



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**



JESSICA COELHO VALERIANO

**MICROPROPAGAÇÃO DO IMBIRUÇU (*Pseudobombax
simplicifolium* A. Robyns) E DA BARAÚNA (*Schinopsis
brasilensis* Engl.) E USO DOS FLUOROCROMOS CMA3/DAPI
NA CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO IMBIRUÇU**

FEIRA DE SANTANA – BA

2016

JESSICA COELHO VALERIANO

**MICROPROPAGAÇÃO DO IMBIRUÇU (*Pseudobombax
simplicifolium* A. Robyns) E DA BARAÚNA (*Schinopsis
brasiliensis* Engl.) E USO DOS FLUOROCROMOS CMA₃/DAPI
NA CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO IMBIRUÇU**

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

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo

FEIRA DE SANTANA – BA

2016

Ficha catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

V254m Valeriano, Jessica Coelho
Micropropagação do Imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns) e da Baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e uso dos fluorocromos CMA3/DAPI na caracterização citogenética do Imbiruçu / Jessica Coelho Valeriano. – Feira de Santana, 2016.
71 f.: il.


Orientador: Nataniel Franklin de Melo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéricos Vegetais, 2016.


1. Imbiruçu - Citogenética. 2. Imbiruçu – Cultura *in vitro* 3. Baraúna – Cultura *in vitro*. 4. *Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns. 5. *Schinopsis brasiliensis* Engl. I. Melo, Nataniel Franklin de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 575

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiróz
(Universidade do Estado da Bahia)


Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana)


Dr. Nataniel Franklin de Melo
(Embrapa Semiárido)
Orientador e Presidente da Banca

Ao meu filho **Gabriel Coelho** e a minha mãe **Luzia Rodrigues**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido **DEUS**, na santíssima Trindade, pelo dom da vida, por ser meu amparo e refúgio, por todas as graças alcançadas e por conceder as forças necessárias para conquistá-las.

A nossa **Senhora** pelo seu amor e poderosa intercessão, advogando sempre em meu favor.

Ao meu filho, **Gabriel Coelho**, minha maior motivação e alegria de meus dias.

A minha mãe, **Luzia Rodrigues**, pelo exemplo de caráter e honestidade, pela educação, formação do meu caráter, assim como de meus irmãos (Jaendson e Jefferson), dedicação, amor e incentivo em minhas escolhas, pois graças a ela, devo esta vitória.

Ao meu esposo, **Alan Honorato**, pela ajuda, amizade, paciência, pelos conselhos e apoio durante o mestrado, pelas orações e companhia.

Aos meus irmãos **Jaendson e Jefferson**, pelo apoio, descontração e incentivo.

Ao meu orientador, **Nataniel Franklin de Melo**, pela orientação, paciência, disponibilidade e incentivo.

Ao Dr. Francisco Pinheiro de Araújo, por toda ajuda e disponibilidade quando precisei, pelo apoio e incentivo a vida acadêmica.

A equipe do laboratório de Biotecnologia (Ângela Katiussa, Maria do Socorro, Micaele, Aline, Maiane, Lívia, Hugo, Maziele, Uiliane, Carla, Larisse, Tamires Dália, Katherine, Francisco e Elenício) pela amizade e apoio.

Em especial a Socorro e a Ângela, pela amizade, por todo ensinamento e disponibilidade sempre quando precisei, pelas correções e por ser exemplo de dedicação e responsabilidade.

Ao Antônio Pereira pelo ajuda durante a coleta do material vegetal.

A Universidade Estadual de Feira de Santana, pela oportunidade .

A CAPES pela concessão da bolsa e financiamento deste projeto.

Aos professores Ranieri, Adriana, Geraldo, Manoel Abilio pelas contribuições científicas e pelo conhecimento adquirido.

As minhas amigas Sheila, Bruna e Larissa pela amizade e apoio.

Ao grupo de Oração Anjo Gabriel, em especial, a Adalberto, pelos conselhos, por me mostrar o caminho certo a seguir.

A Flávia, Celso, Raphael pela sincera amizade, pelo apoio e orações.

A Rita, Valquiria, Julieta e Maria Pacífico pela amizade e orações.

MINHA FAMÍLIA! Por ser minha base de sustentação e ânimo.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para o sucesso deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

“Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento!”

Provérbios 3:13

Chegando o tempo do inverno,
Tudo é amoroso e terno,
Sentindo o Pai Eterno
Sua bondade sem fim.
O nosso sertão amado,
Estrumicado e pelado,
Fica logo transformado
No mais bonito jardim.

Neste quadro de beleza
A gente vê com certeza
Que a musga da natureza
Tem riqueza de incantá.
Do campo até na floresta
As ave se manifesta
Compondo a sagrada orquestra
Desta festa naturá.

Tudo é paz, tudo é carinho,
Na construção de seus ninho,
Canta alegre os passarinho
As mais sonora canção.
E o camponês prazentero
Vai prantá feção ligero,
Pois é o que vinga premero
Nas terras do meu sertão.

(A festa da Natureza - Patativa do Assaré)

RESUMO

As espécies *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Pseudocombax simplicifolium* A. Robins encontram-se amplamente distribuídas no semiárido brasileiro. A pressão sobre os recursos genéticos do bioma caatinga, principalmente, medicinal e madeireiro, seja devido ao uso para subsistência ou comercial, tem levado à perda da variabilidade genética destas espécies. Em vista a isto, a cultura de tecidos e a citogenética podem auxiliar nas estratégias de caracterização e propagação de suas populações. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de reguladores de crescimento e meios de cultura no estabelecimento e multiplicação *in vitro* das duas espécies, bem como o uso dos fluorocromos CMA3/DAPI na caracterização citogenética do imbiruçu. Em *P. simplicifolium*, avaliou-se diferentes concentrações dos sais DKW, acrescidos ou não com carvão ativado e diferentes concentrações de BAP e AIB no estabelecimento e multiplicação da espécie. Em *S. brasiliensis*, avaliou-se os meios DKW e WPM e o uso do carvão ativado e da polivinilpirrolidona na redução da oxidação, e o efeito de diferentes concentrações de BAP e AIB no meio WPM no estabelecimento do cultivo *in vitro* da espécie. Em *S. brasiliensis*, a adição de BAP ao meio de cultura não favoreceu a multiplicação *in vitro* da espécie. Em *P. simplicifolium* as respostas para as variáveis estudadas variaram em função das concentrações dos reguladores e entre os genótipos da espécie. Concentrações acima de 4,92 e 6,64 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB inibiram a multiplicação *in vitro* em ambas espécies. A dupla coloração CMA₃/DAPI permitiu a visualização de $2n= 84$ cromossomos e diferentes números de blocos CMA⁺ nos genótipos estudados de *P. simplicifolium*.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagação, reguladores de crescimento, cromossomos, caracterização citológica, fluorocromos.

ABSTRACT

Schinopsis brasiliensis Engl. and *Pseudobombax simplicifolium* A. Robins are species widely distributed in the Brazilian semi-arid. The pressure on the genetic resources from Caatinga biome, mainly medicinal and for wood, caused by subsistence or commercial use, leads to reduce genetic variability of these species. Based on that, the cytogenetic and the tissue culture can support the characterization and propagation strategies of their populations. The research goals of this study were evaluate growth regulators and culture media effects on the establishment and *in vitro* micropropagation for the species, and the use of fluorochromes CMA3/DAPI in the cytogenetic characterization of *P. simplicifolium*. For *P. simplicifolium* it was evaluated different DKW ingredient concentration, added or not activated charcoal and different concentration of BAP and IBA on the establishment and *in vitro* multiplication of the species. For *S. brasiliensis*, it was evaluated the micropropagation media DKW and WPM (with different concentration of BAP and IBA) and the use of activated charcoal and polyvinylpyrrolidone to reduce the oxidation during establishment of *in vitro* cultivation of the species. In *S. brasiliensis*, the addition of BAP in the micropropagation media did not promote *in vitro* multiplication of the species. In *P. simplicifolium*, the results obtained for variables studied varied depending on the regulators concentrations and among genotypes. Concentrations above 4.92 and 6.64 $\mu\text{M.L}^{-1}$ AIB inhibited the multiplication *in vitro* in both species. The double staining CMA3/DAPI allowed the visualization of $2n = 84$ chromosomes and different numbers of CMA⁺ blocks in the genotypes of *P. simplicifolium*.

Keywords: Micropropagation, growth regulators, chromosomes, cytological characterization, fluorochromes.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	20

CAPÍTULO I - EFEITO DE DOIS MEIOS DE CULTURA E DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DA BARAÚNA: (<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.) ESPÉCIE ARBÓREA COM OCORRÊNCIA NA CAATINGA.	25
---	----

RESUMO	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

CAPÍTULO II - MICROPROPAGAÇÃO DO IMBIRUÇU (<i>Pseudobombax simplicifolium</i> A. Robyns): ESPÉCIE ARBÓREA DA CAATINGA COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA MEDICINAL.	41
---	----

RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO III – COLORAÇÃO CROMOSSÔMICA DIFERENCIAL CMA₃/DAPI DE <i>Pseudobombax simplicifolium</i> A. Robyns.	59
--	----

RESUMO	60
ABSTRACT	61
INTRODUÇÃO	62
MATERIAIS E MÉTODOS	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	69

CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
-----------------------------	----

INTRODUÇÃO GERAL

A Caatinga é o único bioma restrito ao território brasileiro, com uma área de 844.453 km², representando cerca de 10% do território nacional e 70% da região Nordeste (IBGE, 2004), abrangendo os estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e parte do norte de Minas Gerais.

Esse ecossistema é muito importante do ponto de vista biológico por apresentar fauna e flora únicas, formada por uma vasta biodiversidade, rica em recursos genéticos e de vegetação constituída por espécies lenhosas, herbáceas, cactáceas e bromeliáceas. Aproximadamente 1.356 espécies já foram registradas para a região (MAIA, 2012), das quais 380 são endêmicas (MMA, 2002).

O aspecto seco das fisionomias dominadas por cactos e arbustos da caatinga sugere uma baixa diversificação da fauna e flora. No entanto, esse bioma é considerado mais rico que outras florestas secas da América do Sul, onde um olhar mais atento revela sua grande biodiversidade e sua beleza peculiar (PRADO, 2003; LEAL et al., 2003).

Dentre os biomas brasileiros, é o menos conhecido cientificamente e vem sendo tratado com baixa prioridade, não obstante ser um dos mais ameaçados, devido ao uso inadequado e insustentável dos seus solos e recursos naturais, e por ter apenas 1% de remanescentes protegidos por unidades de conservação (ALVES et al., 2009; IBAMA, 2011; LEAL et al., 2003), está entre os mais alterados, sendo ultrapassado pela Mata Atlântica e Cerrado. Segundo o MMA (2002), 80% de seus ecossistemas originais já foram alterados, principalmente por meio de desmatamentos, agricultura, utilização de lenha para combustível, crescimento urbano, dentre outros processos de ocupação que começaram nos tempos do Brasil colônia, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos chaves e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região (IBAMA, 2011; LEAL et al., 2003).

Entre o ano de 2008-2009, em números absolutos, a Caatinga teve sua cobertura vegetal remanescente reduzida de 443.039,06 km² para 441.117,88 km², sofrendo, portanto, uma perda aproximada de 0,23%. No tocante ao desmatamento, a Caatinga teve sua cobertura vegetal nativa suprimida nesse período em 1.921,18 km² (IBAMA, 2011).

Segundo o MMA (2002), a região abriga uma população de 28 milhões de pessoas equivalente a 15,5% da população brasileira, onde grande parte dessa população que reside no domínio da Caatinga necessita dos recursos da sua biodiversidade para sobreviver, tais como:

alimentação, remédios, forragem para os mais variados tipos de rebanhos, madeira para construções, dentre outros. Atividades que permanecem importantes até hoje (LOIOLA, 2012).

As espécies típicas de extrato arbóreo da Caatinga têm usos variados na economia de subsistência da região (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009). Dentre os recursos disponíveis no bioma, o medicinal e o madeireiro sofrem uma maior pressão extrativista, sendo a casca do caule o produto mais utilizado para fins medicinais, seguido das folhas e raízes. Muitas espécies medicinais também possuem uso madeireiro, sendo utilizadas, principalmente, para a produção de lenha, carvão e mourões (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). Essa forte pressão extrativista se dá não apenas pelo seu uso local, mas pela existência de um amplo mercado consumidor. Esse comércio causa sério risco às populações dessas plantas, pois muitas vezes as pessoas envolvidas com a coleta desse recurso são descomprometidas e/ou desconhecem as técnicas adequadas de obter o produto desejado sem agredir as populações. Entre essas plantas, pode-se destacar a aroeira, o mulungu, a baraúna, o angico e a imburana-de-cheiro (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2001).

De acordo com Albuquerque e Andrade (2001), a manipulação de plantas pelas pessoas em regiões semiáridas depende de vários fatores que vão desde a demanda e disponibilidade temporal dos recursos até o grau de interesse por um recurso em especial.

Segundo o MMA (2008) 165 espécies da flora do bioma Caatinga encontram-se ameaçados de extinção. Dentre essas espécies está a baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) a qual se encontra na categoria vulnerável com uma redução no tamanho da população estimada de mais de 30% durante os últimos 10 anos.

A baraúna pertence à família Anacardiaceae e seu nome vem do tupi *ibirá-uma* (madeira preta) (MAIA, 2012), ocorrendo naturalmente em baixas densidades. A espécie possui crescimento muito lento e dependente de condições abióticas específicas para atingir a maturidade (BIODIVERSITAS, 2005).

A espécie apresenta porte arbóreo, podendo atingir até 15m de altura e 20 a 60 cm de diâmetro, com ramos providos de espinhos e folhas compostas (BRAGA, 1976; MAIA, 2012). As flores são pequenas (3-4 mm de diâmetro), brancas, suavemente perfumadas, dispostas em panículas de até 10-12 cm (MAIA, 2012).

A madeira é o principal produto extrativista da espécie, de grande valor econômico, apresenta cerne duro e resistência a fungos xilófagos (BIODIVERSITAS, 2005; PAES et al., 2005). Excelente para usos externos, principalmente para a produção de mourões, estacas e postes, usada também na construção civil, para obras internas, na carpintaria, como vigas,

ripas, linhas. Pode ser utilizada também para a produção de álcool combustível. Na medicina caseira é utilizada contra histeria e o nervosismo, o chá feito da casca é usado, pelos índios Kariri-xoco, para aliviar dores de ouvido. Em animais domésticos é utilizada popularmente, no tratamento de verminoses. Além dos usos em paisagismo, sistemas agroflorestais, apicultura e forragem (MAIA, 2012).

A propagação sexuada da espécie apresenta taxa de germinação em torno de 50%, sendo necessária a escarificação mecânica das sementes, visto que, as mesmas são envoltas por tegumento rígido (SIQUEIRA-FILHO et al., 2009). Até o momento não estão relatados métodos eficientes de propagação vegetativa, revelando a necessidade de novas técnicas de propagação, principalmente para a preservação e conservação da espécie (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2008).

Outra espécie endêmica do bioma Caatinga é o imbiruçu (*Psdeubombax simplicifolium*), esta por sua vez, apesar de não estar presente na lista das espécies ameaçadas de extinção, pelo intenso uso extrativista, também é explorada para fins múltiplos.

O gênero *Pseudobombax* Dugand pertence à família Malvaceae, subfamília Bombacoideae. Estudos de filogenia, baseados em dados moleculares associados com dados morfológicos das antigas famílias Malvaceae e Bombacaceae, mostraram que a distinção destas famílias é insustentável, evidenciando a existência de uma única família monofilética, Malvaceae (ALVERSON et al., 1999; BAUM e OGINUMA, 1994), e por esta razão os gêneros que compunham as Bombacaceae, estão sendo tratados entre as Malvaceae (SOUZA e LORENZI, 2008).

