



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



CAROLINA FIGUERÊDO COSTA

**MICROPROPAGAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Vellozia*
(VELLOZIACEAE) DA CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA:
ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

CAROLINA FIGUERÊDO COSTA

**MICROPROPAGAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Vellozia*
(VELLOZIACEAE) DA CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA:
ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alone Lima Brito

Co-orientadora: Dr^a. Andressa Priscila Piancó Santos Lima

Feira de Santana - BA
2025

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Costa, Carolina Figuerêdo

C871m Micropropagação de duas espécies de *Vellozia* (Velloziaceae) da Chapada Diamantina, Bahia: aspectos fisiológicos e bioquímicos / Carolina Figuerêdo Costa. - 2025.
79f. : il.

Orientadora: Alone Lima Brito

Coorientadora: Andressa Priscila Piancó Santos Lima

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2025.

1. Candombá. 2. Estresse salino. 3. Reguladores vegetais. 4. Cultivo in vitro. 5. Vedação (Plantas). 6. Velloziaceae. I. Brito, Alone Lima, orient. II. Lima, Andressa Priscila Piancó Santos, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

CDU: 582.576.1

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

MARIA NAZARE GUIMARAES MARCHI

Data: 13/02/2025 09:01:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Maria Nazaré Guimarães Marchi
(Instituto Federal Baiano)



Documento assinado digitalmente

MARA MARCIA SAMPAIO ALBUQUERQUE

Data: 13/02/2025 14:55:11-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Mara Marcia Sampaio Albuquerque
(Pesquisadora/Consultora - Analítica)



Documento assinado digitalmente

ALONE LIMA BRITO

Data: 13/02/2025 09:54:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Alone Lima Brito
Orientadora e Presidente da Banca
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)

Feira de Santana – BA
2025

Dedico este trabalho ao meu porto seguro, aqueles que me fazem entender que o sol vai voltar
amanhã, Claudia Aida e Caio Fernandes.

AGRADECIMENTOS

É chegado o final deste ciclo e assim sendo, gostaria de proferir agradecimentos a todos que me acompanharam aqui. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer grandemente às boas energias que me fizeram mudar de área radicalmente e entender que muito pode mudar em dois anos.

Sou grata a Deus por não ter me desamparado e sou grata a Nossa Senhora Aparecida por ter me feito sentir em vários momentos que ela “me protegeu com seu manto”.

Sou extremamente grata, todo santo dia, à minha mãe, Claudia Aida, e ao meu irmão, Caio Fernandes, por serem o meu ninho, por fazerem dos nossos abraços a minha morada, pelas palavras de incentivo e puxões de orelha. Escrevi isso só pra agradecer mais uma vez por todo esse bem, amo vocês.

Agradeço grandemente às minhas orientadoras, Alone e Andressa, que me ensinaram muito além do que a relação de orientador exigiria. Foram vários os momentos de ensinamento e remanejamentos que este trabalho exigiu, mas ao longo desses dois anos, também foram vários os momentos que pude contar com o lado humano e amigo de vocês, é uma honra ter recebido cada acolhimento, crítica e cobrança de vocês.

Ao longo destes dois anos, muita coisa nova e diferente me aconteceu dentro do Horto. Gostaria de agradecer aos meus colegas de LCTV, especialmente Fernanda e Andressa, que transformaram os dias rotineiros em dias surpreendentes. Tivemos diversos momentos conversando sobre cultivo in vitro, cantando, contando histórias ou mesmo desabafando da vida, são momentos que levo comigo com carinho.

Agradeço demais pela paciência que meus amigos tiveram comigo, por entender minha ausência e cansaço, por me ouvirem mesmo sem entender nada do que eu fazia no laboratório. Gostaria de agradecer a Antonio Carlos pela sua “aula” de como tirar fotos de coisas milimétricas, recebi vários elogios até hoje, metade devo a você.

Agradeço demais pela preocupação de Dona Claudia e Dona Sandra, que sempre vinham perguntar se já almocei, oferecer uma conversa e uma palavra de apoio, muito obrigada!

Gostaria de agradecer a Robson e Uasley por toda ajuda fornecida para as análises de prolina. Agradeço grandemente às componentes da banca de defesa desta dissertação, que trouxeram sugestões que certamente contribuíram para esse texto final.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - CAPES - Finance Code 001).

RESUMO

A Chapada Diamantina é composta majoritariamente pelos campos rupestres, apresentando espécies endêmicas que contribuem para a ornamentação da paisagem, como a *Vellozia pyrantha* e a *Vellozia punctulata*, utilizadas neste estudo, cujo objetivo foi estabelecer protocolos de micropropagação para estas espécies. O cultivo in vitro de *V. punctulata* e *V. pyrantha* foi realizado através do estabelecimento com sementes desinfestadas e inoculadas em meio MS $\frac{1}{3}$, 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar; a parte aérea das plântulas foi o explante selecionado, sendo transferidas para multiplicação in vitro, viabilizada pela benzilaminopurina (BAP) sendo utilizada as concentrações 0,00; 4,44; 8,88; 17,76 μ M nos explantes de *V. pyrantha*. Os brotos, obtidos após multiplicação in vitro, foram enraizados in vitro, sendo testadas a adição de carvão ativado ao meio e dois tipos de vedação dos recipientes (PVC ou algodão). As microplantas foram aclimatizadas em casas de vegetação. Na micropropagação de *V. pyrantha*, na etapa de multiplicação obteve-se em média 9,35 brotos usando 8,88 μ M de BAP. O carvão favoreceu os comprimentos da parte aérea (CPA) e radicular (CPR), enquanto o número de raízes e o CPR foram favorecidos pelo uso do tampão de algodão. Houve sobrevivência de 80 a 95% das plantas após 30 dias da aclimatização, permitindo inferir que a micropropagação é uma técnica eficiente para produção de mudas de *V. pyrantha*. Ao micropropagar *V. punctulata*, foram testadas duas estratégias para multiplicação in vitro, com indução de estresse salino, com NaCl (0; 10; 20; 40 e 80 mM), e a utilização do regulador vegetal BAP (0,00; 4,44; 8,88; 13,32 e 17,76 μ M). O estresse salino, induzido com a concentração 40 mM de NaCl, gerou 2,53 brotos, enquanto o uso do BAP promoveu o surgimento de 7,6 brotos na concentração 10,72 μ M. Durante o período de regeneração dos brotos induzido via estresse, foi realizada a quantificação de prolina; aos 30º dia de cultivo in vitro no meio ausente de NaCl observou-se 1,77 μ g de prolina e 16,41 μ g no meio contendo 40 mM de NaCl. Somente os brotos obtidos com BAP foram transferidos para o enraizamento in vitro, na qual observou-se que a vedação com algodão favoreceu esta etapa. A aclimatização de *V. punctulata* apresentou porcentagem de sobrevivência acima de 92,5%, e a utilização prévia da vedação com algodão no enraizamento ocasionou o aumento na massa fresca e seca da parte aérea e radicular nas plantas aclimatizadas. Este estudo estabeleceu o primeiro protocolo de micropropagação das espécies *V. pyrantha* e *V. punctulata* comprovando a eficiência da técnica, tendo sido necessário 240 dias para obtenção das microplantas a partir da germinação in vitro.

Palavras-chave: Candombá, Estresse salino, Reguladores vegetais, Cultivo in vitro, Vedação.

ABSTRACT (Micropropagation of two *Vellozia* (Velloziaceae) species from Chapada Diamantina, Bahia: physiological and biochemical aspects)

Chapada Diamantina is predominantly composed of rupestrian fields, presenting endemic species that contribute to the ornamentation of the landscape, such as *Vellozia pyrantha* and *Vellozia punctulata*, which were used in this study. The aim of this study was to establish micropropagation protocols for these species. The in vitro cultivation of *V. punctulata* and *V. pyrantha* was carried out through the establishment with disinfected seeds inoculated in MS $\frac{1}{2}$ medium, 15 g L⁻¹ sucrose, and 7 g L⁻¹ agar; the aerial part of the seedlings was the selected explant, which was transferred for in vitro multiplication, facilitated by benzylaminopurine (BAP) at concentrations of 0.00; 4.44; 8.88; 17.76 μ M for *V. pyrantha* explants. The shoots, obtained after in vitro multiplication, were rooted in vitro, and the addition of activated charcoal to the medium and two types of sealing of the containers (PVC or cotton) were tested. The microplants were acclimatized in greenhouses. In the micropropagation of *V. pyrantha*, during the multiplication stage, an average of 9.35 shoots were obtained using 8.88 μ M of BAP. The charcoal favored the length of the aerial part (CPA) and root part (CPR), while the number of roots and CPR were favored by the use of the cotton seal. There was a survival rate of 80 to 95% of the plants after 30 days of acclimatization, allowing the inference that micropropagation is an efficient technique for the production of *V. pyrantha* seedlings. When micropropagating *V. punctulata*, two strategies were tested for in vitro multiplication, with salt stress induction using NaCl (0; 10; 20; 40; and 80 mM), and the use of the plant growth regulator BAP (0.00; 4.44; 8.88; 13.32; 17.76 μ M). The salt stress, induced with the concentration of 40 mM NaCl, produced 2.53 shoots, while the use of BAP promoted the emergence of 7.6 shoots at the concentration of 10.72 μ M. During the regeneration period of the shoots induced by stress, proline quantification was carried out; on the 30th day of in vitro cultivation in the medium without NaCl, 1.77 μ g of proline was observed, and 16.41 μ g in the medium containing 40 mM NaCl. Only the shoots obtained with BAP were transferred for in vitro rooting, where it was observed that the sealing with cotton favored this stage. The acclimatization of *V. punctulata* showed a survival rate above 92.5%, and the prior use of cotton sealing in rooting resulted in increased fresh and dry mass of the aerial and root parts in the acclimatized plants. This study established the first micropropagation protocol for the species *V. pyrantha* and *V. punctulata*, proving the efficiency of the technique, and it took 240 days to obtain the microplants from in vitro germination.

Keywords: Candombá, Salt stress, Plant growth regulators, In vitro culture, Sealing.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DE LITERATURA	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
Capítulo 1 - Micropropagação de <i>Vellozia pyrantha</i> , A. A. Conc.: uma espécie ornamental da Chapada Diamantina	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
Capítulo 2 - Citocinina e estresse salino como moduladores do cultivo in vitro de <i>Vellozia punctulata</i> Seub.	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
APÊNDICES	76

INTRODUÇÃO

A Serra do Espinhaço é uma região montanhosa, localizada entre os estados de Minas Gerais e Bahia, com uma paisagem composta por campo rupestre, que se caracteriza por possuir uma vegetação de porte herbáceo a arbustivo e solos rasos e pobres (Camargo *et al.*, 2019; Colli-Silva; Vasconcelos; Pirani, 2019; Rapini *et al.*, 2008). As famílias Eriocaulaceae, Xyridaceae e Velloziaceae compõem o grupo de famílias com maior riqueza de espécies e proporção de endemismos descritos para a região, assim como são famílias cujo campo rupestre é referido como seu centro de diversidade, possibilitando compreender a alta taxa de espécies endêmicas descritas (Giulietti *et al.*, 2005; Giulietti; Pirani, 1988; Silveira *et al.*, 2016).

Dentro da Serra do Espinhaço, na porção restrita ao estado da Bahia, localiza-se a Chapada Diamantina, que concentra uma alta diversidade de plantas, contendo 459 espécies endêmicas, distribuídas entre 48 famílias botânicas (Gonçalves; Azevedo Gonçalves, 2023); entre as Monocotiledôneas, duas famílias, Poaceae e Velloziaceae, apresentam distribuição mais abundante nos campos rupestres, ocupando quase a metade do território desta vegetação (Conceição *et al.*, 2016).

Vellozia (Vand.) é um dos cinco gêneros de Velloziaceae, apresentando 121 espécies com distribuição neotropical, e destas, 118 são consideradas endêmicas do Brasil, majoritariamente distribuídas na Cadeia do Espinhaço (Mello-Silva, 2018), e apresenta importância econômica para a Chapada Diamantina, pois algumas espécies endêmicas, como *Vellozia pyrantha*, popularmente conhecida como candombá, são extraídas e comercializadas na região, e usadas como combustível, para acender fogão a lenha, ou como cola para instrumentos de mineração, utilizando sua resina (Oliveira *et al.*, 2015).

As plantas de *Vellozia* apresentam flores brancas, amarelas, lilases e roxas, sendo bem vistosas, posto que, no campo rupestre, durante o período seco, são poucas as plantas que permanecem com aspecto esverdeado ou que mantêm sua floração, destacando plantas ornamentais, como *Vellozia sincorana* e *Vellozia punctulata* em meio a essa paisagem (Conceição; Orr, 2012; Neves; Conceição, 2010). Na região próxima ao Parque Nacional da Chapada Diamantina, *Vellozia pyrantha* atrai bastante atenção dada a especificidade que a espécie tem para revivescência após incêndios, visto que o fogo é um fator intrínseco para floração e frutescência do candombá, e justamente por isto, se destaca na paisagem, ao florir e frutificar em meio ao habitat queimado (Conceição, 2018).

Alcantara *et al.* (2015) hipotetizaram razões para a existência de espécies de Velloziaceae que apresentam traços funcionais associados à tolerância à dessecação no grupo.

As raízes de Velloziaceae são um destes traços, que auxiliam na fixação destas plantas em habitats inóspitos e com déficit nutricional, como ocorre nas regiões rochosas do campo rupestre, onde estas raízes são úteis ao mobilizar o fósforo, através da reação química de carboxilação (Teodoro *et al.*, 2019).

A alta recorrência de incêndios naturais na região da Chapada Diamantina é preocupante pois afeta os campos rupestres, vegetação natural predominante para a área (Neves; Conceição, 2010). Clarke *et al.* (2012) esclareceram que o fogo tem uma habilidade dicotômica para as plantas, pois acarreta na morte do indivíduo ou em sua rebrota, estratégia que em Velloziaceae ocorre devido à proteção da gema apical, junto a demais estratégias que permitem persistir após as chamas, como um espessamento no caule e ausência de câmbio vascular, que auxiliam na sobrevivência em campo.

No entanto, apesar da passagem do fogo afetar a qualidade e quantidade dos recursos dispostos para a região, nas populações de *Vellozia pyrantha*, a consequência gerada pós ocorrência dos incêndios é a rebrota e as consecutivas fases de floração e frutificação de seus indivíduos (Conceição, 2018; Conceição *et al.*, 2013; Conceição; Orr, 2012), bem como há espécies no gênero com sementes resistentes ao fogo e a fase de germinação é também dependente dos incêndios para dar início ao processo (José, 2015; Zironi *et al.*, 2019). Entre as espécies de *Vellozia*, há diversas estratégias ecológicas e funcionais, como é o caso de *V. nivea*, uma espécie caracterizada como não tolerante à dessecação, cuja população em campo aparenta estar morta durante os períodos secos, mas rapidamente reidrata; dentro do mesmo gênero, há uma espécie que apresenta distinta estratégia funcional, posto que *V. punctulata* é sensível ao fogo, protegendo-se das chamas por conta do isolamento geográfico proporcionado pelas ilhas de vegetação, localizadas acima dos afloramentos rochosos (Conceição; Pirani; Meirelles, 2007; Neves; Conceição, 2010).

O candombá, nome que populares deram à *V. pyrantha*, é uma espécie que apresenta a peculiaridade fenológica, pois rebrota pós passagem de incêndios naturais na região; justamente por esta característica, associada a produção de resinas em suas folhagens, há exploração extrativista do candombá, que trazem impactos diretos para a dinâmica estrutural e densidade das populações naturais, visto que há redução significativa de indivíduos (Oliveira *et al.*, 2015).

Além de apresentar características que exibem contribuição a nível ecológico, o gênero *Vellozia* apresenta também características que conferem à espécie uma ampla gama de usos já comprovados em literatura, pois apresenta espécies com diversos potenciais a serem explorados pela indústria farmacêutica, como é o caso das espécies *V. canelinha* (Mello-Silva, 1993), *V. pusilla* (Dantas *et al.*, 2005), *V. flavicans* (Souza; Felfili, 2006; Oliveira *et al.*, 2011; Quintão

et al., 2013; Tribuiani *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Wiseva *et al.*, 2021) e *V. kolbekii* (Silva *et al.*, 2011).

Espécies como *Vellozia pyrantha* e *Vellozia punctulata* apresentam, respectivamente, os status de conservação de “criticamente ameaçada” e “não avaliado”, conforme pesquisas recentemente divulgadas (Conceição *et al.*, 2018; Gonçalves; Azevedo-Gonçalves, 2023). Espécies cujo status de conservação são desconhecidos ou ameaçados, como é o caso das espécies supracitadas, podem ser cultivadas in vitro, visando conservação ex situ da espécie e explorar seus potenciais já descritos.

A cultura de tecidos abrange um conjunto de técnicas, baseadas na biotecnologia, que podem ser aplicadas no cultivo in vitro dos tecidos vegetais, que são colocados em meio sintético e asséptico, permitindo que possa haver exploração comercial de espécies, além de proporcionar manejo em germoplasma endêmico ou espécies ameaçadas, através de técnicas como criopreservação ou propagação in vitro de explantes, tendo em vista a sua conservação (Carvalho; Rodrigues; Santos, 2016; Coelho; Gonçalves; Romano, 2020; Moraes *et al.*, 2012).

A micropropagação, é uma das técnicas mais utilizadas do cultivo in vitro, sendo reconhecida como importante para o avanço para o melhoramento de plantas e produção de mudas, sendo constituída de fases consecutivas de estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização, podendo assim proporcionar o aumento da produção, bem como também garante ao produtor adquirir plantas livres de patógenos (Barreto-Cid, 2015).

Na literatura há relatos de protocolos bem sucedidos de micropropagação de espécies endêmicas da Chapada Diamantina, a exemplo de *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R. Parra and Giul. (Lima *et al.*, 2022), *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe (Oliveira *et al.*, 2023), *Sincoraea mucugensis* (Lima; Lima-Brito; Santana, 2020) e *Vellozia seubertiana* Goethart & Henrard (Pinto; Lima-Brito, 2023).

Dentro do protocolo de micropropagação, é recorrente o uso de substâncias para potencializar a etapa de multiplicação, visto que é desejável obter o máximo de número de brotos por explante (Erig *et al.* 2002; Souza *et al.*, 2008). As citocininas são exemplos dos reguladores vegetais sintéticos que costumam ser utilizados para favorecer a multiplicação, devido a sua característica em promover, principalmente, a divisão celular, quebra da dominância apical e o crescimento de brotos laterais (Melo, 2002). A multiplicação in vitro também é possível de ser obtida em resposta a estresses abióticos, como o estresse hídrico, osmótico, podendo ser induzidos com o manitol ou sacarose (Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023) ou salino, induzido ao utilizar o NaCl (El Sherif, 2012), havendo produção de metabólitos

secundários, como a prolina, que é produzida como resposta a tolerância aos estresses ambientais, como os fatores de seca ou temperatura (Isah, 2019; Szepesi; Szollosi, 2018).

Nos estudos in vitro em espécies de *Vellozia*, foi possível estabelecer a multiplicação in vitro através do uso de reguladores na multiplicação, especialmente através de citocininas, auxinas e giberelinas, sendo aplicado: benzilaminopurina (BAP), citocinina (KIN), ácido indolbutírico (AIB) em *Vellozia sincorana* (Borges, 2015), *Vellozia flavicans* (Freitas-Neto, 2009) e KIN, AIB e giberelina (GIB) em *Vellozia squamata* (Calazans-Júnior *et al.*, 2022), ácido naftalenoacético (ANA) e BAP em *Vellozia seubertiana* e *Vellozia pyrantha* (Pinto, 2021; Pinto; Lima-Brito, 2023).

Outra estratégia utilizada para multiplicar *Vellozia* in vitro foi o uso de diferentes mecanismos de estresse vegetal, como a regulação de temperaturas em estufas e o uso controlado de chamas, aplicados nos explantes de *Vellozia sincorana* e *Vellozia pyrantha* (Borges, 2015; Borges *et al.*, 2020), o uso de agentes osmóticos no meio de cultura, como manitol, sacarose e polietilenoglicol, disponibilizados a cinco espécies de *Vellozia* spp, sendo possível observar que o uso de manitol gerou um estresse hídrico, que resultou em alterações fisiológicas notórias a nível morfológico, como a redução da quantidade de folhas e a produção de folhas apresentando pigmentação arroxeada, correspondendo a uma possível produção de antocianina nestas plantas, ao passo que, a utilização de PEG 6000 não induziu formação de brotos, além de gerar folhagens com coloração marrom, indicando degradação da clorofila no tecido. Somente a adição de altas concentrações de sacarose promoveu a propagação de *Vellozia pyrantha* (Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023). Neste mesmo estudo, Borges, Lima-Brito e Conceição (2023) indicam que *Vellozia punctulata* e *Vellozia jolyi* apresentam alto potencial para uma “fácil” multiplicação in vitro.

Posto que o objetivo da micropropagação é retornar a planta para o ambiente ex vitro, após as sucessivas divisões celulares ocorridas na multiplicação in vitro, faz-se necessário transferir o explante para enraizar, pois as raízes são um órgão importante para a absorção de água, nutrientes e para a sinalização celular, além de ser uma estrutura necessária para a sobrevivência do tecido. Há espécies que são beneficiadas pela adição do carvão ativado no meio de cultura utilizado para o enraizamento in vitro, uma vez que o carvão proporciona dupla funcionalidade na cultura de tecidos, favorecendo a formação de raízes devido ao microhabitat escurecido, assim como o carvão possibilita a adsorção de substâncias tóxicas que podem se formar após autoclavagem do meio de cultura (George *et al.*, 2008), tal qual pode ser observado em *Vellozia seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023). O uso de diferentes vedações no microhabitat, como o algodão, tampas ou PVC, representam uma estratégia que pode ser

empregada no enraizamento in vitro para possibilitar a rustificação da planta, etapa que pode otimizar a aclimatização ex vitro, visto que as plantas cultivadas in vitro podem adquirir características anatômicas disfuncionais para o ambiente ex vitro (hiperidricidade, densidade estomática, baixa absorção fotossintética, cutícula delgada) que constituem fatores limitantes para a sobrevivência em campo (Barboza et al., 2006; Mayer et al., 2008; Vasconcelos et al., 2012).

Deste modo, como as etapas de enraizamento e aclimatização foram pouco exploradas nos estudos in vitro de *Vellozia* sp., este estudo objetivou estabelecer os primeiros protocolos de micropropagação para as espécies *Vellozia pyrantha* e *Vellozia punctulata*, espécies endêmicas da Chapada Diamantina.

