo com broto (BR) teve resposta significativa ($p \leq 0,05$) para a presença dos reguladores BAP e ANA de forma isolada (Tabela 11). Já o efeito combinado desses reguladores influenciou de forma significativa ($p \leq 0,05$) a porcentagem de explante responsivo com calos (CL) (Tabela 11).

Tabela 11. Resumo de Análise de Variância para porcentagem de explante com broto (BR%) e com calo (CL%) a partir do segmento nodal de *Sideroxylon obtusifolium*, no cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de citocinina e auxina.

FV	GL	Quadrado Médio	
		BR(%)	CL(%)
BAP	4	3274.509*	27763.925*
ANA	2	65058.823*	21904.317*
BAP*ANA	8	1921.568 ^{ns}	3638.631*
Resíduo		240	240
CV (%)		161,18	72,88

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação; *Valor significativo ao nível de 5% de significância.

A presença de brotos em segmentos nodais (Figura 8) apresentou maior média (51,7%) na ausência de ANA, enquanto a adição de 2 μ M desse regulador apresentou apenas 1,17% de explante com broto (Tabela 12) demonstrando que a presença dessa auxina apresentou efeitos inibitório na formação de brotos.



Figura 8. Formação de broto a partir do explante segmento nodal de *Sideroxylon obtusifolium* na presença de 6-benzilaminopurina e ácido 1-naftaleno acético. Barra equivale a 1cm.

Tabela 12. Valores médios para a presença de brotos, a partir de segmentos nodais de *Sideroxylon obtusifolium*, em diferentes concentrações de ANA.

ANA (μM)	% de broto
0	51,76a
1	7,05b
2	1,17b

*Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O uso de reguladores de crescimento vegetais desempenha papel fundamental no sucesso do cultivo in vitro, uma vez que sua adição ao meio de cultura desencadeia uma série de respostas morfogênicas envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas (CAMPOS et al., 2013; LEMOS, 2015; VIDAL; DINIZ; SILVA, 2013). Dentre os hormônios vegetais, as auxinas exercem papel fundamental na expansão, alongamento e divisão celular, com destaque para o ácido naftalenoacético (ANA) (STEFANEL et al., 2022).

A maior formação de brotos em explante nodais em quixabeira ocorreu na ausência do regulador, indicando que não há necessidade de uma fonte exógena dessa substância para a

formação de estruturas vegetativas dentro do intervalo das concentrações testadas. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2013), em que observaram o maior número de brotos (0,97) para a espécie *Caesalpinia pyramidalis* em meio de cultura isento de reguladores vegetais. Oliveira et al. (2016) também observaram que a ausência de reguladores é efetiva para a multiplicação de *Hancornia speciosa*.

Por outro lado, estudos têm mostrado a eficiência da suplementação de auxinas ao meio de cultivo. Em pesquisa realizada com segmentos nodais de mogno, se fez necessário a utilização de 0,05 μM de ANA para a formação de brotações (LAMEIRA; CORDEIRO; MENESES, 2005). Em estudo realizado com *Eugenia involucrata*, o maior número de brotações (1,33) foi verificado na presença de 2,0 μM de ANA quando comparadas a 4 μM (0,50) (STEFANEL et al., 2022), resultado oposto ao encontrado nesse trabalho.

Como resultado para a análise do efeito de BAP na indução de brotos de quixabeira, a utilização de 2 μM apresentou média (31,37%) estatisticamente superior a observada na presença de 8 μM (9,80%), no entanto a ausência desse regulador não apresentou diferença estatística para as concentrações avaliadas (Tabela 13).

Tabela 13. Valores médios para a presença de brotos em segmentos nodais de *Sideroxylon obtusifolium*, sob diferentes concentrações de BAP e cultivadas in vitro por 45 dias.

BAP (μM)	% de broto
0,0	23,52ab
2,0	31,37a
4,0	17,64ab
8,0	9,80b
16,0	17,64ab

*Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As citocininas atuam para estimular o desenvolvimento das gemas axilares, desencadeando o crescimento e divisões celulares que resultam no surgimento de brotações, além da quebra da dominância apical (VIEIRA; MONTEIRO, 2002), com concentrações que variam de acordo com a espécie estudada. A adição de concentrações acima do necessário podem induzir respostas negativas, promovendo a fitotoxicidade e o encurtamento de entrenós das plantas cultivadas in vitro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; XAVIER et al., 2003).

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de micropropagação para *Dioscorea multiflora*, Souza et al. (2011) obtiveram 80% de explantes com brotos na presença de 0,44 μM de

BAP. Ainda de acordo com esses autores, concentrações de BAP superiores a 4,44 μM podem ter causado um efeito fitotóxico nos explantes, com menor número de brotos, comparado ao resultado obtido em 0,444. Resultados semelhantes foram observados para a multiplicação de *Toona ciliata* (ROMANIUK et al., 2022), *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS et al., 2005), *Cabranea canjerana* (ROCHA et al., 2007) e *Amburana cearensis* (CAMPOS et al., 2013). Em contrapartida, a adição de 22,2 μM de BAP ao meio, maximizou a formação de brotos em mangabeira (SOARES et al., 2007), semelhante ao observado para *Amburana acreana*, em que a formação do maior número de brotos ocorreu com a concentração de 17,76 μM de BAP (FIRMINO JÚNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

No presente estudo, foi verificada a presença de um broto por explante e a adição de BAP não resultou em diferença estatística na indução de brotos de quixabeira, o que requer avaliação de citocininas mais potentes para otimizar a multiplicação da espécie. No entanto, pode se observar que a presença de 2 μM dessa citocinina gerou um incremento na porcentagem de explante com broto. Essa diversidade de resultados com variadas concentrações e tipos de regulador, embora seja determinante para o cultivo in vitro, o crescimento e desenvolvimento das plantas envolve fatores endógenos e exógenos que depende da espécie de interesse (CALDAS et al., 1998; CAMPOS et al., 2013).

Ao analisar a presença de calos, constatou-se que a utilização de 1 μM de ANA sem adição de BAP apresentou média (94,11%) estatisticamente superior às médias do controle (52,94%) e da combinação de 1 μM de ANA com 8 μM de BAP (41,17%) (Tabela 14), o que demonstra que a baixa concentração da auxina isolada é suficiente para formação de calos. Embora a combinação de 16 μM de BAP com 2 μM de ANA também tenha registrado média de 94,11% a adição de BAP não é necessária, o que resulta em um menor custo no cultivo in vitro da quixabeira.

Tabela 14. Valores médios para a presença de calos em segmentos nodais de *Sideroxylon obtusifolium*, em diferentes concentrações de BAP e ANA e cultivados in vitro por 45 dias.

ANA (μM)	BAP (μM)				
	0	2	4	8	16
0	52,94Ba	64,70Aa	41,17Bab	5,94Bb	41,17Bab
1	94,11Aa	82,35Aa	82,35Aa	41,17Ab	64,70ABab
2	82,35ABa	58,82Aa	64,70ABa	5,88Bb	94,11Aa

*Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Auxina e citocinina interagem de maneira a controlar muitos aspectos do crescimento e diferenciação, sugerindo uma rede de interação de sinais (PINO-NUNES, 2009). Esses reguladores atuam de formas variadas nas respostas fisiológicas, a citar o efeito sinérgico a partir da combinação entre auxina e citocinina na divisão celular, assim como o efeito antagônico no controle de brotos ou raízes laterais (COENEN; LOMAX, 1997). Observa-se que o nível elevado de citocinina em relação à auxina proporciona formação de brotos, de forma oposta, há formação de raízes, e em concentrações semelhantes entre os dois reguladores ocorre a formação de calos (KRIKORIAN, 1995).