A subfamília Bombacaceae, no Brasil, está representada aproximadamente por 14 gêneros e 120 espécies distribuídas em todo o território brasileiro, onde o gênero *Pseudobombax* é representado por 20 espécies com distribuição neotropical (ROBYNS, 1963), das quais 16 ocorrem no Brasil (CARVALHO-SOBRINHO, 2006).

Dentre estas, encontra-se a espécie *P. simplicifolium* que apresenta distribuição restrita à região Nordeste do Brasil, ocorrendo nos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí. Em Pernambuco, sua distribuição parece ser restrita ao extremo oeste do Estado, na zona de caatinga, em solos arenosos, onde aparecem grandes populações. Esta espécie pode ser facilmente reconhecida pela presença de ramos abreviados (braquiblastos), com os inferiores descendentes, alcançando quase o chão, e os superiores ascendentes e pelas folhas unifolioladas agrupadas no ápice de braquiblastos, distinguindo-a das demais espécies do gênero mesmo quando folhas, flores e/ou frutos estão ausentes (BOCAGE e SALES, 2002; CARVALHO-SOBRINHO, 2006).

A árvore pode atingir até 18 m de altura, o tronco apresenta estrias verdes longitudinais. Além disso, caracteriza-se pelos folíolos glabros, flores com cálice externamente glabro, androceu sem falanges, tubo estaminal 9-13 mm comprimento, glabro e cápsulas oblongas, apiculadas (CARVALHO-SOBRINHO, 2006). Floresce entre os meses de maio e setembro e frutifica entre agosto e novembro (MACIEL et al., 2012).

No tocante à importância econômica, as Bombacaceae são usadas para diversos fins. A paina das espécies de *Pseudobombax* é utilizada como isolante térmico, no enchimento e na confecção de bóias e salva-vidas. A madeira, embora frágil e de baixas durabilidade e densidade, é usada no enchimento e revestimento de miolo de compensados de portas e na confecção de brinquedos (LORENZI, 2002).

Embora não existam na literatura registros que comprovem o potencial medicinal da espécie *P. simplicifolium*, a população que reside no domínio da caatinga utiliza na medicina caseira a casca da árvore no tratamento de inflamações do sistema urinário (Figura 1). De acordo com Maia (2012) a população do estado do Ceará, região endêmica da espécie *P. marginatum* A. Robyns, também utiliza a casca desta espécie para tratar inflamações das vias urinárias.



Foto: Valeriano, J.C.

Figura 1. Extração da casca do imbiruçu (a) e pluma do fruto do imbiruçu (b) no município de Queimada Nova – PI.

Apesar da baixa disponibilidade de relatos na literatura sobre o uso da espécie imbiruçu comparado com outras espécies com ampla ocorrência no semiárido, é necessário destacar a sua importância em programas de reflorestamento de áreas degradadas, principalmente, por apresentar crescimento rápido (MACIEL et al., 2012; LORENZI, 2002).

De acordo Maciel et al. (2012) devido à ocorrência preferencial por solos arenosos, a espécie pode ser utilizada para a recuperação das áreas degradadas na Ecorregião Dunas do São Francisco, visto que esta região apresenta maior potencial para o estabelecimento das populações de *P. simplicifolium*.

As duas espécies apresentam polinização cruzada, indicando alogamia (KIILL, 2008; NASARIO, 2014). Santos et al. (2007) observaram por meio de marcadores RAPD a existência de variabilidade genética intraespecífica em indivíduos das populações de baraúna, aroeira e umburana de cheiro, coletados em diferentes áreas de ocorrência natural dessas espécies. Os autores sugerem a execução de estratégias que resultem no estabelecimento de um maior número de áreas de proteção ambiental para conservação *in situ* ou amostragens de um maior número de indivíduos, em diferentes unidades de paisagens para preservação *ex situ*.

Portanto, considerando a importância dessas espécies, tornam-se necessárias medidas de caracterização de suas populações, bem como o estabelecimento de técnicas para sua propagação e caracterização citológica, destacando-se, nesse caso, a cultura de tecidos vegetais e a citogenética.

A cultura de tecido vegetal envolve uma série de técnicas assépticas que permitem a produção de plantas inteiras regeneradas *in vitro* ou a indução e manutenção de massas de células indiferenciadas, chamadas de calos (LOYOLA-VARGAS e VARQUEZ-FLOTA, 2006). A técnica baseia-se na teoria de totipotência celular, a qual se caracteriza pela capacidade que a célula, tecido ou órgão têm para expressar o genoma completo por divisão celular, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados (TORRES et al., 2001; HUSSAIN et al., 2012).

Essa técnica representa uma alternativa de suporte a programas de conservação e reflorestamento de populações de espécies ameaçadas de extinção através das técnicas de micropropagação (LOYOLA-VARGAS e VARQUEZ-FLOTA, 2006; TAMTA et al., 2008). A micropropagação permite a obtenção massal de mudas com características genéticas idênticas às da planta-matriz a partir de genótipos selecionados, em um curto período de tempo, sob condições controladas (COSTA et al., 2010; FORSTER et al., 2013).

O sucesso da micropropagação depende de vários fatores, como os nutritivos, ambientais e endógenos (MELO et al., 1999). De acordo com Niedz e Evens (2007) a qualidade das respostas morfogenéticas dos tecidos *in vitro* são fortemente influenciadas pelo tipo e concentração dos nutrientes fornecidos no meio básico de cultivo (Tabela 1). De acordo com Grattapaglia e Machado et al., (1998), em espécies lenhosas, o meio MS não tem se

mostrado satisfatório em alguns casos, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes proporcionaram melhor desempenho, Melo et al., (1999) avaliaram o efeito de três formulações de meios de cultura no estabelecimento *in vitro* da aceroleira, concluindo que meios DKW (DRIVER e KUNIYUKI, 1984) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) foram os mais eficientes.

Tabela 1- Composição dos meios MS (Murashige e Skoog, 1962), DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) e WPM (Lloyd e McCown, 1981).

Componentes	MS mg.L ⁻¹ (mM)	DKW mg.L ⁻¹ (mM)	WPM mg.L ⁻¹ (mM)
NH ₄ NO ₃	1650 (20,6)	1,416 (17,68)	400 (4,9)
KNO ₃	1900(18,8)	-	-
H ₃ BO ₃	6,2 (0,1)	4,8 (0,078)	6,2 (0,1)
KH ₂ PO ₄	170 (1,25)	265 (1,95)	170 (1,25)
K ₂ SO ₄	-	1,559 (8,96)	990 (5,69)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	1,967 (8,33)	556 (2,35)
KI	0,83 (0,005)	-	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25 (0,01)	0,39 (0,0156)	0,25 (0,01)
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,02 (0,0001)	-	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440 (2,99)	149 (1,01)	96 (0,65)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370 (1,5)	740,11 (3,0)	370 (1,5)
MnSO ₄ .H ₂ O	-	33,50 (0,19)	22,3 (0,13)
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3 (0,13)	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 (0,029)	-	8,6 (0,029)
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,02 (0,0001)	0,25 (0,001)	0,25 (0,001)
NiSO ₄ .6H ₂ O	-	0,005 (0,00002)	-
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	17 (0,057)	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3 (0,1)	45,4 (0,12)	37,3 (0,1)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8 (0,1)	33,8 (0,12)	27,8 (0,1)

Bosela e Michler (2008), por exemplo, relataram que formulações mais diluídas do meio básico DKW possibilitou melhores resultados no crescimento da parte aérea de noqueira

preta (*Juglans nigra* L.). Por outro lado, além de proporcionar maior crescimento, a diminuição da concentração dos sais no meio reduz o custo laboratorial, otimizando assim, o processo de micropropagação das espécies.

Porém, vale ressaltar que composição do meio de cultura não é a única variável determinante do sucesso da micropropagação, uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, e as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Nesse caso, os fitorreguladores também desempenham um papel fundamental no sucesso da multiplicação *in vitro*, com destaque para as auxinas e as citocininas. Além destes, o carvão ativado tem sido incorporado ao meio nutritivo para melhorar o crescimento ou promover a organogênese de uma ampla variedade de espécies (CID e TEIXEIRA, 2010).

Ao nível celular, as auxinas controlam processos básicos, tais como a divisão celular e expansão das células (GEORGE et al., 2008; SMITH, 1978). Já as citocininas desempenham um papel em praticamente todas as fases de desenvolvimento da planta, no controle da divisão celular, na formação de flores e frutos. Elas afetam o metabolismo, incluindo as atividades de enzimas e a biossíntese de fatores de crescimento (SMITH, 1978). Na cultura de tecidos as citocininas geralmente induzem a formação de brotos e proliferação gemas axilares (HUSSAIN, et al., 2012).

A combinação de auxinas e citocininas tem impacto em processos diferentes no desenvolvimento da planta, estando envolvidas na iniciação e crescimento dos brotos, e a ação conjunta destes reguladores está vinculada ao processo de divisão e alongamento celular. Divisões celulares normais requerem sincronia entre a fase S e a divisão celular, o que sugere que os níveis de auxina e citocinina em culturas devem ser cuidadosamente combinados (LOYOLA-VARGAS e VARQUEZ-FLOTA, 2006; GEORGE et al., 2008).

Por outro lado, alguns fatores dificultam o processo de estabelecimento e multiplicação das espécies lenhosas *in vitro*, tais como as contaminações por microorganismos e as oxidações. Esta última ocorre devido a liberação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante (SATO et al., 2001). Para controlar a oxidação Grattapaglia e Machado (1998) recomendaram a lavagem do material em água corrente, auxiliando a lixiviação dos compostos fenólicos e a utilização de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado e polivinilpirrolidona (PVP).

O carvão ativado apresenta propriedades físico-químicas interessantes, devido ao seu alto poder de adsorção. Esta substância tem beneficiado a formação de raízes adventícias em várias espécies lenhosas, adsorvendo uma série de substâncias liberadas pelos explantes,

incluindo substâncias tóxicas, fenóis e/ou quinonas, produzidas durante a autoclavagem do meio de cultura, ou liberadas de explantes devido a injúrias provocadas pelo corte no tecido dos explantes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; SOUZA e PEREIRA, 2007). Por sua vez, o PVP atua na transformação dos compostos fenólicos liberados pelo explante no meio de cultura, devido à formação de pontes de hidrogênio (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

As contaminações são causadas principalmente por bactérias endógenas, representando uma grande limitação no estabelecimento das culturas (XAVIER et al. 2009). Pelo exposto, torna-se mais fácil trabalhar com plântulas germinadas em condições assépticas.

Por outro lado, as análises citogenéticas podem trazer contribuições indispensáveis no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e mesmo de trabalhos de melhoramento com as espécies. Estas pesquisas têm contribuído para o estudo da evolução, principalmente porque os cromossomos constituem o próprio material genético, o que os torna significativos para o rumo evolutivo das espécies. Cada cromossomo ou par de cromossomos representa um papel decisivo no desenvolvimento de um indivíduo. Por isso, o número de cromossomos e as variantes que cada um deles apresenta, dentro de uma espécie, são dados importantes para a determinação da posição filogenética e taxonômica, sendo então, um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citológica (GUERRA, 1998).

Com a introdução das técnicas de bandeamento, possibilitou-se a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), havendo um avanço significativo na caracterização dos cromossomos (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2005). Essa técnica permite a identificação das regiões heterocromáticas formadas por sequências de DNA repetitivo, que apresentam muitas vezes uma proporção de pares de bases guanina e citosina (GC) ou de adenina e timina (AT) diferente do resto do genoma (GUERRA, 1993; GUERRA et al., 2000).

Os fluorocromos comumente mais utilizados são a cromomicina A_3 (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). O CMA se liga preferencialmente às regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC, enquanto o DAPI se liga preferencialmente a regiões ricas em pares de bases AT (SCHWEIZER e AMBROS, 1994).

Não existem na literatura trabalhos relacionados à micropropagação e a caracterização citológica da espécie imbiruçu. Observam-se poucos registros na literatura relacionados à citogenética de algumas espécies do gênero *Pseudobombax*, merecendo destaque os trabalhos de Baker e Baker (1968), que identificou números cromossômicos $2n = 72$ e 88 na espécie *P. ellipticum*, $2n = 84$ em *P. grandiflorum* (NASARIO, 2014) e em *P. munguba* (MORAWETZ, 1986), $2n = 88$ em *P. tomentosun*, *Pseudobombax* sp. (NASARIO, 2014) e em *P. longiflorum*

(FORNI-MARTINS, 2000). A subfamília Bombacaceae é caracterizada por apresentar cromossomos pequenos e numerosos (BAKER e BAKER, 1968), onde o número cromossômico nesta subfamília pode variar de $2n= 72$ em *P. ellipticum* a ca. $2n= 276$ em *Eriotheca pubescens* (BAUM e OGINUMA, 1994).

Diante do potencial que as espécies *S. brasiliensis* e *P. simplicifolium* apresentam, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas que aumentem a eficiência das estratégias de propagação e de conhecimento da variabilidade genética, mediante a caracterização citológica e o estabelecimento de protocolos de multiplicação *in vitro* dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta botânica Brasília**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 27, n. 7, p.336-346, 2002.
- ALVERSON, W. S. et al. Phylogeny of the core malvales: evidence from *ndhf* sequence data. **American Journal of Botanic**, v. 86, n. 10, p. 1474-1486, 1999.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da caatinga: Uma investigação ecogeográfica. UFERSA. **Caatinga**, Brasil, v. 22, n3, p. 126-135, 2009.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB. p. 261-330, 1998.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. Chromosome numbers in the Bombacaceae. **Botanical Gazette**, v. 129, n.4, p. 294-296, 1968.
- BAUM, D. A.; OGINUMA. K. A review of chromosome numbers in Bombacaceae new counts for *Andansonia*. **Taxon**. v.43, n.1, p. 11-20, 1994.
- BIODIVERSITAS. **Lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. 2005. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/destaque_flora.asp>. Acesso em: 30 de Setembro de 2014.
- BOCAGE, A. L. D.; SALES, M. F. de. A Família Bombacaceae Kunth no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Basílica**. v. 16, n.2, p. 123-139, 2002.
- BOSELA, M. J.; MICHLER, C. H. Media effects on Black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth *in vitro*: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.44, n.4, p. 316-329, 2008.

BRAGA, Renato. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3.ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. 540p.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C. et al. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploids *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.2, p. 308-313, 2005.

CARVALHO-SOBRINHO, Jefferson Guedes de. **O gênero *Pseudobombax* Dugand (Malvaceae s. l., Bombacoidade) no estado da Bahia, Brasil**. 2006. 1v. 166f Dissertação (Mestrado em Botânica) - UEFS, Feira de Santana, BA.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. **Cultivo in vitro de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15-49.

COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n.5, p. 1090-1096, 2010.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation walnut rootstock. **Horticultural Science**. v.19, p.507-509, 1984.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 455-464, 2002.

FORNI-MARTINS, E. R.; MARTINS, F. R. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4. 2000.

FORSTER, N.; MEWIS, I.; ULRICH, C. Moringa Oleifera- Establishment and multiplication of different ecotypes *in vitro*. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p.21-31, 2013.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht. The Netherlands, 3ed, v.1, 2008. 501p.

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

GUERRA M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v.71, p. 234-241, 1993.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Guanabara. Rio de Janeiro, 1998.

GUERRA, M.; SANTOS K. G. B.; SILVA, A. E. B.; EHRENDORFER F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioidae - A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, v.87, p.735-747, 2000.

HUSSAIN, A. et al. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A.; RINALDI, L. M.R. **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. Intech, 2012. 220p.

IBAMA, **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por Satélite**. Relatório. 2011. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/arquivos/relatoriofinal_cerrado_2010_fi nal_72_1.pdf>. acesso em 20 de agosto de 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação.** Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso em: 28 de Setembro de 2014.

KILL, L. H. P.; MARTINS, C. T. V. D.; SILVA, P. P. Biologia reprodutiva de duas espécies de Anacardiaceae da Caatinga ameaçadas de extinção. In: ALBIQUERQUE, U. P.; MOURA, A. N.; ARAÚJO, E. L. **Biodiversidade, Potencial Econômico e Processos Eco-Fisiológicos em Ecossistemas Nordestinos.** Bauru, SP, 2010. 538 p.