REVISÃO DE LITERATURA

- Família Velloziaceae e Gênero *Vellozia*

Velloziaceae J. Agardh é uma família presente nas Américas Central e Sul, bem como na África e sudeste da Península Arábica (Kubitzki, 1998). Entre as 276 espécies existentes no mundo, 235 são brasileiras (aproximadamente 85,15%), sendo Velloziaceae, junto a Eriocaulaceae e Xyridaceae, consideradas famílias que caracterizam os campos rupestres da Serra do Espinhaço, pois somam 800 espécies, sendo 90% endêmicas da região (Giulietti *et al.*, 2005).

Vellozia Vand. é o maior gênero da família Velloziaceae (Mello-Silva *et al.*, 2011), pertence a subfamília Vellozioideae e possui aproximadamente 150 espécies, sendo bem representado nos campos rupestres (Conceição *et al.*, 2007; Conceição; Pirani, 2007; Giulietti; Pirani, 1988; Mello-Silva, 1991). Algumas espécies de *Vellozia* são conhecidas popularmente como canela-de-ema ou candombá (Conceição, 2018). As plantas de Velloziaceae dominam as regiões de afloramentos rochosos da Cadeia do Espinhaço, onde os solos são rasos e há maior teor de matéria orgânica (Rapini *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *Vellozia* tem potencial ornamental descrito, especialmente por se destacar na paisagem dos campos rupestres, com um porte arbustivo, flores geralmente roxas, com anteras amarelas, e resistentes à seca e à passagem do fogo, havendo rebrotamento de *Vellozia pyrantha* logo após a ocorrência dos incêndios naturais (Conceição, 2018; Oliveira *et al.*, 2015).

Na Chapada Diamantina, espécies de *Vellozia* costumam ocorrer em regiões de afloramentos rochosos, com solos rasos (Rapini *et al.*, 2008), sendo solos pobres em micronutrientes (Joaquim, 2013). Em especial, há déficit do nutriente fósforo nos solos dos campos rupestres e, para lidar com esta situação, Velloziaceae conta com a presença de raízes especializadas, com grande quantidade de filamentos de raízes, o que aumenta o contato da planta com o solo, além de proporcionar que haja a produção de carboxilatos, que permitem que haja liberação do fósforo contido nas rochas quartzíticas, bem como sua absorção (Teodoro *et al.*, 2019).

Na região da Chapada Diamantina, as plantas de *V. pyrantha* e *V. sincorana* são

utilizadas pela comunidade regional como combustível para propagação da chama no fogo à lenha (Conceição, 2018; Conceição; Orr, 2012; Oliveira *et al.*, 2015). Há também o uso regional de partes das plantas de *V. canelinha*, como as suas folhas, no preparo de decocções, para doenças renais e hepáticas, fazendo parte do comércio local, nas feiras de Rio de Contas e Brumadinho (Mello-Silva, 1993).

As folhas de *Vellozia* tem seus estômatos posicionados nos sulcos na face abaxial para regular a transpiração e permite maior mobilidade conforme a hidratação, ao possibilitar contrações e até dobraduras longitudinais na lâmina foliar, que, junto à presença de uma massiva cobertura da bainha foliar, ao redor do caule, que é lenhoso, porém delgado, auxilia que haja redução na perda de água (Ayensu, 1973). As plantas de *Vellozia* spp. são conhecidas por sua longevidade e crescimento lento, uma vez que há dificuldades para sua fixação no ambiente xérico e, para lidar com esta dificuldade, se associam a fungos endofíticos, como uma estratégia para permanência no habitat (Ferreira, 2017). Uma outra estratégia que espécies de Velloziaceae tem, que lhes permite lidar com o habitat, é a deciduidade das folhas senescentes como tolerância à dessecação (Abraão *et al.*, 2019).

- Potencial farmacológico, medicinal e industrial de *Vellozia* spp.

Mello-Silva (1993) ao identificar três novas espécies de *Vellozia* da região do Pico das Almas, relata haver uso na comunidade local para as folhas e os segmentos acima do pseudocaule das plantas de *Vellozia canelinha*, que preparam decocções, usadas como tratamento para doenças renais e hepáticas. Esta possivelmente foi uma das primeiras descrições acadêmicas do uso medicinal das plantas de *Vellozia* spp, junto à publicação de Ayensu (1973), que indica haver o uso da resina de algumas espécies de *Vellozia* no tratamento de machucados na pele.

Outras espécies também foram exploradas para compreender seu potencial farmacológico e medicinal, como o extrato hexânico de *Vellozia pusilla*, cuja pesquisa revelou atividade antitumoral durante um ensaio in vitro, inibindo a ação da topoisomerase 1 (Dantas *et al.*, 2005).

A canela-de-ema, nome popular de *Vellozia flavicans*, espécie sinonimizada de *Vellozia squamata*, é a espécie em que foram encontrados mais relatos, tendo sido descrito potencial antiinflamatório, anti-reumático (Souza; Felfili, 2006), auxilia na dor de dente, podendo preparar suas folhas para gargarejos (Oliveira *et al.*, 2011), apresenta atividade antiofídica

(Tribuiani *et al.*, 2014), além de já ter sido realizado o uso de extratos hidroalcoólicos, bem como foi possível detectar a presença de antraquinonas, cumarinas e flavonoides, que possibilitaram a ação emulsificante em cosméticos (Quintão *et al.*, 2013; Wiseva *et al.*, 2021) e até a apresentar atividades inibitórias satisfatórias quando expostas a culturas de promastigotas, apesar de não ter obtido atividade leishmanicida satisfatória (Lima *et al.*, 2015).

Os flavonoides extraídos de *Vellozia kolbekii* apresentaram efeito protetivo ao estresse oxidativo e potencial de inibição à mutagênese em células cancerígenas (Silva *et al.*, 2011). Há também descrição da produção de antocianinas em Velloziaceae, como a petunidina 3 e o 5-diglucosídeo (Santos *et al.*, 2021).

A produção de resina nas plantas de *Vellozia* é objeto de interesse cultural e apresenta uso farmacológico e medicinal: a resina de *Vellozia pyrantha*, que vem sendo utilizada como combustível para lamparinas, é utilizada para tradição religiosa local e também como cola para reparos nas ferramentas de mineradores (Oliveira *et al.*, 2015), além de ter sido descoberto também que há cinco diterpenoides em *V. pyrantha* (Santos *et al.*, 2021),

A deposição de secreção em *Vellozia variabilis* foi descrita por Martins e Paiva (2016), e os autores descrevem haver dois tipos de glândulas de resinas para a espécie, localizadas na lâmina foliar e na porção distal da bainha foliar, o que permite que a secreção seja depositada com abundância nas folhas de *V. variabilis*.

- Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas cujo objeto de estudo são os tecidos vegetais, que são cultivados em meios assépticos, com condições controladas de temperatura e luminosidade, e com meio de cultura adequado para cada espécie, sendo possível realizar diversas técnicas, como a micropropagação via organogênese, direta ou indiretamente (Barrueto-Cid, 2015).

A utilização de reguladores vegetais, substâncias atreladas à modulação do crescimento e desenvolvimento dos explantes cultivados *in vitro*, foi inicialmente testada por Skoog e Tsui (1948), adicionando altas quantidades de adenina e fosfato, proporcionando a produção de raízes e brotos em tecidos não meristemáticos. Os reguladores vegetais podem ser utilizados para diversos fins, mas são principalmente usados para inibição ou promoção do crescimento vegetativo, bem como podem ser empregados para tentar estabelecer a produção de brotos

(Melo, 2002). As auxinas e citocininas são substâncias reguladoras essenciais para a morfogênese e estão intimamente relacionadas com a divisão celular e o crescimento do meristema e, a formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores (Reis *et al.*, 2004).

Dentre as técnicas possíveis de serem realizadas na cultura de tecidos, a micropropagação é a técnica que gera maior interesse, por exemplo, no setor de espécies ornamentais, visto que permite produzir um grande número de mudas em pequeno espaço e em tempo reduzido (Schwertner; Zaffari, 2003). A partir da micropropagação é possível assegurar ao consumidor que as mudas comercializadas estão livres de doenças e que são de qualidade, principalmente com a difusão das biofábricas, que propagam o material adequado e desejado pelo consumidor, dentro de um prazo curto, obtendo plantas idênticas à planta matriz (Dal Vesco; Ribeiro; Guerra, 2007).

A micropropagação pode ocorrer por duas principais vias, sendo elas a via organogênica, promovida através do cultivo de meristemas, ou a via embriogênica, estabelecida com o cultivo de embriões somáticos; ambas as vias de regeneração podem ser obtidas via direta ou indireta, sendo possível aplicar a micropropagação em diversos explantes vegetais, desde que sejam realizadas através de sucessivas etapas, desde o estabelecimento, até que haja multiplicação, enraizamento e aclimatização do material propagado (George *et al.*, 2008).

A organogênese direta ocorre quando há surgimento direto de gemas a partir de tecidos para obtenção dos brotos. Assim, o processo para indução da organogênese inicia-se com a seleção da fonte dos explantes como hipocótilo, gemas dos cotilédones ou mesmo eixo embrionário, a fim de se produzir os brotos, que em seguida, serão enraizados e, por último, aclimatizados (Carvalho *et al.*, 2006). Entretanto, a produtividade do tecido *in vitro* pode ser limitada, devendo-se considerar que haverá maior eficiência quando se utiliza tecidos jovens. Os estresses salino e osmótico são também alguns dos fatores que limitam a produtividade, posto que o estresse é uma condição ambiental que impede a planta de alcançar seu potencial genético pleno (Taiz *et al.*, 2017), e que acarretam a danos metabólicos, toxicidade iônica e estresse oxidativo (Mareri; Parrotta; Cai, 2022).

O estresse vegetal pode produzir o acúmulo de metabólitos secundários, como as antocianinas, um pigmento que protege a planta da luz e apresenta ação antioxidante (Lopes *et al.*, 2007), e a prolina, um aminoácido que confere osmorregulação e osmoproteção ao dano celular causado pelo estresse, atuando na tolerância ao estresse osmótico (Claeys; Inzé, 2013),

além de ser uma molécula sinalizadora e que confere regulação nas reações de redução e oxidação (Szabados; Savouré, 2010), e age como fonte de energia, pois o catabolismo da prolina acarreta na transferência de elétrons, indo assim para a cadeia de elétrons mitocondrial (Sharma; Villamor; Verslues, 2011).

O uso de substâncias como sacarose, cloreto de sódio (NaCl) e polietileno glicol (PEG) tem sido utilizadas em plantas in vitro, visando induzir situações de estresse salino, osmótico e hídrico, viabilizando testar condições estressantes como estímulo à produção de brotos. Em especial, a adição de NaCl ao meio de cultura é considerada um fator de duplo estresse, uma vez que o estresse salino também proporciona estresse osmótico para o tecido cultivado in vitro (Mareri; Parrotta; Cai, 2022). Assim sendo, há casos de sucesso cujo NaCl promoveu brotação in vitro, como no cultivo do kiwi (Sotiropoulos; Dimassi, 2004), apesar de ser necessário investigar sempre se o cultivo apresenta tolerância salina ou quais doses podem promover ou não a multiplicação, como no caso da cultivar Gold de abacaxi, onde a adição de altas concentrações de NaCl, como 100 e 150 mM, ocasionou alterações fisiológicas nos brotos, sendo menores do que os brotos obtidos ao adicionar NaCl e reguladores no meio de cultura (Melo *et al.*, 2011), enquanto o NaCl proporcionou o aumento do tamanho dos brotos e de suas raízes no cultivo in vitro de *Mentha viridis* (Chandra *et al.*, 2020). Estratégias de estresse in vitro vem sendo estudadas em algumas espécies de *Vellozia*, sendo viabilizado através de agentes osmóticos como a sacarose, o PEG e o manitol (Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023), além de ter sido investigado também os efeitos do estresse térmico em explantes de *Vellozia sincorana* e *Vellozia pyrantha* cultivadas in vitro (Borges, 2015; Borges et al., 2020).

O cultivo in vitro para produção de mudas é importante para economia mundial, visto que estima-se haver a movimentação de cerca de 1,5 bilhão de mudas obtidas pelo emprego da técnica (Mastache, 2007), e o comércio de mudas de espécies ornamentais destaca-se como principal aplicação da cultura de tecidos, principalmente em relação à produção de orquídeas (Carvalho; Rodrigues; Santos, 2012). A Bahia é o estado que apresenta maior representação entre os estados nordestinos licenciados para produção de mudas a partir de micropropagação, além de que, os dados exibem que, entre as biofábricas vegetais, a produtividade no estado, as espécies vegetais ligadas à silvicultura representam 46% da produtividade, enquanto espécies ornamentais ocupam o segundo lugar neste ranking (Sales, 2020).

- Gênero *Vellozia* no cultivo in vitro

A aplicação das técnicas da cultura de tecidos no gênero *Vellozia* foi iniciada no Brasil

no final da década de 2000, quando Freitas-Neto *et al.* (2007) realizou a germinação de *Vellozia flavicans*, seguida da realizada a micropropagação de *Vellozia flavicans* (Freitas-Neto, 2009).

O estabelecimento in vitro a partir da germinação das sementes foi relatado para as espécies *Vellozia flavicans* (Freitas-Neto *et al.*, 2007; Freitas-Neto, 2009) *Vellozia sincorana* (Borges, 2015; Borges, 2022), *Vellozia punctulata* (Borges, 2022), *Vellozia seubertiana* (Borges, 2022; Pinto; Lima-Brito, 2023), *Vellozia jolyi* (Borges, 2022), *Vellozia pyrantha* (Borges, 2022) e *Vellozia abietina* (Magalhães *et al.*, 2024).

A multiplicação in vitro foi obtida por meio do uso dos reguladores vegetais citocininas benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (KIN), combinadas ou não com as auxinas ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) nas espécies *Vellozia flavicans* (Freitas-Neto, 2009), *Vellozia sincorana* (Borges, 2015), *Vellozia seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023), *Vellozia squamata* (Calazans Júnior *et al.*, 2022) e *Vellozia pyrantha* (Pinto; Lima-Brito, 2023). Quanto a aplicação de giberelina, esta foi realizada em *Vellozia squamata* (Calazans-Júnior *et al.*, 2022).

Também foi possível obter multiplicação in vitro no gênero *Vellozia* através de mecanismos de estresse como a utilização de chamas e temperaturas elevadas de uma estufa, conforme testado para *Vellozia sincorana* (Borges, 2015), *Vellozia pyrantha*, *Vellozia punctulata*, *Vellozia jolyi* e *Vellozia seubertiana* (Borges, 2022). É válido ressaltar que todos os estudos citados para a etapa de multiplicação in vitro de *Vellozia* spp. abordaram apenas a via organogênica direta.

As etapas de enraizamento in vitro e aclimatização foram pouco exploradas para *Vellozia* spp. O enraizamento in vitro foi relatado na espécie *Vellozia flavicans* (Freitas-Neto, 2009), aplicando dois tratamentos, um deles contendo o enraizante Selagel e o outro através de uma solução homogeneizada da auxina AIB ácido indolbutírico, álcool 92° e talco. Além deste experimento, Pinto e Lima-Brito (2023) foram responsáveis pelo enraizamento in vitro de *Vellozia seubertiana*, tendo sido proposto o uso do carvão ativado e do AIB; o AIB é um regulador vegetal, do tipo auxina, que vem sendo utilizado na cultura de tecidos para promoção de alongamento celular e enraizamento, sendo especialmente recrutada para o enraizamento, pois é considerado um pré-requisito para facilitar o estabelecimento do cultivo no solo (Kaviani, 2015).

Na etapa de aclimatização ex vitro há publicação para três espécies de *Vellozia* sendo duas delas consideradas sinônimas a nível taxonômico, *Vellozia flavicans* e *Vellozia squamata*, para as quais utilizaram solo da região do cerrado como substrato (Calazans Júnior *et al.*, 2022;

Freitas-Neto, 2009), e *Vellozia seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023), que foi aclimatizada em substrato vegetal acrescido de vermiculita ao, em proporções 1:1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão, A. *et al.* Vellozioid roots allow for habitat specialization among rock-and soil-dwelling Velloziaceae in campos rupestres. **Functional Ecology**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 442-457, 14 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.13479>.
- Alcantara, S. *et al.* Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: a comparison between desiccation and non-desiccation-tolerant species of neotropical Velloziaceae (pandanales). **Functional Ecology**, [S.L.], v. 29, n. 12, p. 1499-1512, 27 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.12462>.
- Ayensu, E. S. Biological and Morphological Aspects of the Velloziaceae. **Biotropica**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 135, dez. 1973. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2989806>.
- Barboza, S. B. S. C. *et al.* Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, p. 185-194, 2006.
- Barrueto-Cid, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa, 2015. 337p.
- Borges, B. P. S. **Regeneração in vitro de Vellozia sincorana Ayensu & Smith**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em de Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- Borges, B. P. S. **Traços morfofuncionais, regeneração in vitro e bioquímica de espécies de Vellozia sob distúrbios por seca, alta temperatura e fogo**. 2022. 112 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2022.
- Borges, B. P. S. *et al.* Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (PCTOC)**, [S.L.], v. 143, n. 3, p. 709-713, 17 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-020-01933-z>.
- Borges, B. P. S.; Lima-Brito, A.; Conceição, A. A. Role of water stress as a stimulus for in vitro multiplication and its effects on biochemical response in *Vellozia* species. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 1-9, jun. 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054202347003923>.
- Calazans-Júnior, E. R. *et al.* Leaf anatomy and photosynthetic parameters of *Vellozia squamata* Pohl (Velloziaceae) grown under different light intensities along in vitro cultivation. **Hoehnea**, v. 49, p. 1 - 12, 2022.
- Camargo, A.P. *et al.* Microbiomes of Velloziaceae from phosphorus-impooverished soils of the campos rupestres, a biodiversity hotspot. **Scientific Data** 6, 140 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0141-3>
- Carvalho, J. M. F. C. *et al.* **Fatores inerentes À Micropropagação**. Embrapa Algodão, Campina Grande, v. 148, n. 1, p. 1-28, jun. 2006.

Carvalho, A.C. P. P.; Rodrigues, A. A. J.; Santos, E. O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil (2008-2015)**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, v.1, n. 1, p. 1-37, dez. 2016.

Chandra, V. *et al.* Effect of different concentrations of NaCl on micropropagation of *Mentha viridis*. **Annals of Plant Sciences**, [S.l.], v. 9, n. 11, p. 4059-4066, dec. 2020. ISSN 2287-688X. Available at: <<https://annalsofplantsciences.com/index.php/aps/article/view/741>>.

Claeys, H.; Inzé, D. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. **Plant physiology**, v. 162, n. 4, p. 1768-1779, 2013.

Clarke, P. J. *et al.* Resprouting as a key functional trait: how buds, protection and resources drive persistence after fire. **New phytologist**, v. 197, n. 1, p. 19-35, 2013.

Coelho, N.; Gonçalves, S.; Romano, A. Endemic Plant Species Conservation: biotechnological approaches. **Plants**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 345, 9 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants9030345>.

Colli-Silva, M.; Vasconcelos, T. N.C; Pirani, J. R. Outstanding plant endemism levels strongly support the recognition of campo rupestre provinces in mountaintops of eastern South America. **Journal of Biogeography**, v. 46, n. 8, p. 1723-1733, 2019.

Conceição, A.A. A hot case for conservation: candombá (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal For Nature Conservation**, [S.L.], v. 45, p. 118-121, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnc.2018.08.011>.

Conceição, A.A. *et al.* Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of Chapada Diamantina, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 641-656, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-84042007000400009>.

Conceição, A.A. *et al.* Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. In: FERNANDES, G.W. **Ecology And Conservation Of Mountaintop Grasslands In Brazil**, [S.L.], Springer International Publishing, 2016. p. 105-127 http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29808-5_6.

Conceição, A.A. *et al.* Massive post-fire flowering events in a tropical mountain region of Brazil: high episodic supply of floral resources. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 4, n. 27, p. 847-850, jul. 2013.

Conceição, A.A.; Orr, B. J. Post-fire flowering and fruiting in *Vellozia sincorana*, a caulescent rosette plant endemic to Northeast Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 94-100, mar. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062012000100011>.

Conceição, A.A.; Pirani, J. R. Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: espécies distintas, mas riquezas similares. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 193-206, jan. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860200758114>.

Conceição, A.A.; Pirani, J. R.; Meirelles, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina", Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, p. 641-656, 2007.

Dal Vesco, L. L.; Ribeiro, R. J.; Guerreiro, M. P. Otimização da micropropagação de bromélias ornamentais em sistema biofábrica. **Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-4, jun. 2007.

Dantas, A. L. A. *et al.* In Vitro study of *Vellozia pusilla* ohl (Velloziaceae), a Brazilian plant species: antitumoral activity and labeling of blood elements. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 63-67, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132005000700008>.

El Sherif, F. In vitro NaCl tolerances of *Artemisia dracunculus*. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 549-557, 2012.

Erige, A. C. *et al.* 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação in vitro da amoreira - preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 765- 770, out. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782002000500005>.

Freitas-Neto, O. G. *et al.* Germinação in vitro de sementes de canela-de-ema (*Vellozia squamata* Pohl). **Ornamental Horticulture**, Viçosa, v. 13, n. 1, p. 1533-1533, jun. 2007.

Freitas-Neto, O. G. **Micropropagação e anatomia foliar de Canela-de- Ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f. - Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

Ferreira, M. C. ***Vellozia gigantea* (Velloziaceae) e seus fungos endofíticos: diversidade e bioprospecção de substâncias bioativas**. 2017. 167 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

George, E.F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F. *et al.* **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. Cap. 1. p. 1-503.

Giulietti A.M., Pirani J.R.. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. Vanzolini PE, Heyer WR (eds) **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 39-69. 1988.

Giulietti, A. M. *et al.* Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.

Isah, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, United Kingdom, v. 39, n. 52, p. 1-25, 29 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>.

Joaquim, E. O. **Carboidratos não estruturais e aspectos anatômicos de plantas herbáceas de campos rupestres, com ênfase em Asteraceae**. 2013. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de

São Paulo, Piracicaba, 2013. doi:10.11606/D.11.2013.tde-06092013-102132. Acesso em: 2023-11-27.

José, H. P. **A germinação de espécie de *Vellozia* é afetada pelo fogo do Cerrado?** 2015. 33 f. Monografia (Graduação) - Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

Kaviani, B. Some useful information about micropropagation. **Journal of Ornamental Plants**, v. 5, n. 1, p. 29-40, 2015.

Kubitzki, K. Velloziaceae. In: **Flowering Plants**. Monocotyledons: Lilliana (except Orchidaceae). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 459-467.