A formação de calos em segmentos nodais de quixabeira ocorreu em todos os tratamentos, mesmo na ausência de reguladores vegetais. Resultado oposto foi encontrado por Navroski et al. (2012), em que na ausência de ANA e de BAP não ocorreu a formação de calos para a espécie *Satureja hortensis*. Já em estudos realizados por Oliveira, Freire e Aloufa (2016) a adição de BAP e ANA promoveu a formação de calos em *Hancornia speciosa*, uma espécie arbórea nativa do Nordeste de grande importância ambiental e medicinal, com média de 40% de calos na presença de 15,54 μM BAP e 75% na concentração de 2,685 μM de ANA. Ainda segundo estes autores, foi possível observar um aumento na taxa de formação de calos conforme o aumento das concentrações desses reguladores (OLIVEIRA; FREIRE; ALOUFA, 2016). Em plantas herbáceas, a formação de calos a partir de segmentos do caule da variedade Naga Chili (*Capsicum chinense* Jacq.) foi obtida com a utilização da combinação de 13,32 μM de BAP com 5,37 μM de ANA, apresentando 91% de indução (RAJ; GLINT; BABU, 2015).

Em relação a textura, constatou-se calos friáveis, compactos e calos com partes friáveis e compactas simultaneamente para quixabeira. Resultado semelhante foi observado na formação de calos de catingueira que apresentam, em sua maioria, regiões compactas e friáveis no mesmo calo (CARVALHO-FILHO, 2021). Calos friáveis apresentam características meristemáticas, sendo mais propícios à embriogênese somática (VASCONCELOS et al., 2012) além de serem favoráveis ao cultivo de células em suspensão, devido a facilidade de se desintegrarem quando manipulados (BARRUETO CID, 1992; NAVROSKI et al., 2012), enquanto calos compactos possuem maior potencial organogênico por serem mais coesos (VASCONCELOS et al., 2012).

No que diz respeito à coloração, foram observados calos que variaram de tons claros à escuros, com coloração esbranquiçada, marrom e verde, tendo sido observado também a coloração

rosa, e a presença de mais de uma cor por calo, com ampla variação de tamanho (Figura 9). De acordo com Carvalho-Filho (2021), a presença de mais de uma cor no calo está associada a variabilidade genética da espécie em estudo. Além disso, a coloração apresentada nos calos é um indicativo da produção de metabólitos secundários, a citar a tonalidade rosa, que sugere a presença de antocianinas, como o verificado por Porto et al. (2020), em que a presença desse composto fitoquímico na espécie *Byrsonima gardneriana* foi maior em calos de cor rosa.

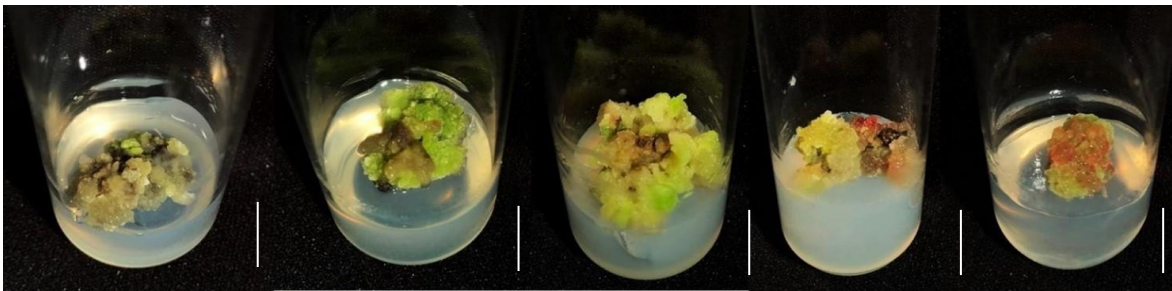


Figura 9. Variação na coloração de calo no segmento nodal de *Sideroxylon obtusifolium* sob diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido 1-naftaleno acético. Barra equivale a 1cm.

6.1.2 Efeito de BAP e ANA em segmento de hipocótilo

A análise de variância apontou que a combinação de BAP e ANA foi significativa ($p \leq 0,05$) para a variável porcentagem de explante com brotos (Br) e com calos (Cl) de *S. obtusifolium* (Tabela 15).

Tabela 15. Resumo da análise de variância para porcentagem de broto (Br%) e porcentagem de calo (Cl%) a partir do hipocótilo de *Sideroxylon obtusifolium*, no cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de citocinina e auxina.

FV	GL	Quadrado Médio	
		Br(%)	Cl(%)
BAP	4	266.66 ^{ns}	7100.00*
ANA	2	266.66 ^{ns}	18200.00*
BAP*ANA	8	266.66*	5200.00*
Resíduo		135	135
CV (%)		816.50	92,82

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação; *Valor significativo ao nível de 5% de significância.

A combinação de 4 μM de BAP e 2 μM de ANA, resultou em 100% de explantes com a formação de calos, já o aumento no nível da citocinina, acarretou na diminuição na porcentagem de formação de calos, indicando um efeito fitotóxico desse regulador de crescimento (Tabela 16).

Tabela 16. Valores médios para a presença de calos (%), a partir de segmentos nodais de *Sideroxylon obtusifolium*, em diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA (μM)	BAP (μM)				
	0	2	4	8	16
0	60Aa	20Ba	50Ba	10Aa	40Aa
1	60Aa	60ABa	10Ba	50Aa	10Aa
2	90Aab	70Aab	100Aa	40Ab	50Aab

*Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Esse resultado justifica-se, pois, o balanço hormonal entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas do calo, podem tanto estimular a proliferação celular como exercer um efeito antagônico, reduzindo a multiplicação dos mesmos (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010). Na multiplicação de espécies herbáceas como a *Physalis peruviana*, houve 85% de formação de calos no hipocótilo em meio contendo 2,22 μM de 2,4-D (MASCARENHAS, 2019). Em estudos com *Physalis ixocarpa* variedade verde, Alvarado et al. (2021) obtiveram maior taxa (52%) de formação de calos no explante hipocótilo na presença de BAP e ANA. A combinação de 5,37 μM de ANA e 6,66 μM de BAP, foi positiva na formação de calos em hipocótilo da espécie *Nigella sativa* (PRAMONO; HARIJATI; WIDORETNO, 2021). A combinação de BAP e 2,4-D também foi eficiente para a formação de calos em hipocótilo de *Astragalus adsurgens* (LUO; JIA, 1998). Essa variedade de tipos de explantes e regulador no cultivo *in vitro* de espécies herbáceas é amplamente relatado e a resposta desencadeada depende da espécie de interesse.

Em estudo com *Hibiscus sabdariffa*, Sobrinho e Santos (2021) demonstraram que a produção de biomassa calogênica, é uma alternativa viável para produção continuada de compostos farmacológicos quando comparada aos métodos tradicionais em ambiente natural. Pesquisas dessa natureza são valiosas uma vez que os calos podem ser utilizados para a produção em larga escala de metabólitos secundários. No que se refere às plantas medicinais, a produção de compostos fitoquímicos bioativos, que podem ser utilizados no tratamento de diversas doenças, podem ser extraídos do calo produzido *in vitro*, reduzindo a exploração de espécies ameaçadas de extinção (EFFERTH, 2019).

Verificou-se no presente estudo calos com uma ampla diversidade de textura que variaram entre friáveis, compactos ou misto, e cores esbranquiçada, marrons, verde e rosa (Figura 10). Essa diversidade de cores e textura, está relacionado ao potencial embriogênico e organogênico dos calos (NASUTION; NASUTION, 2019).