LEAL, I.R., TABARELLI, M. & SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga.** Ed. Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003. 822p.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1981.

LOIOLA, M. I. B.; ROQUE, A. A. de; OLIVEIRA, A. C. P. de. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Ecologia**, v. 4, p. 14-19, 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** v.2. 2ªed. Editora Plantarum. Nova Odessa – SP. 2002. p.368.

LOYOLA-VARGAS, V.; VARQUEZ-FLOTA, F. An introduction to plant cell culture: Back to the future. In: **Plant Cell Culture Protocols: Methods in molecular biology.** Humana press, Toyowa, New Jersey. 2ed. 2006. 385 p.

MACIEL, J. R.; FERREIA, J. V. A.; SIQUEIRA FILHO, J. A. de. Modelagem de distribuição de espécies arbóreas na recuperação de áreas degradadas da caatinga. In:

MAIA, G. N. **Caatinga: Árvores e arbustos e suas utilidades.** 2 ed. Fortaleza-CE. Printcolor Gráfica e Editora, p. 20, 2012.

MELO, N. F. de. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n.1, p. 102-107, 1999.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga.**2002. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/biodivbr.pdf>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2014.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº6, de 23 de Setembro de 2008.**Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

MORAWETZ, W. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematic and Evolution.** v. 152, p. 49-100, 1986.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 437-497, 1962.

NASARIO, João Paulo Sardin. **Biologia floral, reprodutiva e cariótipos de espécies de *Pseudobombax Dugand* (Bombacoideae, Malvaceae) do Sudeste do Brasil**. 2014. 1v. 91f Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - UNICAMP, Campinas, SP.

NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. In vitro Cellular and Developmental Biology, **Society for *in vitro* Biology**, v.43, n.4, p. 370-381, 2007.

OLIVEIRA, M. C. P.; OLIVEIRA, G. J. Superação de dormência de sementes de *Schinopsis brasiliensis*. **Ciência Rural**, v. 38, n.1, p. 251-254, 2008.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semiárido brasileiro a fungos causadores da podridão mole. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 365-371, 2005.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (orgs.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco. 2003. p 3-74.

ROBYNS, A. Flora of Panama. Bombacaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v.51, p.37-68,1964.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. de; KIILL, L. H. P.; SÁ, I. I. S. Variabilidade genética, com base em marcadores RAPD, de três espécies arbóreas ameaçadas de extinção no semi-árido brasileiro. **Scientia Forestalis**, n. 74, p. 37-44, 2007.

SATO, A. Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp: Controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SCHWEIZER D.; AMBROS P.F. Chromosome banding. In: Gosden J.R. Methods in Molecular Biology. **Chromosome Analysis Protocols**, v. 29, p. 97-113, 1994.

SIQUEIRA-FILHO, J. A.; SANTOS, A. P.B.; NASCIMENTO, M. F. S.; ESPÍRITO-SANTO, F. S. **Guia de Campo de Árvores da Caatinga**. Petrolina, PE: editora e gráfica Franciscana Ltda. 2009. 64p.

SIQUEIRA FILHO, J. A. de (orgs.). **Flora das Caatingas do Rio São Francisco: História natural e conservação**. 1ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2012. p. 230-259.

SMITH, H. **The Molecular Biology of Plant Cells**. Berkeley:University of California, Los Angeles, 1978.484p.

SOUZA, V. C. e LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2 ed., Instituto Plantarum, 2008. 640p.

TAMTA, S.; PALNI, L. M. S.; PUROHIT, V. K.; NANDI, S. K. *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.44, n.2, p. 136-141, 2008.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. Brasília:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA Hortaliças, 2001. p. 20.

XAVIER A., WENDLING L., SILVA R.L. **Silvicultura clonal:** Princípios e técnicas. Viçosa, MG: Editora UFV, 272 p. 2009.

CAPÍTULO I

**EFEITO DE DOIS MEIOS DE CULTURA E DE REGULADORES DE
CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN VITRO* DA BARAÚNA: (*Schinopsis brasiliensis* Engl.)
ESPÉCIE ARBÓREA COM OCORRÊNCIA NA CAATINGA**

Efeito de dois meios de cultura e de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* da baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.): Espécie arbórea com ocorrência na Caatinga

RESUMO

A espécie arbórea, baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), endêmica da região Nordeste, apresenta-se na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção, devido ao uso irracional da sua madeira. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos meios de cultura DKW e WPM combinados com dois tipos de antioxidantes em diferentes concentrações de BAP e AIB no estabelecimento do cultivo *in vitro* da baraúna. Em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais obtidos de plantas mantidas em casa de vegetação, foram desinfestados com 0,2% de cloridrato de Kasugamicina e solução de NaClO₂ (20%). No experimento de estabelecimento *in vitro*, foram avaliados os meios de cultura DKW e WPM e os antioxidantes carvão ativado e polivinilpirrolidona-PVP, em esquema fatorial 2x2 (meio x antioxidante). No segundo experimento, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de BAP e do AIB, combinadas entre si, em esquema fatorial 4x4 (concentrações de BAP x concentrações de AIB). Após 30 dias de cultivo *in vitro* observou-se que o meio de cultura WPM acrescido de PVP é o mais indicado para o estabelecimento do cultivo *in vitro* da baraúna. Não se observou efeitos significativos na multiplicação *in vitro* da espécie com as concentrações de BAP utilizadas. Porém, verificou-se que a concentração ideal para a multiplicação da espécie foi de aproximadamente 1,48 µM.L⁻¹ de AIB. Concentrações acima de 4,92 µM.L⁻¹ da auxina inibiram o comprimento dos brotos e do número de folhas.

Palavras-Chave: Estabelecimento, micropropagação e conservação *in vitro*.

**Effect of two culture medias and growth regulators on *in vitro* culture of baraúna
(*Schinopsis brasiliensis* Engl.): Aboreal specie of occurrence in Caatinga**

ABSTRACT

The arboreal species baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), endemic to the Brazilian Northeast, is listed in the Brazilian endangered species, due to irrational use of its wood. This study proposed evaluate the effect of culture media DKW and WPM combined with two types of antioxidants in different concentrations of BAP and IBA in cultivation *in vitro* for baraúna establishment. In the laminar flow cabinets, nodal segments were obtained from plants grown in a greenhouse and they were disinfected with 0.2% kasugamycin hydrochloride and NaClO solution (20%). For the *in vitro* establishment experiment, the DKW and WPM culture media were evaluated combined with activated charcoal and polyvinylpyrrolidone – PVP antioxidants, on a 2x2 factorial design (media x antioxidant). The second experiment was design to evaluate the effect of different concentrations of BAP and IBA, combined with each other, in a 4x4 factorial (BAP concentrations x IBA concentrations). After 30 days *in vitro*, the WPM culture media combined with PVP proved to be more favorable for baraúna development. The treatment with BAP did not exhibited significant effects on multiplication *in vitro*. However, this study allowed to discover the optimal concentration for the specie multiplication, which is approximately $1.48 \mu\text{M.L}^{-1}$ of IBA. Auxin concentrations above $4.92 \mu\text{M.L}^{-1}$ inhibit shoots length and leaf number.

Keywords: Establishment, conservation and micropropagation *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) é uma árvore da família das anacardiáceas, nativa do Brasil, especialmente da região Nordeste, com ocorrência também no Centro-Oeste e no estado de Minas Gerais (LORENZI, 2002). A madeira é o principal produto extrativista da espécie, de valor econômico, apresentando cerne duro e resistência a fungos xilófagos (BIODIVERSITAS, 2005; PAES et al., 2005), sendo uma alternativa para a produção de mourões, estacas e postes. Além disso, na medicina caseira essa espécie é utilizada contra histeria e o nervosismo (MAIA, 2012), e a exploração irracional a coloca na lista de espécies ameaçadas de extinção, de acordo com o art. 3º da lei nº 10.683/2003 (MMA, 2008).

A propagação da espécie *S. brasilienses* ocorre somente por via sexuada, com viabilidade germinativa em torno de 50%. A semente da baraúna apresenta dormência devido a presença de um tegumento rígido, sendo necessário a escarificação mecânica para a quebra de dormência da mesma. Até o momento não se encontram registrados na literatura métodos eficientes de propagação vegetativa da espécie, (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2008; SIQUEIRA-FILHO et al., 2009) revelando a necessidade de novas técnicas de propagação, principalmente para a preservação e conservação da baraúna.

Diante do exposto, as técnicas de micropropagação representam uma ferramenta importante para a multiplicação de diversas espécies arbóreas de importância econômica ou que encontram-se em extinção (TAMTA et al., 2008). A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de produção de mudas em grande escala, em condições fitossanitárias e em curto período de tempo, como também a conservação *in vitro* de genótipos como uma alternativa auxiliar e complementar da conservação convencional (FORSTER et al., 2013).

Por outro lado, um dos entraves da micropropagação de espécies lenhosas é a oxidação, que ocorre devido a liberação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante. Para o controle das oxidações, recomendam-se o uso de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado e polivinilpirrolidona -PVP (CORDEIRO et al., 2004; SATO et al., 2001).

O carvão ativado tem beneficiado a formação de raízes adventícias em varias espécies lenhosas, devido a sua propriedade de adsorção de uma série de substâncias liberadas pelos explantes, incluindo sustâncias tóxicas, fenóis e/ou quinonas. (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; SOUZA e PEREIRA, 2007). Outro antioxidante utilizado no controle da oxidação devido a sua propriedade adsorvente é o PVP, que por sua vez se ligam aos fenóis liberados pelo no

meio de cultura, devido à formação de pontes de hidrogênio (MELO et al., 2001; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

Por outro lado, a composição e concentração de hormônios e reguladores de crescimento no meio compõem os fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos (SOUZA e PEREIRA, 2007).

Assim como os reguladores, os nutrientes minerais que são componentes básicos fornecidos no meio de cultura, também compõem os fatores que influenciam no desenvolvimento das espécies *in vitro* (NIEDZ e EVENS, 2007). Os meios DKW e WPM são exemplos de meio mais diluídos que apresentarem concentrações de sais diferentes sendo indicados para o cultivo dessas espécies (BOSELA e MICHLER, 2008; MELO et al., 1999).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos meios básicos DKW e WPM combinados com dois tipos de antioxidantes (PVP e carvão ativado) em diferentes concentrações de BAP e AIB no estabelecimento do cultivo *in vitro* da baráúna.

MATERIAS E MÉTODOS

Para desenvolvimento do presente trabalho foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro para avaliação do estabelecimento *in vitro* e o segundo o efeito dos reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* da espécie. As plantas matrizes foram obtidas por germinação de sementes coletadas na área de Caatinga do Campo Experimental da Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina (9° 09' S, 40° 22' W), sendo estas escarificadas e colocadas para germinar em bandejas de plástico contendo substrato vermiculita. Após a germinação as plântulas foram transferidas para vasos contendo areia, solo e vermiculita, na proporção de 3:1:1 (v/v/v), respectivamente, e mantidas em casa de vegetação.

Para prevenção de contaminação *in vitro*, antes da coleta dos explantes, foram realizadas duas pulverizações nas plantas matrizes com o fungicida e bactericida cloridrato de Kasugamicina 0,5% com intervalo de um dia entre as pulverizações. Três dias após as pulverizações, segmentos nodais foram coletados, sendo feito um corte medial nas folhas, três lavagens com detergente neutro e enxágue em água corrente por cinco minutos cada. Em seguida, os explante foram transportados para o laboratório em recipiente contendo água destilada e 0,1 g. L⁻¹ de PVP (Polivinilpirrolidona).

Em câmara de fluxo laminar os segmentos nodais passaram por uma nova desinfestação com 0,2% de cloridrato de Kasugamicina (20 minutos) e 20% da solução comercial de hipoclorito de sódio (NaClO) durante 15 minutos, respectivamente, sendo feito três enxágues em água destilada autoclavada acrescida de PVP a $0,1 \text{ g.L}^{-1}$.

Em seguida, os segmentos nodais foram seccionados com cerca de 1,0 cm de comprimento, sendo feito cortes reto e em bisel, com o auxílio de um bisturi previamente esterilizado, nas extremidades distal e proximal, respectivamente. Posteriormente, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), os quais continham 10 ml de meio, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar e pH ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. Logo após, os tubos foram fechados com papel alumínio e vedados lateralmente com filme transparente de PVC.

Para a montagem deste experimento foram utilizados os meios de cultura DKW e WPM, cujas formulações encontram-se em MELO et al. (1999), e dois antioxidantes ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$ carvão ativado e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de PVP), compondo os seguintes tratamentos: T1 (DKW + PVP); T2 (DKW + carvão ativado); T3 (WPM + PVP) e T4 (WPM + carvão ativado), respectivamente. O experimento foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (meio x antioxidante), com 07 repetições cada. Após 60 dias em condições de cultivo *in vitro*, avaliaram-se os percentuais de explantes com raízes (ER), explantes com brotações (EB), número de folhas (NF), número brotos (NB) e comprimento dos brotos, além do percentual de contaminação e oxidação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias dos tratamentos foi feita utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Para a instalação do segundo experimento: Efeito de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* da baraúna, os explantes oriundos de plantas mantidas em casa de vegetação, após a etapa de desinfestação descrita acima, foram inoculados em meio WPM acrescido do antioxidante PVP. A escolha do meio de cultivo foi feita mediante os resultados obtidos no experimento anterior, suplementado com a citocinina benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de $0,0 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$; $2,22 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$; $4,44 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$ e $8,87 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$ e a auxina ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de $0 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$; $2,46 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$; $4,92 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$ e $9,84 \text{ } \mu\text{M.L}^{-1}$, em esquema de combinação fatorial.

O cultivo foi realizado em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e sob e fotoperíodo de 16 horas. O modelo estatístico foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4 (concentrações de BAP x concentrações de AIB) compondo assim 16 tratamentos com 4 repetições cada.

As avaliações foram feitas 30 dias após a inoculação, observando-se o índice de contaminação por fungos e bactérias, o número e comprimento dos brotos, número e comprimento das raízes, oxidação e formação de calos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial, a comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I- Estabelecimento *in vitro* *baraúna*

Com base nos resultados da análise de variância, observou-se efeito significativo da interação meio e antioxidante para as variáveis número de folhas (NF) e comprimento dos brotos (CB) ($p < 0,05$). Para número de brotos (NB), a análise revelou a inexistência de diferenças significativas ($p > 0,05$) tanto para os fatores isolados quanto a interação (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis CB, NF e NB, em explantes de *baraúna* (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) em função dos meios de culturas WPM e DKW combinação com os antioxidantes PVP e Carvão ativado. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

F.V	GL	QUADRADO MÉDIO		
		CB	NF	NB
MEIO	1	0,000089 ^{ns}	0,010048 ^{ns}	0,033405 ^{ns}
ANTIO	1	0,007232 ^{ns}	0,014101 ^{ns}	0,033405 ^{ns}
MEIO x ANTIO	1	0,085804*	3,177098*	0,000166 ^{ns}
Resíduo	24	0,004345	0,117955	0,015819
CV (%)		29,53	19,89	10,86

F.V – Fontes de Variação; CB- Comprimento dos Brotos; NF- Número de Folhas; NB- Número de Brotos; ANTIO- Antioxidante; ^{ns}- não significativo; *- significativo a 5% pelo teste F.

Para o CB e NF observa-se que a presença de carvão ativado no meio DWK promoveu maior comprimento médio do broto (2,7 mm) e do número de folha (3,64/explante) em relação ao meio WPM. Por outro lado, os explantes cultivados em meio WPM com a adição de PVP apresentaram respostas com aumentos de tamanho significativos, com média de 2,9 mm para o comprimento do broto e de 4,07 para o número de folhas (Tabela 2).