Lima, A. P. P. S. *et al.* Ex situ conservation of the endangered “sempre-viva” species *Comanthera mucugensis*. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, [S.L.], v. 44, p. 1-9, 16 mar. 2022. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v44i1.59754>.

Lima, P. C. *et al.* Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do Cerrado. **Revista de Patologia Tropical**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 45-55, 2 abr. 2015. Universidade Federal de Goiás. <http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v44i1.34800>.

Lopes, T. J. *et al.* Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, 2007.

Magalhães, H. S. *et al.* Potencial ornamental, caracterização morfológica e germinação in vitro de *Vellozia abietina*. **Revista Contemporânea**, v. 4, n. 4, p. e3858-e3858, 2024.

Martins, L. C.; Paiva, E. A. S. Flammable resin in *Vellozia variabilis* (Velloziaceae): gland structure and chemical composition. **Flora**, [S.L.], v. 219, p. 94-100, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2016.01.004>.

Mareri, L.; Parrotta, L.; Cai, G. Environmental stress and plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5416, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23105416>

Mastache, L. C. N. Large scale commercial micropropagation in Mexico: the experience of Agromond, S.A. de C.V. *Acta Horticulturae*, Leuven, n. 748, p. 91-94, 2007.

Mayer, J. L. S. *et al.* Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort.(Orchidaceae) cultivadas ex vitro e in vitro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 323-332, 2008.

Melo, N. F. Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. In: SEMINÁRIO CODA DE NUTRIÇÃO VEGETAL, 1., 2002, Petrolina. **Artigo em Anais de Congresso**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2002.p. 37-54. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/196661/1/Hormonios-e-Reguladores-de-Crescimento-Vegetal.pdf>. Acesso em: 05 out. 2023.

Melo, Y. L. *et al.* Indicadores de estresse salino em abacaxizeiro cultivado na ausência e presença de fitorreguladores. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 698-705, 2011.

Mello-Silva, R. Three New Species of *Vellozia* from Pico das Almas, Bahia, Brazil, with an Account of Their Leaf Anatomy. **Kew Bulletin**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 1, 1993. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/4115739>.

Mello-Silva, R. The infra-familial taxonomic circumscription of the Velloziaceae: a historical and critical analysis. **Taxon**, p. 45-51, 1991.

Mello-Silva, R. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Velloziaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 259-262, 2018.

Mello-Silva, R. *et al.* Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 87-102, 1 jan. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr107>.

Morais, T.P. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722012000100016>.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 473-497, jun. 1962.

Neves, S. P. S; Conceição, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 697-707, set. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062010000300013>.

Oliveira, E. O. S. *et al.* Plantas medicinais usadas pela comunidade Kalunga do quilombo do Engenho de Dentro em Cavalcante – GO para tratamento de afecções bucais. **Cereus**, Gurupi, v. 4, n. 1, p. 1-10, jun. 2011.

Oliveira, J. *et al.* In vitro development and acclimatization of *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe, an endemic species of the Chapada Diamantina. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 1-9, nov. 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20210599>.

Oliveira, R.C.S., *et al.* Ethnobotany and Harvesting Impacts on Candombá (*Vellozia aff. sincorana*), A Multiple Use Shrub Species Endemic to Northeast Brazil. **Economic Botany**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 318-329, 16 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12231-015-9324-9>.

Pinto, D. I. J. G. C. **Micropropagação de duas espécies de Velloziaceae da Chapada Diamantina**. 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2021.

Pinto, D. I. J. G. C.; Lima-Brito, A. Micropropagation of *Vellozia seubertiana* (Velloziaceae). **Revista Caatinga**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 271-279, jun. 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252023v36n204rc>.

Quintão, F. J. O. *et al.* Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 101-107, jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2013005000001>.

Rapini, A. *et al.* A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1-2, p. 16-25, dez. 2008.

Reis, C. V. *et al.* Efeitos do tipo de explante e diferentes balanços de auxina e citocinina na regeneração in vitro de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON. **Agronomia**, v. 38, n.1, p. 93-97, 2004.

Sales, E. D. **Cenário das biofábricas de plantas no Nordeste brasileiro**. 29 f. Monografia (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraíba, Areia, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/19163>. Acesso em: 15 fev. 2025.

Santos, I.B.F. *et al.* Cleistanthane diterpenoids from the resin of *Vellozia pyrantha* A.A.Conc and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 94, p. 1-3, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2020.104216>.

Sharma, S.; Villamor, J. G.; Verslues, P. E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant physiology**, v. 157, n. 1, p. 292-304, 2011.

Schwertner, A. B. S.; Zaffari, G. R. Micropropagação de singônio. **Ornamental Horticulture**, v. 9, n. 2, 2003.

Silva, C. G. *et al.* Protective effects of flavonoids and extract from *Vellozia kolbekii* Alves against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in yeast. **Journal Of Natural Medicines**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 367-372, 14 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-011-0585-z>.

Silveira, F.A.O. *et al.* Ecology and evolution of plant diversity in the endangered *campo rupestre*: a neglected conservation priority. **Plant Soil** 403, 129–152 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2637-8>

Skoog, F.; Tsui, C. (1948) Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. **American Journal of Botany**, 35, p. 782–787.

Souza, J. A. *et al.* Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação in vitro de pitangueira. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 38, n. 7, p. 2046-2048, out. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782008000700040>.

Souza, C. D.; Felfili, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 135-142, mar. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062006000100013>.

Sotiropoulos, T.E., Dimassi, K.N. Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of in vitro kiwifruit shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 79, 285–289 (2004). <https://doi-org.ez77.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11240-004-4609-1>

Szabados, L.; Savouré, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009

Szepesi, Á.; Szollosi, R. Mechanism of Proline Biosynthesis and Role of Proline Metabolism Enzymes Under Environmental Stress in Plants. **Plant Metabolites And Regulation Under Environmental Stress**, [S.L.], p. 337-353, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812689-9.00017-0>.

Taiz, L. *et al.* Estresse Abiótico. In: Taiz, Lincoln. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 732-761.

Teodoro, G. S. *et al.* Specialized roots of Velloziaceae weather quartzite rock while mobilizing phosphorus using carboxylates. **Functional Ecology**. 2019; 33: 762–773. <https://doi-org.ez77.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1365-2435.13324>

Tribuiani, N. *et al.* *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complement Altern Med** 14, 48 (2014). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-48>

Vasconcelos, A. G. V. *et al.* Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, p. 837-844, 2012.

Wiseva, K. O., *et al.* (2021). A review on various formulation of nanoemulsions in cosmetics with plant extracts as the active ingredients. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, 13(4), 34–40. <https://doi.org/10.22159/ijap.2021.v13s4.43814>

Zirondi, H. L. *et al.* Heat and smoke affect the germination of flammable resprouters: *Vellozia* species in the Cerrado. **Folia Geobotanica**, v. 54, p. 65-72, 2019.

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO DE *VELLOZIA PYRANTHA* A.A.CONC., UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DA CHAPADA DIAMANTINA¹

¹ Manuscrito submetido para publicação na Revista Caatinga em 31 de outubro de 2024.

INTRODUÇÃO

A Chapada Diamantina, localizada na Cadeia do Espinhaço, é uma área reconhecida como hotspot para a biodiversidade (Pontara *et al.*, 2018), tendo sido registradas 459 espécies endêmicas, distribuídas em 48 famílias botânicas (Gonçalves; Azevedo Gonçalves, 2023).

Velloziaceae é uma das famílias que apresentam espécies endêmicas da Chapada Diamantina como as do gênero *Vellozia*, que se destacam em meio à paisagem por possuírem tolerância à dessecação, podendo ressecar extremamente durante períodos secos e reidratar rapidamente durante os chuvosos (Alcantara *et al.*, 2015; Gaff; Oliver, 2013). Há também espécies de *Vellozia* que apresentam tolerância térmica, como *Vellozia pyrantha* A. A. Conc. (Conceição, 2018).

Conhecida popularmente como “candombá”, a *V. pyrantha* é uma espécie ornamental, endêmica da Chapada Diamantina, que apresenta particularidades em sua morfologia e fisiologia, sendo uma das raras plantas cujo evento de floração é dependente da passagem de chamas naturais, é utilizada historicamente pela comunidade local, usando a planta inteira como tochas, ou sua resina, obtida no caule, como cola para ferramentas (Oliveira *et al.*, 2015; Conceição, 2018). A redução da população natural de candombá não se deve somente ao uso extensivo pela comunidade local, mas também ao crescimento lento das plantas e à ocorrência de incêndios antropogênicos, pois, embora estas plantas apresentam estratégias para lidar com fogo, a intensidade destas chamas é maior do que as chamas naturais, podendo comprometer a habilidade de rebrotar destas plantas (Abrahão *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2016). O Parque Nacional da Chapada Diamantina foi delimitado para manejar e valorizar suas espécies endêmicas, entretanto não estão estabelecidas estratégias de manejo e/ou de propagação para minimizar os impactos que o gênero *Vellozia* tem sofrido historicamente

O cultivo de plantas ornamentais é uma atividade que gera benefícios ao ambiente, devido às interações biológicas que proporcionam, assim como é responsável pela geração de renda aos produtores, sendo um mercado em crescimento no Brasil. A micropropagação é uma das técnicas de cultura de tecidos vegetais empregada para propagação *in vitro* de plantas, otimizando a produção de mudas; necessita de condições adequadas e controladas de assepsia, nutrição, luz e temperatura para obter uma alta quantidade de brotos (Carvalho *et al.*, 2006; Soares; Menezes-Filho; Ventura, 2023), e é caracterizada por sucessivas fases: estabelecimento *in vitro*, multiplicação *in vitro*, enraizamento *in vitro* e aclimatização (George *et al.*, 2008).

Os experimentos *in vitro* com propagação de espécies do gênero *Vellozia* correspondem a aplicação de estresses *in vitro* ou adição de reguladores vegetais ao meio de cultura, tendo

sido aplicado estresse térmico, através de fogo, em *Vellozia pyrantha* (Borges *et al.*, 2020), e estresse hídrico e térmico em *Vellozia jolyi*, *Vellozia sincorana*, *Vellozia punctulata*, *Vellozia pyrantha* e *Vellozia seubertiana* (Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023).

A utilização dos reguladores vegetais, como auxinas e citocininas, foi testada com diferentes espécies de *Vellozia*: *Vellozia flavicans* (Freitas Neto, 2009), *Vellozia sincorana* (Borges, 2015), e *Vellozia seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023). Entretanto, somente há relato na literatura de protocolos completos de micropropagação para duas espécies de *Vellozia*, sendo estas: *Vellozia flavicans* (Freitas Neto, 2009) e *Vellozia seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023).

Para *Vellozia pyrantha*, há apenas dois estudos que viabilizaram a multiplicação *in vitro*, entretanto, ambos obtiveram aproximadamente 2 brotos por explante, utilizando diferentes abordagens de estresse, através da adição de PEG 6000, sacarose e manitol. Considerando o deficit em trabalhos abordando as etapas de enraizamento e aclimatização de plantas de *Vellozia* cultivadas *in vitro*, este trabalho objetivou estabelecer um protocolo para micropropagar *Vellozia pyrantha*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das sementes

As sementes de *Vellozia pyrantha* foram coletadas na Serra do Candombá (12°33'S 041°28'W), no Parque Nacional da Chapada Diamantina, Palmeiras, Bahia. Após a coleta, as sementes foram retiradas das cápsulas e armazenadas em sacos de papel na geladeira com temperatura de 6 a 10°C.

Desinfestação das sementes

As sementes de *Vellozia pyrantha* foram lavadas em água corrente por 5 minutos para retirar sujeiras superficiais. Em seguida, foram levadas para a câmara de fluxo laminar, sendo colocadas submersas em álcool 70% (1 min), e lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio 2,0 - 2,5%, adicionado de uma gota de detergente neutro (15 min). Em sequência, as sementes foram lavadas três vezes, usando água destilada autoclavada.

Estabelecimento in vitro

As sementes de *Vellozia pyrantha* foram inoculadas em 10 ml de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), com um terço das concentrações salinas ($MS \frac{1}{3}$), adicionado de 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Borges, 2022). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem, à 121°C, por 15 minutos. Após 90 dias da germinação, as plântulas obtidas foram utilizadas para a fase de multiplicação in vitro.

Multiplicação in vitro

As microplantas, oriundas de plantas germinadas in vitro, foram selecionadas com ± 1 cm, e o tipo de explante utilizado para a multiplicação foi obtido a partir da remoção das raízes, inoculando-se, em tubos de ensaio, a parte aérea, composta por pseudocaule e folhas. Cada tubo de ensaio continha 15 ml de meio $MS \frac{1}{3}$, suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina – BAP (0,00; 4,44; 8,88; 17,76 µM), compondo um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto por quatro tratamentos, com quatro repetições e cinco amostras por repetição. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem a 121° C, por 15 minutos.

Aos 60 dias da montagem do experimento foram avaliados a sobrevivência dos explantes (%SOB), a porcentagem de explantes com brotos (%ECB), o número de brotos por

explante (NB), e o comprimento dos brotos (CB).

Enraizamento in vitro

Os brotos, obtidos na etapa de multiplicação, não apresentaram tamanhos uniformes, e portanto, foi necessário transferi-los para um meio de cultura básico, ausente de regulador vegetal para haver alongamento dos brotos. Foram selecionados brotos com ± 1 cm, e o tipo de explante utilizado para o enraizamento foi obtido a partir da remoção das raízes, inoculando-se, em tubos de ensaio, a parte aérea, composta por pseudocaule e folhas.

Os brotos obtidos na etapa de multiplicação, medindo aproximadamente 1 cm, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS $\frac{1}{3}$, suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e carvão ativado (0,0 ou 1,0 g L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), seguindo esquema fatorial 2 x 2 composto por dois tipos de meio de cultura (sem carvão e com carvão) e dois tipos de vedação dos tubos de ensaio (filme PVC ou algodão). O algodão utilizado no experimento foi previamente autoclavado. Cada tratamento constou de quatro repetições, com cinco amostras por repetição. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (%SOB), a porcentagem de enraizamento (%ENR), o comprimento da parte aérea (CPA), o comprimento da parte radicular (CPR), o número de raízes (NR), o número de folhas verdes (FV) e o número de folhas senescentes (FS).

Aclimatização

As microplantas, obtidas durante o enraizamento *in vitro*, foram retiradas do tubo e lavadas com água destilada, para eliminar resíduos do meio de cultura. Em sequência, foram transferidas para copos descartáveis (200 ml) contendo vermiculita e substrato vegetal autoclavados (2:1), os quais foram alocados em bandejas com lâmina de água. Em cada copo haviam cinco furos na base para possibilitar a rega. Foi utilizado outro copo transparente como cobertura, permanecendo fechados durante 10 dias. Ao 10º dia, foram feitos furos nos copos superiores, para haver gradual passagem de ar. O sistema permaneceu assim até o 15º dia, quando foram retirados os copos de cobertura. As plantas aclimatizadas permaneceram em casa de vegetação, coberta com 70% de sombreamento, até completar 30 dias (Lima; Lima-Brito; Santana, 2020; Pinto; Lima-Brito, 2023).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), mantendo o que fora delimitado na etapa de enraizamento *in vitro*, visto que essas microplantas foram transferidas para o sistema de aclimatização após sua avaliação. Foi delimitado um esquema fatorial (2 x

2), considerando a interação entre os tipos de meio de cultura (sem carvão e com carvão) e os tipos de vedação (PVC ou algodão). Em cada tratamento constaram quatro repetições, com cinco amostras por repetição.

Com 30 dias de transferência, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (%SOB), a porcentagem de enraizamento (%ENR), o comprimento da parte aérea e da parte radicular (CPA e CPR), o número de raízes (NR), o número de folhas verdes e folhas senescentes (FV e FS), a massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA), a massa fresca e seca da parte radicular (MFPR e MSPR), a porcentagem de plantas com brotos (PCB) e o número de brotos por planta (NB).

Local de realização dos experimentos e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), da Unidade Experimental Horto Florestal (UNEHF), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no município de Feira de Santana, Bahia. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, com radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Análise estatística

Os resultados foram analisados quanto à normalidade, utilizando o Teste de Shapiro-Wilk e não foi encontrada rejeição. Os dados foram analisados considerando o nível de 5% de significância, através da análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Scott Knott, usando o software SISVAR 5.6 (Ferreira, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os explantes de *V. pyrantha* apresentaram alta taxa de sobrevivência durante a multiplicação in vitro, tanto no controle (0 μM) como em todas as concentrações de BAP testadas, com médias variando entre 90 e 100%, sem diferença estatística entre elas.

A utilização do regulador BAP, em todas as concentrações testadas, resultou em médias estatisticamente superiores ao controle (0 μM) quanto à porcentagem de explantes com brotos (%ECB); já em relação ao número médio de brotos por planta (NB), a quantidade produzida ao utilizar as concentrações 8,88 e 17,76 μM foram estatisticamente superiores se comparado à quantidade média obtida no controle (0 μM) e na concentração de 4,44 μM , às quais não diferiram entre si (Figura 1). Estes resultados diferem do observado por Borges (2015), que investigou, para *Vellozia sincorana*, quais concentrações de cinetina (KIN) e benzilaminopurina (BAP) seriam mais indicadas para viabilizar a multiplicação in vitro. A autora realizou experimentos utilizando as concentrações de 0, 2,22 e 4,44 μM de BAP e 0, 2,32 e 4,64 μM de KIN e, dada a observação da porcentagem de explantes que realizou emissão de brotos, as médias obtidas a levaram contraindicar o uso das concentrações e combinações que havia testado para estas citocininas, uma vez que a maior média obtida foi de 0,30 brotos por explante.

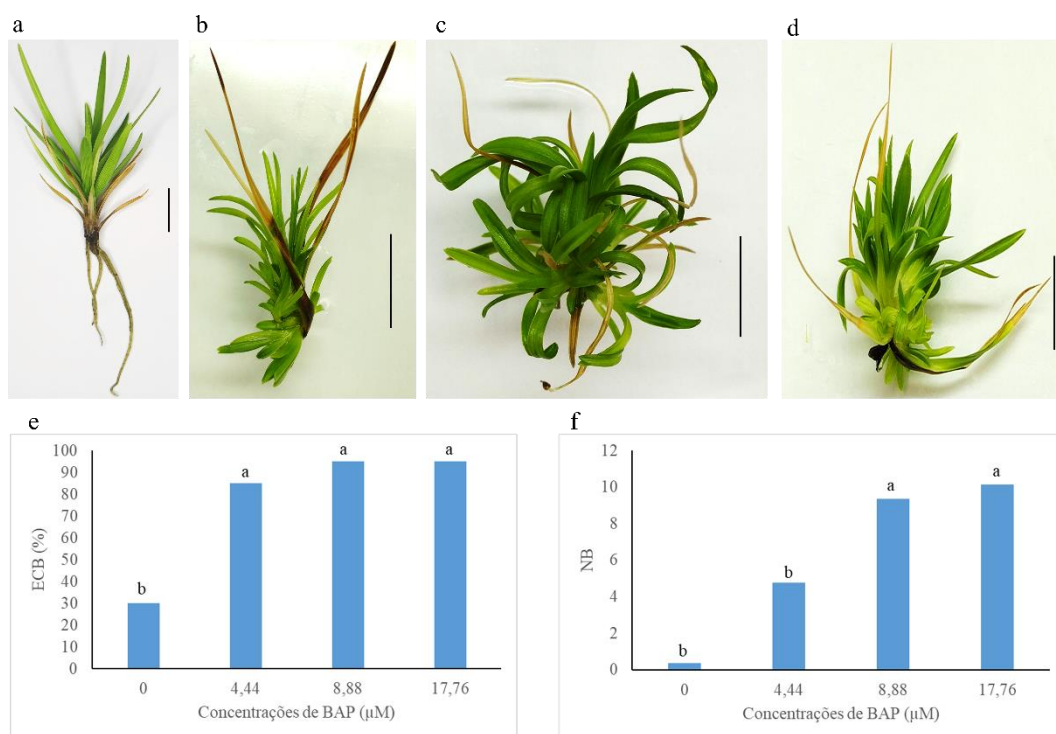


Figura 1. Multiplicação in vitro de *Vellozia pyrantha* em diferentes concentrações de BAP: (a) 0,00 μM ; (b) 4,44 μM ; (c) 8,88 μM ; (d) 17,76 μM após 60 dias de cultivo in vitro; (e) porcentagem de explantes com brotos - ECB e (f) número de brotos - NB. A barra vertical indica 1 cm (a - d).

Até o presente estudo, a multiplicação *in vitro* de *V. pyrantha* havia sido induzida através da aplicação de duas distintas abordagens de estresse: estresse térmico e estresse hídrico (Borges *et al.*, 2020; Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023). No entanto, foram obtidos, em média, menos de dois brotos por explante em ambos os casos. Borges *et al.* (2020) também explicitam que a utilização das chamas durante 8 segundos elevou a mortalidade dos explantes, culminando numa sobrevivência média de 30% das amostras. Frente aos resultados obtidos no presente estudo, a utilização das concentrações de 8,88 e 17,76 μM de BAP se mostraram eficazes para assegurar a responsividade, o maior número de brotos e a alta sobrevivência dos explantes, o que pode permitir a transferência desses explantes para novos ciclos de regeneração em ambiente *in vitro*. Entretanto, as concentrações 8,88 e 17,76 μM obtiveram médias do número de brotos que não são possíveis de serem diferenciadas estatisticamente, e assim, recomenda-se a aplicação de 8,88 μM de BAP para indução da multiplicação *in vitro* de *V. pyrantha*.

O comprimento dos brotos não apresentou médias que permitissem distinguir significativamente os tratamentos, apresentando brotos com tamanho variando entre 0,66 cm, no controle (0 μM), até 1,14 cm, obtido ao utilizar 4,44 μM de BAP. Ao induzir a multiplicação *in vitro* através de explantes, obtidos da parte aérea de *Vellozia seubertiana*, Pinto e Lima-Brito (2023) informam que também não houve diferença significativa, para a mesma variável, entre os tratamentos propostos, constituídos por combinações de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA), reguladores utilizados comumente para indução de multiplicação *in vitro* e para alongamento celular da parte aérea e raízes. Já os resultados obtidos por Borges, Lima Brito e Conceição (2023) ao aplicar estresse hídrico, através da adição ao meio de cultura de sacarose combinada ou não manitol demonstraram diferença significativa para o comprimento dos brotos de *V. pyrantha*, com as maiores médias de 2,13 e 2,14 cm nas concentrações de 75 e 120 g L^{-1} de sacarose, respectivamente.