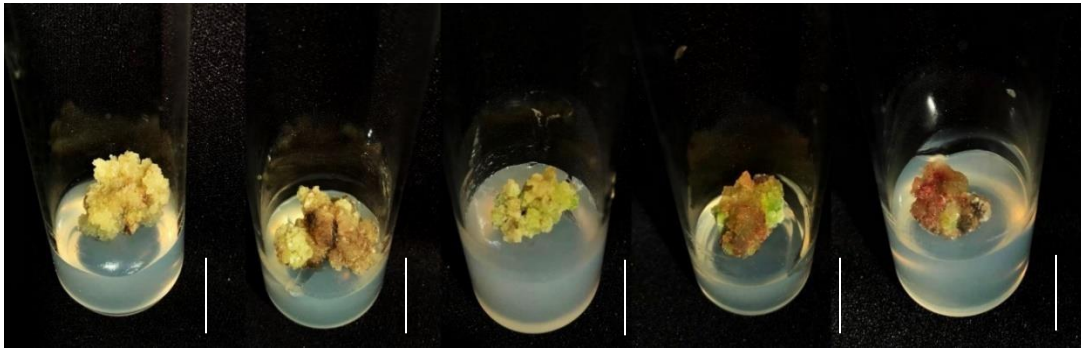


Figura 10. Diferença na coloração de calo no hipocótilo de *Sideroxylon obtusifolium* sob diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido 1-naftaleno acético. Barra equivale a 1cm.

A formação de brotos ocorreu apenas na presença de 2,0 μM BAP e 1,0 μM de ANA, sendo observado uma média de 20% de explantes com brotos de quixabeira e 1 broto por explante (Figura 11). Essa baixa porcentagem na formação de brotos pode ser explicada, pois como sugerem Campos et al. (2013), o crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* dependem além da ação direta de reguladores vegetais, do genótipo, condições da planta matriz, dentre outros fatores.



Figura 11. Formação de broto a partir do segmento de hipocótilo de *Sideroxylon obtusifolium* na presença de 6-benzilaminopurina e ácido 1-naftaleno acético. Barra equivale a 1cm.

6.1.3 Efeito de BAP na indução de broto em segmento apical

A análise de variância apresentada na Tabela 17 mostra que a formação de calos em segmento apical foi significativa ($p \leq 0,05$), já para a formação de brotos não foi observado efeito significativo ($p \leq 0,05$) dos tratamentos.

Tabela 17. Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivo com calo (Cl%) e explante responsivo com broto (Br%) em segmento apical de *Sideroxylon obtusifolium*, aos 120 dias de cultivo in vitro sob diferentes concentrações de citocinina.

FV	GL	Quadrado Médio	
		Cl (%)	Br (%)
Tratamento	4	0,65*	0,1 ^{ns}
Resíduo	9		
CV (%)		142,72	298,14

FV: Fonte de Variação; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; CV: Coeficiente de Variação; *Valor significativo ao nível de 5% de significância.

Conforme apresentado na tabela 18, a presença de calos na concentração de 0,5 μM de BAP apresentou média (70%) estatisticamente superior às médias obtidas em 1,5 μM (10%) e 2,0 μM (10%).

Tabela 18. Valores médios para a presença de calos em segmento apical de *Sideroxylon obtusifolium*, sob diferentes concentrações de BAP cultivadas in vitro por 120 dias.

BAP (μM)	% de calos
0	20ab
0,5	70a
1,0	40ab
1,5	10b
2,0	10b

*Médias seguidas por letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Dentro da classe de fitohormônios, as citocininas atuam estimulando a divisão celular, na regulação da parte aérea e da raiz, no crescimento de folhas, entre outras funções fisiológicas (VANKOVA, 2014). De acordo com Dar et al. (2021), os níveis de citocininas endógenos e exógenos são fundamentais para a formação de calos em diversas espécies de plantas e exercem influência na formação de calos promovendo diminuição na lignificação da parede celular.

Corroborando os resultados do presente trabalho, Navroski et al. (2012) constataram que a utilização de 19,45 μM de BAP promoveu formação de calos no cultivo de *Satureja hortensis*. Em estudo com *Jatropha curcas*, Shamsiaha et al. (2011) também relataram a necessidade de BAP na indução de calos. Greco (1984) aponta que a presença de BAP pode aumentar o nível de outro hormônio pela promoção da biossíntese ou inibição do metabolismo degradativo.

Durante o processo de morfogênese, os hormônios vegetais auxinas e citocininas são requeridos por desencadear diferentes respostas na planta. As auxinas são responsáveis pelo alongamento e divisão celular, dominância apical e desenvolvimento de raízes (TAIZ; ZEIGER, 2017). Por sua vez, as citocininas atuam promovendo a divisão celular, o crescimento de meristemas e regulando a senescência celular (PAIVA PORFÍRIO et al., 2019).

As auxinas presentes no segmento apical podem atuar inibindo o acúmulo de citocininas, promovendo a dominância apical, já as citocininas inibem alguma ação das auxinas, promovendo a quebra da dominância apical (MONFORT et al., 2012). Além do balanço hormonal, o tipo de explante utilizado é primordial para o sucesso do cultivo in vitro (GRATAPAGLIA; MACHADO,

1998). No cultivo in vitro do pimentão (*Capsicum annuum*) o segmento apical apresentou resposta satisfatória na indução de calos (BARBOSA et al., 1994). Em estudo realizado com ipê-roxo-de-sete-folhas (*Tabebuia heptaphylla*) foi observada a maior formação de calos em explante de segmento apical em meio contendo BAP (HIGA, 2006).

6.2 Quantificação bioquímica

Através da análise bioquímica dos calos obtidos a partir do explante hipocótilo e segmento nodal, verificou-se o teor de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), proteínas e aminoácidos (Figura 12).

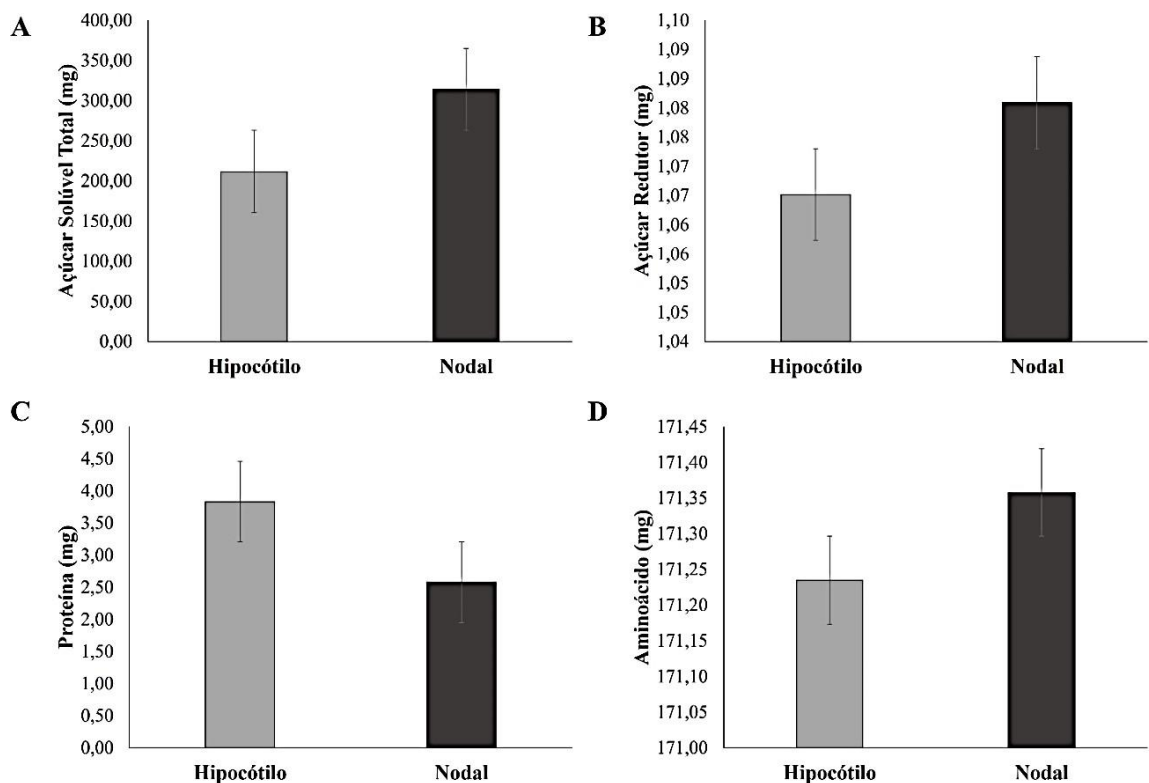


Figura 12. Quantificação bioquímica de calos obtidos a partir do segmento nodal e hipocótilo de *Sideroxylon obtusifolium*. Teor de açúcar solúvel total (A); teor de açúcar redutor (B); Teor de proteína (C); Teor de aminoácido (D) aos 90 dias de cultivo in vitro.