Tabela 2. Número de Folhas (NF), Número de Brotos (NB) e Comprimento dos Brotos (CB) em explantes de baráúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) cultivados *in vitro*, em função dos meios DKW e WPM combinados com os antioxidantes carvão ativado e polivinilpirrolidona (PVP). Embrapa Semiárido. Petrolina - PE, 2014.

MEIO	NF			NB			CB (mm)		
	Carvão	PVP	Médias	Carvão	PVP	Médias	Carvão	PVP	Médias
DKW	3,64 aA	1,50 bB	2,57a	1,00 Aa	0,86aA	0,93a	2,70aA	1,90bB	0,23a
WPM	1,57 bB	4,07 aA	2,82 a	0,86aA	0,72aA	0,79a	1,50bB	2,90aA	0,22a
Médias	2,61a	2,79 a		0,93 a	0,79 a		0,21 a	0,24 a	
CV (%)	19,89			10,86			29,53		

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esse tipo de resposta pode estar relacionada ao alto poder adsorvente do carvão ativado no meio de cultura. Em adição, deve-se também considerar que o meio WPM é mais diluído que o DKW (MELO et al., 1999), fato que associado ao uso do carvão ativado nos permite inferir que a redução no comprimento dos brotos pode estar ligado a uma menor disponibilidade de nutrientes do meio de cultivo. De acordo com Niedz e Evens (2007), a qualidade das respostas morfogênicas dos tecidos *in vitro* são fortemente influenciadas pelo tipo e concentração dos nutrientes fornecidos no meio básico de cultivo. Por exemplo, Schwalbert et al. (2015), relataram que a adição de 0,1% de carvão ativado no meio MS ½ restringe drasticamente o cultivo *in vitro* de *D. incanum*, visto que, a adição desse adsorvente inibiu o comprimento dos brotos e do número de folhas, observando-se também redução na formação de raízes em todos os tratamentos de carvão ativado testados. Em *Cordia verbenácea*, Lameira (1997), também relataram que a adição de carvão ativado (0,3%) no meio MS diminuiu a eficiência do meio para multiplicação de brotos. Leitzke et al. (2009) também constataram uma interação entre as concentrações de sais e de carvão ativado no meio de cultura no enraizamento de amoreira-preta. A análise de regressão revelou efeito negativo do carvão no número e comprimento das raízes conforme a redução da concentração dos sais do meio, onde em 50% da concentração de sais MS observou-se uma tendência linear descendente com o aumento da concentração do carvão ativado.

Observa-se na Figura 1, que o meio WPM acrescido de PVP é o mais indicado para o estabelecimento da espécie, pois, além de promover maiores valores médios para o CB e NF, observou-se baixo índice de oxidação (28,57%) dos explantes, embora a adição desse antioxidante em ambos os meios tenha promovido o mesmo índice de abscisão foliar

(14,28%). O meio DKW apresentou o maior índice de oxidação (64,26%) com a adição de PVP e de abscisão foliar com a adição de carvão ativado (64,28%).

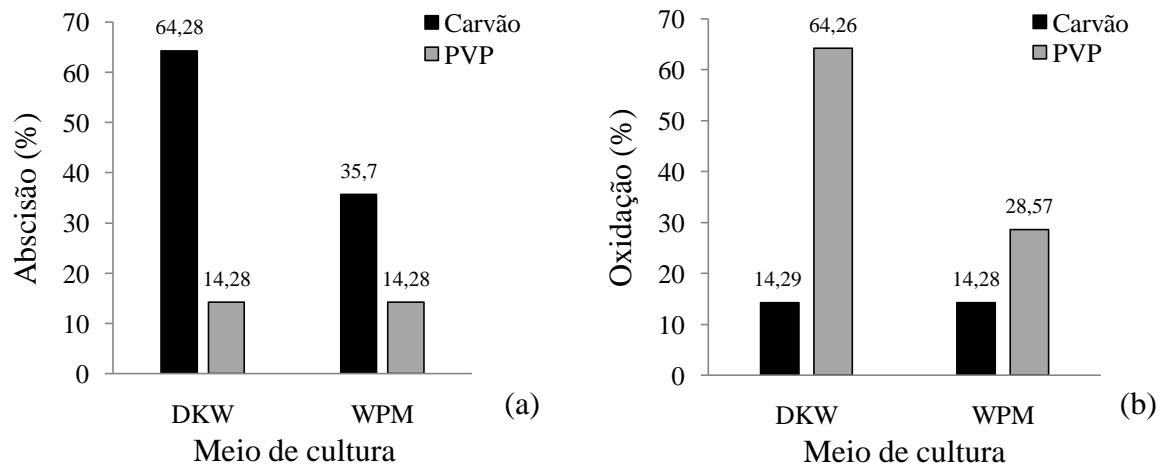


Figura 1. Índice de abscisão (a) e oxidação foliar (b) em explantes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) em função do meio e antioxidante. Embrapa Semiárido, Petrolina - PE, 2014.

Schwalbert et al. (2015) afirmaram que o efeito do carvão ativado no meio de cultivo varia conforme a espécie ou genótipo em estudo. Nota-se essa variação quando se compara com os efeitos positivos obtidos em estudos com outras espécies. Shimelis (2015), por exemplo, estudando o efeito do uso do carvão e do PVP no controle da oxidação e no estabelecimento de dois genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) observou que, tanto a adição do carvão quanto do PVP promoveram maiores índices de sobrevivência, quando comparado com a ausência desses antioxidantes, devido a redução dos compostos fenólicos no meio. Pacek-Bienik et al. (2010), estudando a influência do carvão na propagação *in vitro* de orquídea, observaram que a adição de 3 g.L⁻¹ de carvão ativado beneficiou a micropropagação da espécie, promovendo a formação de folhas com praticamente o dobro do comprimento das folhas e o triplo do comprimento das raízes quando comparado aos explantes inoculados em meio suplementado com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado. Esses autores não observaram desenvolvimento dos explantes no meio isento de carvão. Resultados benéficos do uso do carvão também foram obtidos por Moura et al. (2012), onde a suplementação com carvão ativado no meio de cultura, durante o enraizamento, proporcionou menor percentual de clorose foliar, comparado ao PVP, aumentando a qualidade das brotações nos explantes de sucupira-preta.

Para os quatro tratamentos avaliados não foram observados nenhuma contaminação fúngica ou bacteriana, o que indica eficiência na desinfestação do material vegetal.

Aos 60 dias de cultivo, observou-se a formação de raízes adventícias em 28,57% dos explantes no meio WPM + PVP, seguido dos explantes inoculados também no meio WPM

acrescido de carvão ativado. Não se observou a formação de raízes adventícias nos explantes inoculados no meio DKW + PVP (Figura 2).

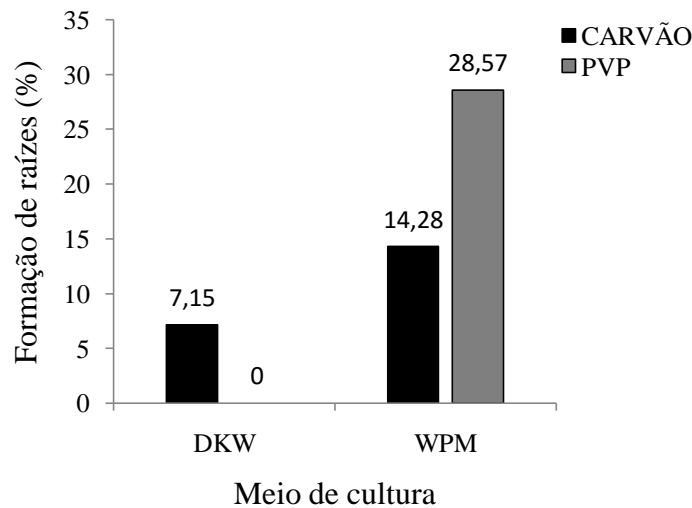


Figura 2. Percentual de formação de raízes durante o estabelecimento do cultivo *in vitro* de baraúna (*Schinopsis brasiliensis*Engl.).

Experimento II- Efeito de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro*

A análise de variância não revelou significância estatística para a interação BAP x AIB ($p \geq 0,05$). Porém observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) para o fator isolado AIB, para o variável comprimento dos brotos (CB) e número de folhas (NF). Para as demais variáveis não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos utilizados (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância das variáveis CB, NF e NB, em explantes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) em função de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento, BAP e AIB. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

F.V	GL	QUADRADO MÉDIO		
		CB	NF	NB
BAP	3	0,701042 ^{ns}	0,057199 ^{ns}	0,005699 ^{ns}
AIB	3	3,302238 [*]	0,196100 [*]	0,024550 ^{ns}
BAP X AIB	9	1,434229 ^{ns}	0,106556 ^{ns}	0,012176 ^{ns}
Resíduo	48	0,903554	0,058994	0,020436
CV (%)		40,13	17,93	11,74

F.V – Fontes de Variação; CB- Comprimento dos Brotos; NF- Número de Folhas; NB- Número de Brotos; BAP- Benzilaminopurina; AIB- Ácido Indolbutírico; ^{ns}- não significativo; ^{*}- significativo a 5% pelo teste F.

Pode-se observar nos gráficos de regressão polinomial uma tendência de curva quadrática tanto no comprimento do broto quanto para o número de folhas em função do aumento das concentrações da auxina. No presente estudo, o desdobramento das equações, $y = 2,618165 + 0,1783x - 0,3089x^2$ e $y = 1,5534 + 0,1216x - 0,1932x^2$, permitiram definir a

concentração ideal para o comprimento do broto como sendo de $1,43 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB (Figura 3a) e de $1,57 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB para o número de folhas (Figura 3b).

A análise de regressão revelou uma diminuição do comprimento dos brotos e do número de folhas em concentrações acima de $4,92 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB. A adição de BAP ao meio de cultura não promoveu efeitos significativos para as variáveis analisadas na espécie em estudo, principalmente para a variável número de brotos.

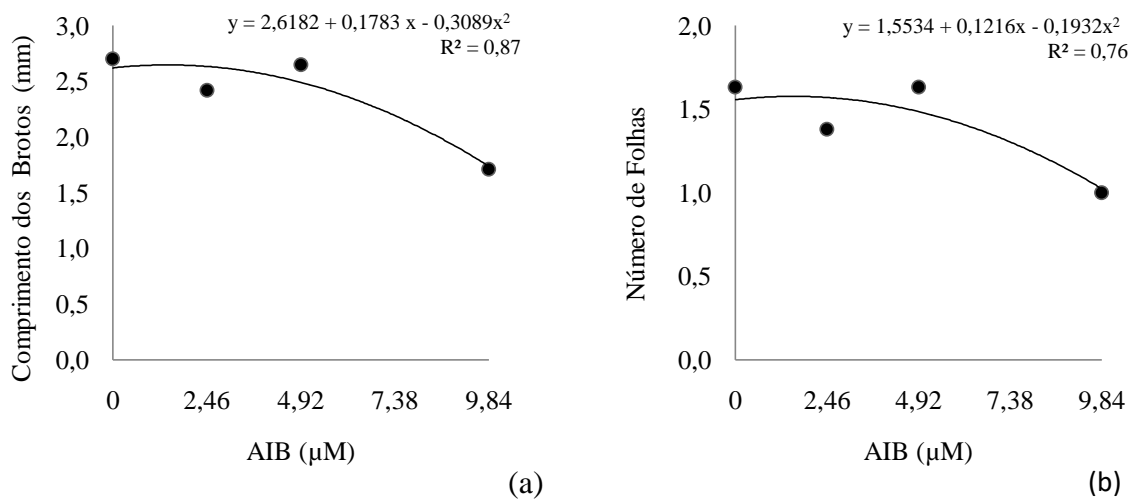


Figura 3. Comprimento médio dos brotos(a) e número médio de folhas (b) de baraúna em função das concentrações de AIB (μM) aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Só foi observado enraizamento em 25% dos explantes em três tratamentos (T1 (controle) T2 ($0,0 \mu\text{M.L}^{-1}$ BAP + $2,46 \mu\text{M.L}^{-1}$ AIB) e T5 ($2,22 \mu\text{M.L}^{-1}$ BAP + $0,0 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB) (Figura 4). Segundo Grimald et al. (2008) o tempo da indução das raízes adventícias varia amplamente entre espécies lenhosas. Resultados semelhantes ao presente estudo também foram obtidos por Erig et al. (2004) no enraizamento *in vitro* de Pereira (*Pyrus communis* L.), os quais observaram que as concentrações de 3,2 e $6,4 \mu\text{M}$ de ANA promoveram índices de 25,6 e 32,91 % de enraizamento, respectivamente. Em *Fraxinus angustifolia*, Tonon et al. (2001) relataram que os tratamentos com ANA não foram essenciais para o enraizamento da espécie, visto que resultados semelhantes também foram obtidos no tratamento sem auxina. Assis et al. (2012) observaram que a adição de ANA e BAP também não induziram respostas positivas na micropropagação do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), indicando que as concentrações utilizados não foram suficientes para suprir as eventuais deficiências hormonais endógenas nos explantes da espécie.



Figura 4. Cultivo *in vitro* de baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

O processo de rizogênese é único e complexo, cuja formação de raízes adventícias depende de vários fatores com grande interação entre eles. Porém, alguns pontos básicos influenciam no processo de rizogênese como as substâncias reguladoras de crescimento onde, dentre estas, algumas promovem o enraizamento e outras inibem. Entretanto, para todas há uma concentração ótima que pode variar tanto entre espécies, quanto entre populações ou clones. Além dos reguladores de crescimento, o estado nutricional da planta matriz, a composição do meio nutritivo, bem como as características do explante em si (respostas associadas ao estresse, fermentos e liberação de compostos fenólicos) influenciam no controle e desenvolvimento das raízes adventícias (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; ASSIS et al., 2004).

As substâncias fenólicas produzidas pelos explantes e liberadas para o meio de cultura também têm sido consideradas inibidoras do enraizamento. O acúmulo do etileno provoca o escurecimento das superfícies de corte dos explantes, difundem-se para o meio de cultura e são altamente inibitórios ao processo de rizogênese (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). A síntese desse hormônio pode ser promovida através de alguns estímulos, como fermentos nos órgãos ou tecidos provocados pela incisão feita pelo bisturi antes da inoculação e a aplicação exógena de auxina e citocinina que resulta no aumento da síntese de etileno do que quando esses hormônios não são aplicados (SUTTLE e HULTSTRAND, 1991).

A liberação dos compostos fenólicos durante o cultivo *in vitro* tem influência sobre os resultados da micropropagação (AHMADIAN et al., 2013). O escurecimento de explantes tem sido relatado como uma dificuldade no estabelecimento de culturas *in vitro* em algumas espécies lenhosas (OLIVEIRA et al., 2007), devido a liberação de compostos fenólicos no meio. Porém, no presente estudo só foi observado oxidação em 50% dos explantes nos tratamentos T1 e T2 e em 25% dos explantes dos tratamentos T7, T8 e T16 (Figura 5b). Por

outro lado, foram observados formação de calos entre 50 e 100% em todos os tratamentos avaliados (Figura 5a). Segundo Hamann (1998) a formação de calos em espécies lenhosas, geralmente, precedem a formação de raízes.