As condições propostas para o enraizamento *in vitro* de *V. pyrantha*, envolvendo a adição de carvão ao meio de cultura básico e o uso do algodão para vedação do tubo, apresentaram altas taxas para a sobrevivência e para o enraizamento destes brotos, entre 90 a 95% para ambas as variáveis, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos testados (Figura 2).

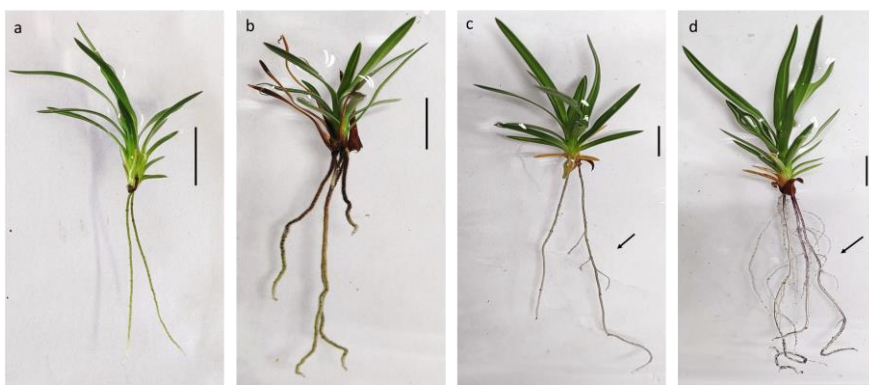


Figura 2. Enraizamento in vitro de *Vellozia pyrantha*: (a) meio sem carvão e vedação com PVC, (b) meio sem carvão e vedação com algodão, (c) meio com carvão e vedação com PVC e (d) meio com carvão e vedação com algodão. Setas pretas indicam raízes secundária. A barra vertical indica 1 cm.

De acordo com a ANOVA, para os parâmetros morfométricos avaliados na etapa do enraizamento in vitro, somente houve efeito significativo ($p < 0,05$) considerando as fontes de variação isoladas. Assim sendo, foi obtida significância para comprimento da parte aérea (CPA) em relação à presença ou ausência de carvão no meio de cultura, e para o número de raízes (NR) em relação ao tipo de vedação. O comprimento da parte radicular (CPR) foi influenciado pelas duas fontes de variação testadas isoladamente.

O meio de cultura com a adição de carvão produziu médias estatisticamente superiores às obtidas em meio sem carvão para os parâmetros CPA e CPR (Figura 3 a, b). O carvão ativado é uma substância que costuma ser aplicada na cultura de tecidos vegetais, especialmente por ter capacidade de adsorção, além de também promover um escurecimento ao meio de cultura, podendo propiciar melhoria no enraizamento in vitro dos brotos previamente multiplicados (Thomas, 2008). O efeito do carvão para promoção do crescimento da parte aérea e da parte radicular também foi registrado como positivo durante o enraizamento in vitro de *Vellozia seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023).

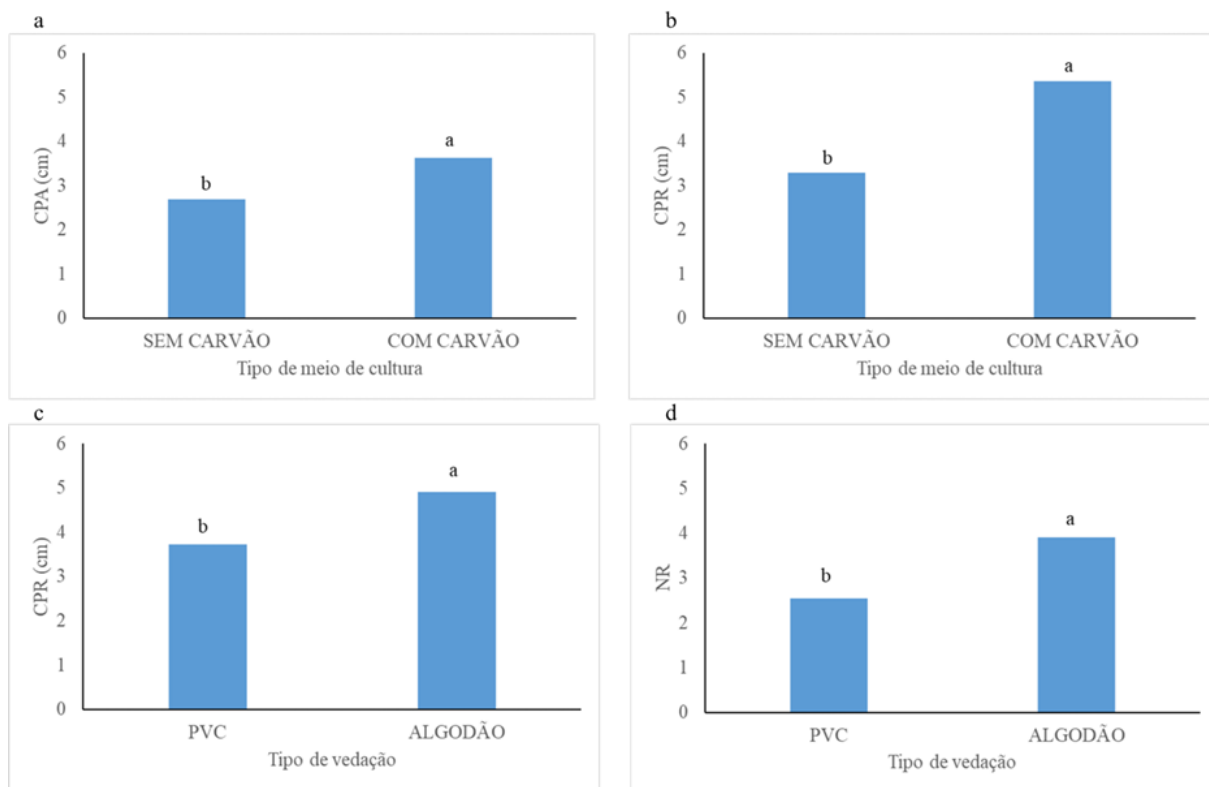


Figura 3. Variáveis morfofisiológicas do enraizamento in vitro de *Vellozia pyrantha* após 60 dias de cultivo in vitro, em resposta ao tipo de meio de cultura e ao tipo de vedação: (a) comprimento da parte aérea - CPA (cm), (b) e c) comprimento da parte radicular - CPR (cm) e (d) número de raízes - NR.

Levando em consideração os tipos de vedação testados, os resultados alcançados, quanto ao CPR e NR foram estatisticamente superiores utilizando o algodão para vedar os tubos (Figura 3 c, d). As raízes obtidas em *V. pyrantha* nos tratamentos que utilizaram o tampão de algodão se assemelham às “vellozioids roots” ou “raízes vellozióides”, termo cunhado para se referir às estratégias que estas raízes apresentam para sobreviver nos solos rasos e nutricionalmente pobres dos campos rupestres, como a capacidade de mobilização de fósforo, através da carboxilação das rochas quartzíticas, possibilitando associar que, durante o cultivo in vitro de *V. pyrantha*, ao possibilitar as trocas gasosas através do algodão, houve um comportamento similar do desenvolvimento de raízes ramificadas, tal qual acontece em seu habitat natural (Teodoro *et al.*, 2019).

É possível aplicar materiais permeáveis na vedação dos recipientes do cultivo in vitro de plantas, uma técnica chamada rustificação, a fim de permitir que a microplanta seja exposta às trocas gasosas, com liberação do etileno e redução de umidade, que ficam retidos ao utilizar PVC ou tampas de plásticas para vedar o ambiente in vitro (Cardoso; Sheng Gerald; Teixeira Da Silva, 2018).

A adição de carvão ativado ao meio de cultura promoveu a emissão de raízes secundárias durante o enraizamento in vitro dos brotos de *V. pyrantha*, e isto ocorreu independentemente

do tipo de vedação que foi associada (Figura 2 c, d). Taiz *et al.* (2017) explicitam a importância da formação das raízes secundárias, uma vez que, a ramificação das raízes aumenta a superfície de contato do sistema radicular, o que otimiza a captação de água e nutrientes para a planta. Possivelmente, ao incrementar o meio de cultura básico com carvão ativado, foi fornecido um microambiente mais propício para o enraizamento e também deve ter havido a adsorção de substâncias tóxicas, que possivelmente estavam difusas no meio.

Em estudo realizado com *Comanthera mucugensis* (Lima *et al.*, 2022) foi demonstrado que, além do carvão ter sido eficaz no enraizamento *in vitro* de suas microplantas, também gerou raízes mais longas do que as raízes obtidas utilizando o regulador ácido indolbutírico (AIB), um tipo de auxina. Ao combinar o carvão com auxina, durante o enraizamento *in vitro* de *V. seubertiana* foi possível observar que o microambiente escuro fornecido pelo carvão atuou favorecendo o enraizamento contrariamente ao uso da auxina (Pinto; Lima-Brito, 2023). Dessa forma o uso do carvão ativado para o enraizamento *in vitro* possibilita uma economia para aplicação da técnica em detrimento ao uso de auxinas, por apresentar menor custo posto que não foi necessário associar auxina na produção das microplantas (Lima; Lima-Brito; Santana, 2024).

Assim como na etapa de enraizamento, não foram observadas interações significativas entre as fontes de variação com os parâmetros morfométricos avaliados nas plantas aclimatizadas, conforme ANOVA ($p < 0,05$). Houve efeito isolado do tipo de vedação para os parâmetros CPR, NR e massas fresca e seca das partes aérea (MFPA e MSPA) e radicular (MFPR e MSPR) e efeito isolado do tipo de meio apenas para o CPA.

As microplantas oriundas do meio com carvão ativado exibiram, após aclimatização, o CPA significativamente superior ao das microplantas que vieram de meio sem uso do carvão (Figura 4a). De modo similar, o crescimento da parte aérea de *Vellozia seubertiana* foi favorecido pelo carvão, indicando que o uso desta substância na etapa de enraizamento é benéfico para o desenvolvimento da parte aérea de espécies do gênero *Vellozia*, assim como beneficia suas plantas após transferência para aclimatização (Pinto; Lima-Brito, 2023).

Semelhante à etapa de enraizamento, na aclimatização, o uso da vedação do tubo com algodão resultou em médias estatisticamente superiores, se comparado às médias obtidas pelas plantas provenientes do enraizamento usando PVC como vedação, para CPR e NR, tal qual ocorreu quanto MFPA, MSPA, MFPR, MSPR (Figuras 4 b, c).

Assim como observado no enraizamento, o desenvolvimento da parte aérea e radicular das plantas aclimatizadas de *V. pyrantha* foi favorecido pela rustificação em tubos vedados com algodão. Ao avaliar as plantas aos 30 dias da transferência para o ambiente *ex vitro*, notou-se

que, as massas frescas e secas tanto da parte aérea como do sistema radicular resultaram em valores estatisticamente superiores ao que se obteve com as plantas advindas do enraizamento com a vedação de pvc (Figuras 4 d, e). Em microplantas de caroá pré-aclimatizadas, cultivadas utilizando tampão de algodão para vedar os tubos, houve aumento de quase 40% no comprimento da parte aérea de suas microplantas (Silveira *et al.*, 2013), ratificando haver benefício com a ventilação do microhabitat in vitro, para o crescimento e desenvolvimento de algumas espécies cultivadas in vitro.

O ambiente in vitro limita a deposição de cutícula nas folhas, e apresenta taxas de transpiração menores do que é obtido por plantas expostas ao ambiente externo, conforme observado em *Vellozia squamata*, cultivada in vitro, ex situ e em casa de vegetação (Calazans Junior *et al.*, 2022). Em Velloziaceae foi descrita a existência de traqueídes de transfusão em suas folhas e caules, sendo que os traqueídes são elementos de vaso relacionados a estrutura e resistência à cavitação e à seca (Cattai, 2007; Mello-Silva *et al.*, 2011). Assim, além da presença dos traqueídes em Velloziaceae, a ventilação promovida através do tampão de algodão, possivelmente surtiu efeito positivo no aumento do comprimento das plantas por facilitar as trocas gasosas das microplantas de *V. pyrantha* e no desenvolvimento do espessamento de sua cutícula, evitando perda de água para o ambiente.

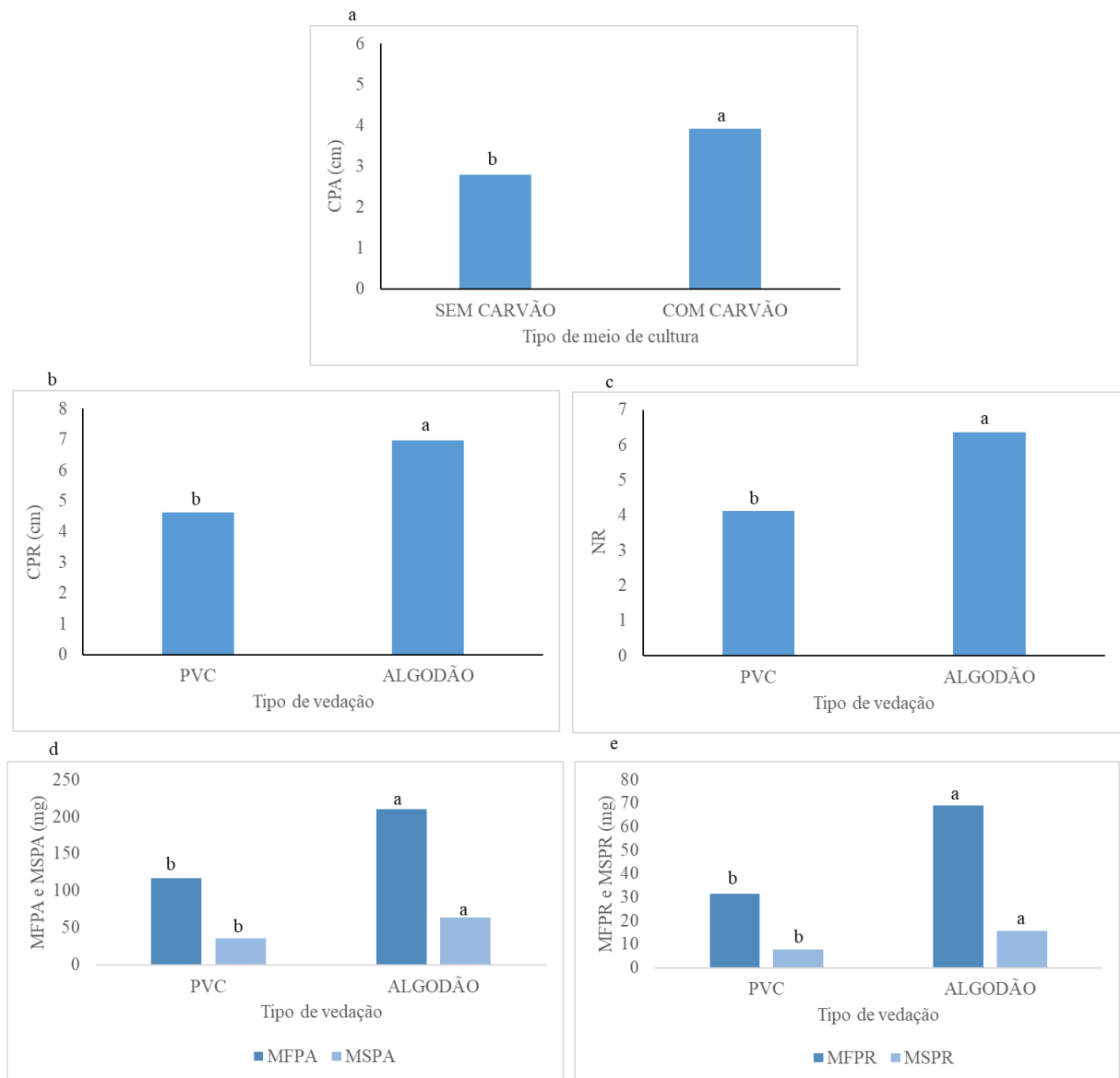


Figura 4. Variáveis morfofisiológicas das microplantas aclimatizadas de *Vellozia pyrantha* após 30 dias da transferência para ambiente *ex vitro*, em resposta ao tipo de meio de cultura e ao tipo de vedação: (a) comprimento da parte aérea - CPA (cm), (b) comprimento da parte radicular – CPR (cm), (c) número de raízes - NR, (d) massa fresca da parte aérea e da parte radicular - MFPA e MFPR (mg), (e) massa seca da parte aérea e da parte radicular - MSPA e MSPR (mg).

A sobrevivência dos explantes de *V. pyrantha*, durante a aclimatização, resultou em médias que indicam alta taxa de sobrevivência, entre 80 e 95%. Entretanto, não houve diferença significativa que permitisse distinguir o efeito entre os tratamentos propostos. Ao aclimatizar microplantas de *V. seubertiana*, Pinto e Lima-Brito (2023) relataram uma taxa média de sobrevivência variaram entre 50 a 75%, mesmo adicionando ácido indolbutírico e carvão antes de transferir para o ambiente *ex situ*; enquanto que na aclimatização de *V. flavicans*, feita em ambiente de viveiro, todas as microplantas sobreviveram à transferência para ambiente *ex situ*, utilizando a vermiculita misturada ao substrato para melhorar a expansão radicular (Freitas Neto, 2009). É necessário testar, na pré-aclimatização, substâncias ou condições ambientais que

possam favorecer a sobrevivência de microplantas após serem transferidas para fora do tubo, uma vez que cada espécie apresenta particularidades que podem, ou não, otimizar o seu cultivo.

Deste modo, a aclimatização de *V. pyrantha* apresentou taxas de sobrevivência satisfatórias, e suas microplantas que foram cultivadas in vitro em meio com carvão e tubos com tampão de algodão se desenvolveram raízes secundárias, mais espessas se comparadas às obtidas em microplantas oriundas do tamponamento com PVC (Figura 5). Freitas Neto (2009) e Calazans Júnior *et al.* (2022) indicam que, durante a aclimatização de *V. flavicans* e *V. squamata* haveria uma “imaturidade no aparato fotossintético”, se comparadas às condições fotossintéticas das plantas cultivadas in vivo, devido a disfuncionalidade dos estômatos, mas quando aclimatizadas são adquiridas modificações anatômicas que permitem vantagens para adaptação ao ambiente ex vitro em relação aos estresses hídricos, visto que haveria melhorias na taxa de transpiração foliar. Ao aclimatizar *V. pyrantha*, as altas taxas de sobrevivência indicam que, ao haver a transferência das microplantas do ambiente in vitro para o ex vitro, provavelmente houveram adaptações anatômicas e funcionais, possivelmente ligadas à plasticidade fenotípica desta espécie.

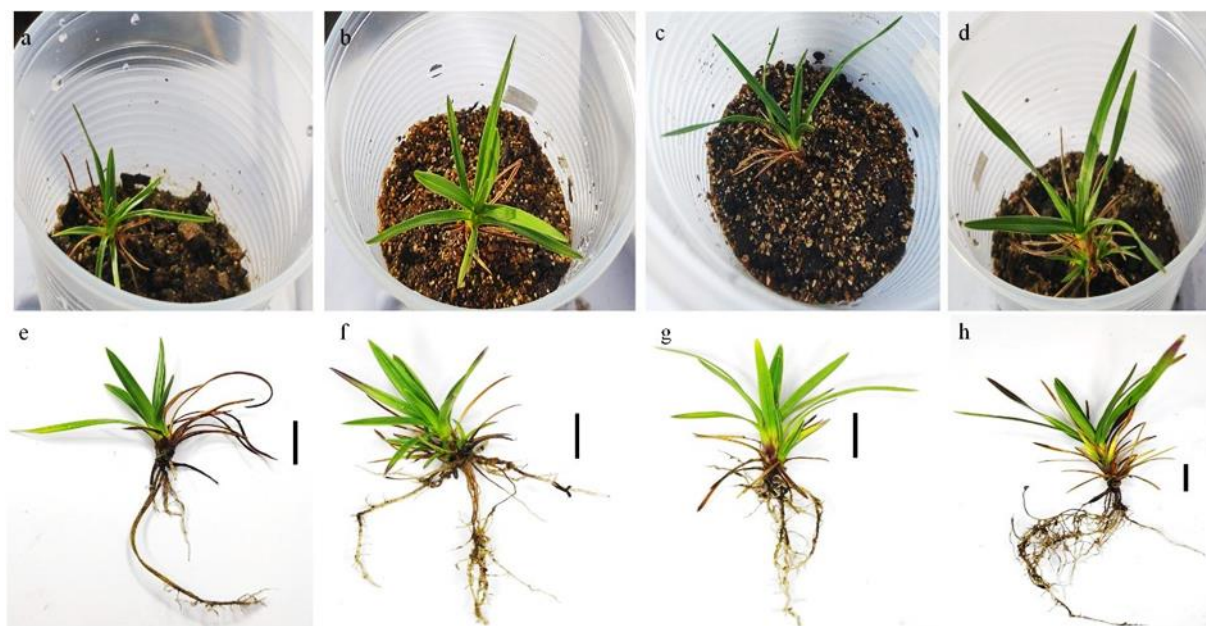


Figura 5. Aclimatização de *Vellozia pyrantha*, oriundas dos tratamentos da etapa do enraizamento: (a, e) sem carvão com vedação de PVC, (b, f) sem carvão com vedação de algodão, (c, g) com carvão e vedação de PVC, (d, h) com carvão e vedação de algodão. A barra indica 1 cm.

A obtenção das mudas micropropagadas de *V. pyrantha* ocorreu no período de 240 dias de cultivo, tendo sido promovidas desde o estabelecimento, através de sementes, utilizando a via de organogênese direta, até a aclimatização ex situ da espécie em casa de vegetação (Figura 6). O período para obtenção destas mudas micropropagadas se assemelha ao que foi alcançado por Pinto e Lima-Brito (2023) para *V. seubertiana*, diferindo por percorrer mais 10 dias para

concluir as etapas.



Figura 6. Micropropagação de *Vellozia pyrantha* e suas sucessivas etapas: (a-b) estabelecimento através de germinação in vitro, (c-d) multiplicação in vitro, utilizando $8,88 \mu\text{M}$ de BAP, (e) enraizamento in vitro. Sequência feita durante a aclimatização: (f) 10 primeiros dias com copo superior fechado, (g) furo no copo superior, feito no 10º dia, (h) remoção do copo superior, no 15º dia. A barra vertical indica 2 cm (a); 1cm (c-h).

CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo que estabelece um protocolo de micropropagação de *Vellozia pyrantha* e comprova a eficiência da técnica para a produção de microplantas da espécie, tendo sido necessário 240 dias para obtenção das mesmas, inicialmente estabelecidas através de sementes. A utilização do meio de cultura MS $\frac{1}{3}$, adicionado de 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 8,88 μ M da citocinina BAP promove eficaz regeneração in vitro de brotos em *V. pyrantha*. O enraizamento in vitro dos brotos deve ser realizado em meio MS $\frac{1}{3}$, na presença de carvão ativado, e vedação de algodão. As microplantas de *V. pyrantha* apresentam altas porcentagem de sobrevivência, após aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão, A. *et al.* Vellozioid roots allow for habitat specialization among rock-and soil-dwelling Velloziaceae in campos rupestres. **Functional Ecology**, v. 34, n. 2, p. 442-457, 2020.
- Alcantara, S. *et al.* Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: a comparison between desiccation-and non-desiccation-tolerant species of Neotropical Velloziaceae (Pandanales). **Functional ecology**, v. 29, n. 12, p. 1499-1512, 2015.
- Borges, B. P. S. **Regeneração in vitro de Vellozia sincorana Ayensu & Smith**. 70 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- Borges, B. P. S. **Traços morfofuncionais, regeneração in vitro e bioquímica de espécies de Vellozia sob distúrbios por seca, alta temperatura e fogo**. 2022. 112 f. Tese (Doutorado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2022.
- Borges, B. P. S. *et al.* Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, [S.L.], v. 143, n. 3, p. 709-713, 17 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
- Borges, B. P. S.; Lima-Brito, A.; Conceição, A.A. Role of water stress as a stimulus for in vitro multiplication and its effects on biochemical response in *Vellozia* species. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 1-9, 2023. FapUNIFESP (SciELO).
- Calazans Júnior, E. R. *et al.* Leaf anatomy and photosynthetic parameters of *Vellozia squamata* Pohl (Velloziaceae) grown under different light intensities along *in vitro* cultivation. **Hoehnea**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1-12, 2022. FapUNIFESP (SciELO).
- Cardoso, J.C., Sheng Gerald, L.T., Teixeira Da Silva, J.A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) **Plant Cell Culture Protocols**. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York, NY.
- Carvalho, J.M.C. *et al.* Considerações gerais sobre organogênese. 1º Edição. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, 2006. p. 27 (Embrapa Algodão. Documentos, 150).
- Cattai, M. B. **Anatomia em Velloziaceae: caracteres, evolução e filogenia**. 2007. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- Conceição, A.A. A hot case for conservation: candombá (*Vellozia pyrantha*), a flammable plant endemic to a national park is used to make a fire and threatened by fire suppression policy. **Journal For Nature Conservation**, [S.L.], v. 45, p. 118-121, set. 2018. Elsevier BV.
- Freitas Neto, O. G. **Micropropagação e anatomia foliar de Canela-de-Ema (Vellozia flavicans Mart. ex Schult f. - Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- Ferreira, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823.

Gaff, D. F.; Oliver, M. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 4, p. 315-328, 2013.

George, E. F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, Edwin F. *et al.* **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. Cap. 1. p. 1-503.

Gonçalves, C.N.; Azevedo Gonçalves, C.F. A Preliminary checklist of vascular plants endemic to the Chapada Diamantina, Bahia, Brazil, with comments on their extinction threats status. **Biodiversidade Brasileira**, v. 13, n. 4, 2023.

Lima, A. P. P. S.; Lima-Brito, A.; Santana, J. R.F. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 1-6, dez. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180922>.

Lima, A. P. P. S. *et al.* Ex situ conservation of the endangered “sempre-viva” species *Comanthera mucugensis*. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, v. 44, n. 1, p. 1-9, mar. 2022.

Lima, A.P.P.S.; Lima-brito, A.; Santana, J.R.F. Seedling production of bromeliad endemic to the semiarid region of Bahia, Brazil. **Rodriguésia**, v. 75, p. e01942023, 2024.

Mello-Silva, R. *et al.* Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology, **Annals of Botany**, v. 108, p.87-102, 2011.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, [s. l], v. 15, n. 1, p. 473-497, jun. 1962.

Oliveira, R.C. *et al.* Ethnobotany and Harvesting Impacts on Candombá (*Vellozia* aff. *sincorana*), A Multiple Use Shrub Species Endemic to Northeast Brazil. **Economic Botany**, v. 69, n. 4, 2015.

Oliveira, R.S. *et al.* Ecophysiology of campos rupestres plants. Ecology and conservation of mountaintop grasslands in Brazil. In: FERNANDES, G. W. **Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil**. S.L: Springer International Publishing Switzerland, 2016. p. 227-272.

Pinto, D. I. J. G. C.; Lima-Brito, A. Micropropagation of *Vellozia seubertiana* (Velloziaceae). **Revista Caatinga**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 271-279, jun. 2023. FapUNIFESP (SciELO).

Pontara, V. B. *et al.* Evolutionary history of campo rupestre: an approach for conservation of woody plant communities. **Biodiversity and Conservation**, v. 27, p. 2877–2896 (2018).

Silveira, D. G. *et al.* Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização in vitro e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 544-553, 2013. FapUNIFESP (SciELO).

Soares, I.A.; Menezes-Filho A.C.P.; Ventura, M.V.A. Biofábricas no cenário atual agrícola brasileiro: revisão. **Brazilian Journal of Science**. v. 2, n.1, p. 16-33, 2023.

Teodoro, G. S. *et al.* Specialized roots of Velloziaceae weather quartzite rock while mobilizing

phosphorus using carboxylates. **Functional Ecology**, v. 33, n. 5, p. 762-773, 2019.

Thomas, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 618-631, nov. 2008. Elsevier BV.

Velloziaceae *in* Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB605082>>. Acesso em: 21 out. 2024.

CAPÍTULO 2

CITOCININA E ESTRESSE SALINO COMO MODULADORES DO CULTIVO IN VITRO DE *VELLOZIA PUNCTULATA* SEUB.

INTRODUÇÃO

Vellozia Vand. é um gênero, pertencente à família Velloziaceae, que contém espécies ornamentais resistentes a condições ambientais de seca, habitando solos rasos e pobres em fósforo, e com ocorrência na Cadeia do Espinhaço (Rapini *et al.*, 2008; Camargo *et al.*, 2019).

Estas espécies apresentam características anatômicas relevantes que permitem compreender como ocorre sua resistência ao déficit hídrico, como a presença de um caudex fibroso, cutícula fina ao redor da epiderme, e mais espessa ao redor dos estômatos (Ayensu; Smith, 1976). Além disto, a presença de traqueídes no caule, atuando como uma região de constrição hídrica, e o velame que recobre as raízes também são outras alterações morfológicas que permitem a tolerância e permanência de Velloziaceae nos campos rupestres (Cattai, 2007; Oliveira *et al.*, 2016).

O potencial de tolerância da espécie pode ser elucidado pela indução do estresse abiótico in vitro o qual pode ser utilizado como técnica para a regeneração de brotos in vitro. Estresses osmóticos, viabilizados com a utilização de manitol, sorbitol, sacarose e PEG, foram utilizados em espécies de *Vellozia*, endêmicas da Cadeia do Espinhaço, exibindo o potencial de tolerância que o grupo tem frente a condições abióticas adversas, havendo, inclusive, rebrotamento com o uso da sacarose em *Vellozia pyrantha*, como exemplo (Borges, 2022; Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023). Explantes in vitro de *Vellozia pyrantha* também mostraram tolerância ao fogo, mesma situação que é observada em seu habitat, obtendo em laboratório menos do que dois brotos por explante (Borges *et al.*, 2020).

A quantificação de conteúdo de prolina em situações de estresse in vitro é comumente realizada, visando compreender quais os limites da relação proporcional entre o aumento da prolina e a tolerância ao estresse (Alvarenga *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2019; Martínéz-Santos *et al.*, 2021; Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023). A prolina é um aminoácido presente na parede celular dos tecidos vegetais e, que se acumula quando há situações de estresse no meio como a redução do potencial hídrico da célula, o que resulta no acúmulo de água, tendo assim uma função osmoprotetora, e também protege a planta dos subprodutos tóxicos formados no momento de déficit hídrico, além de servir como fonte de carbono e nitrogênio, sendo associado ao mecanismo de rebrota (Oh *et al.*, 2017; Taiz *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos que relatam a multiplicação in vitro de espécie do gênero *Vellozia* abordam a utilização de reguladores vegetais, como benzilaminopurina e cinetina, que

pertencem ao grupo das citocininas (Freitas-Neto, 2009; Borges, 2015; Pinto, 2021; Pinto; Lima-Brito, 2023; Borges; Lima-Brito; Conceição, 2023). As citocininas são uma classe de hormônios vegetais responsáveis pela promoção da divisão celular, sendo aplicado na cultura de tecidos para indução da regeneração de brotos (Kerbaudy, 2004; Barrueto-Cid, 2015).

Baseado nos conhecimentos acumulados sobre o cultivo in vitro de *Vellozia punctulata*, obtido ao induzir estresse hídrico na espécie, Borges, Lima-Brito e Conceição (2023) explicitam que a espécie tem potencial para micropropagar facilmente. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito do estresse abiótico na multiplicação in vitro, bem como estabelecer protocolos de enraizamento e aclimatização de *Vellozia punctulata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das sementes

As sementes de *Vellozia punctulata* foram coletadas na Serra do Candombá (12°59'S 041°20'W), no Parque Municipal de Mucugê, Mucugê, Bahia. Após a coleta, as sementes foram retiradas das cápsulas e armazenadas em sacos de papel na geladeira com temperatura de 6 a 10°C.

Desinfestação das sementes

As sementes de *Vellozia punctulata* foram lavadas em água corrente por 5 minutos para retirar sujeiras superficiais. Em seguida, foram levadas para a câmara de fluxo laminar, sendo colocadas submersas em álcool 70% (1 min), e lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio 2,0 - 2,5%, adicionado de uma gota de detergente neutro (15 min). Em sequência, as sementes foram lavadas três vezes, usando água destilada autoclavada.

Estabelecimento in vitro

As sementes foram inoculadas em 10 ml de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), com um terço das concentrações salinas (MS $\frac{1}{3}$), adicionado de 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Borges, 2022). O pH do meio foi ajustado para 5,7 $\pm$ 0,1, antes de ser autoclavado à 121°C, por 15 minutos. Após 90 dias da germinação, as plântulas obtidas foram utilizadas para a fase de multiplicação *in vitro*.

Multiplicação in vitro

Experimento 1: Multiplicação in vitro em diferentes concentrações de NaCl

As microplantas, oriundas de plantas germinadas *in vitro*, foram selecionadas com $\pm$ 1 cm, e o tipo de explante utilizado para a multiplicação foi obtido a partir da remoção das raízes, inoculando-se, em tubos de ensaio, a parte aérea, composta por pseudocaule e folhas. Cada tubo de ensaio continha 15 ml de meio MS $\frac{1}{3}$ suplementado com 15g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (0; 10, 20, 40 e 80 mM).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos composto por 15 repetições, contendo 1 amostra em cada repetição.

Avaliação morfofisiológica do estresse salino (NaCl)

Após 90 dias de cultivo in vitro foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência do explante (SOB), número de folhas verdes e senescentes (FV e FS), comprimento da parte aérea e da parte radicular (CPA e CPR), número de raízes (NR), massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA) e da parte radicular (MFPR e MSPR).

Também foi mensurado a porcentagem de explantes com brotos (ECB), número de brotos por explante (NB), massa fresca e seca dos brotos (MFB e MSB).

Avaliação bioquímica do estresse salino

As microplantas, oriundas de plantas germinadas in vitro, foram selecionadas com ± 1 cm, e o tipo de explante utilizado para a multiplicação foi obtido a partir da remoção das raízes, inoculando-se, em tubos de ensaio, a parte aérea, composta por pseudocaule e folhas. Cada tubo de ensaio continha 15 ml de meio MS $\frac{1}{3}$ para *V. punctulata*; foram suplementados com 15 g L^{-1} de sacarose, 7 g L^{-1} de ágar e diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (0 e 40 mM), visando estabelecer um comparativo entre o controle e um dos tratamentos que obteve média estatisticamente superior do número de brotos. Foram definidos cinco intervalos, de acordo com os dias desde a inoculação do material, para realizar o preparo das amostras (dia 3 - dia 6 - dia 12 - dia 24 - dia 30).

Foi realizada a quantificação de prolina livre (mmol g^{-1}), $\lambda = 520\text{ nm}$, conforme a metodologia de Bates (1973), utilizando 150 mg da massa fresca das folhas, que foram homogeneizadas com 3 ml de ácido sulfossalicílico (3%), e em seguida centrifugados a 12000 rpm, por 12 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e utilizado para a análise em espectrofotômetro.

Houve preparo de curva de calibração do espectrofotômetro antes de realizar as leituras, utilizando diluições seriadas da solução estoque de prolina (μg) para obtenção da curva. Após esta etapa, houve preparo de uma amostra, referente ao dia 30, concentração de 40 mM, para observar se a amostra excederia os valores da curva. Após esta checagem, houve preparo das amostras para a análise, sendo pipetados, em tubo de ensaio, 0,25 ml da amostra, junto a 2 ml de ninhidrina e 2 ml de ácido acético. As amostras foram levadas para banho-maria por uma 1 hora e, após resfriar a vidraria, foram adicionados 4 ml de tolueno, recolocadas as tampas nos tubos, agitando-os, para realizar a extração do cromatóforo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), seguindo esquema fatorial duplo (2×5) composto pela concentração do NaCl (0 e 40 mM) e os dias de cultivo in vitro (3, 6, 12, 24 e 30).

Experimento 2: Multiplicação in vitro utilizando BAP

As microplantas, oriundas de plantas germinadas in vitro, foram selecionadas com ± 1 cm, e o tipo de explante utilizado para a multiplicação foi obtido a partir da remoção das raízes, inoculando-se, em tubos de ensaio, a parte aérea, composta por pseudocaule e folhas. Cada tubo de ensaio continha 15 ml de meio MS $\frac{1}{3}$, suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e, diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (0,00 – 4,44 – 8,88 – 13,32 – 17,76 μ M), compondo um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto por cinco tratamentos, com quatro repetições e cinco amostras por repetição. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes de ser autoclavado à 121° C, por 15 minutos.

Com 60 dias de experimento, foram avaliados a sobrevivência dos explantes (SOB), o comprimento da parte aérea e da parte radicular dos explantes (CPA e CPR), número de raízes dos explantes (NR), folhas verdes e senescentes dos explantes (FV e FS), a porcentagem de explantes com brotos (EB), número de brotos por explante (NB), e porcentagem de explantes com calos (EC).

Enraizamento in vitro

Os brotos, obtidos na etapa de multiplicação, não apresentaram tamanhos uniformes, e portanto, foi necessário transferi-los para um meio de cultura básico, ausente de regulador vegetal, período em que houve alongamento dos brotos. Foram selecionados brotos medindo aproximadamente 1 cm, sendo transferidos para tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS $\frac{1}{3}$, suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e carvão ativado (0,0 ou 1,0 g L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), seguindo esquema fatorial (2 x 2) composto por dois tipos de meio de cultura (sem carvão e com carvão) e dois tipos de vedação dos tubos de ensaio (filme PVC ou algodão). Em cada tratamento constam quatro repetições, com cinco amostras por repetição. Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (SOB), porcentagem de enraizamento (ENR), comprimento da parte aérea e parte radicular (CPA e CPR), número de raízes (NR).

Aclimatização

As microplantas enraizadas de *Vellozia punctulata* foram retiradas do tubo e lavadas com água destilada, para retirar resíduos do meio de cultura. Em sequência, foram transferidas

para copos descartáveis (200 ml) contendo substrato vegetal autoclavado, os quais foram alocados em bandejas com lâmina de água. Em cada copo haviam cinco furos na base para possibilitar a rega. Foi utilizado outro copo transparente como cobertura, permanecendo fechados durante 10 dias. Ao 10º dia, foram feitos furos nos copos superiores, para haver gradual passagem de ar. O sistema permaneceu assim até o 15º dia, quando foram retirados os copos de cobertura. As plantas aclimatizadas permaneceram em casa de vegetação, coberta com 70% de sombreado, até completar 30 dias (Lima; Lima-Brito; Santana, 2020; Pinto; Lima-Brito, 2023).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), mantendo o que fora delimitado na etapa de enraizamento *in vitro*, visto que essas microplantas enraizadas foram transferidas para o sistema de aclimatização após sua avaliação. Foi delimitado um esquema fatorial (2 x 2), considerando a interação entre os tipos de meio de cultura (sem carvão e com carvão) e os tipos de vedação, que haviam sido utilizados nos tubos de ensaio (PVC ou algodão). O algodão utilizado no experimento foi previamente autoclavado. Em cada tratamento constaram quatro repetições, com cinco amostras por repetição.

Com 30 dias de transferência, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (SOB), comprimento da parte aérea e da parte radicular (CPA e CPR), número de raízes (NR), número de folhas verdes e folhas senescentes (FV e FS), massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA), massa fresca e seca da parte radicular (MFPR e MSPR).

Local de realização dos experimentos e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), da Unidade Experimental Horto Florestal (UNEHF), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no município de Feira de Santana, Bahia. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, com radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Análise estatística

Os dados foram analisados considerando o nível de 5% de significância, através da análise de variância (ANOVA), tendo sido aplicados o teste de Scott Knott, e a análise de regressão, utilizando o software SISVAR 5.6 (Ferreira, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência dos explantes (SOB), o número de raízes (NR) e as massas fresca e seca da parte radicular (MFPR e MSPR) não apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,05$) em relação aos tratamentos aplicados (Apêndice 4; Tabela 1). A sobrevivência dos explantes, induzidos à multiplicação in vitro através do cloreto de sódio (NaCl), apresentou médias entre 60 e 86,66%, o que comprova a tolerância da espécie ao estresse salino (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis morfofisiológicas avaliadas nos explantes de *Vellozia punctulata* induzidos à multiplicação in vitro em diferentes concentrações de NaCl (mM), após 60 dias de cultivo in vitro: sobrevivência dos explantes - SOB (%), número de raízes - NR, massa fresca e massa seca da parte radicular - MFPR e MSPR (mg).

NaCl (mM)	SOB	NR	MFPR	MSPR
0	86,66 a	5,26 a	57,53 a	10,46 a
10	86,66 a	7,26 a	60,86 a	11,73 a
20	73,33 a	5,93 a	59,40 a	8,60 a
40	73,33 a	5,73 a	99,66 a	18,00 a
80	60,00 a	3,86 a	32,46 a	9,73 a

* Letras iguais nas colunas não diferem entre si no teste de ScottKnott, a 5% de probabilidade.

De acordo com a análise de variância houve efeito significativo ($p \geq 0,05$) dos tratamentos para as variáveis folhas verdes e senescentes (FV e FS), comprimento da parte aérea e das raízes (CPA e CPR), e massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA) de *V. punctulata* exposta ao estresse salino promovido pelo NaCl (Apêndice 4).

As médias obtidas para o FV se adequaram à regressão linear decrescente (R^2 86,99%), obtendo maior média no controle (0 μ M) (Figura 1a) e reduzindo em resposta ao aumento da concentração salina, demonstrando que o decréscimo do FV em *V. punctulata* à medida que houve acréscimo nas concentrações de NaCl, limitaram significativamente o seu desenvolvimento in vitro. Resultados similares foram obtidos na multiplicação in vitro da cultivar MD Gold de abacaxi, em que a utilização de NaCl reduziu o número de folhas “vivas”, sendo então considerado que o NaCl afetou o desenvolvimento das plantas do abacaxizeiro (Melo *et al.*, 2011). Borges, Lima-Brito e Conceição (2023) submeteram explantes de cinco espécies de *Vellozia* a diferentes substâncias osmóticas, sendo elas sacarose, manitol e PEG 6000, para promoção de multiplicação in vitro através do estresse hídrico. Segundo a autora, ao

quantificar o número de folhas de *Vellozia pyrantha*, as maiores médias foram obtidas ao utilizar duas concentrações de sacarose (75 e 120 g L⁻¹) e uma combinação de sacarose e manitol (120 g L⁻¹ e 15,6 g L⁻¹), enquanto *Vellozia punctulata* não obteve diferença no número de folhas quantificadas nos tratamentos que dispunham diferentes concentrações de sacarose e a combinação de sacarose e manitol. Estas diferentes respostas fisiológicas obtidas frente aos distintos mecanismos de indução do estresse indicam a necessidade de seguir estudando as respostas das plantas do gênero *Vellozia*, posto que, entre as espécies já estudadas há uma ampla gama de respostas fisiológicas, tal qual é possível observar quanto ao número de folhas, uma variável que indica o nível de desenvolvimento do explante frente a condição de estresse induzida.

O FS apresentou médias estatisticamente superiores para os tratamentos com 0, 10 e 20 mM de NaCl nos explantes (Figura 1b). Resultados divergentes foram obtidos na multiplicação in vitro de *Comanthera mucugensis* por Bastos (2021), em que os explantes expostos a partir da concentração de 20 mM de NaCl, tiveram alteração morfofisiológica, com suas folhas apresentando o estado de senescência.