Analisando a produção de AST em quixabeira se constatou um teor de 313,94 mg g⁻¹ MF em calos no segmento nodal e 213,83 mg g⁻¹ MF em calos no hipocótilo após 90 dias de cultivo in vitro (Figura 12A). Esse alto teor de AST pode ser justificado pela absorção de sacarose adicionada ao meio de cultura, a qual pode ser quebrada em monossacarídeos como a glicose para obtenção de energia.

Os carboidratos são fornecedores de carbono estruturais para processos biossintéticos (MEIRA, 2019), atuam também como agentes osmóticos e para a manutenção da integridade da membrana plasmática (THELANDER; LANDBERG; SUNDBERG, 2018). Os teores de ASTs caracterizam as fases de desenvolvimento celular que podem demandar maior produção de compostos metabólicos específicos (SERRA, 1999). Além disso, esses açúcares indicam níveis de reserva para o crescimento vegetal (PASSOS, 1996), podendo ser degradado e utilizado na composição de nucleotídeos formando novas fitas de DNA durante a divisão celular (SERRA, 1999).

Em estudo bioquímico de calos obtidos a partir de explantes foliares para aroeira-do-sertão, Vasconcelos et al. (2012) observaram um teor de AST de $43,32 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$, resultado muito inferior ao verificado no presente estudo. O elevado teor de AST ($3,3368 \text{ g}$) também foi observado em estudos com a espécie *Jatropha curcas* aos 105 dias de cultivo (SANTOS et al., 2010) e *Copaifera langsdorffii* ($3,3368 \text{ mg}$ de glicose) aos 84 dias de cultivo (AZEVEDO, 2003), indicando a variabilidade no teor de açúcar em calos de espécies lenhosas.

Para o AR o teor quantificado em quixabeira para o hipocótilo foi de $1,07 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ e para o segmento nodal de $1,08 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ aos 90 dias de cultivo *in vitro* (Figura 12B). Açúcares redutores podem ser metabolizados e utilizados como fonte de energia e esqueleto de carbono para outras estruturas (SILVA et al., 2020) e são os primeiros açúcares consumidos no metabolismo celular devido a sua maior reatividade do que os açúcares não redutores (CARVALHO et al., 2013). A análise de calos em folhas de castanha-do-brasil, revelou baixo teor de AR aos 60 dias de cultivo, sugerindo que os explantes não absorveram a sacarose presente no meio de cultura e que o AR foi consumido para produzir energia (SERRA, 1999).

Em relação ao teor de proteínas os calos do hipocótilo tiveram $3,83 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ e do segmento nodal $2,58 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ (Figura 12C). As proteínas são os principais compostos macromoleculares das células, formados por longas cadeias específicas de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas, dessa forma cada proteína é formada por uma sequência única que determinará sua função na célula vegetal (MEIRA, 2019; TAIZ; ZEIGER, 2017). O aumento no teor de proteínas é um indicativo de mudanças no metabolismo celular, uma vez que há a necessidade de proteínas específicas para garantir que suas funções sejam executadas (MULLER, 2008). Esse incremento aos 90 dias pode ocorrer devido a utilização de aminoácidos formados ou absorvidos anteriormente a partir da degradação de carboidratos.

Na quantificação dos aminoácidos foi verificada 171,23 mg g⁻¹ MF para o hipocótilo e 171,36 mg g⁻¹ MF para o segmento nodal de quixabeira (Figura 12D). A síntese de aminoácido está envolvida diretamente no desenvolvimento da planta (NASCIMENTO-GAVIOLI et al., 2017). Em calos de explantes foliares para aroeira-do-sertão o teor de aminoácidos (3,147 mg g⁻¹ MF) foi menor do que o observado para quixabeira. Santos et al. (2010) relatam que o teor de aminoácidos em *Jatropha curcas* alcançou níveis elevados no dia da inoculação, possivelmente devido ao conteúdo endógeno do explante e elevação no 63º dia, indicado que ocorreu absorção dos aminoácidos contidos no meio de cultura. A relação entre aminoácidos e proteínas é notável quando se compara o baixo teor de aminoácido nos calos originados no hipocótilo com o incremento de proteínas no mesmo explante (Figura 12 C e D). Para o segmento nodal foi observado um elevado teor de aminoácido e baixo teor de proteína, sugerindo que esses aminoácidos ainda não foram utilizados na síntese proteica (Figura 12 C e D).

6.3 Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos de quixabeira foi positiva para a presença de metabólitos secundários agrupados em três classes distintas: alcaloides, cumarinas e saponinas e negativa para flavonoides e antocianinas (Tabela 19).

Tabela 19. Triagem fitoquímica qualitativa de calos oriundos do explante hipocótilo e segmento nodal de *Sideroxylon obtusifolium* aos 90 dias de cultivo in vitro.

Metabólitos Secundários	Hipocótilo	Segmento nodal
Alcaloides	+	+
Cumarinas	+	+
Saponinas	+	+
Flavonoides	-	-
Antocianinas	-	-

(+) Presença do metabólito; (-) ausência do metabólito

Compostos secundários presentes nas plantas podem ser produzidos como resposta ao estresse ambiental e ao ataque de patógenos, auxiliam na dispersão de frutos e sementes por atrair polinizadores devido a produção de cor, cheiro ou sabor e na produção de compostos farmacológicos ativos, atuando na prevenção e tratamento de diversas enfermidades (BHATLA, 2018).

Em análises fitoquímicas realizadas com extrato metanólico obtido das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* coletadas em campo, Aquino et al. (2019) relataram a presença de diversas classes de metabólitos, entre eles: fenóis; taninos pirogálicos, flavonoides, catequinas e alcaloides. A presença de fenóis e flavonoides demonstram a atividade anti-inflamatória dessa espécie (AQUINO et al., 2019; LEITE, et al., 2015), visto que extratos vegetais ricos nessa classe de metabólitos reduzem inflamações por eliminar superóxidos que participam da cascata da inflamação (VATTEN; SHETTY, 2005), e por possuir a capacidade de atravessar as membranas celulares e realizar sua atividade biológica (BHATLA, 2018).

A triagem fitoquímica da entrecasca de *S. obtusifolium* revelou a presença de flavonóis, flavanonas, flavonóides, fenóis, saponinas, esteroides, taninos, triterpenos e xantonas, demonstrando atividade antinociceptivas e anti-inflamatórias, (ARAÚJO-NETO et al., 2010). Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura seis carbonos contendo um anel aromático (anel benzênico) com um ou mais grupos funcionais hidroxila como unidade química básica (BHATLA, 2018). Dentre a categoria de compostos fenólicos, os flavonoides atuam inibindo enzimas como a ciclo-oxigenase, lipoxigenase e NAPH-oxigenase, além de inibir a desgranulação de neutrófilos, diminuindo assim a adesão de células inflamatórias ao endotélio e a resposta inflamatória (ODONTUYA; HOULT; HOUGHTON, 2005; NIJVELDT et al., 2001), corroborando com o potencial antioxidante e anti-inflamatório de quixabeira, devido a presença de flavonoides (LEITE et al., 2015).

Os taninos são uma mistura de derivados fenólicos que podem se ligar e desnaturar proteínas, atuam impedindo a alimentação de herbívoros, e funcionam como compostos alelopáticos inibindo o crescimento de outras plantas (BHATLA, 2018). Eles atuam na inibição das enzimas óxido nítrico sintase induzível e ciclo-oxigenase, além de apresentar propriedades cicatrizantes (CARVALHO, 2004).