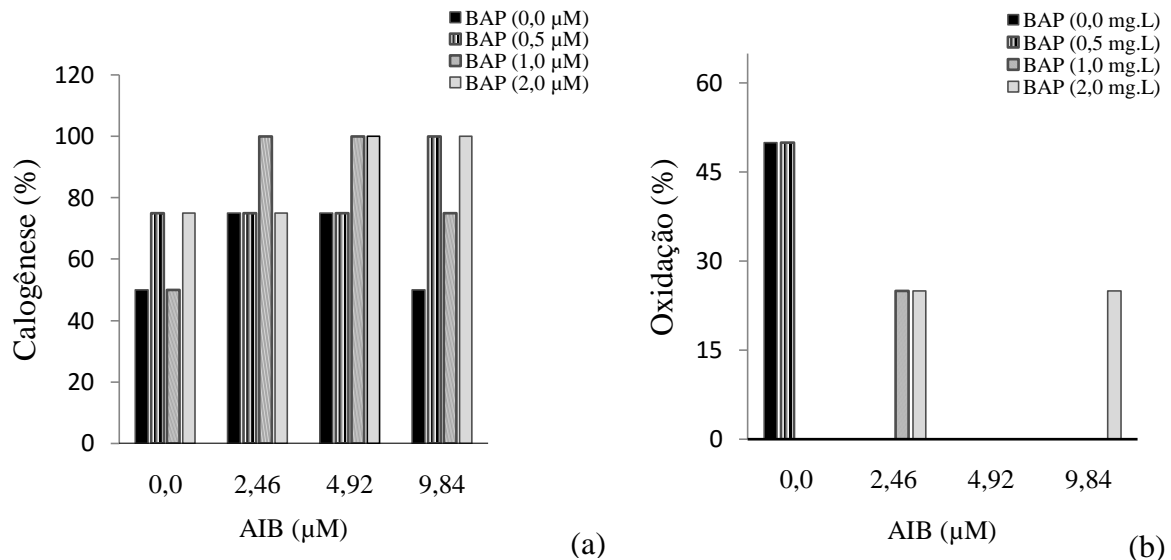


Figura 5. Percentual da formação de calos (a) e oxidação (b) em explantes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) cultivadas *in vitro* no meio WPM, sob diferentes concentrações de BAP e AIB (μM).

Finalmente, é importante destacar que as concentrações isoladas ou combinadas dos dois reguladores não apresentaram influência sob a multiplicação da espécie *Schinopsis brasiliensis*. Resultados semelhantes também foram reportados em *Anacardium* por Assis et al. (2012). Os autores observaram que as concentrações utilizadas de BAP e ANA no meio de cultura não apresentaram respostas significativas na taxa de multiplicação da espécie em estudo.

CONCLUSÕES

O meio de cultura WPM acrescido de PVP é o mais indicado para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de baraúna.

A adição de PVP mostrou-se eficiente para o estabelecimento *in vitro*

A adição de BAP, nas concentrações avaliadas, no meio de cultura não promoveu efeitos significativos para multiplicação *in vitro* da baraúna.

Concentrações acima de 4,92 μM.L⁻¹ de AIB inibiram o comprimento dos brotos e do número de folhas.

REFERÊNCIAS

- AHMADIAN, E. et al. Investigation of Importance Parameters of Plant Tissue. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 5, n.8, p.900-905, 2013.
- ASSIS, K. C. et al. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.:Effects of growth regulator, explant orientation and lighting.**African Journal of Biotechnology**, v. 11, n.7, p.1559-1566, 2012.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB. p. 261-330, 1998.
- ASSIS, T. F. de. et al. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. **Plantation Forest Biotechnology**. 2004. p. 303-333.
- BIODIVERSITAS. **Lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. 2005. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/destaque_flora.asp>. Acesso em: 30 de Setembro de 2014.
- BOSELA, M. J.; MICHLER, C. H. Media effects on Black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.44, n.4, 2008. p. 316-329.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento in vitro de pereira (*Pyrus communis* L.)cv. Carrick. **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p.275-277, 2004.
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 455-464, 2002.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA. v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FORSTER, N.; MEWIS, I.; ULRICH, C. Moringa oleifera- Establishment and multiplication of different ecotypes *in vitro*. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p. 21-31, 2013.
- GRIMALDI, F. et al. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família *Rosaceae*.**Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, n.2, p.160-168, 2008.
- HAMANN, A. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. **Trees**, v. 12, p. 175-180, 1998.
- LAMEIRA, O. A. efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, 1997.
- LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação enraizamento in vitro de amoreira-preta ‘xavante’: efeito da concentração de sais ,do tipo de explante, e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1959- 1966, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v.2. 2ªed. Editora Plantarum. Nova Odessa – SP. 2002. p.368.

MELO, N. F. de. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n.1, p. 102-107, 1999.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*syagrus oleracea* (mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº6, de 23 de Setembro de 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

MOURA, L. C. et al. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.

NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.43, n.4, p. 370-381, 2007.

OLIVEIRA, F. F. M. et al. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.152-159, 2007.

OLIVEIRA, M. C. P.; OLIVEIRA, G. J. Superação da dormência de sementes de *Schinopsis brasiliensis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p.251-254, 2008.

PACEK-BIENIEK, A.; DYDUCH-SIEMINKA, M.; RUDAS, M. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (*Orquidaceae*). **Folia Horticulturae**. v.22, n.2, 2010.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semiárido brasileiro a fungos causadores da podridão mole. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 365-371, 2005.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: Controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SCHWALBERT, R.; MALDANER, J.; AMARAL, G. A.; AITA, M. F.; TAROUÇO, A. K. Multiplicação *in vitro* de *desmodium incanum* em presença de carvão ativado. **Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.21; p. 1365, 2015.

SHIMELIS, D. Effects of Polyvinylpyrrolidone and Activated Charcoal to Control Effect of Phenolic Oxidation on In Vitro Culture Establishment Stage of Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.). **The Journal of Applied Sciences Research**. v. 2, n. 1, p. 52-57, 2015.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. et al., **Guia de Campo de Árvores da Caatinga**. Petrolina, PE: editora e gráfica Franciscana Ltda. 2009. 64p.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M S. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-116, 2007.

SUTTLE, J. C.; HULTSTRANS, J. F. Ethylene-induced Leaf Abscission in Cotton Seedlings. **Plant Physiology**, v. 95, p. 29-33, 1991.

TAMTA, S. et al. *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.44, n.2, p. 136-141, 2008.

TONON, G.; CAPUANA, M.; DI MARCO, A. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. **Scientia Horticulture**, v. 87, p. 291-301, 2001.

CAPÍTULO II

**MICROPROPAGAÇÃO DO IMBIRUÇU (*Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns):
ESPÉCIE ARBÓREA DA CAATINGA COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA
MEDICINAL**

Micropropagação do imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns): espécie arbórea da Caatinga com potencial atividade biológica medicinal

RESUMO

O imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*) apresenta-se distribuído do Norte de Minas Gerais norte da Bahia e regiões adjacentes do oeste de Pernambuco, no vale do rio São Francisco. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de sais do meio DKW na presença e ausência de carvão ativado (C.A) no estabelecimento do cultivo *in vitro* de *P. simplicifolium*, além de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de seis genótipos de imbiruçu. Para o estabelecimento *in vitro* avaliaram-se diferentes concentrações de sais DKW (50, 70 e 100%) combinados ou não com CA. No experimento de avaliação da multiplicação *in vitro*, os explantes foram inoculados em meio DKW, acrescido de 1,0 g.L⁻¹ de C.A, suplementado com diferentes concentrações de AIB e BAP isoladas e combinadas. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado e em esquema fatorial 4x4x6 (concentrações de AIB x concentrações de BAP x genótipos). Com base nos resultados obtidos pode-se concluir para o estabelecimento *in vitro* que a adição de 1,0 g.L⁻¹ de C.Ano meio nutritivo favorece o aumento no comprimento e número de brotos. Na multiplicação *in vitro*, observou-se que as respostas para o comprimento e números dos brotos variam em função das concentrações e combinações dos reguladores e do genótipo utilizado, observando-se também que concentrações superiores a 6,64 µM.L⁻¹ de AIB e 4,44 µM.L⁻¹ de BAP não são indicadas para a multiplicação *in vitro* do imbiruçu.

Palavras chave: Conservação *in vitro*, genótipos, estabelecimento e multiplicação *in vitro*.

Micropropagation of imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns): arboreal species from Caatinga with potential biological medicinal activity

ABSTRACT

The Imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*) is found distributed from the Northern of Minas Gerais, North of Bahia and adjacent regions of the West of Pernambuco State, in the São Francisco River Valley. This study aimed to evaluate the effect of different concentrations of salts formulation of the DKW medium in the presence and absence of activated chacoal (CA) for the establishment of *in vitro* tissue culture of *P. simplicifolium*. Furthermore, has also been investigated the effect of different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and indolbutyric acid (IBA) on the establishment and *in vitro* multiplication of six genotypes of imbiruçu. For the *in vitro* establishment was evaluated different concentrations (dilutions) of DKW salts formulation (50, 70 and 100%) combined or not with CA. In the experiment for evaluation of *in vitro* multiplication, explants were inoculated in DKW medium supplemented with 1.0 g.L⁻¹ of C.A and different concentrations of IBA and BAP, both uniquely as in combination. The experimental design was randomized and at factorial design 4x4x6 (IBA concentrations x BAP concentrations x genotypes). Based on the results obtained can be concluded for the *in vitro* establishment that addition of 1.0 g.L⁻¹ of C.A in the medium favored an increase in the length and number of shoots. To assay for multiplication *in vitro*, we observed that the responses for the length and numbers of shoots varied depending on the concentrations and combinations of growth regulators and investigated genotype. Concentrations higher than 6.64 µM.L⁻¹ IBA and 4.44 µM.L⁻¹ BAP are not indicated for *in vitro* multiplication of imbiruçu.

Key words: *In vitro* conservation, genotypes, establishment and *in vitro* multiplication.

INTRODUÇÃO

Pseudobombax simplicifolium A. Robyns é uma árvore nativa da caatinga, popularmente conhecida como embiruçu, imburauçu, embiratanha e umburuçu, apresentando-se distribuída do Norte de Minas ao norte da Bahia, além das regiões adjacentes do oeste de Pernambuco no vale do rio São Francisco (BOCAGE et al., 2001; LORENZI, 2002). No tocante à importância econômica, a paina das espécies de *Pseudobombax* é utilizada como isolante térmico e no enchimento e na confecção de bóias e salva-vidas. A madeira, embora frágil e de baixas durabilidade e densidade, é usada no enchimento e revestimento de miolo de compensados e portas, e na confecção de brinquedos (LORENZI, 2002).

Embora não existam na literatura registros que comprovem o potencial medicinal da espécie *P. simplicifolium*, a população que reside no domínio da caatinga utiliza, na medicina caseira, a casca do caule da espécie *P. marginatum* para o tratamento de inflamações do sistema urinário (MAIA, 2012). Vale destacar também a importância do imburauçu em programas de reflorestamento de áreas degradadas, principalmente, por apresentar crescimento rápido, podendo esse reflorestamento ser utilizado como estratégia na conservação genética desta espécie (MACIEL et al., 2012; LORENZI, 2002).

Por outro lado, a cultura de tecidos *in vitro* representa uma alternativa para dar suporte a programas de conservação e reflorestamento de populações de espécies ameaçadas de extinção através das técnicas de micropropagação (LOYOLA-VARGAS e VARQUEZ-FLOTA, 2006; TAMTA et al., 2008). Esta técnica permite a obtenção de mudas com características genéticas idênticas às da planta-matriz a partir de genótipos selecionados, em um curto período de tempo, sob condições controladas (COSTA et al., 2010; FORSTER et al., 2013).

O sucesso da micropropagação depende de vários fatores, como os nutritivos, ambientais e endógenos (MELO et al., 1999). A qualidade das respostas morfogênicas dos tecidos *in vitro* são fortemente influenciadas pelo tipo e concentração dos nutrientes fornecidos no meio básico de cultivo (NIEDZ e EVENS, 2007). Nesse caso, os fitorreguladores desempenham um papel fundamental no sucesso da multiplicação *in vitro*, com destaque para as auxinas e as citocininas. Além destes, o carvão ativado tem sido incorporado ao meio nutritivo para melhorar o crescimento ou promover a organogênese de uma ampla variedade de espécies (CID e TEIXEIRA, 2010). Porém, vale ressaltar que composição do meio de cultura não é a única variável determinante do sucesso da micropropagação, uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, e as necessidades

para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. (FARIA et al., 2007; MORAIS et al., 2012).

Diante do exposto, o presente estudo avaliou pela primeira vez o efeito de diferentes concentrações de sais do meio DKW na presença e ausência de carvão ativado no estabelecimento do cultivo *in vitro* de *P. simplicifolium*, além de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) na multiplicação *in vitro* de seis genótipos da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, Petrolina/PE (9° 09' S, 40° 22' W), no segundo e primeiro semestre de 2014 e 2015, respectivamente, utilizando-se seis genótipos de *P. simplicifolium* coletados nos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí no segundo semestre de 2013.

De cada genótipo foram coletadas frutos em estágio de maturação plena no distrito de Massaroca em Juazeiro-BA (9° 52' 37'' S, 40° 13' 09' W- **PBBA 03**), Queimada Nova-PI (8° 24' 08'' S, 41° 07' 51'' W- **PBPI 07** e 8° 23' 20'' S, 41° 05' 55'' W-**PBPI 08**) e Petrolina-PE (9° 09' S, 40° 22' W-**PBPE 14** e **PBPE15** e 9° 19' 50'' S, 40° 33' 15'' W-**PBPE UNI**), sendo colocadas para secar sob sobreamento de 50% até a abertura e liberação das sementes. Posteriormente as sementes foram armazenadas em sacos de papel e estocadas em câmara fria até sua utilização nos experimentos.

Experimento 1: Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Em capela de fluxo laminar, sementes dos seis genótipos foram desinfestadas utilizando-se álcool 70% por 30 segundos, cloridrato de kasugamicina 0,2% (v/v) por 20 minutos, e hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos. Posteriormente foram feitas três lavagens em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram secas sobre papel filtro previamente esterilizado, sendo, logo após, transferidas para potes de plástico contendo 50 ml de meio DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6,5 g.L⁻¹ de ágar e 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, sendo o pH ajustado para 5,9 antes da autoclavagem.

A germinação *in vitro* foi realizada em sala de crescimento sob temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16h. Trinta dias após a germinação e desenvolvimento das plântulas, segmentos nodais foram seccionados com cerca de 1,0 cm de comprimento, sendo inoculados

nos seguintes tratamentos: T1 (meio DKW 100 % + carvão ativado); T2 (meio DKW 100 %, sem carvão ativado); T3 (meio DKW 70 % + carvão ativado); T4 (meio DKW 70 %, sem carvão ativado); T5 (meio DKW 50 % + carvão ativado) e T6 (meio DKW 50 %, sem carvão ativado). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x3x2 (genótipos x concentrações de sais DKW x carvão ativado), compondo assim, 36 tratamentos com 3 repetições, com 2 explantes por repetição.

O experimento foi mantido em sala de crescimento sob as mesmas condições descritas anteriormente para germinação. Após 40 dias em condições de cultivo *in vitro*, avaliou-se o número de brotações por explante (EB), número de folhas (NF), comprimento dos brotos (CB) e o comprimento equatorial da folha.

Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo a comparação entre as médias dos tratamentos realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Experimento 2: Multiplicação *in vitro*

Para a fase de multiplicação, segmentos nodais com cerca de um cm de comprimento foram utilizados como explantes, sendo inoculados em meio de cultura DKW com a seguinte composição: 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol, 0,002 g.L⁻¹ de glicina, 6,5 g.L⁻¹ de ágar e 1,0 g. L⁻¹ de carvão ativado, suplementado com AIB nas concentrações de 0 µM.L⁻¹; 2,46 µM.L⁻¹; 4,92 µM.L⁻¹ e 9,84 µM.L⁻¹ e BAP nas concentrações de 0,0 µM.L⁻¹; 2,22 µM.L⁻¹; 4,44 µM.L⁻¹ e 8,87 µM.L⁻¹, isoladas e combinadas. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado e em esquema fatorial 4x4x6 (concentrações de AIB x concentrações de BAP x genótipos) com três repetições.

O cultivo foi realizado em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, sob um fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram feitas aos 60 dias após a inoculação, observando-se o número e comprimento dos brotos, número e comprimento das raízes e percentual de formação de calos. As medições para comprimento do broto e largura da folha foram feitas com o auxílio do paquímetro com escala em milímetros.