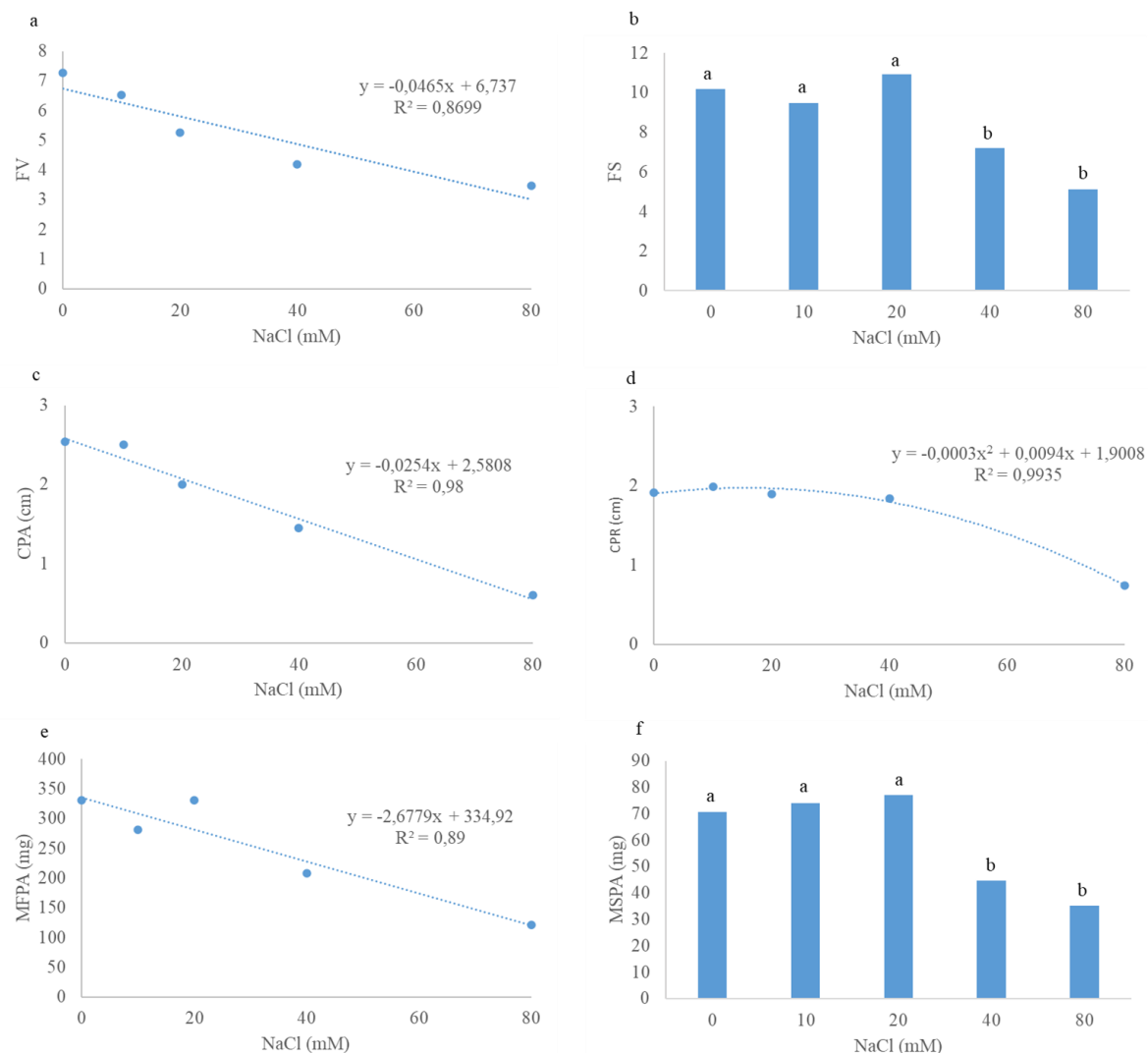


Figura 1. Variáveis morfofisiológicas de *Vellozia punctulata* cultivada in vitro em diferentes concentrações de NaCl: (a) folhas verdes – FV; (b) folhas senescentes - FS; (c) comprimento da parte aérea – CPA; (d) comprimento da parte radicular – CPR; (e) massa fresca da parte aérea - MFPA e (f) massa seca da parte aérea – MSPA.

Na indução da multiplicação in vitro de *V. punctulata*, viabilizada através do estresse salino, as médias obtidas para o CPA se adequaram ao modelo de regressão linear decrescente (R^2 98%), sendo então possível observar que o aumento das concentrações de NaCl levaram a redução do desenvolvimento da parte aérea dos explantes de *V. punctulata*. Estes resultados são similares aos obtidos em segmentos nodais de *Alternanthera brasiliana* submetidos ao estresse salino com NaCl tendo sido observado que a progressão da concentração salina também culminou na redução do comprimento dos explantes (Rodrigues, 2010).

Diferentemente do comportamento ocorrido no CPA, o CPR se ajustou ao modelo de regressão quadrática, apresentando um (R^2 99,35%). O ponto de máxima obtido indicou que a concentração de 15,66 mM é indicada para obtenção de maior comprimento de raiz, tendo como seu valor máximo estimado em 1,97 cm.

Ao avaliar o experimento, foi possível observar que conforme houve aumento da concentração de NaCl, a MFPA apresentou um comportamento linear decrescente (R^2 89%), assim como observado para as variáveis FV e CPA indicando que o aumento da concentração de NaCl apresenta um efeito inversamente proporcional para o desenvolvimento do sistema aéreo de *V. punctulata* (Figura 1e). Foi observado no cultivo dos brotos de *Chrysanthemum morifolium* que o aumento das concentrações salinas resultou no incremento da massa fresca até 60 mM de NaCl, e a partir de 80 mM houve redução significativa destas médias (Shatnawi *et al.*, 2010), distinto do que foi observado com *V. punctulata*. A MSPA obteve menores médias com as concentrações salinas mais altas (40 e 80 mM), portanto a adição de NaCl ao meio de cultura apresenta resultado negativo para obtenção da massa seca a partir da concentração de 40 mM (Figura 1f). Estes resultados corroboram os obtidos por Mohamed *et al.* (2011), ao avaliar a resposta de dois tipos de explantes (hipocótilo e cotilédono) de duas cultivares de tomate (Beril e Pearl). Os autores observaram que houve decréscimo da massa fresca e seca dos explantes à medida que a concentração de NaCl foi incrementada ao meio de cultivo.

Em relação ao surgimento de brotos de *V. punctulata*, obtidos em resposta a adição de NaCl ao meio *in vitro*, as variáveis explantes com brotos (EB), número de brotos (NB) e massa fresca e seca dos brotos (MFB e MSB) produziram efeito significativo estatisticamente dadas as concentrações testadas ($p < 0,05$) conforme a análise de variância (Apêndice 5).

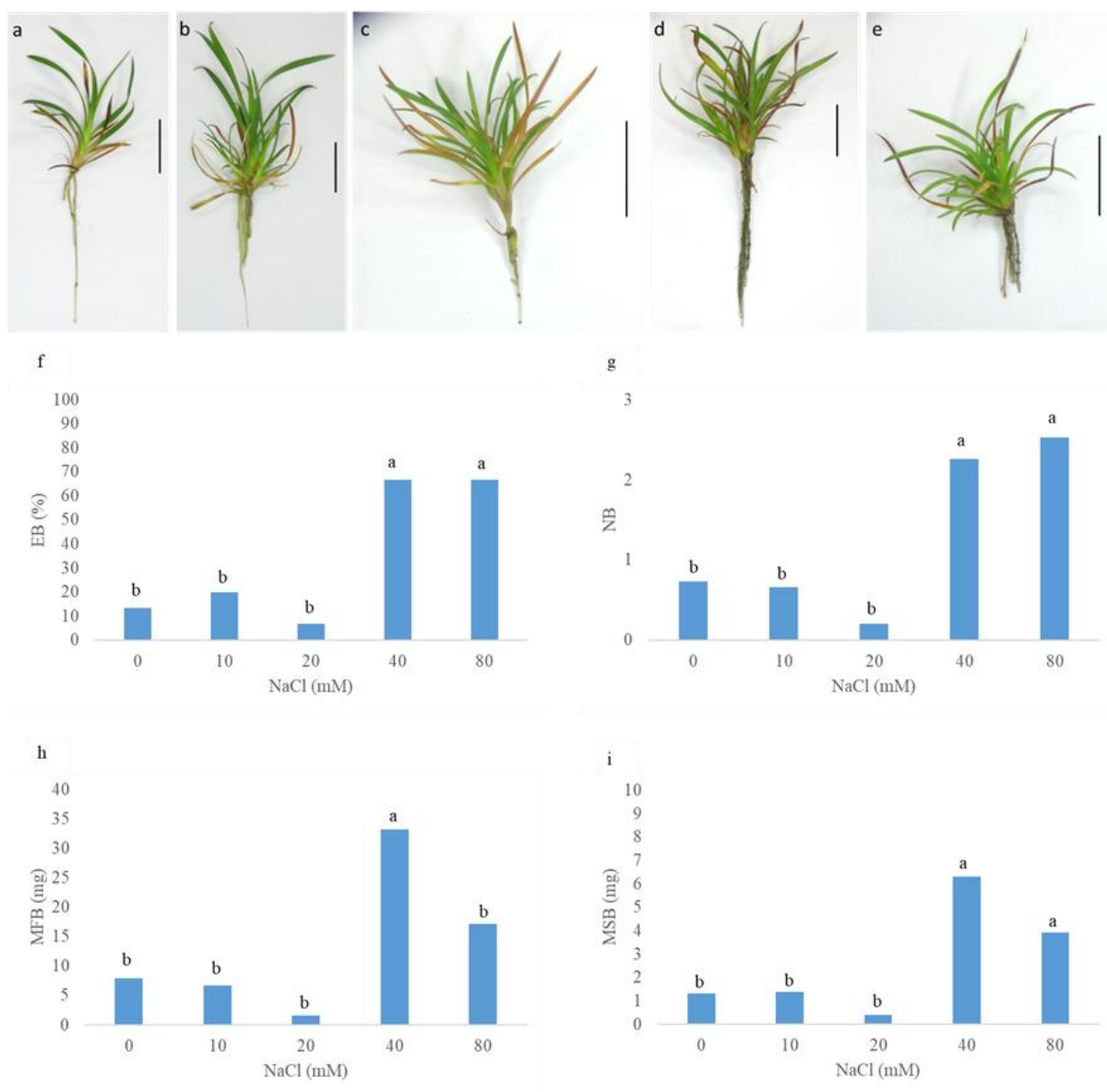


Figura 2. *Vellozia punctulata* submetida a diferentes concentrações de NaCl in vitro por 60 dias: (a) controle (0 μ M); (b) 10 mM; (c) 20 mM; (d) 40 mM; (e) 80 mM; e avaliação da multiplicação in vitro em diferentes concentrações de NaCl: (f) explantes com brotos – EB; (g) número de brotos – NB; (h) massa fresca dos brotos – MFB e (i) massa seca dos brotos – MSB.

A variável EB de *V. punctulata* obteve resposta significativamente superior aos demais tratamentos nas concentrações de 40 e 80 mM (Figura 2f), bem como houve uma produtividade de NB estatisticamente superior ao utilizar essas mesmas concentrações (Figura 2g). Borges, Lima-Brito e Conceição (2023) investigaram os efeitos de mecanismos de estresse hídrico, com sacarose e manitol, na multiplicação in vitro de quatro espécies de *Vellozia*, incluindo *V. punctulata*, e indicam que esta espécie e *Vellozia jolyi* tem potencial para multiplicação in vitro. No presente estudo, através do estresse salino foi possível obter 2,53 brotos utilizando 40 mM de NaCl, enquanto que, quando os explantes de *V. punctulata* foram expostos ao estresse hídrico, foram obtidos 1,41 brotos através da utilização de 45 gL⁻¹ (Borges; Lima-Brito;

Conceição, 2023). É possível observar a obtenção de um número de brotos maior ao utilizar 40 mM de NaCl. Deste modo, sugere-se que haja continuidade nas investigações das respostas fisiológicas de *V. punctulata* quando submetida a mecanismos de estresse vegetal.

A resposta de cada espécie ao estresse salino promovido pelas crescentes concentrações de NaCl são bastante específicas, posto que a adição desta substância no meio de cultura aumentou o número de brotos de *Alternanthera brasiliana* (Rodrigues, 2010), assim como ocorreu com o número de brotos de *V. punctulata*, ao passo que a mesma substância, o NaCl reduziu o número de brotos obtidos para cultivares de blueberry (Molnar *et al.*, 2024). Foi identificada a produção de broto no meio contendo 40 mM de NaCl no 12º dia de cultivo in vitro (Figura 3).

A massa fresca dos brotos de *V. punctulata* obteve média estatisticamente superior utilizando 40 mM (Figura 2h); enquanto houve aumento de massa seca destes brotos, diferindo-se estatisticamente das demais, ao utilizar as concentrações de 40 e 80 mM de NaCl (Figura 2i).



Figura 3. Broto identificado no 12º dia do cultivo in vitro de *Vellozia punctulata* em meio de cultura contendo 40 mM de NaCl (a).

A utilização de mecanismos de estresse no cultivo in vitro pode induzir a produção de metabólitos secundários, como ocorrido no cultivo in vitro de *V. punctulata*, onde foi possível observar uma coloração arroxeada indicativa do acúmulo de antocianina nas folhas dos explantes cultivados in vitro com 40 mM de NaCl (Figura 4b) se comparado aos explantes cultivados com ausência de concentração de NaCl (Figura 4a).



Figura 4. Plantas de *Vellozia punctulata* ao 30º dia do cultivo in vitro em meio de cultura (a) ausente do estresse salino e (b) 40 mM de NaCl. A barra indica 1 cm e as setas indicam folhas com acúmulo de antocianina.

Na análise bioquímica observou-se o efeito da adição do NaCl ao meio de cultivo na produção do aminoácido prolina. O maior teor de prolina, 16,41 µg, foi obtido aos 30 dias de cultivo in vitro com 40 mM de NaCl. Em contraponto, o menor teor, 1,77 µg, ocorreu na ausência de NaCl, no mesmo período de cultivo (Tabela 4). De modo geral, nota-se que na ausência do sal houve diminuição da prolina quantificada no primeiro dia (dia 3) e no último (30), e o inverso foi registrado na presença do NaCl, indicando seu efeito estressor no cultivo in vitro de *V. punctulata*. Isto pode ser visualizado também na figura 5 que apresenta o efeito isolado deste agente estressor sob o acúmulo de prolina, com diferença estatística superior na concentração de 40 mM em comparação a de 0 mM.

Tabela 4. Prolina quantificada (µg) durante 30 dias de cultivo in vitro de *Vellozia punctulata* em meios de cultura contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl).

NaCl (mM)	Dias				
	3	6	12	24	30
0	10,67Aa	7,33Bb	8,09Ab	2,83Bc	1,77Bc
40	8,37Ac	11,77Ab	6,45Ac	12,46Ab	16,41Aa

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

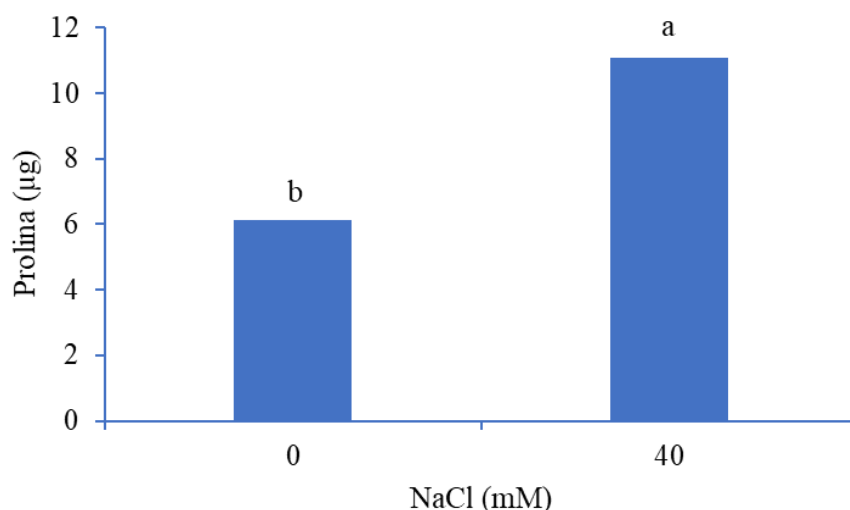


Figura 5. Efeito do NaCl no acúmulo de prolina em *Vellozia punctulata* in vitro.

V. punctulata possivelmente é uma espécie tolerante à dessecação, e foi observado no cultivo in vitro com adição do estresse salino, que houve acúmulo de prolina, e possivelmente antocianina, para minimização dos danos celulares que a aplicação de 40 mM de NaCl promoveu neste cultivo.

Borges, Lima-Brito e Conceição (2023) quantificaram a prolina em três espécies de *Vellozia* (*V. punctulata*, *V. pyrantha* e *V. seubertiana*) após cultivo in vitro com concentrações de PEG 6000, e observaram o aumento do nível de prolina apenas para *V. pyrantha*, atuando nesta espécie como um agente bioquímico de osmoproteção. Já no presente estudo foi identificado aumento no teor de prolina em *V. punctulata*, podendo-se inferir que este aminoácido é um marcador de estresse para a espécie.

No que tange a redução da prolina no tratamento controle (0 µM) (sem NaCl) durante o período do experimento, é possível supor que houve remanejamento da prolina, inicialmente acumulada, para atividades celulares relacionadas ao estabelecimento do explante transferido para a etapa de multiplicação. No tratamento contendo 40 mM de NaCl, houve formação de brotos a partir do 12º dia, permitindo inferir que, ao início do cultivo neste meio salino houve inicial acúmulo de prolina nos dias 3 e 6, que possivelmente foram remanejados para formação e nutrição dos brotos, observados no 12º dia; após esse estágio, foi possível observar retorno no acúmulo de prolina, indicando que o microhabitat manteve-se ofertando condições estressantes para *V. punctulata*.

De acordo com a análise de variância dos resultados obtidos com a multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata*, viabilizada pelo regulador vegetal BAP, não houve efeito

significativo ($p > 0,05$) para as variáveis sobrevivência dos explantes (SOB), comprimento da parte aérea (CPA), folhas senescentes (FS) e porcentagem de explantes com calos (EC); houve efeito significativo ($p < 0,05$) para o comprimento da parte radicular (CPR), o número de raízes (NR), as folhas verdes (FV), explantes com brotos (EB) e número de brotos (NB) (Apêndice 6).

Durante a multiplicação in vitro de *V. punctulata*, induzida através de diferentes concentrações de BAP, foi possível observar que as taxas de SOB não obtiveram diferenças estatísticas entre o controle (0 μM) e as concentrações de BAP aplicadas, ainda que, respectivamente, os valores obtidos tenham variado entre 75 a 95%, representando altas taxas de sobrevivência.

O CPA dos explantes de *V. punctulata*, expostos aos meios de cultura básico e aos meios contendo diferentes concentrações do regulador BAP, não obtiveram médias estatisticamente distintas entre si, indicando que o uso do regulador não alteraria a expressão do comprimento do explante multiplicado in vitro. O FS, obtido através da multiplicação in vitro de *V. punctulata*, não apresentou diferença estatística entre suas médias.

Para as variáveis CPR e NR, o controle (0 μM), ausente de regulador, proporcionou média significativamente superior aos tratamentos com as diferentes concentrações de BAP testadas (Figuras 6a e 6b), o que indica a ação inibitória desta citocinina no sistema radicular da espécie em estudo. Ao utilizar a citocinina BAP no cultivo in vitro das espécies *Ocimum selloi* (Monfort *et al.*, 2012), *Hylocereus udantus*; *Hylocereus megalantus* (Ramalho-Neta *et al.*, 2022), não houve formação de raízes na presença do regulador, uma resposta ainda mais inibitória do que foi possível observar em *V. punctulata*, pois apesar de haver uma redução no comprimento e número de raízes, em todas as concentrações de BAP testadas, ainda foi possível observar a emissão das raízes e quantificá-las. O BAP é um regulador vegetal que pertence ao grupo das citocininas, e costumam ser empregadas na cultura de tecidos para promover sucessivas divisões celulares, resultando na multiplicação do explante, e a adição de um citocinina exógena, como o BAP, atua na zona de transição, podendo induzir a uma diminuição do tamanho do meristema radicular sem afetar a atividade de divisão das células do meristema radicular da planta (Ioio; Linhares; Sabatini, 2008). Resultados divergentes dos obtidos para *V. punctulata* foram relatados por Oliveira *et al.* (2012) ao testar o efeito das citocininas benzilaminopurina e cinetina, combinadas ou não com o ácido naftalenoacético (auxina), em plântulas in vitro de *Etlingera elatior*. No referido estudo a presença de citocinina não teve

efeito inibitório na emissão de raízes nos “bastões do imperador”.

Ao utilizar diferentes concentrações do regulador BAP na indução da multiplicação in vitro, foi possível observar que os dados para FV apresentaram um comportamento de regressão quadrática (R^2 98,45%), com ponto de máxima equivalente a 10,01 μM , onde o valor máximo estimado corresponderia a 13,28 folhas verdes (Figura 6c).

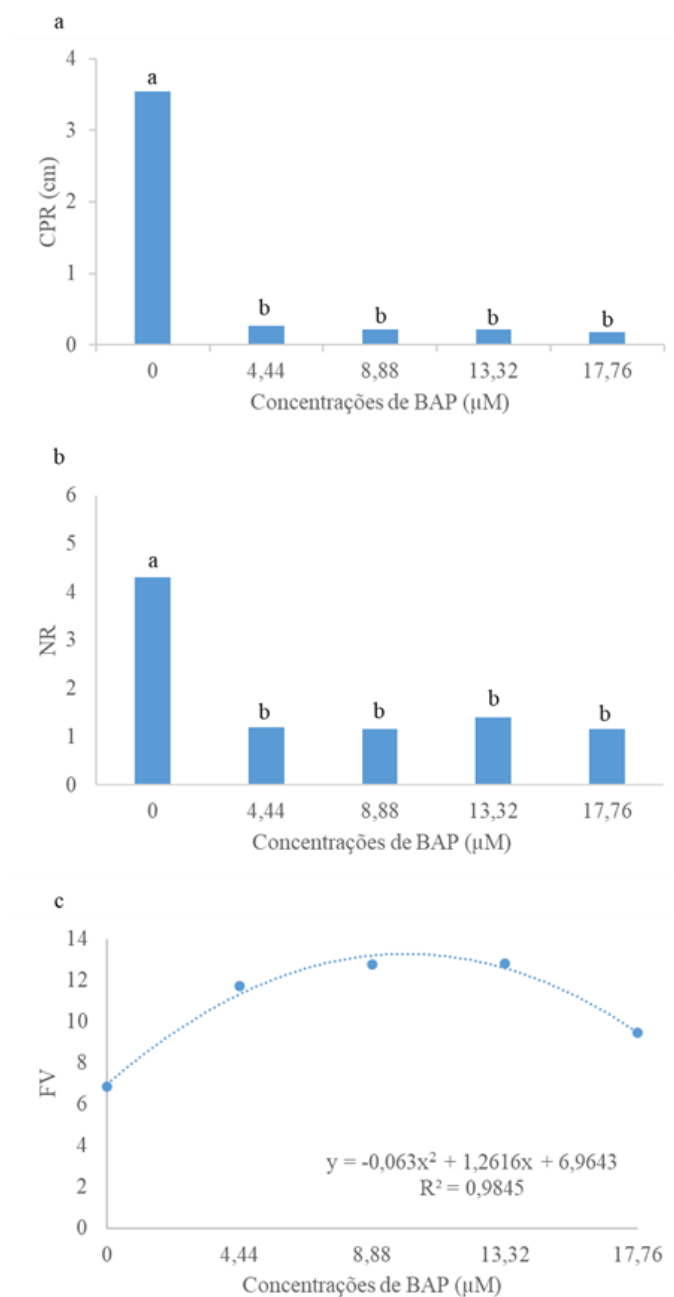


Figura 6. Variáveis morfofisiológicas de *Vellozia punctulata* cultivadas in vitro utilizando diferentes concentrações de BAP (μM): (a) comprimento da parte radicular - CPR (cm), (b) número de raízes - NR e (c) número de folhas verdes - FV.