Dentre os compostos verificados para quixabeira estão as cumarinas, que funcionam como agentes antimicrobianos, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitumoral, anticoagulante, broncodilatadora e antioxidante (HOULT; PAYÁ, 1996), e as saponinas, que são glicosídeos de esteróides ou glicosídeos triterpênicos e atuam na proteção contra patógenos fúngicos (BHATLA, 2018).

Embora existam trabalhos que apontam para a produção de compostos secundários em quixabeira, este trabalho é pioneiro na análise fitoquímica no cultivo in vitro. Estudos dessa

natureza são importantes porque permitem a produção controlada de metabólitos secundários em larga escala, independentemente de fatores ambientais que podem afetar a produção desses compostos na planta inteira em quantidades elevadas (NEPOMUCENO, 2012).

7 CONCLUSÃO

O uso de hipoclorito de sódio 2% durante 20 min é eficiente para assepsia das sementes de *Sideroxylon obtusifolium*.

O meio WPM com adição de carvão ativado é indicado na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas.

O uso de GA₃ não influencia a germinação das sementes de quixabeiras nas concentrações testadas.

O uso de 2 µM de BAP é competente na formação de brotos em segmentos nodais.

É possível a formação de calos em segmento nodal com 1 µM de ANA, e em hipocótilo com a combinação de 4 µM de BAP e 2 µM de ANA.

A formação de calos em segmento apical é possível utilizando 0,5 µM de BAP.

Os calos de hipocótilo e segmento nodal apresentam alto teor de AST.

Calos obtidos do hipocótilo apresentam alto teor de proteínas em comparação ao teor de aminoácido e para calos oriundos do segmento nodal obteve-se resposta inversa.

Os calos de quixabeira possuem os seguintes metabólitos secundários: alcaloides, cumarinas e saponinas.

A cultura de tecidos é considerada como alternativa sustentável para minimizar os impactos causados pela exploração antrópica e extrativista para a espécie.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBERTS, Bruce *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular-4**. Artmed Editora, 2006.

ALBUQUERQUE, U. P. de. *et al.* Use and extraction of medicinal plants by the Fulni-ô indians in northeastern Brazil—implications for local conservation. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 11, n.2, p. 309-320, 2011. Disponível em: <http://periodicos.uefs.br/index.php/sitientibusBiologia/article/view/78>. Acesso em: 11 ago. 2020.

ALMEIDA CANÇADO, G. M. de. *et al.* Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 30, n. 253, p. 64-74, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Geraldo_Cancado/publication/234059674_Cultivo_de_plantas_in_vitro_e_suas_aplicacoes/links/0912f50eb6cb940d04000000/Cultivo-de-plantas-in-vitro-e-suas-aplicacoes.pdf. Acesso em: 16 ago. 2020.

ALEMIDA JR., E. B. de.; SILVA, A. N. F. da.; ZICKEL, C. S. Nova ocorrência de *Manilkara triflora* (Sapotaceae) para o litoral do Maranhão, nordeste do Brasil. **Revista Trópica; Ciências Agrárias e Biológicas**. v.10, n. 1, 2018. Disponível em: <http://www.periodicoelectronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/6307/6223>. Acesso em: 04 jul. 2021

ALMEIDA, C. dos S. *et al.* Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* jenipapeiro. **Scientia Plena**, v. 9, n. 10, 2013. Disponível em: <https://scientiaplena.org.br/sp/article/view/1537/901> Acesso em 25 jan. 2023.

ALVARADO, D. Z. *et al.* *In vitro* morphogenesis of *Physalis ixocarpa* Brot ex. Horm. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. 69416, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/7V9vR5KH56PbFnXF3rjDWGH/?format=pdf&lang=en> Acesso em 21 jan. 2024

ANDRADE, S. R. M. de. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**. p. 16, 2002. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/546466/1/doc58.pdf>. Acesso em 17 ago. 2020.

ARAÚJO-NETO, V. de. *et al.* Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 933-938, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/Nndq3zvjmXByX4w4jHnDcmw/?format=pdf&lang=en> Acesso em: 04 jul. 2021.

ARMSTRONG, K. **Systematics and biogeography of the pantropical genus *Manilkara* Adans. (Sapotaceae)**. Doctor of Philosophy, Institute of Evolutionary Biology School of Biological Sciences, University of Edinburgh & Royal Botanic Garden Edinburgh. p. 226, 2010.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e Análises bioquímicas de calos e Aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) Universidade Federal de Lavras.

BARBOSA, D. D. A. **Etnobotânica e screening fitoquímico de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) TD Penn. (Quixabeira), Cabaceiras, Semiárido da Paraíba**. 2018. p. 108. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/14505/1/Arquivototal.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.

BELTRÃO, A. E. S. *et al.* In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 696-698, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18s0/a10v18s0.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.

BALESTRIN, J. T. *et al.* Uso de plantas medicinais em uma comunidade rural do município de Sertão, Norte do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 84391-84405, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/19260> Acesso em 15 fev. 2022.

BARBOSA, M. H. P. *et al.* Efeito de reguladores de crescimento e tipo de explantes na morfogênese *in vitro* de *Capsicum annum* L. **Ciência Rural**, v. 24, p. 67-72, 1994.

BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. A. Contaminação *in vitro* de plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 20, 2006.

BHATLA, S. C. Plant growth regulators: an overview. **Plant physiology, development and metabolism**, p. 559-568, 2018.

BORGES, E. E. de L. *et al.* Alterações fisiológicas em sementes de *Tachigalia multijuga* (Benth.) (mamoneira) relacionadas aos métodos para a superação da dormência. **Revista Árvore**, v. 28, n. 3, p. 317-325, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rarv/v28n3/21597.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2020.

BOSCOLO, O. H.; SENNA VALLE, L. de. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica.**, v. 63, n. 2, p. 263-278, 2008. Disponível em: <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/149/156>. Acesso em 11 mar. 2023.

BUKATSCH, Franz. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976

- BRAUN, H. *et al.* Germinação in vitro de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 539-545, 2010. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744097002.pdf> Acesso em 25 jan. 2023.
- BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant physiology**, v. 124, n. 2, p. 507-514, 2000.
- CASTRO, A. H. F. *et al.* Cultivo in vitro e aspectos da anatomia foliar de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae Papilionoideae]. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 3, n. 2, p. 61-68, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Aparecida-Araujo/publication/304380840_Efeito_da_concentracao_de_sacarose_e_qualidade_de_luz_na_propagacao_in_vitro_de_plantulas_de_orquidea/links/576d7ca708ae842225a407fb/Efeito-da-concentracao-de-sacarose-e-qualidade-de-luz-na-propagacao-in-vitro-de-plantulas-de-orquidea.pdf#page=12 Acesso em 21 jan. 2024.
- CAMPOS, V. C. A. *et al.* Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, v. 43, p. 639-644, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/hrnRQkjNHjp4Qv73JKxpNrp/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.
- CANATTO, R. A.; ALBINO, B. E. S.; CORDEIRO, A. T. Propagação in vitro de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel): uma espécie florestal nativa. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 12, n. 3. 2016. Disponível em: http://www.amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/view/1413. Acesso em: 17 ago. 2020.
- CARNEIRO, C. E. *et al.* **Sapotaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB217>. Acesso em: 26 dez. 2019.
- CARVALHO, D. C. de *et al.* Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) cultivated in vitro under different carbohydrates, amino acids and 6-Benzylaminopurine levels. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 191-201, 2013.
- CARVALHO, J. M. F. C. *et al.* Considerações gerais sobre organogênese. **Embrapa Algodão-Documentos** (INFOTECA-E), p. 26, 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/276551/1/DOC150.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2020.
- CARVALHO, F. M. J.; VIDAL, S. M. Noções básicas de cultura de tecidos. **Embrapa: Documentos**, v. 116, p. 39, 2003.
- CELOTTO, A. C. *et al.* Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 339-340, 2003.

CHAVES, Thiago Pereira *et al.* **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro.** 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Estadual da Paraíba. Disponível em: <http://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/1879>. Acesso em 11 mar. 2023.