Os dados foram submetidos a análise de variância e de regressão polinomial, a comparação entre as médias dos tratamentos foi feita utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância do estabelecimento *in vitro* revelou efeito significativo para a interação tripla, sais x genótipo x carvão, apresentando diferenças na significância estatística para o comprimento dos brotos e largura das folhas ($p < 0,05$). No entanto, o número de brotos e de folhas foi influenciado significativamente pela interação genótipo x carvão ativado (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis CB, LF, NF e NB, em seis genótipos de imbiruçu (*P. simplicifolium*) submetidos a diferentes concentrações dos sais do meio DKW e em função da presença e ausência do carvão ativado. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

F.V	GL	QUADRADO MÉDIO			
		CB	LF	NF	NB
SAIS	2	0,0004 ^{ns}	5,0024 [*]	0,0146 ^{ns}	0,0064 ^{ns}
CA	1	0,1210 [*]	21,0234 [*]	0,1333 [*]	0,1221 [*]
GENOT	5	0,0411 [*]	17,5807 [*]	0,1273 [*]	0,0350 ^{ns}
SAIS x CA	2	0,0137 [*]	3,3485 [*]	0,0338 ^{ns}	0,0074 ^{ns}
SAIS x GENOT	10	0,0078 [*]	2,4994 [*]	0,0355 ^{ns}	0,0199 ^{ns}
CA x GENOT	5	0,0224 [*]	14,9293 [*]	0,1917 [*]	0,0457 [*]
SAIS X CA x GENOT	10	0,0098 [*]	2,0429 [*]	0,0288 ^{ns}	0,0137 ^{ns}
Resíduo	72	0,0031	0,3775	0,0323	0,0151
CV (%)		22,93	14,68	13,92	10,05

F.V – Fontes de Variação; CA- Carvão Ativado; GENOT- Genótipo; CB- Comprimento dos Brotos; LF- Largura da Folha; NF- Número de Folhas; NB- Número de Brotos; ^{ns}- não significativo; ^{*}- significativo a 5% pelo teste F.

Os genótipos apresentaram respostas diferentes, dentro de cada concentração de sal do meio de cultura em função da presença do carvão. Observa-se na Tabela 2, que em 50% dos sais com a adição de carvão ativado os genótipos PBPE UNI, PBPI 07 e PBPI 08 apresentaram diferenças significativas para o comprimento dos brotos, quando comparado a ausência do carvão no meio. Resultados semelhantes também foram observados na concentração de 70% dos sais para estes genótipos, com exceção do PBBA03.

Na concentração original dos sais estabelecida do meio DKW, os genótipos que apresentaram maiores comprimentos médios dos brotos foram PBPE 14 e PBPI 11. Por outro lado, observa-se também que o genótipo PBPE 15 em 100% dos sais e na ausência do carvão obteve o maior comprimento do broto (2,9 mm) quando comparado com os outros genótipos.

No geral, a adição do carvão promoveu melhores respostas no estabelecimento *in vitro* da espécie, observando que o crescimento médio da parte aérea foi entre 1,2 e 5 vezes maior nos explantes inoculados em meio contendo carvão ativado. O genótipo PBPI 07 quando cultivado em metade da concentração dos sais apresentou o dobro do crescimento e, com 70%

da formulação dos sais DKW obteve comprimento médio do broto 5 vezes maior ao broto formado sem a adição de carvão.

Tabela 2. Valores médios do comprimento dos brotos (mm) no estabelecimento de seis genótipos de imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*) sob diferentes concentrações de sais DKW na presença e ausência de carvão ativado no meio de cultura, Embrapa Semiárido, PE.

Genótipos	Comprimento médio dos Brotos (mm)					
	50%		70%		100%	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
PBBA03	2,2 abA1	2,6 bA1	2,3 aA1	3,1 aA1	2,8 abA1	2,1 bA1
PBPE14	2,3 abA1	2,3 bA1	2,3 aA1	2,3 aA1	1,8 bB1	3,4 aA1
PBPE15	2,3 abA1	1,6 bA2	2,6 aA1	3,2 aA1	2,9 abA1	1,9 bB2
PBPI07	1,2 bB1	2,5 bA12	0,7 bB1	3,5 aA1	1,6 bA1	2,2 abA2
PBPI08	1,6 bB1	2,7 bA1	1,3 abB1	2,3 aA1	1,6 bB1	2,8 abA1
PBPEUNI	3,0 aB12	4,7 aA1	2,3 aB2	3,2 aA2	3,4 aA1	3,3 abA2
CV (%)	22,93					

- Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna, maiúscula na linha e número na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Dentre os genótipos avaliados na presença de carvão ativado (CA), o PBPE UNI foi o que apresentou a maior média em todas as concentrações dos sais, seguido dos genótipos PBPE 14, PBPI 07e PBPI 08 em 70% dos sais com valores médios 3,4 mm, 2,2 mm e 2,8 mm, respectivamente. Por outro lado, não se observaram diferenças significativas entre genótipos em 50% dos sais DKW. O genótipo PBPE UNI apresentou maior média (3,3 mm) entre os demais genótipos para os dois fatores estudados.

Explantos cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas, cujos meios de cultura podem ser modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (TORRES et al., 2001). As diluições no meio de cultura resultaram em diferenças significativas em três dos seis genótipos estudados, observando-se a maior média no genótipo PBPE UNI, em meio DKW 50% tanto na presença quanto na ausência de carvão ativado e na concentração original dos sais em meio isento de carvão, e nos genótipos PBPE 15 e PBPI 07, em meio DKW com 70% dos sais, na presença de carvão. Resultados semelhantes foram observados por Assis (2010) em que as concentrações de ½ e ¼ do meio MS e ½ do meio WPM foram os mais eficientes na regeneração de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. De acordo com o autor a redução dos sais é benéfica para o estabelecimento do cultivo *in vitro* da maioria das espécies lenhosas.

Os resultados mostraram que há diferenças entre genótipos de imbiruçu quanto às necessidades nutricionais do meio de cultura. Oliveira et al. (2011) também observaram em

Eucalyptus grandis, variação nas respostas do genótipo não só entre os meios MS e WPM mas também dentro do genótipo em cada meio utilizado. Cordeiro et al. (2014) obtiveram diferenças na taxa de multiplicação de *Eucalyptus globulus* em função do meio de cultura utilizado.

Nesse caso, concentrações mais diluídas do meio DKW favoreceram uma melhor resposta de crescimento na espécie. Bosela e Michler (2008), por exemplo, relataram que formulações mais diluídas do meio básico DKW possibilitou melhores resultados no crescimento da parte aérea de noqueira preta (*Juglans nigra* L.). Por outro lado, além de proporcionar maior crescimento, a diminuição da concentração dos sais no meio reduz o custo laboratorial, otimizando assim, o processo de micropropagação das espécies.

Para a largura das folhas (Figura 1), o carvão ativado promoveu maior formação de folhas largas na maioria dos genótipos estudados em todas as concentrações de sais. As exceções foram o genótipo PBPE 15, onde a ausência do carvão ativado proporcionou as maiores larguras das folhas em todas as concentrações de sais, assim como, o genótipo PBPI 07, em 100% dos sais. Resultados semelhantes foram obtidos por Melo et al. (2001), estudando o desenvolvimento de plântulas de guarirrobeira, cuja adição do carvão ao meio de cultura promoveu a formação de maior número e tamanho de folhas.

Os genótipos que obtiveram folhas com o menor diâmetro dentro de cada concentração de sal e na presença do carvão (Figura 1e) foram o PBPI07, nas três concentrações de sais DKW, PBPE15, em 50% e 100% DKW, e PBBA 03, em 50% DKW. Dentro dos fatores carvão e concentração dos sais no meio de cultura, os genótipos que apresentaram a formação de folhas mais largas foram PBPE14, PBPE15, PBPEUNI e PBPI08, respectivamente.

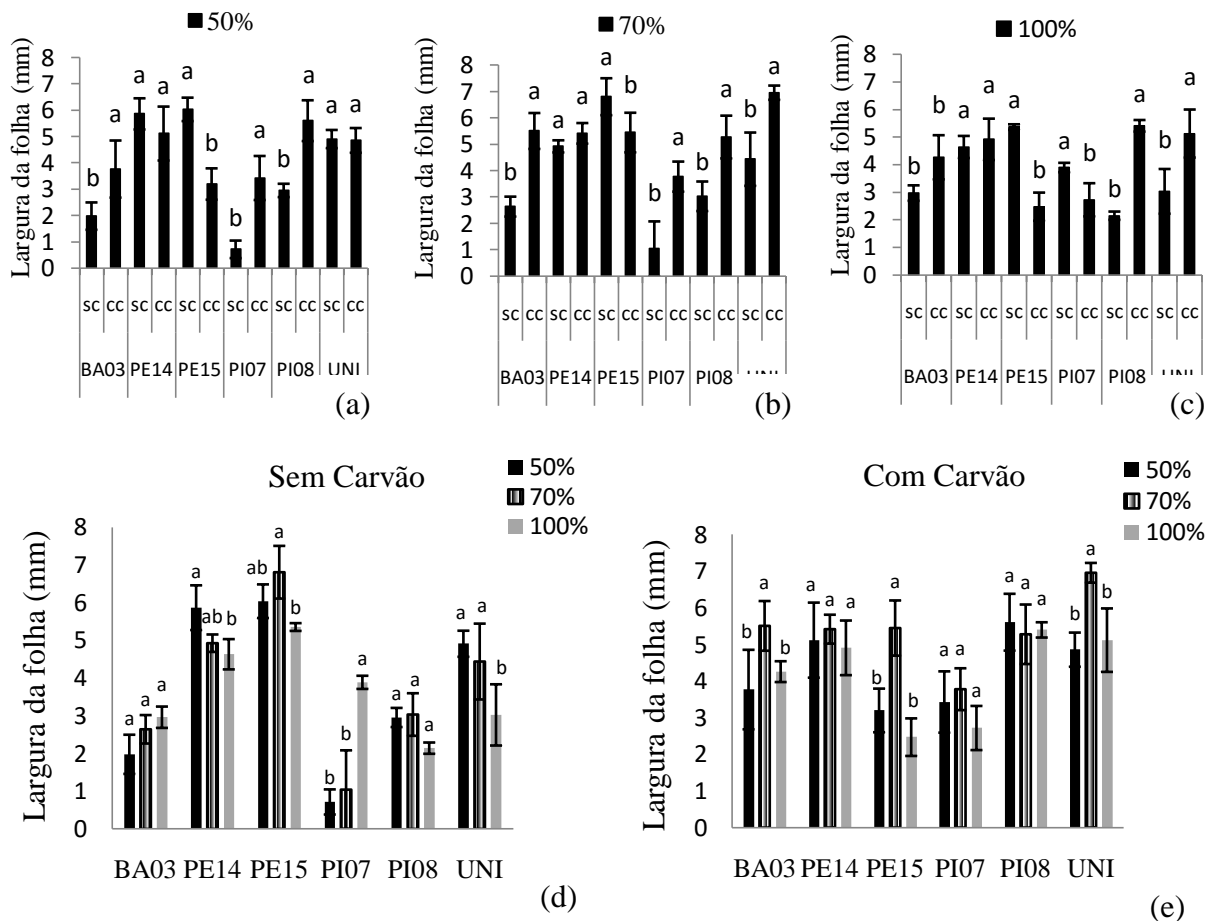


Figura 1. Largura média das folhas (mm) em função da presença e ausência do carvão em 50% dos sais DKW (a), em 70% dos sais (b) e em 100% da concentração dos sais do meio DKW (c), e dados do desenvolvimento foliar em função das concentrações dos sais na ausência (d) e na adição de carvão no meio DKW (e) em seis genótipos da espécie *P. simplicifolium*. Petrolina, PE, 2015.

Assim como para o comprimento dos brotos e largura das folhas, a adição de carvão ativado promoveu maior formação no número de brotos e de folhas (Tabela 3), para a maioria dos genótipos estudados, exceto o genótipo PBPE 15 que apresentou maior média no número de brotos e de folhas no meio sem CA, e os genótipos PBBA 03 e PBPEUNI em que o número de brotos não diferiu significativamente tanto na ausência quanto na presença do carvão ativado.

Em relação ao número de brotos os genótipos não diferiram significativamente quando submetidos ao meio de cultura com a adição de carvão. Porém, o cultivo na ausência do mesmo resultou em diferenças significativas entre os genótipos estudados, onde o genótipo PBPE 15, seguido do PBPEUNI e PBPI 08 distinguiram-se dos demais com maiores médias. Para variável número de folhas, destacaram-se o genótipo PBPEUNI, que apresentou maiores médias tanto na ausência quanto na presença do carvão (1,39 e 1,78, respectivamente), bem

como o genótipo PBPE 15 na ausência e PBPI 08 na presença do carvão ativado, com valores médios 1,72 e 1,6, respectivamente.

Vale ressaltar que assim como para o comprimento dos brotos e largura das folhas, o genótipo PBPE UNI também apresentou os maiores valores médios entre os demais genótipos para os dois fatores estudados nas duas variáveis analisadas.

Tabela 3. Avaliação do número de brotos e de folhas (NB e NF), no estabelecimento de seis genótipos de imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*) sob diferentes concentrações dos sais DKW em presença e ausência de carvão ativado no meio de cultura, Embrapa Semiárido, PE, 2015.

Genótipo	NB		Média Geral	NF		Média Geral
	AUSENTE	PRESENTE		AUSENTE	PRESENTE	
PBBA03	0,83 bA	1,06 aA	0,94	0,83 aB	1,00 bcA	0,92
PBPE14	0,83bB	1,11 aA	0,97	0,94 bB	1,39 abcA	1,17
PBPE15	1,28aA	0,94 aB	1,11	1,72 aA	0,83 cB	1,28
PBPI07	0,70bB	1,00 aA	0,86	0,80 bA	1,21 abcA	1,03
PBPI08	0,90abB	1,20 aA	1,06	1,00 bB	1,60 abA	1,31
PBPEUNI	1,06 abA	1,22aA	1,13	1,39 abA	1,78 aA	1,58
Média	0,93	1,09	1,01	1,11	1,30	1,21
CV (%)	10,05			13,92		

- Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Diferenças significativas também foram observadas entre os genótipos estudados não só entre os coletados em diferentes municípios, mas também entre os do mesmo município, tanto na ausência quanto na presença do carvão. A diferença no desempenho dos genótipos para os fatores estudados pode estar relacionada a existência de variabilidade genética intraespecífica, bem como a fatores fisiológicos das plantas matrizes. A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, cujo estado fisiológico tem grande influência no posterior comportamento do cultivo (FARIA et al., 2007; MORAIS et al., 2012).

Mesmo na ausência de reguladores de crescimento, observou-se aos 40 dias de cultivo a formação de calos em 16,7% dos explantes nos genótipos PBPI07, PBPI 08 e PBPE14, já no genótipo PBPEUNI, 33,33% dos explantes apresentaram formação de calos.

EXPERIMENTO II- Multiplicação *in vitro* de seis genótipos de imbiruçu

A análise de variância revelou significância estatística para a interação tripla Genótipo x BAP x AIB ($p < 0,05$), para o comprimento (CB) e número de brotos (NB). Pode-se observar nos gráficos de regressão polinomial (Figura 2) que a maioria das curvas dessa interação

apresentou tendência de comportamento quadrático (Tabela 4). Nota-se também que os genótipos responderam de forma diferente aos tratamentos com AIB e BAP, provavelmente devido a fatores fisiológicos, como a concentração hormonal endógena, ou a fatores genéticos, como a existência de uma possível variabilidade intraespecífica.

Tabela 4. Resumo da análise de variância das variáveis CB, NF e NB, em seis genótipos de imbiruçu (*P. simplicifolium*) submetidos a diferentes concentrações de BAP e AIB. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

F.V	GL	QUADRADO MÉDIO		
		CB	NF	NB
GENOT	5	50,2127*	0,8951*	1,9471*
BAP	3	8,8165*	0,0134 ^{ns}	1,7229*
AIB	3	7,6040 ^{ns}	0,0248 ^{ns}	0,0299 ^{ns}
GENOT x BAP	15	47,4633*	0,1500*	1,6946*
GENOT x AIB	15	11,2792*	0,0739*	0,0440*
BAP x AIB	9	15,5906*	0,0422 ^{ns}	0,0471*
GENOT x BAP x AIB	45	22,2918*	0,0703*	0,0458*
Resíduo	192	3,1528	0,0296	0,0211
CV (%)		21,11	10,59	9,80

F.V – Fontes de Variação; BAP- Benzilaminopurina; AIB- Ácido Indolbutírico; GENOT- Genótipo; CB- Comprimento dos Brotos; NF- Número de Folhas; NB- Número de Brotos; ^{ns}- não significativo; *- significativo a 5% pelo teste F.