A citocinina BAP favoreceu a etapa de multiplicação in vitro de *V. punctulata* (Figuras 7a-e). A porcentagem média de explantes com brotos apresentou padrão de regressão quadrática (R^2 75,99%), onde o ponto de máxima foi 11,98 μM de BAP com o valor máximo estimado para 93,11% da taxa de responsividade dos brotos (Figura 4f).

Para o número de brotos foi observado que as médias encontradas correspondem à regressão quadrática (R^2 74,73%); a concentração de 10,72 μM foi o valor encontrado para o ponto de máxima, obtendo um valor máximo estimado de 7,60 brotos (Figura 4g).

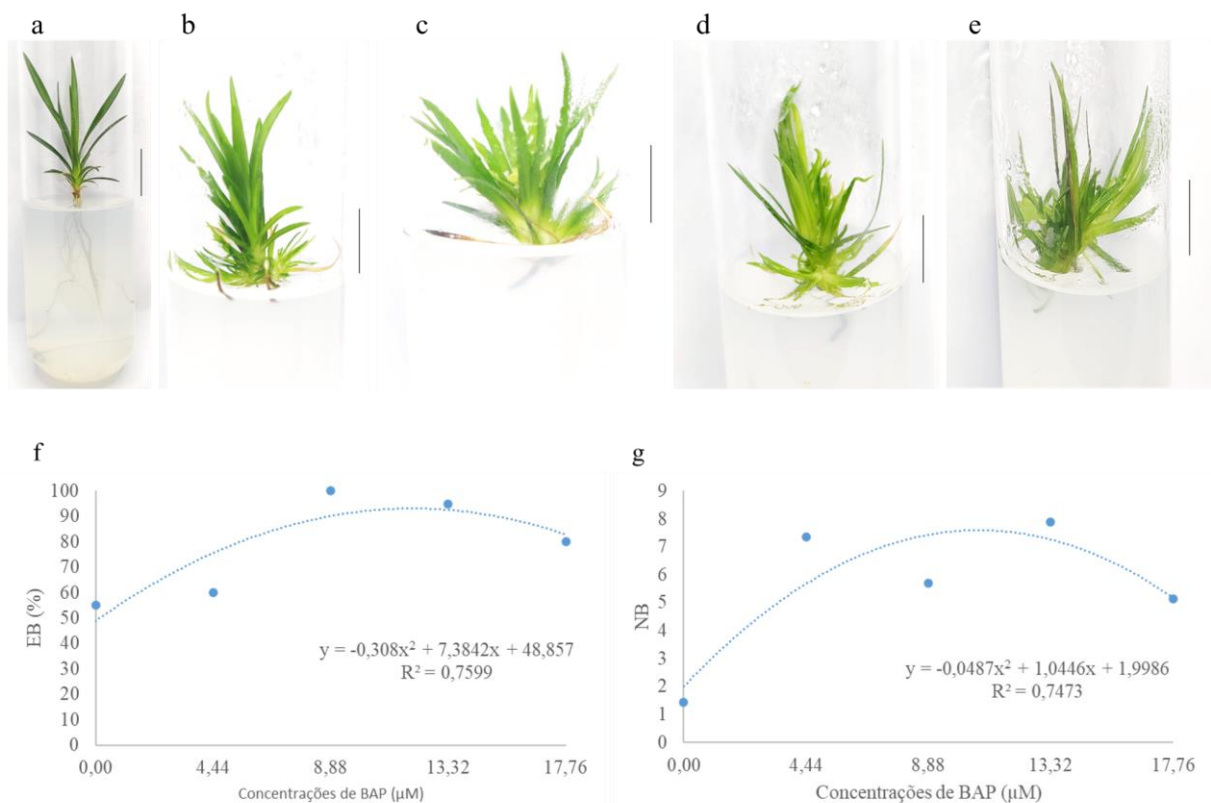


Figura 7. Multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata* em diferentes concentrações de BAP: (a) 0 μM , (b) 4,44 μM , (c) 8,88 μM , (d) 13,32 μM , (e) 17,76 μM após 60 dias de cultivo in vitro; (f) porcentagem de explantes com brotos - EB e (g) número de brotos - NB. A barra vertical indica 1 cm (a-e).

Na multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata*, foram obtidos explantes com calos apenas nos tratamentos em que houve adição do regulador BAP (Figura 8). Houve baixa responsividade dos explantes para a indução dos calos, com médias entre 15 e 30%. Todavia, a obtenção de organogênese indireta não é uma resposta frequentemente obtida ao aplicar somente o BAP, portanto estes resultados sugerem que o tecido foliar de *V. punctulata* oferta um potencial interessante a ser explorado para a regeneração de plantas via organogênese indireta.

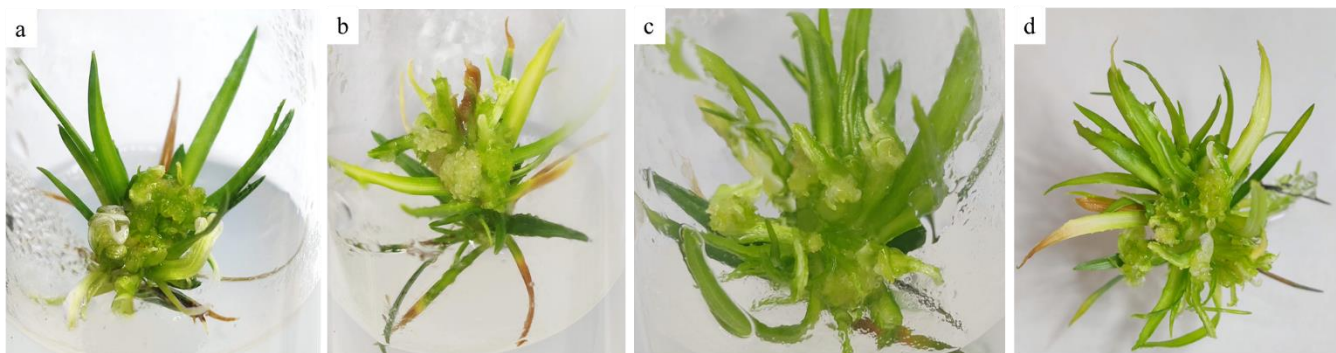


Figura 8. Formação de calos durante a etapa de multiplicação in vitro em *Vellozia punctulata* submetida a diferentes concentrações de BAP: (a) 4,44 μM ; (b) 8,88 μM ; (c) 13,32 μM e (d) 17,76 μM .

Na etapa de enraizamento in vitro de *Vellozia punctulata*, as variáveis SOB e ENR não obtiveram efeito significativo ($p > 0,05$), sendo observado efeito significativo ($p < 0,05$) isolado das fontes de variação utilizadas; assim, em relação ao CPA e NR, foi detectado efeito significativo do carvão ativado, promovendo maior CPA e do NR enquanto para a variável CPR houve efeito significativo tanto para o carvão ativado, quanto a vedação do tubo de ensaio, promovendo maiores raízes (Apêndice 7).

As porcentagens de sobrevivência e enraizamento dos explantes não obtiveram médias estatisticamente distintas, apesar de alcançar altas taxas em todos os tratamentos aplicados, com valores entre 96,42 e 100%.

O CPA de *V. punctulata* no enraizamento in vitro apresentou maiores médias no meio com carvão ativado (Figura 10a). Ao realizar o enraizamento in vitro de *Vellozia seubertiana*, Pinto e Lima-Brito (2023) também dispuseram carvão ativado no meio de cultura, bem como adicionaram o ácido naftalenoacético (ANA), mas não observaram interação entre estes fatores na promoção do comprimento da parte aérea de *Vellozia seubertiana*, somente sendo observada a influência do carvão para este comprimento. Já o CPR apresentou resultados superiores no meio de cultura sem carvão ativado (Figura 10b) e em recipiente vedado com tampa de algodão (Figura 10d).

O ácido indolbutírico (AIB) foi disposta no enraizamento in vitro de *Vellozia flavicans*, tendo sido obtido uma porcentagem de 40% de enraizamento com este tratamento (Freitas-Neto, 2009). É possível inferir que os níveis endógenos de auxina das espécies de *Vellozia* cultivadas in vitro são suficientes para a emissão de raízes, tal qual foi sugerido por Pinto e Lima-Brito (2023), ao avaliar o enraizamento in vitro de *Vellozia seubertiana*, e também como é observado no enraizamento in vitro de *V. punctulata*, cuja porcentagem de enraizamento

alcançou médias entre 96,42 e 100%; deste modo, sugere-se que a não utilização de auxinas no enraizamento in vitro representaria uma economia no cultivo in vitro de *Vellozia*.

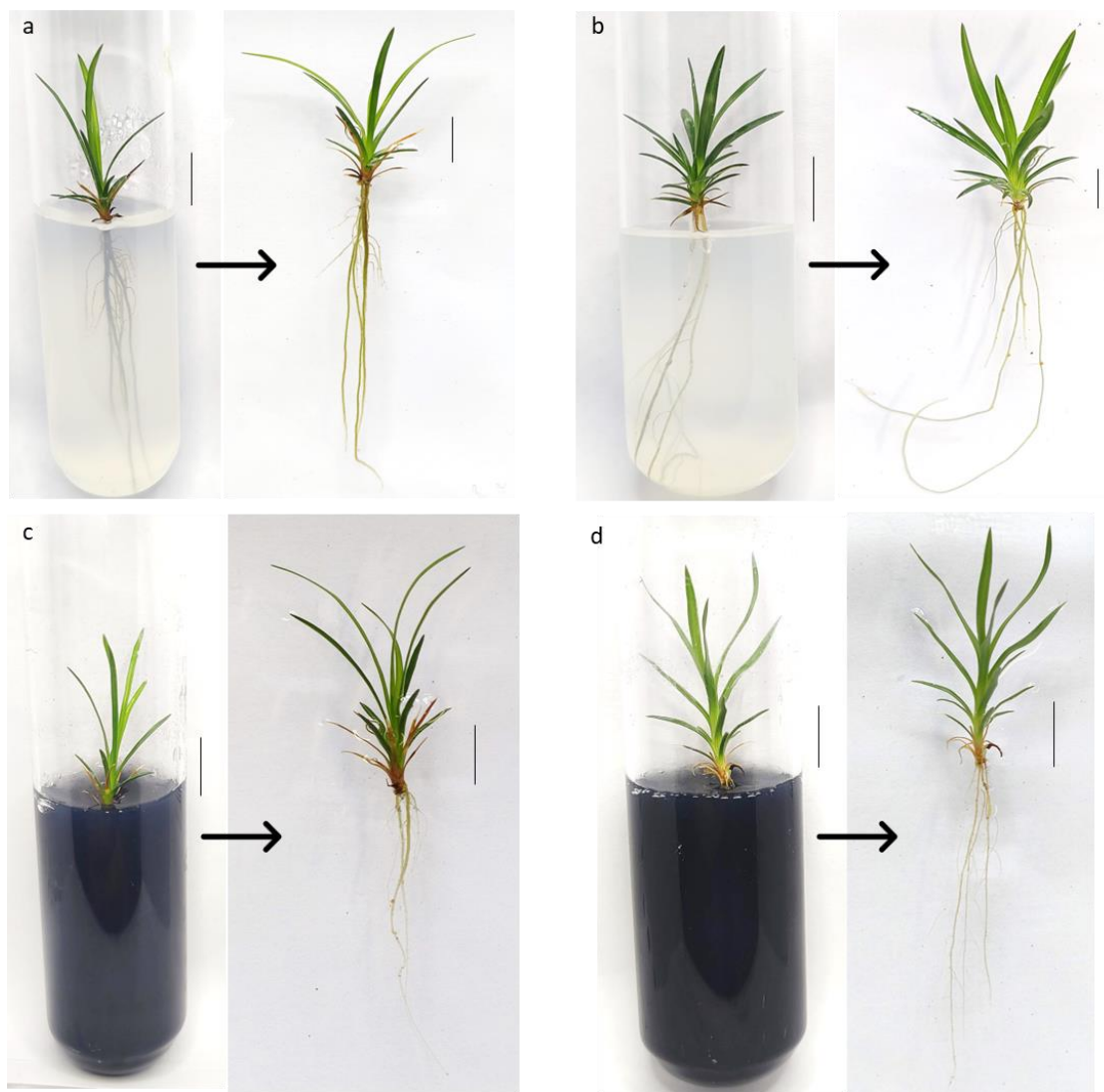


Figura 9. Enraizamento in vitro de *Vellozia punctulata* após 60 dias de cultivo in vitro: (a) meio sem carvão e vedação com PVC; (b) meio sem carvão e vedação com algodão; (c) meio com carvão e vedação com PVC; (d) meio com carvão e vedação com algodão. A barra vertical indica 1 cm.

É possível observar através dos dados obtidos de *V. punctulata* que o acréscimo de carvão ativado não levou ao aumento do CPR, assim como as maiores médias dos NR foram obtidas no meio de cultura sem a adição do carvão ativado (Figura 10b e 10c). Também é notório que a adição do carvão ativado proporcionou a formação de raízes que, visivelmente, aparentavam ser mais frágeis do que as raízes obtidas em meio de cultura ausente de carvão ativado. Este resultado se distingue do que foi registrado para *Vellozia seubertiana*, pois esta espécie apresentou seu maior comprimento radicular no microambiente adicionado de carvão ativado para o enraizamento in vitro (Pinto; Lima-Brito, 2023).

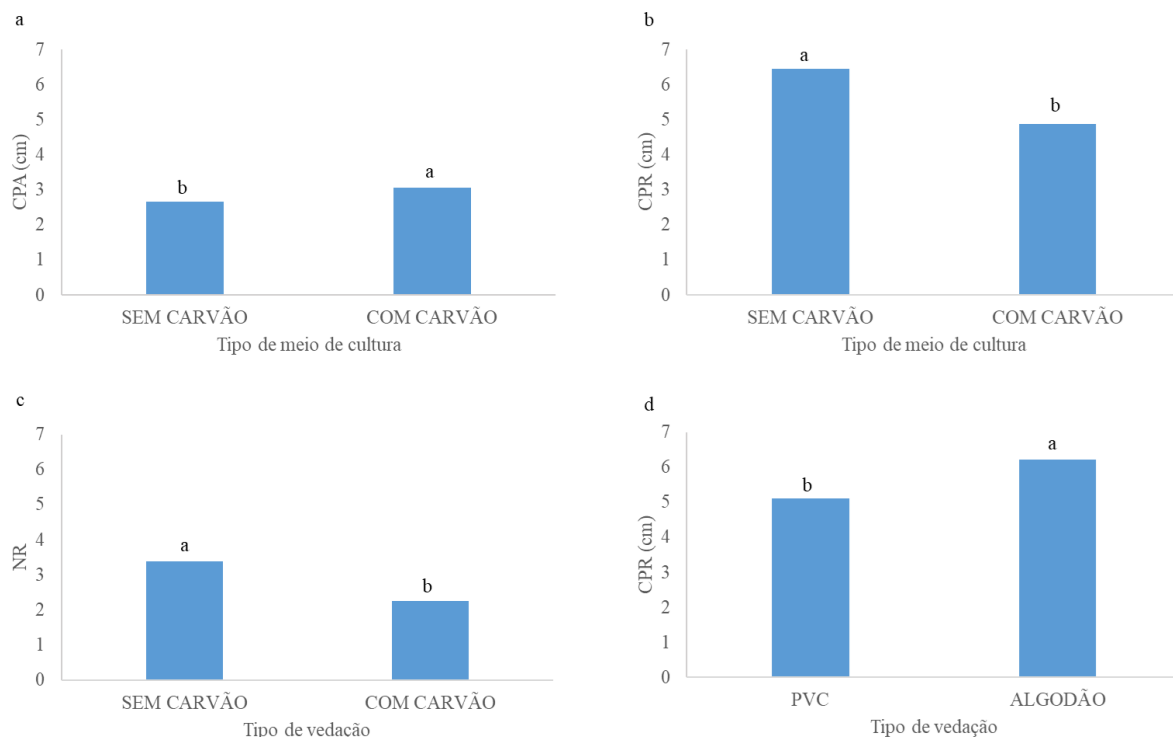


Figura 10. Variáveis morfofisiológicas do enraizamento in vitro de *Vellozia punctulata* após 60 dias de cultivo in vitro, em resposta ao tipo de meio de cultura e ao tipo de vedação: (a) comprimento da parte aérea - CPA (cm), (b) comprimento da parte radicular - CPR (cm) e (c) número de raízes - NR; (d) comprimento da parte radicular - CPR (cm).

A análise de variância das plantas aclimatizadas de *Vellozia punctulata* não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) para as variáveis SOB, NR, FS; houve efeito significativo ($p < 0,05$) para as variáveis CPA, CPR, FV, MFPA, MSPA, MFPR e MSPR (Apêndice 8).

A variável SOB obteve durante a aclimatização de *V. punctulata* médias de 92,85 e 100%, que não diferiram estatisticamente entre si. O número de raízes obtidas na aclimatização de *V. punctulata* não apresentou médias que permitissem distinguir o efeito entre os tratamentos que estas plantas foram pré-dispostas. O número de folhas senescentes quantificadas na aclimatização de *V. punctulata* não obteve médias estatisticamente distintas quanto aos tratamentos aplicados.

O comprimento da parte aérea apresentou maiores médias com as plantas que vieram do tamponamento com algodão (Figura 12a). Estes resultados diferem dos obtidos no estudo conduzido por Lima-Brito *et al.*, (2016), no qual o comprimento da maior folha de *Comanthera mucugensis*, apresentou maiores médias nos tamponamentos de PVC e tampa do que com o algodão. Deste modo, a ventilação proporcionada pelo tamponamento de algodão na etapa de enraizamento in vitro aparenta ter favorecido o desenvolvimento das plantas aclimatizadas de *V. punctulata* (Figura 11).

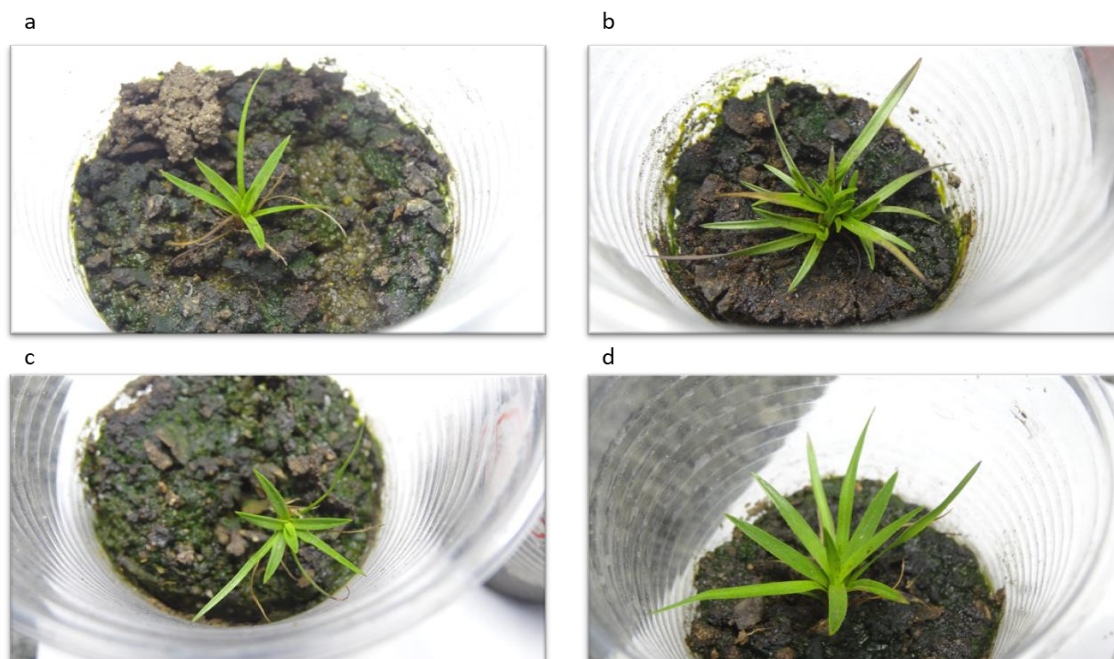


Figura 11. Aclimatização de *Vellozia punctulata* oriundas dos tratamentos da etapa do enraizamento: (a) sem carvão e vedação de PVC, (b) sem carvão com vedação de algodão, (c) com carvão e vedação de PVC, (d) com carvão e vedação de algodão.

Foi obtido maior média para comprimento da parte radicular nas plantas oriundas do enraizamento em meio sem carvão (Figura 12b). A aclimatização de *Vellozia seubertiana* também constou com as plantas oriundas dos tratamentos dispostos para a enraizamento in vitro da espécie, sendo notório que o uso do carvão ativado proporcionou maiores médias para o comprimento da parte aérea e radicular de *V. seubertiana* (Pinto; Lima-Brito, 2023), diferente do que foi observado para *V. punctulata*, onde não houve favorecimento do uso do carvão para promoção do comprimento radicular desde a etapa do enraizamento in vitro, e assim foi mantido em sua aclimatização.

A maior média de folhas verdes foi obtida ao utilizar o tamponamento com algodão (Figura 12c), efeito também obtido na aclimatização ex vitro de *Solidago chilensis* (Rodrigues *et al.*, 2021).

As médias obtidas das plantas oriundas do tamponamento com algodão foram maiores para as massas fresca e seca da parte aérea (Figura 12d). O mesmo comportamento ocorreu em relação às massas fresca e seca da parte radicular (Figura 12e). Bellintani *et al.* (2007) observaram que possibilitar ventilação na aclimatização de microplantas de *Orthophytum mucugense*, através da vedação com algodão por 30 dias, é uma estratégia eficaz para a espécie pois esta permeabilidade para passagem de ar acarretaria no desenvolvimento de mecanismos de adaptação, tal como foi observado, após 60 minutos, que houve redução na perda de água por transpiração menor em relação às plantas cultivadas in vitro utilizando o PVC como

vedação do microambiente (Figura 12d e 12e).