CID, L. P. B. TEIXEIRA, L. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In:* CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas.** 4 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. Cap. 1.

CID, L. P. B.; ZIMMERMANN, M. J. A contaminação *in vitro* de plantas. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2006.

COELHO, A. da C. B. *et al.* Análise dos metabólitos secundários da mangifera indica linneaus como possibilidade de tratamento alternativo para a síndrome pós covid-19. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 95673-95692, 2021.

COSTA, E. S. S. **Indução e caracterização de calos de *Amburana cearensis* (Allen.) AC E *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz.** 2018. p. 47 Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Estadual de Feira de Santana. Disponível em: http://www.rgv.uefs.br/arquivos/File/Downloads/teses_e_dissertacoes/dissertacao_completa_evel_ynsophia.pdf. Acesso em 09 jan. De 2020.

COSTA, F. C. *et al.* Sacarose e qualidade de luz na propagação *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 472-475, 2007. Disponível em: <file:///D:/Arquivos%20&%20Documentos/Downloads/1401-Texto%20do%20Artigo-8145-6958-10-20180730.pdf> Acesso em 25 jan. 2023.

COUTO, J. M. F. *et al.* Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, p. 633-642, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rarv/a/JSG9bjZRvCLhxPZKDhFycsF/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 15 fev. 2022.

CORDEIRO, I. M. C. C. *et al.* Indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Plant Cell Culture Micropropagation**, v.3, n.1, p. 35-40, 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/409259/1/Parica.pdf>. Acesso em 11 mar. 2023.

CRUZ, F. R. da S. **FENOLOGIA, BANCO DE SEMENTES E PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D.Penn.** 2018, p. 157. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/14391/1/TA195.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2020.

DAR, S. A. *et al.* Effect of plant growth regulators on *in vitro* induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. **Biotechnology Reports**, v. 32, p. e00688, 2021.

DAYKIN, A. et al. Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. **Planta**, v. 203, n. 4, p. 526-535, 1997.

DE AQUINO, P. E. A. *et al.* The Wound Healing Property of N-Methyl-(2 S, 4 R)-Trans-4-Hydroxy-L-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* Is Related to Its Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 24, p. 2515690X19865166, 2019.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER, E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n.2, p. 225-232, 1995.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo in vitro de plantas. **Rodriguésia**, v. 71, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/KRFnLTP6V8br3fRRfQKGVKf/?format=pdf&lang=pt> . Acesso em: 04 jul. 2021.

FABRIS, D.; GERBER, T.; SARTORETTO, L. M. Disinfection, germination and micropropagation in vitro of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride. **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 3, p. 17-26, 2016. Disponível em: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/215/pdf> Acesso em: 25 jan. 2023.

FABRIS, L. C.; PEIXOTO, A. L. Sapotaceae das Restingas do Espírito Santo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 2, p. 265-283, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rod/v64n2/06.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.

FERRAZ, J. S. F.; MEUNIER, I. M.J.; ALBUQUERQUE, U. P. de. Conhecimento sobre espécies lenhosas úteis da mata ciliar do Riacho do Navio, Floresta, Pernambuco. **Zonas Áridas**, v. 9, n. 1), p. 25-34, 2005. Disponível em: <https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/rza/article/view/566/555> Acesso em 15 fev. 2022.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, F. J.; LIMA, V. L. A. G. Antioxidant activity of anthocyanins from quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*) fruits. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 473-479, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n3/1516-0572-rbpm-17-3-0473.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.

FIRMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Smith-Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, p. 1-9, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cflo/a/smHvFrNJj8Vb5JgkgLrvrmn/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023

FLORES, R. *et al.* Sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199,

2013. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/article/view/600/350>
Acesso em 15 fev. 2022.

FOGLIO, M.A. *et al.* Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

GARRIDO, M. da S. *et al.* Características física e química de frutos de quixaba (*Sideroxylon obtusifolium* Penn.). **Revista Caatinga**, v. 20, n. 4, p. 34-37, 2007. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/34/218>. Acesso em: 11 ago. 2020.

GENEROSO, A. L. *et al.* In vitro germination to overcome dormancy in seeds of ‘Red Globe’, ‘Italia’ and ‘Niagara Rosada’ grapes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/BdXZYcYDLLVtgLS43jKSVKs/?format=pdf&lang=en> Acesso em 25 jan. 2023.

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

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores na influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

GOELZER, A. *et al.* Reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019. Disponível em: [file:///D:/Arquivos%20&%20Documentos/Downloads/1342-3630-1-PB%20\(1\).pdf](file:///D:/Arquivos%20&%20Documentos/Downloads/1342-3630-1-PB%20(1).pdf). Acesso em: 17 ago. 2020.

GOMES, R. Biologia floral de *Manilkara subsericea* e de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) em restinga. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 2, p. 271-283, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/fC5P85rLdqBNQLLwB3Fz8Pd/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 11 ago 2020.

GOTTLIEB, O. R. *et al.* Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, p. 97-102, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/z3tZTMWcTwwdZkbnrhcpXWk/abstract/?lang=pt>. Acesso em 11 mar. 2023.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; PENNINGTON, T.D. **World checklist and bibliography of Sapotaceae**. Kew: The Royal Botanical Garden, p. 361, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v. 1. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

GRECO, B. *et al.* Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Science Letters**, v. 36, n. 1, p. 73-77, 1984.

- GRIMALDI, F. *et al.* Protocolo de micropropagação de marmeleiro BA29 em meio semissólido. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 15, n. 3, 2016. Disponível em: <http://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/223811711532016266>. Acesso em: 16 ago. 2020.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2016. 44 p.
- HIGA, T. C. **Morfogênese e conservação in vitro para *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae)**. 2006. 1337 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina.
- HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.
- HUTTLY, A. K.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin-regulated plant genes. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 2, p. 310-317, 1995.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 470 p.
- KIELSE, P. *et al.* Regeneração in vitro de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1088-1094, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v39n4/a152cr1223.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- KIELSE, P. *et al.* Regeneração in vitro de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1088-1094, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/yjSpHPQG3byYYHN8vrCnRKw/abstract/?lang=pt> Acesso em 15 fev. 2022.
- KIILL, L. H. P.; MARTINS, C. T. de V. D.; SILVA, P. P. da. Biologia reprodutiva de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Sapotaceae) na região semiárida da Bahia. **Revista Árvore**, v. 38, n.6, p.1015-1025, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rarv/v38n6/a06v38n6.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- LACERDA, A. V. de. *et al.* Levantamento florístico do componente arbustivo-arbóreo da vegetação ciliar na bacia do rio Taperoá, PB, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 647-656, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/abb/v19n3/27381.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; MENESES, A. A. S. de. Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotações in vitro de mogno. **Embrapa Amazônia Oriental- Documentos (INFOTECA-E)**, p. 15, 2005. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/407849/1/BoletimPD51AMAZORIENTA L.pdf> Acesso em 25 jan. 2023.
- LAMEIRA, O. A. *et al.* Cultura de tecidos:(manual). **Embrapa Amazônia Oriental- Documentos (INFOTECA-E)**, p. 41, 2000.

LEANDRO, L. M. G. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. **Revista e-Ciência**, v. 1, n. 1, 2013. Disponível em:

https://www.researchgate.net/profile/Henrique_Coutinho4/publication/263658773_AVALIACAO_DA_ATIVIDADE_ANTIBACTERIANA_E_MODALATORIA_DE_EXTRATOS_METANOLICO_E_HEXANICO_DA_CASCA_DE_Sideroxylon_obtusifolium/links/560ed99208ae483375176e4a/AVALIACAO-DA-ATIVIDADE-ANTIBACTERIANA-E-MODULATORIA-DE-EXTRATOS-METANOLICO-E-HEXANICO-DA-CASCA-DE-Sideroxylon-obtusifolium.pdf.

Acesso em: 11 ago. 2020.