As concentrações de AIB (2,46 $\mu\text{M.L}^{-1}$ e 4,92 $\mu\text{M.L}^{-1}$), combinadas ou não com BAP, promoveram a formação de maiores comprimentos dos brotos em todos os genótipos, com exceção do genótipo PBPE 14 (Figura 2), em que o aumento da concentração do AIB, na ausência de BAP, promoveu o crescimento da parte aérea dos explantes, obtendo-se brotos com média de 11,69 mm em 9,84 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB. Porém, efeito contrário foi observado com o aumento da concentração da auxina dentro da concentração de 8,87 $\mu\text{M.L}^{-1}$ BAP. Concentrações superiores a 4,44 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP e 4,92 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB induziram efeito inibitório no comprimento dos brotos, exceto no genótipo PBPEUNI para a citocinina. Costa et al. (2010), observaram em seus estudos com a espécie *Erythrina velutina*, que o aumento da concentração do BAP diminuiu significativamente o comprimento dos brotos dentro de cada concentração de ANA. Resultado semelhante também foi observado por Erig et al. (2002) onde o aumento dos níveis de BAP combinado com várias concentrações de AIB induziu a redução da altura média das brotações nos explantes de amoreira preta (*Rubus idaeus* L.).

A ausência da citocinina BAP promoveu maiores comprimentos dos brotos nos genótipos PBPE14, PBBA 03 e PBPI08 com médias de 11,69 mm, 17,61 mm e 15,49 mm respectivamente. A adição de 2,22 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP promoveu maior comprimento no genótipo PBPI07 com média 11,62 mm e também PBPE15 com média de 12,26 mm. O aumento da

concentração de BAP para $4,44 \mu\text{M.L}^{-1}$ proporcionou resultados satisfatórios também nos genótipos PBPE15 e PBBA03 com médias de 12,46 mm e 15,6 mm, respectivamente.

Pode-se observar nos gráficos de regressão polinomial (Figura 2), que as concentrações entre $5,41 \mu\text{M.L}^{-1}$ e $6,89 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB combinados com $4,44 \mu\text{M.L}^{-1}$ e $8,87 \mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP proporcionaram uma tendência no aumento do comprimento dos brotos nos genótipos PBPE 15, PBPE UNI, PBPI 07 e PBPI 08.

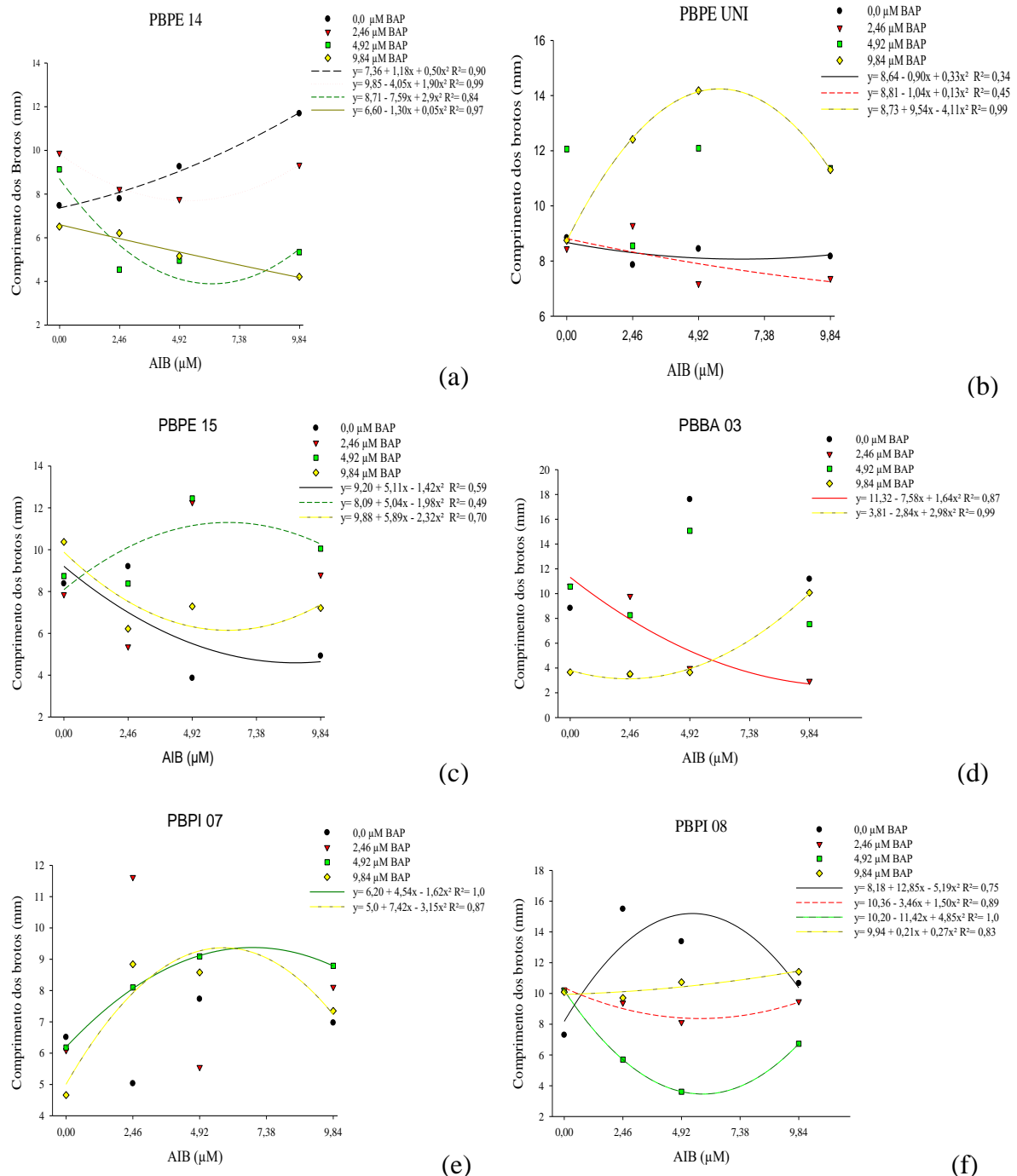


Figura 2. Comprimento médio dos brotos (mm) formados na multiplicação *in vitro* de 6 genótipos de imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*), PBPE 14 (a); PBPEUNI (b); PBPE 15 (c); PBBA 03 (d); PBPI 07 (e) e PBPI 08 (f), em função de diferentes concentrações de BAP e AIB ($\mu\text{M.L}^{-1}$) adicionados ao meio de cultivo DKW. Petrolina, PE, 2015.

Os presentes resultados corroboram a afirmação de Bosela e Michler (2008) que a suplementação do AIB combinado com algumas citoninas tem demonstrado efeitos positivos na multiplicação de nogueira preta (*Juglans nigra* L.). Os resultados obtidos por Moraes et al. (2004) revelaram um acréscimo acentuado no comprimento das brotações, principalmente para os meios contendo BAP e AIB, que estimularam positivamente o alongamento das brotações *in vitro* de *Pyrus calleryana*. Da mesma forma, Karimpour et al. (2013) obtiveram em seu estudo com pêra da cultivar Sebri o comprimento máximo das brotações em meio suplementado na combinação de 2,2 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP e 0,44 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB.

Para o número de brotos (NB), as concentrações dos reguladores de crescimento variaram entre os genótipos estudados (Figura 3). Pode-se observar por meio da derivação das equações, $y = 1,22 + 0,21x - 0,09x^2$; $y = 1,28 + 0,37x - 0,14x^2$; $y = 1,21 + 0,45x - 0,22x^2$, que as concentrações de 6 $\mu\text{M.L}^{-1}$, 6,64 $\mu\text{M.L}^{-1}$ e 5,02 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB combinados com 2,22 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP promoveram maior número de brotações nos genótipos PBBA03, PBPEUNI e PBPE15, respectivamente. Porém, derivando-se a equação $y = 1,24 + 0,16x - 0,09x^2$, observou-se que o genótipo PBPE 15 apresentou maior número de broto/explante na concentração de 4,63 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB na ausência de BAP.

Já em PBPE 14 e PBPI 08 o maior número médio de brotos formados foram observados na concentração de 4,92 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB na ausência de BAP com 2,8 e 1,8 brotos por explante, respectivamente. Sendo que este último apresentou as maiores médias para o NB em todas as concentrações de AIB na ausência de BAP.

No genótipo PBPI07 o maior NB formado foi observado na combinação de 4,44 $\mu\text{M.L}^{-1}$ BAP + 2,46 $\mu\text{M.L}^{-1}$ AIB com 2,33 brotos/explante. Portanto, concentrações superiores a 6,64 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB e 4,44 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP não são indicadas para a multiplicação *in vitro* da espécie.

Observou-se diferenças significativas entre os genótipos somente nos tratamentos com 9,84 $\mu\text{M.L}^{-1}$ AIB + 2,22 $\mu\text{M.L}^{-1}$ BAP, onde o genótipo PBPE15 apresentou a menor média no número de brotos. Por outro lado, em 4,92 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB na ausência de BAP, os genótipos PBPE14 e PBPI 08 apresentaram os maiores números de brotos que os demais genótipos. Em 2,46 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB + 4,44 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP o maior número de brotos formados foi observado nos genótipos PBPEUNI e PBPI07.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Costa et al. (2010) em *Erythrina velutina*, onde a adição de BAP e ANA ao meio de cultura proporcionou aumento do número de brotos formados por explante. Também Moraes et al. (2004) demonstraram em *Pyrus*

calleryana que o número de brotos nos tratamentos acrescidos somente com BAP foram inferiores à combinação de BAP e AIB.

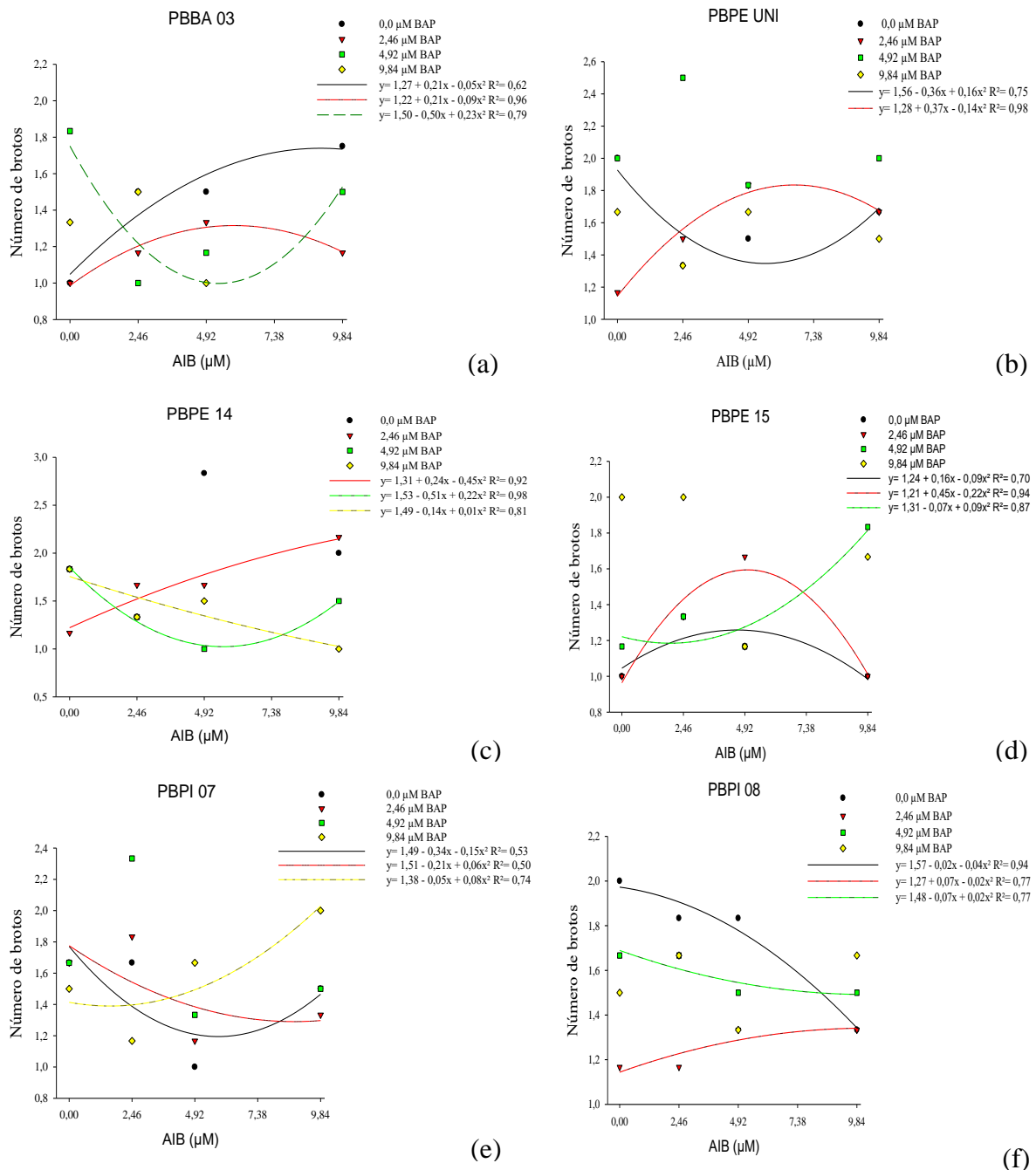


Figura 3. Número médio de brotos formados na multiplicação *in vitro* de seis genótipos de imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*) em função de diferentes concentrações de BAP e AIB (μM) adicionados ao meio de cultivo DKW. Petrolina, PE, 2015.

As auxinas são amplamente usadas no cultivo *in vitro* vegetal, sendo parte integrante do meio de cultura. A combinação de auxinas e citocininas tem impacto em processos diferentes no desenvolvimento da planta, estando envolvidas na iniciação e crescimento dos brotos, e a ação conjunta destes reguladores está vinculada ao processo de divisão e alongamento

celular(Figura 4). Divisões celulares normais requerem sincronia entre a fase S e a divisão celular, o que sugere que os níveis de auxina e citocinina em culturas devem ser cuidadosamente combinados (LOYOLA-VARGAS e VARQUEZ-FLOTA, 2006; GEORGE et al., 2008).

Aos 60 dias de cultivo verificou-se para todos os genótipos estudados índices entre 50 e 100% de formação de calos em todos os tratamentos utilizados, inclusive nos tratamentos isentos de reguladores de crescimento.

Não foi observado enraizamento em nenhum dos genótipos avaliados, durante os 60 dias de cultivo, tanto no estabelecimento quanto na multiplicação, para todos os tratamentos utilizados. De acordo com Grimaldi et al. (2008), o tempo de desenvolvimento das raízes iniciais em espécies lenhosas varia amplamente. A resposta ao enraizamento depende de muitos fatores endógenos e exógenos, principalmente para promover a formação de raízes em espécies com difícil enraizamento. Segundo Souza e Pereira (2007) questões diretamente ligadas ao transporte de auxinas também podem ser relevantes para o estudo de enraizamento *in vitro*, visto que existe uma relação entre aplicação de auxina exógena e a ação e concentração de auxina endógena no local de formação das raízes.