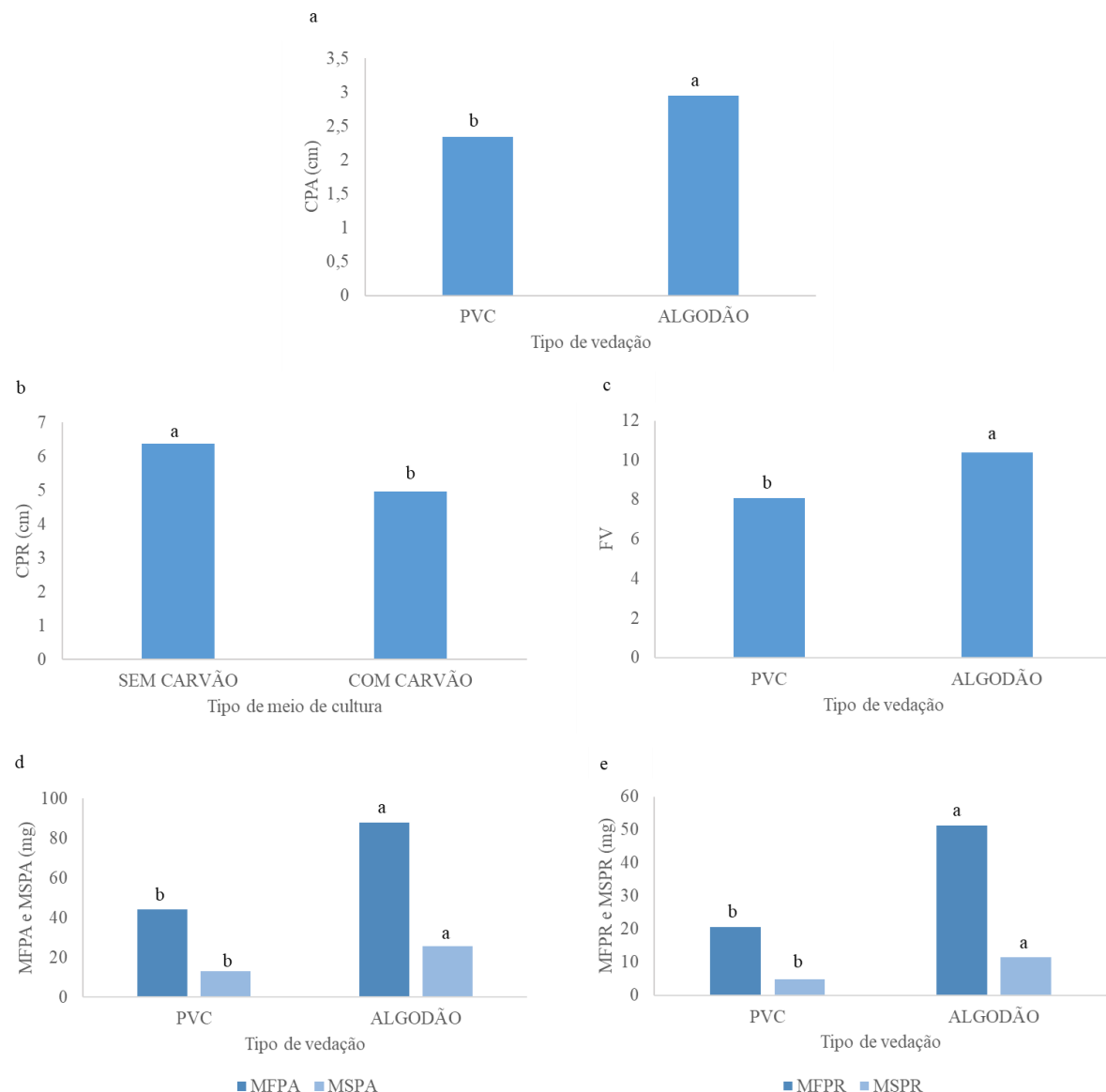


Figura 12. Variáveis morfofisiológicas das microplantas aclimatizadas de *Vellozia punctulata* após 30 dias de transferência para ambiente ex vitro em resposta ao tipo de meio de cultura e ao tipo de vedação: (a) comprimento da parte radicular - CPR e (b) comprimento da parte aérea - CPA, (c) número de folhas verde - FV, (d) massa fresca e seca da parte aérea - MFPA e MSPA, (e) massa fresca e seca da parte radicular - MFPR e MSPR.

A micropropagação de *V. punctulata* necessitou de 240 dias de cultivo, realizado desde o estabelecimento, com sementes germinadas in vitro, passando consecutivamente pela multiplicação in vitro, enraizamento in vitro e aclimatização ex vitro (Figura 13). O período para totalizar as etapas de micropropagação de *V. punctulata* se assemelham ao que foi obtido no protocolo de *Vellozia seubertiana*, viabilizado por Pinto e Lima-Brito (2023), completando as técnicas em 10 dias a menos do que foi necessário para *V. punctulata*.

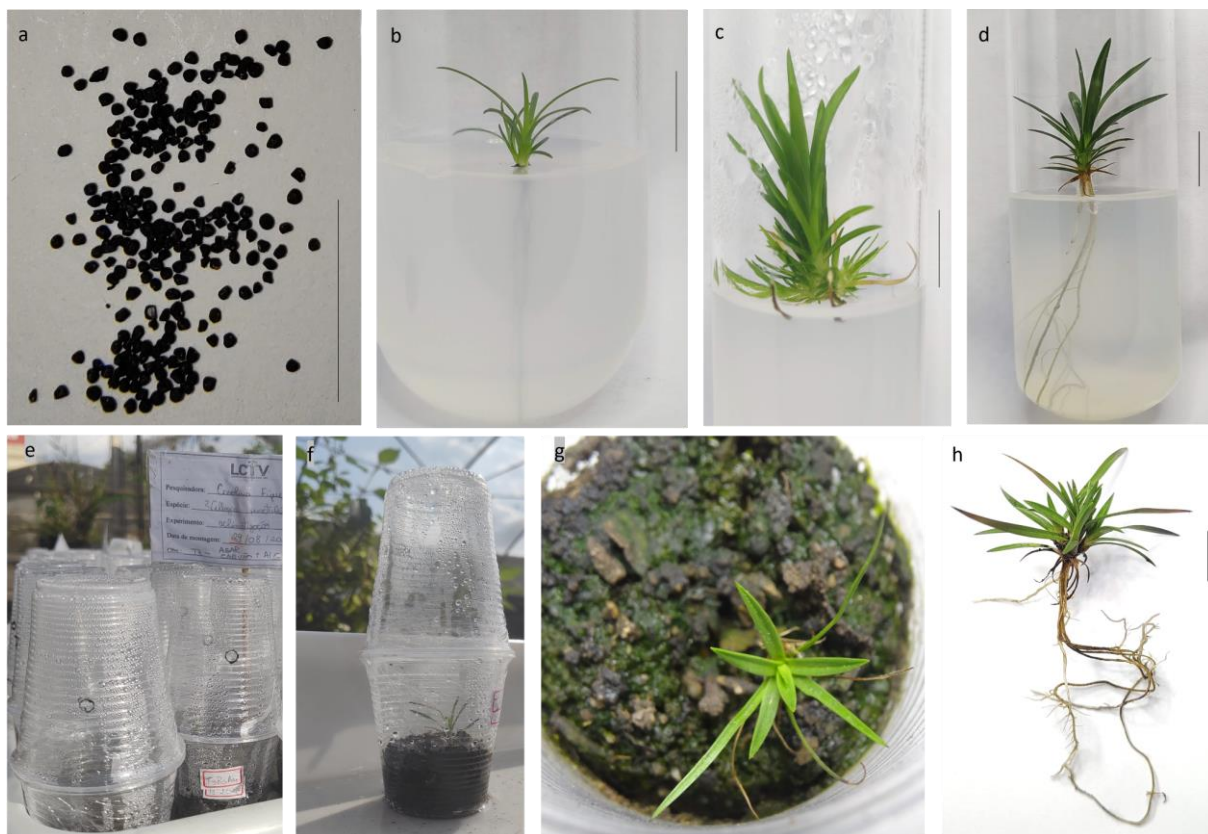


Figura 13. Micropropagação de *Vellozia punctulata* e suas sucessivas etapas: (a) sementes, (b) estabelecimento pela germinação in vitro, (c) multiplicação in vitro, utilizando 8,88 μM de BAP, (d) enraizamento in vitro. Sequência feita durante a aclimatização: (e) 10 primeiros dias com copo superior fechado, (f) furo no copo superior, feito no 10º dia, (g) remoção do copo superior, no 15º dia, (h) aspecto da planta aclimatizada aos 30 dias da aclimatização. A barra vertical indica 1 cm.

CONCLUSÕES

O presente estudo foi pioneiro ao investigar a utilização do estresse salino promovido por NaCl como mecanismo para multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata*, atestando que o estresse salino induz a regeneração de brotos, e a prolina é um biomarcador de estresse para a espécie. A citocinina BAP na concentração de 10,72 μM é eficaz para a multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata*. O enraizamento in vitro de *V. punctulata* ocorre em meio sem adição de carvão ativado e com a vedação de algodão. A aclimatização da espécie apresenta alta porcentagem de sobrevivência. Este é o primeiro estudo que estabelece um protocolo de micropropagação de *V. punctulata*, tendo sido realizado em 240 dias a partir da germinação de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga, I. C. A. *et al.* Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 13, n., p. 539-541, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722011000500006>.
- Barrueto-Cid, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa, 2015. 337 p.
- Bastos, F. J. O. **Estresse como modulador da multiplicação e enraizamento in vitro de sempre-viva de Mucugê**. 2021. 28 f. Monografia – Graduação de Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2021.
- Bates, L.S. (1973) Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies. **Plant and Soil**, 39, p. 205-207. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bellintani, M. C. *et al.* Efeito da ventilação in vitro na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1098-1100, 2007.
- Borges, B. P. S. **Regeneração in vitro de *Vellozia sincorana* Ayensu & Smith**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- Borges, B. P. S. **Traços morfofuncionais, regeneração in vitro e bioquímica de espécies de *Vellozia* sob distúrbios por seca, alta temperatura e fogo**. 2022. 112 f. Tese (Doutorado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2022.
- Borges, B. P. S. *et al.* Fire as a novel technique to stimulate adventitious shoots in the laboratory. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture** (PCTOC), [S.L.], v. 143, n. 3, p. 709-713, 17 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-020-01933-z>.
- Borges, B. P. S.; Lima-Brito, A.; Conceição, A. A.. Role of water stress as a stimulus for in vitro multiplication and its effects on biochemical response in *Vellozia* species. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 1-9, 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054202347003923>.
- Camargo, A.P. *et al.* Microbiomes of Velloziaceae from phosphorus-impooverished soils of the *campos rupestres*, a biodiversity hotspot. **Scientific Data** 6, 140 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0141-3>
- Cattai, M. B. **Anatomia em Velloziaceae: caracteres, evolução e filogenia**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-06112007-140016/>. Acesso em: 28 nov. 2023.
- Ferreira, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Available at: <<http://www.biometria.ufra.br/index.php/BBJ/article/view/450>>. Date accessed: 10 feb. 2020. doi: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

Freitas-Neto, O. G. **Micropropagação e anatomia foliar de Canela-de-Ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f. - Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

Ioio, R. D.; Linhares, F. S.; Sabatini, S. Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. **Current Opinion In Plant Biology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 23-27, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.006>.

Kerbaudy, G.B. **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

Lima, A. P. P.; Lima-Brito, A; Santana, J. R. F. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência Rural**, 50: 1-6, 2020.

Lima-Brito, A. L. *et al.* In vitro haderning in different enviroment and acclimatization of microplants of *Comanthera mucugensis* Giul. subsp.mucugensis. **Revista Ciência Agrônômica**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160018>.

Martínez-Santos, E. *et al.* In vitro response of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) to PEG-induced osmotic stress. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-10, 19 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-02207-0>.

Melo, Y. L. *et al.* Indicadores de estresse salino em abacaxizeiro cultivado na ausência e presença de fitorreguladores. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 698-705, 23 set. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452011005000104>.

Mohamed, A. N. *et al.* In vitro performances of hypocotyl and cotyledon explants of tomato cultivars under sodium chloride stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 44, p. 8757-8764, 2011.

Molnar, S. *et al.* Investigation of salinity tolerance to different cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in vitro. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 52, n. 1, p. 13691-13691, 2024.

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

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, [s. l], v. 15, n. 1, p. 473-497, jun. 1962.

Nascimento, N. F. *et al.* Respostas funcionais foliares de plantas jovens de *Hevea brasiliensis* submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. **Ciência Florestal**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 1019-1032, 30 set. 2019. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509832658>.

Oh, S. *et al.* Proline accumulation and related gene expression during spring regrowth in three rosaceae species. **Horticulture, Environment, And Biotechnology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 21-

26, fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13580-017-0101-9>.

Oliveira, J. F. *et al.* Germinação de embriões e multiplicação in vitro de *Etlintera elatior* (Jack) R.M. Smith. **Revista Ciência Agrícola**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 31-38, 20 dez. 2012. Universidade Federal de Alagoas. <http://dx.doi.org/10.28998/rca.v10i1.732>.

Oliveira, R.C.S. *et al.* Ethnobotany and Harvesting Impacts on Candombá (*Vellozia* aff. *sincorana*), A Multiple Use Shrub Species Endemic to Northeast Brazil. **Economic Botany** 69, 318–329 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12231-015-9324-9>

Pinto, D. I. J. G. C. **Micropropagação de duas espécies de Velloziaceae da Chapada Diamantina**. 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2021.

Pinto, D. J. G. C.; Lima-Brito, A. Micropropagation of *Vellozia seubertiana* (Velloziaceae). **Revista Caatinga**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 271-279, jun. 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252023v36n204rc>.

Ramalho-Neta, T. *et al.* Micropropagação e aclimatização de duas espécies de pitaya sob diferentes concentrações de reguladores de crescimento e substratos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, p. e176111738756-e176111738756, 2022.

Rapini, A. *al.* A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1-2, p. 16-25, dez. 2008.

Rodrigues, A. C. C. *et al.* Regeneração in vitro de *Solidago chilensis* (Asteraceae) via organogênese direta. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 20, p. 244-253, 2018.

Rodrigues, I. C. S. **Micropropagação, tolerância à salinidade e análise de betacianina em plantas de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, cultivadas in vitro**. 2010 45p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS.

Shatnawi, M. *et al.* In vitro multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat and its responses to NaCl induced salinity. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 101-110, 2010.

Smith, L. B.; Ayensu, E. S. 1976. A revision of American Velloziaceae. In *Smithsonian Contributions to Botany*, 30. <https://doi.org/10.5479/si.0081024X>.

Taiz, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo descreveu o primeiro protocolo de micropropagação das espécies *Vellozia pyrantha* e *Vellozia punctulata* comprovando a eficiência da cultura de tecidos para a produção destas espécies, tendo sido necessário 240 dias para obtenção das microplantas a partir da germinação in vitro.

O estabelecimento in vitro das espécies *V. pyrantha* e *V. punctulata* foi feito em meio MS $\frac{1}{3}$, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, a partir de sementes.

Para a etapa de multiplicação de *V. pyrantha* e *V. punctulata* foi utilizado como explante a parte aérea das plantas estabelecidas in vitro. Os explantes foram responsivos à aplicação da citocinina BAP.

O carvão ativado e a vedação com algodão promovem o enraizamento in vitro de *V. pyrantha* e o enraizamento in vitro de *V. punctulata* é favorecido pela vedação com algodão.

A aclimatização de *V. pyrantha* e *V. punctulata* obteve altas taxas de sobrevivência, e as plantas advindas do enraizamento com vedação de algodão apresentaram incremento na massa da parte aérea e radicular.

Este estudo também foi pioneiro para a indução da multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata* em resposta ao estresse salino, promovido pela adição de cloreto de sódio (NaCl) ao meio de cultura. Foi observado acúmulo de prolina nas plantas sob estresse salino, sendo a prolina um biomarcador de estresse para *Vellozia punctulata*.

APÊNDICES

Apêndice 1. Análise de variância (ANOVA) para multiplicação in vitro de *Vellozia pyrantha* submetidas a diferentes concentrações de BAP após 60 dias de cultivo in vitro: porcentagem de sobrevivência – SOB, porcentagem de explantes com brotos - ECB, número de brotos - NB e comprimento dos brotos - CB.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		SOB	ECB*	NB*	CB
BAP	3	100.00	3891.66	82.45	0.18
Erro	12				
CV (%)		5.92	20.39	47.17	48.85

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 2. Análise de variância (ANOVA) do enraizamento in vitro de *Vellozia pyrantha* submetidas a diferentes condições experimentais: tipo de meio de cultura e o tipo de tampa. Após 60 dias de cultivo in vitro, foram quantificados a porcentagem de sobrevivência – SOB (%), porcentagem de enraizamento - ENR (%), o comprimento da parte aérea e da parte radicular - CPA e CPR (cm), o número de raízes - NR e o número de folhas verdes e senescentes - FV e FS.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio						
		SOB	ENR	CPA*	CPR*	NR*	FV	FS
MEIO	1	25.00	25.00	3.61*	16.97*	1.00	1.00	0.04
TAMPA	1	25.00	25.00	0.04	5.42*	7.29*	10.89	0.04
MEIO*TAMPA	1	25.00 ^{ns}	25.00 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.00 ^{ns}	3.61 ^{ns}	2.89 ^{ns}
Erro	12							
CV (%)		19.76	19.76	22.32	22.38	32.45	22.32	24.91

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 3. Análise de variância (ANOVA) da aclimatização ex vitro de *Vellozia pyrantha* advindas das diferentes condições experimentais aplicadas no enraizamento in vitro: tipo de meio de cultura e o tipo de tampa. Após 60 dias de cultivo in vitro, foram quantificados a porcentagem de sobrevivência – SOB (%), porcentagem de enraizamento – ENR (%), o comprimento da parte aérea e da parte radicular - CPA e CPR (cm), o número de raízes – NR, o número de folhas verdes e senescentes - FV e FS, massa fresca e seca da parte aérea - MFPA e MSPA (mg), massa fresca e seca da parte radicular - MFPR e MSPR (mg).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio										
		SOB	ENR	CPA*	CPR*	NR*	FV	FS	MFPA*	MSPA*	MFPR*	MSPR*
MEIO	1	25.00	25.00	5.10*	5.33	0.16	0.01	0.30	0.07	694.05	1111.22	28.46
TAMPA	1	225.00	225.00	1.63	22.09*	20.25*	9.00	5.52	0.00*	3298.77*	5621.25*	259.69*
MEIO*TAMPA	1	225.00 ^{ns}	225.00 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.11 ^{ns}	1.21 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.51 ^{ns}	100.50 ^{ns}	190.30 ^{ns}	0.33 ^{ns}
Erro	12											
CV (%)		23.23	23.23	25.23	28.08	26.86	25.30	24.82	31.61	30.97	39.40	35.93

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 4. Análise de variância (ANOVA) para *Vellozia punctulata* submetidas a diferentes concentrações de NaCl, após 60 dias de cultivo in vitro: porcentagem de sobrevivência – SOB (%), número de folhas verdes e senescentes – FV e FS, comprimento da parte aérea e da parte radicular - CPA e CPR (cm) número de raízes - NR, massa fresca e seca da parte aérea - MFPA e MSPA (mg), massa fresca e seca da parte radicular - MFPR e MSPR (mg).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio									
		SOB	FV*	FS*	CPA*	CPR*	NR	MFPA*	MSPA*	MFPR	MSPR
NaCl	4	1866.66	37.31	85.24	9.83	4.11	22.58	120851.04	5447.92	8696.21	205.08
Erro	70										
CV (%)		56.56	69.83	64.98	63.55	71.90	64.92	82.35	77.47	97.55	85.82

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 5. Análise de variância dos brotos obtidos após 60 dias, na multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata*, viabilizada com estresse salino, induzido através de diferentes concentrações de NaCl: explantes com brotos - ECB (%), número de brotos – NB, massa fresca e seca dos brotos – MFB e MSB (mg).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		ECB*	NB*	MFB*	MSB*
NaCl	4	13133.33	16.44	2335.84	88.38
Erro	70				
CV (%)		118.10	165.29	160.79	148.77

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 6. Análise de variância (ANOVA) para a multiplicação in vitro de *Vellozia punctulata* submetidas a diferentes concentrações de BAP, após 60 dias de cultivo in vitro: porcentagem de sobrevivência – SOB (%), comprimento da parte aérea e da parte radicular - CPA e CPR (cm), número de raízes - NR, número de folhas verdes e senescentes - FV e FS, porcentagem de explantes com brotos – EB (%) e número de brotos – NB.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio							
		SOB	CPA	CPR*	NR*	FV*	FS	EB*	NB*
BAP	4	437.50	0.18	11.03	9.50	32.49	2.39	2037.50	32.18
Erro	20								
CV (%)		22.01	29.98	50.13	50.58	26.56	33.15	22.21	51.16

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 7. Análise de variância (ANOVA) do enraizamento in vitro de *Vellozia punctulata* submetidas a dois fatores de condição experimental, tipo de meio de cultura e o tipo de tampa. Após 60 dias de cultivo in vitro, foram quantificados a porcentagem de sobrevivência – SOB (%), porcentagem de enraizamento -ENR (%), o comprimento da parte aérea e da parte radicular - CPA e CPR (cm) e o número de raízes - NR.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		SOB	ENR	CPA *	CPR *	NR *
Meio	1	89.28	89.28	1.02 *	16.97 *	9.14 *
Tampa	1	89.28	89.28	0.02	8,47 *	0.32
Meio * Tampa	1	89.28 ^{ns}	89.28 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.28 ^{ns}	0.57 ^{ns}
Erro	24					
CV (%)		9.62	9.62	13.77	18.71	29.89

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.

Apêndice 8. Análise de variância (ANOVA) da aclimatização ex vitro de *Vellozia punctulata* submetidas a dois fatores de condição experimental, tipo de meio de cultura e o tipo de tampa. Após 60 dias de cultivo in vitro, foram quantificados a porcentagem de sobrevivência – SOB (%), o comprimento da parte aérea e da parte radicular - CPA e CPR (cm), o número de raízes – NR, folhas verdes e senescentes- FV e FS, massa fresca e seca da parte aérea - MFPA e MSPA (mg) e massa fresca e seca da parte radicular - MFPR e MSPR (mg).

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio									
		SOB	CPA *	CPR *	NR	FV *	FS	MFPA *	MSPA *	MFPR *	MSPR *
Meio	1	357.14	0.02	13.79 *	0.89	0.08	8.58	22.41	4.76	457.24	17.92
Tampa	1	357.14	2.55 *	4.44	5.14	37.72 *	0.08	13304.54 *	1114.47 *	6574.42 *	317.58 *
Meio * Tampa	1	357.14 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.00 ^{ns}	5.14 ^{ns}	0.22 ^{ns}	5.58 ^{ns}	0.03 ^{ns}	1.48 ^{ns}	1.92 ^{ns}	2.17 ^{ns}
Erro											
CV (%)	24	12.65	21.81	21.21	24.28	19.30	22.44	38.15	33.43	47.16	44.35

* O asterisco indica variáveis que apresentaram valor $p > 0,05$.