LÉDO, A. da S. *et al.* Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 989-993, 2007. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cagro/a/MKbGHPRrgRKTW5KgJD66vDx/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

LEITE, N.S. *et al.* Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 164-170, 2015. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n1/1983-084X-rbpm-17-01-00164.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020

LEITZKE, L. N; DAMIANI, C. R; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/rbf/v31n2/v31n2a37.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. *In*: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 4 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. Cap. 4.

LIMA-BRITO, A. **Micropropagação e conservação in vitro de *Syngonanthus mucugensis* GIUL. Subsp. *mucugensis***. 2009. 119 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Programa de PósGraduação em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

LLOYD, G; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **Hort Science**, Alexandria. v. 15, p. 415. 1980.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, São Paulo: **Ed. Plantarum**. V. 2, n. 2, p. 384, 2002.

LORENZI, H. *et al.* Frutas brasileiras e exóticas e cultivadas (de consumo *in natura*). São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**. p. 640, 2006.

MALDANER, J. *et al.* Sacarose e nitrogênio na multiplicação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1201-1206, 2006. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cr/a/rbZxHfsHqMttNm6vb5Jmrcb/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

MAMEDE, J. S. D. S.; Pasa, M. C. Diversidade e uso de plantas do Cerrado na comunidade São Miguel, Várzea Grande, MT, Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 20, n. 4, p. 1087-1098. 2019. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/inter/a/rBzjwZYrx8SDFZ4kt8MZZd/?lang=pt&format=html> Acesso em 15 fev. 2022.

MASCARENHAS, L. M. S.; SANTANA, J. R. F. de; BRITO, A. L. Micropropagation of *Physalis peruviana* L. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pat/a/SgRzKkXNCg96XzzWvhTfpSp/?format=html&lang=en>. Acesso em 11 mar. 2023.

MENEGAES, J. F. *et al.* Assepsia superficial de sementes de cártamo com uso de hipoclorito de sódio. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 19, n. 1, p. 01-10, 2021. Disponível em:

<https://pegasus.unochapeco.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/5523> Acesso em 15 fev. 2022.

MEIRA, F. S. **Fatores envolvidos com a calogênese visando a embriogênese somática em *Acrocomia aculeata*: morfoanatomia, bioquímica e expressão de genes candidatos**. 2019. p. 137. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Universidade de Brasília. Disponível em: [file:///D:/Arquivos%20&%20Documentos/Downloads/2019_FilipeSathlerMeira%20\(1\).pdf](file:///D:/Arquivos%20&%20Documentos/Downloads/2019_FilipeSathlerMeira%20(1).pdf)

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, J. S. *et al.* Tipos de explantes e concentração de bap (6-benzilaminopurina) no estabelecimento in vitro de angico-vermelho. **Revista Ouricuri**, v. 10, n. 1, p. 001-008, 2020.

MONFORT, L. E. F. *et al.* Efeito do BAP no cultivo in vitro de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 458-463, 2012.

MORAIS, T. P. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.

MULLER, T. S. **Fisiologia e metabolismo da embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (Berg) Burret (MYRTACEAE)**. 2012. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de Santa Catarina.

MUNIZ, M.; Fátima B.; SILVA, L. M.; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 140-146, 2007. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbs/a/nBy6Lfr7SJfDRSjSY4xPMbz/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 15 fev. 2022.

NASCIMENTO-GAVIOLI, M. C. A. et al. Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, p. 33-40, 2017.

NASCIMENTO, V. T. *et al.* Rural fences in agricultural landscapes and their conservation role in an area of caatinga (dryland vegetation) in Northeast Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, v. 11, n. 5, p. 1005-1029, 2009.

NASUTION, N. H.; NASUTION, I. W. The effect of plant growth regulators on callus induction of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, v. 305, n. 1, p. 012049, 2019. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/305/1/012049/pdf> Acesso em: 20 jan. 2024.

NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R.; PEREIRA, M. O. Alongamento in vitro de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 79-86, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v38n1/v38n1a12.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

NEPOMUCENO, C.F. **Propagação e conservação in vitro de *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) JFB PASTORE**. 2012. 179 p. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana.

NERY, M. C. *et al.* Germinação in vitro e ex vitro de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. **Cerne**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/744/74414101.pdf> Acesso em 23 jan. 2023.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NOGUEIRA, R. C. *et al.* Germinação in vitro de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 1053-1059, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/WwwYFjLC6B63PfRVsbBK34K/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R. S.; HOUGHTON, P. J. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 9, p. 782-786, 2005.

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

OLIVEIRA, R. C. de *et al.* Regulators, culture media and types of lights in vitro lavender culture. **Ciência Rural**, v. 49, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/78XcXQLDpx5mdkvfz8JswFc/?format=pdf&lang=en> Acesso em 25 jan. 2023.

PAIVA PORFÍRIO, K. de. *et al.* Multiplicação *in vitro* de *Xylopia 68romática* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, n. 1, 2019. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/1895>. Acesso em: 17 ago. 2020.

PAIVA PAULINO, M. A. P. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de *Cyrtopodium Cachimboense* l. C. Menezes em diferentes níveis de sacarose. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 18844-18860, 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/25177/20074> Acesso em 25 jan. 2023.

PACHECO, M. V. *et al.* Dormência de sementes e produção de mudas de *Dimorphandra mollis* Benth. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 4, p. 689-697, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cflo/v21n4/1980-5098-cflo-21-04-00689.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2020.

PARAJARA, F. C. **Propagação vegetativa e desenvolvimento de mudas de espécies nativas por estaquia de ramos herbáceos**. 2015. p. 97. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretária Estadual do Meio Ambiente. Disponível em: http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/pgibt/2015/12/Fulvio_Cavalheri_Parajara_MS.pdf. Acesso em: 16 ago. 2020.

PASA, M. da S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v42n8/a21612cr6272.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

PASSOS, L. P. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. Coronel-Pacheco, 1996. 223p.

PAULINO, R. da C. *et al.* Contribuição ao conhecimento e conservação da laranjinha. **Interações (Campo Grande)**, v. 12, n. 2, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/inter/v12n2/a07.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 234-239, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbf/v23n2/7956.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

PENNINGTON, T. D. **Sapotaceae. Flora Neotropica Monograph 52**. New York: The New York Botanical Garden, 1990.

_____. **The genera of Sapotaceae**. The Royal Botanical Garden, Kew, p. 307, 1991.
RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2014. p. 906.

PEREIRA, G. A.; CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de

sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 222-226, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/VPw7bV544kGG7mMwp8ztGvK/abstract/?lang=pt> Acesso em 15 fev. 2022.

PINHAL, H. F. *et al.* Concentration of MS medium and cutting of seeds on in vitro establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). **Bioscience Journal**, v. 33, n. 2, p. 306-313, 2017.

PINHEIRO, C. G. *et al.* Efeito da assepsia superficial na germinação e incidência de fungos em sementes de espécies florestais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 253-260, 2016. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/1234/516> Acesso em 15 fev. 2022.

PINHEIRO, C. SI. R. *et al.* Germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 413-416, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/nTpqZwwJB5rMzynjBnFJVbW/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

REBOUÇAS, A. C. M. N. *et al.* Métodos para superação da dormência de sementes de quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D.Penn.). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 183-192, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cflo/v22n1/1980-5098-cflo-22-01-00183.pdf>. Acesso em 11 ago. 2020.

REZENDE, J. C. de. Influência do meio de cultura e concentrações de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

RIBEIRO, I. G. **Produção in vitro, análise fitoquímica e avaliação da atividade antineoplásica de metabólitos de Hovenia dulcis Thunb. (Rhamnaceae) obtidos por diferentes estratégias biotecnológicas**. 2013. 202 p. Tese (Doutorado em biociências) Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

RIVERA CURTI, J. C.; CABRERA PINTADO, R. M.; BULNES SORIANO, F. Micropropagación de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. Ex Willd.) Kunth a partir de yemas apicales. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 22, n. 1, p. 18-26, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v22n1/0123-3475-biote-22-01-18.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ROCHA, A. P. *et al.* Métodos para superação da dormência em sementes de *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 505-514, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cflo/v28n2/1980-5098-cflo-28-02-505.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2020.

ROCHA, M. A. C. da. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbf/v30n3/35.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

- RODRIGUES, S. D. S.; FIDALGO, A. D. O.; BARBEDO, C. J. Reproductive biology and production of seeds and seedlings of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. **Journal of Seed Science**, v. 9, n. 3, p. 272-279, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jss/v39n3/2317-1545-jss-39-03-00272.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 333-340, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/LbfwXkXf4vhdHyRxwgJYVvN/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 21 jan. 2024.
- RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S. de; ARAUJO MARIATH, J. E. de. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 2, n. 3, p. 159-166, 2004.
- ROMANIUK, M.de S. et al. Multiplicação e biometria de brotos de toona ciliata var. Australis regenerados via organogênese in vitro. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 19, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/4823/482484647> Acesso em 25 jan. 2023.
- SÁ, T. F. F. de. **Uso de Sistema de Informação Geográfica (SIG) para seleção de plantas matrizes de quixabeira [*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn.]**. 2017, p. 112. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração Agricultura Tropical) - Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/14545>. Acesso em: 11 ago. 2020
- SALLES, E. A. P. B. et al. Desinfestação e introdução in vitro de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, pág. 485-491, 2017. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/1392/607> Acesso em 15 fev. 2022.
- SANTOS, D. N. dos. *et al.* Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2268-2273, 2010.
- SERRA, A. G. P. **Análise bioquímica de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK)**. UFLA, 1999.
- SHAMSI AH, A. *et al.* Effects of BAP concentration on in vitro shoot multiplication and callus induction of *Jatropha curcas*. In: **XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Micro 923**. 2011. p. 203-208.
- SILVA, A. T. da. *et al.* Atividade antioxidante e anti-inflamatória da espécie *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex Roem. & Schult.) T. D. Penn.: uma revisão integrativa. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 3, p. 3133-3158, 2021. Disponível em:

https://www.diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/1717 Acesso em 15 fev. 2022.

SILVA, A. A. O. *et al.* Análise fitoquímica e doseamento de metabólitos secundários das folhas de miconia albicans (sw) triana coletadas de duas regiões do estado de goiás. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 10, n. 1, p. 71-91, 2021. Disponível em: <http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/refacer/article/view/5880/4095>. Acesso em 11 mar. 2023.

SILVA, T.dos S. *et al.* Calogênese em Myracrodruon urundeuva Fr. All. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 700-717, 2020.

SILVA, F. F. S. da.; DANTAS, B. F. *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex. Roem. & Schult.) TD Penn. quixabeira. **Embrapa Semiárido-Nota Técnica/Nota Científica**, n. 2, p. 6, 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1074013/1/Barbara2017.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.

SILVA, T. dos S. *et al.* Multiplicação in vitro de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 13, 2013. Disponível em: <http://ojs3.uefs.br/index.php/sitientibusBiologia/article/view/320/329> Acesso em 25 jan. 2023.

SILVA, F. F. S. da.; DANTAS, B. F. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) de diferentes procedências. **Revista Sodrebas**, v. 8, n. 90, p. 40-43, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/83048/1/2013-Barbara.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2020.

SILVA, K. B. *et al.* Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (SAPOTACEAE). **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 59-64, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rarv/v36n1/a07v36n1.pdf>. Acesso em: 11 ago 2020.

SKOKUT, T. A.; MANCHESTER, J.; SCHAEFER, J. Regeneration in alfalfa tissue culture: stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. **Plant Physiology**, v. 79, n. 3, p. 579-583, 1985.

SMIDERLE, O. J.; SOUSA, R. C. P. de. Dormência em sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth- Fabaceae -Papilionidae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 2, p. 48-52, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbs/v25n2/19648.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2020.

SOARES, F. P. *et al.* Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/mZM8mYk5RfNDWmGGb9LTTbM/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

SOBRINHO, A. C. G.; SANTOS, A. S. Estabelecimento de cultura *in vitro* de *Hibiscus sabdariffa* L.: obtenção de plântulas e indução de calos em diferentes condições de cultura visando o acúmulo de biomassa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e358101523114-e358101523114, 2021. Disponível em:
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23114> Acesso em 21 jan. 2024.

SOUSA, T. T. C. *et al.* Desinfestação e introdução *in vitro* de explantes de eucalyptus. In: III Congresso internacional das ciências agrárias. João Pessoa, 2018. Disponível em:
<https://cointerpdvagro.com.br/wpcontent/uploads/2019/02/DESINFESTA%C3%87%C3%83O-E-INTRODU%C3%87%C3%83O-IN-VITRO-DE-EXPLANTES-DE-EUCALYPTUS.pdf>
 Acesso em 15 fev. 2022.

SOUZA, J. C. de. *et al.* Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. 2018. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018. Disponível em:
https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/30339/julio_vezar_et_all.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 11 mar. 2023

SOUZA, J. C.; RESCAROLLI, C. L. S; NUNEZ, C. V. Production of secondary metabolites by plant tissue culture. **Revista Fitos**. v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018. Disponível em:
https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/30339/julio_vezar_et_all.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 11 mar. 2023.

SOUZA, A. V. de. *et al.* Protocolos de assepsia para o estabelecimento *in vitro* de espécies medicinais nativas da Caatinga. **Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1004161/1/COT160.pdf> Acesso em 15 fev. 2022.

SOUZA, L. S. de. *et al.* Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbf/a/qZrwKm4ywdZTzrtQ3QmTjMy/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 15 fev. 2022.

SOUZA, A. V. de *et al.* Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 92-98, 2011. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/cagro/a/rysXTGcDM5CDxZJ3mmnymTR/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

STEIN, V. C. *et al.* Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1702-1708, 2007. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/cagro/a/KN7sq6YvRb8rwKsnWhJ7bxL/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 23 jan. 2023.

STEFANEL, C. M. *et al.* Ácido naftalenoacético e cinetina na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 42, 2022. Disponível em:
<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/2079> Acesso em 25 jan. 2023.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 113, n. 2, p. 234-238, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

THELANDER, M.; LANDBERG, K.; SUNDBERG, E. Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 2, p. 277-290, 2018.

THOMAS, P.; ASWATH, C. In vitro introduction of hardy alcohol resistant *Bacillus* spp. through aseptically grown watermelon seedlings. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 504-510, 2014.

THOMAS, P.; ASWATH, C. Alcohol-mediated horizontal spread of bacillus spores and assessing the recurrent sterilization needs of culture-handling tools contaminated with hardy spores. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 207-213, 2013.

VAN TELGEN, H. J.; VAN MIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 41, n. 4, p. 453-459, 1992. Disponível em: <http://natuurtijdschriften.nl/download?type=document&docid=540892>. Acesso em: 17 ago. 2020.

VANKOVA, R. Cytokinin regulation of plant growth and stress responses. **Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications**, p. 55-79, 2014.

VASCONCELOS, J. N. C., *et al.*, Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of food biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. da. Multiplicação in vitro de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 64-70, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/wZ4zt58HTkTskHrJCdNwjWG/?format=pdf&lang=pt> Acesso em 25 jan. 2023.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. **Embrapa Florestas-Documentos** (INFOTECA-E). p. 55, 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/314506/1/doc130.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2020.

WILLIAMS, J. F.; PETERSON, M. L. Relations Between Alpha-amylase Activity and Growth of Rice Seedlings 1. **Crop science**, v. 13, n. 6, p. 612-615, 1973.

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

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954

ZANELLA, L. B. *et al.* MICROPROPAGATION OF *Pinus tecunumanii*. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 651-660, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cflo/v28n2/1980-5098-cflo-28-02-651.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ZIMMERMAN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B (Org). **Cultivo in vitro de plantas**. 3ed. Brasília, EMBRAPA. 2014. p. 69-103.