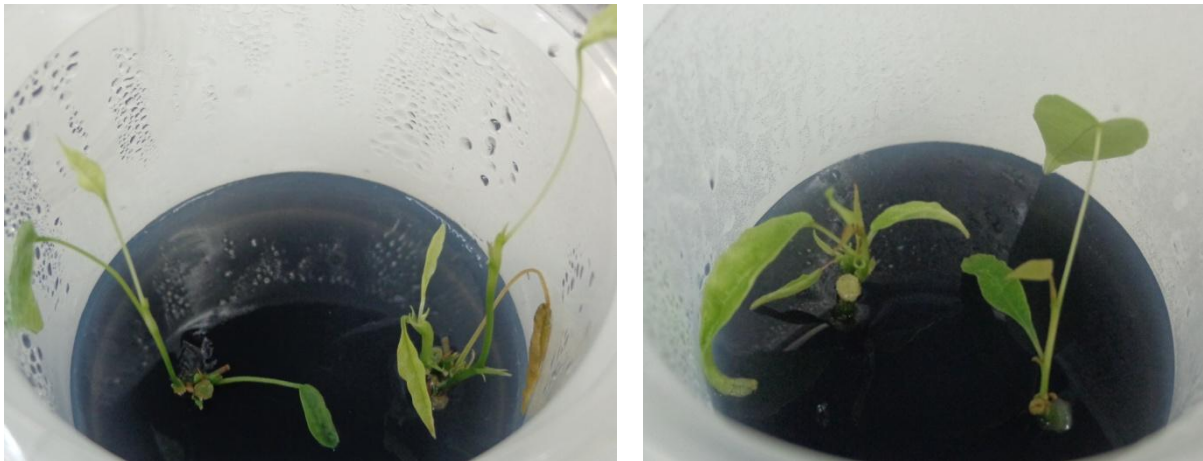


Figura 4. Multiplicação *in vitro* de imbiruçu (*Pseudobombax simplicifolium*) em função de diferentes concentrações de BAP e AIB adicionados ao meio de cultivo DKW. Petrolina,PE, 2015.

CONCLUSÕES

- A adição de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado ao meio de cultura favorece o aumento no comprimento e número de brotos de imbiruçu.

- Concentrações mais diluídas do meio DKW podem ser utilizadas no estabelecimento do cultivo *in vitro* do imbiruçu, as diluições além de proporcionar resultados positivos na fase de estabelecimento reduz o custo final do processo de micropropagação.

- As respostas para o comprimento e números dos brotos variam em função das concentrações e combinações dos reguladores e do genótipo utilizado na espécie *P. simplicifolium*.

- Concentrações superiores a $6,64 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB e $4,44 \mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP não são indicadas para a multiplicação *in vitro* da espécie.

REFERÊNCIAS

ASSIS, Kerlley Cristina de. **Propagação *in vitro* de *Anacardium othonianum* Rizz., uma espécie frutífera e medicinal do Cerrado**. 2010. 1v. 103f Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - UFG, Jataí, GO.

BOCAGE, A. L. D.; SALES, M. F. de. A Família Bombacaceae Kunth no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**. v. 16, n.2, p. 123-139, 2002.

BOSELA, M. J.; MICHLER, C. H. Media effects on Black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.44, n.4, p. 316-329, 2008.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. **Cultivo in vitro de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15-49.

CORDEIRO, G. M. et al. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Forestalis**, v. 42, n.103, p. 337-344, 2014.

COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n.5, p. 1090-1096, 2010.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation walnut rootstock. **Horticultural Science**. v.19, p.507-509, 1984.

ERIG, A. C.; ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

FARIA, G. A. et al., Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, v.66, n.4, p.535-543, 2007.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA, v. 35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FORSTER, N.; MEWIS, I.; ULRICHS, C. Moringa Oleifera- Establishment and multiplication of different ecotypes *in vitro*. **Gesunde Pflanzen**, v.65, p.21-31, 2013.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrecht, 3ed., v.1. 2008. 501p.

GRIMALDI, F. et al. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família *Rosaceae*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, n.2, 2008.

KARIMPOUR, S. et al. *In Vitro* Establishment and Clonal Propagation of Sebri Pear Cultivar. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.15, p.1209-1217, 2013.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v.2. 2ªed. Ed. Plantarum, Nova Odessa,SP. 2002. p.368.

LOYOLA-VARGAS, V.; VARQUEZ-FLOTA, F. **Plant Cell Culture Protocols: Methods in molecular biology**. Humana press, Toyowa, New Jersey. 2ed. 2006. 385 p.

MACIEL, J. R.; FERREIA, J. V. A.; SIQUEIRA FILHO, J. A. de. Modelagem de distribuição de espécies arbóreas na recuperação de áreas degradadas da caatinga. In: SIQUEIRA FILHO, J. A. de (orgs.). **Flora das Caatingas do Rio São Francisco: História natural e conservação**. 1ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2012. p. 230-259.

MAIA, G. N. **Caatinga: Árvores e arbustos e suas utilidades**. 2 ed. Fortaleza-CE. Printcolor Gráfica e Editora, p. 20, 2012

MELO, B. et al. Effect of seed treatment with fungicides, associated with a foliar spray to control Asian soybean rust. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.

MELO, N. F. de. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p.102-107, 1999.

MORAES, L. K. A. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura dupla-fase. **Revista brasileira de fruticultura**, v.26, n.3, p.403-405, 2004.

MORAIS, T. P. et al., Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.43, n.4, p. 370-381, 2007.

OLIVEIRA, M. L. de. et al. Efeitos do meio de cultura e da relação bap/ana na multiplicação *in vitro* de clones de *eucalyptus grandis* x *e. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**,v. 35, n.6, p. 1207-1217, 2011.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

TAMTA, S. et al. *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.44, n.2, p.136-141, 2008.

TORRES, A.C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: Formulações de meios de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 19p.

CAPÍTULO III-
COLORAÇÃO CROMOSSÔMICA DIFERENCIAL CMA₃/DAPI DE *Pseudobombax*
simplicifolium A. Robyns

Coloração cromossômica diferencial CMA₃/DAPI de *Pseudobombax simplicifolium*

A. Robyns

RESUMO

A espécie *Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns (imbiruçu) apresenta-se distribuída na região Nordeste do Brasil, ocorrendo principalmente nos Estados da Bahia, Pernambuco e Piauí. Não existe na literatura, relatos sobre a caracterização e o número cromossômico da espécie. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo, a determinação do número cromossômico e a identificação do padrão de bandas CMA₃/DAPI em quatro genótipos de *P. simplicifolium*. Para o estudo citogenético, foram avaliados os genótipos PBPE 14, PBPE 15, PBPE UNI e PBPI 12, proveniente dos estados de Pernambuco e Piauí. A metodologia empregada para preparação e coloração das lâminas seguiu protocolos estabelecidos, utilizando digestão com enzimas celulase e pectinase, seguido de coloração com fluorocromos. As contagens e medições dos cromossomos foram feitas com auxílio do programa Leica QFish. Para a identificação do número e comprimento cromossômico, quatro metáfases foram analisadas por indivíduo. Foi observada estabilidade no número cromossômico $2n = 84$, com morfologia variando de submetacêntrica a metacêntrica. As medições revelaram comprimento médio cromossômico entre 0,59 μm em PBPEUNI a 1,67 μm em PBPE 15. A análise com dupla coloração CMA₃/DAPI permitiu a visualização de dezesseis bandas CMA₃⁺ em PBPI 12, seis em PBPE 14 e PBPE 15 e oito bandas CMA₃⁺ em PBPE UNI, sendo localizadas na região subterminal cromossômica. As bandas CMA₃⁺ podem estar relacionadas a regiões organizadoras do nucléolo (RONs). A coloração CMA permitiu identificar variabilidade de sequências repetitivas entre as populações.

Palavras-chave: Imbiruçu, número cromossômico, fluorocromos

**Chromosomal staining differential CMA3/DAPI of *Pseudobombax simplicifolium* A.
Robyns**

ABSTRACT

Pseudobombax simplicifolium A. Robyns (Imbiruçu) species is distributed in Northeastern Brazil, occurring mainly in the states of Bahia, Pernambuco and Piauí. Does not exist in the literature, reports on the characterization and the chromosome number of the species. Thus, this study aimed to determine the chromosome number and identification the CMA3/DAPI bands in four genotypes of *P. simplicifolium*. For cytogenetic study we evaluated the genotypes, PBPE 14, PBPE 15, PBPEUNI and PBPI 12, from the states of Pernambuco and Piauí. The methodology for the preparation and staining of slides follow established protocols, using digestion with enzymes cellulase and pectinase, followed by staining with fluorochromes. The chromosomes counts and measurements were performed using the Leica QFish program. To identify the number and chromosomal length, were analyzed four metaphases per individual. It was observed stability in the chromosome number $2n = 84$, with morphology ranging from submetacentric the metacentric. The measurements revealed chromosomal average length from 0.59 μm in PBPE UNI to 1.67 μm in PBPE 15. The analysis with double staining CMA3/DAPI allowed the visualization of sixteen bands CMA3+ in PBPI 12, six on PBPE 14 and PBPE 15, and eight bands CMA3+ in PBPEUN, located in the subterminal region of the chromosomes. The CMA3+ bands may be related to nucleolar organizer regions (NORs). The CMA staining allowed to identify variability of repetitive sequences among populations.

Keywords: Imbiruçu, chromosome number, fluorochromes

INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudobombax* Dugand é representado por 20 espécies com distribuição neotropical (ROBYNS, 1964), das quais 16 ocorrem no Brasil (CARVALHO-SOBRINHO, 2006). Dentre estas, *P. simplicifolium* A. Robyns apresenta distribuição restrita à região Nordeste do Brasil, ocorrendo nos Estados da Bahia, Pernambuco e Piauí.

A árvore, conhecida vulgarmente como embiratanha, imbiruçu ou umburuçu, pode atingir até 18 m de altura e sua madeira é utilizada no enchimento e revestimento de miolo de compensados e portas e para confecção de brinquedos (LORENZI, 2002). Além do uso da paina e da madeira, o imbiruçu pode ser utilizado em programas de reflorestamento de áreas degradadas, principalmente, por apresentar crescimento rápido, resultando assim, na conservação genética desta espécie (MACIEL et al., 2012; LORENZI, 2002).

Do ponto de vista citogenético, a família Malvaceae é caracterizada por apresentar numerosos e pequenos cromossomos onde na subfamília Bombacaceae o número cromossômico pode variar de $2n = 72$ em *Pseudobombax ellipticum* a $2n = 276$ em *Eriotheca pubescens* (BAUM e OGINUMA, 1994).

Não existe na literatura relatos relacionados à caracterização e ao número cromossômico do imbiruçu. O estudo do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie. Nesse caso, o uso das técnicas de bandeamento cromossômico tem possibilitado também a visualização de blocos de coloração diferenciada, havendo um avanço significativo na caracterização dos cromossomos de várias espécies (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo, a determinação do número cromossômico e a identificação do padrão de bandas /DAPI em quatro genótipos de *P. simplicifolium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos utilizados para a análise mitótica foram coletados no município Queimada Nova, PI (08° 23' 20,7'' S, 41° 05' 55,2'' -**PBPI 12**) e Petrolina, PE (9° 09' S, 40° 22' W - **PBPE 14** e **PBPE 15** e 9° 19' 50'' S, 40° 33' 15'' W - **PBPE UNI**). O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido.

Para as análises mitóticas, adotou-se o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002). Para isso, pontas de raízes jovens foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoléina 0,002 M

durante uma hora a temperatura ambiente, sendo colocadas a aproximadamente 8°C por 24 horas. Posteriormente, retirou-se o excesso do antimitótico e as raízes foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v), mantidas por um período entre 3-4 horas à temperatura ambiente e estocadas a -20°C até posterior análise.

A preparação das lâminas foi feita após duas lavagens das raízes em água destilada e digestão enzimática das mesmas em solução celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (v/v) por quatro horas em câmara úmida a 37°C. Em seguida, os meristemas foram esmagados em uma gota de ácido acético 45%, entre lâmina e lamínula e congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e secas ao ar. Logo após, as lâminas foram guardadas a temperatura ambiente por três dias em uma caixa escura (GUERRA e SOUZA, 2002).

Após esse período, as lâminas foram coradas inicialmente com 0,5 mg.mL⁻¹ de CMA₃ (cromomicina A₃) e guardadas no escuro por uma hora. Posteriormente, retirou-se o excesso do fluorocromo com um jato de água e, após a secagem, as lâminas foram coradas com 2µg.mL⁻¹ de DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol), montadas em tampão McIlvaine-glicerol e estocadas em câmara escura, por três dias, conforme o protocolo descrito por Guerra e Souza (2002). As melhores células foram capturadas com câmera Leica DFC 345 FX, adaptada a um microscópio de fluorescência Leica DM 2000.

Para a identificação do número e comprimento cromossômico, quatro metáfases foram analisadas por indivíduo. As medições foram realizadas com o auxílio do programa Leica QFish.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observado através das análises citológicas, estabilidade no número cromossômico ($2n = 84$) e núcleo interfásico do tipo semirreticulado nos quatro genótipos. Entretanto, algumas diferenças cariomorfológicas entre os materiais foram observadas, conforme descrito nas Tabelas 1 e 2. Esse número cromossômico foi registrado anteriormente no gênero, para as espécies *P. munguba* (MORAWETZ, 1986) e *P. grandiflorum* (NASÁRIO, 2014). Vale salientar que há poucos registros na literatura relacionados à citogenética de espécies do gênero *Pseudobombax*, com destaque para os trabalhos de Baker e Baker (1968), que observaram números cromossômicos $2n= 72$ e 88 na espécie *P. ellipticum*, Nasário (2014) observou em *P. grandiflorum* número cromossômico de $2n= 84$, e Morawetz (1986), identificou em três espécies do gênero *Pseudobombax*, $2n=84$ em

P. munguba, $2n= 88$ em *P. tomentosun* e *Pseudobombax* sp. (NASARIO, 2014). (FORNI-MARTINS, 2000) também observou $2n= 88$ na espécie *P. longiflorum*.

Os dados obtidos com as medições dos comprimentos cromossômicos revelam um cariótipo com cromossomos de tamanho pequeno para os quatro indivíduos da espécie. O tamanho do cariótipo variou entre 73,48 μm em PBPE UNI a 89,16 μm em PBPE 15. O menor comprimento médio cromossômico foi observado no indivíduo PBPE UNI com 0,59 μm , e o maior em PBPE 15 com 1,67 μm . De uma maneira geral, a subfamília Bombacaceae é caracterizada por apresentar cromossomos pequenos e numerosos e presença de material heterocromático em núcleos interfásicos (BAUM e OGINUMA, 1994; BAKER e BAKER, 1968).

Os resultados obtidos por Nasário (2014) também mostraram cromossomos pequenos nas três espécies do gênero *Pseudobombax* analisadas, variando de 0,3 a 2,0 μm em *P. grandiflorum*, 0,6 a 2,0 μm em *Pseudobombax* sp., e 0,6 a 3,5 μm em *P. tomentosum*. Devido ao tamanho reduzido dos cromossomos não foi possível realizar a medição dos braços curtos e longos, bem como a simetria cromossômica.

A dupla coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI revelou a presença de bandas CMA₃⁺/DAPI em regiões terminais e subterminais de alguns cromossomos em todos os indivíduos (Figura 1). No indivíduo PBPI 12, observou-se 16 cromossomos com bandas CMA₃⁺, sendo oito localizadas nas regiões terminais, quatro distribuídas entre a região subterminal e terminal e quatro bandas localizadas em regiões terminais distendidas (Figura 1a), relacionados provavelmente às regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Este genótipo apresentou ainda tamanho cromossômico total em torno de 81,38 μm , apresentando cromossomos com tamanho médio em torno de 0,97 μm .

No indivíduo PBPE14 (Figura 1b) observou-se a presença de seis cromossomos com bandas CMA₃⁺, sendo quatro localizadas nas regiões terminais e duas entre a região subterminal e terminal. O tamanho cromossômico total foi estimado em torno de 83,04 μm com tamanho médio em torno de 0,99 μm .

Em PBPE 15 a dupla coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI revelou a presença de seis cromossomos com bandas CMA₃⁺, sendo quatro localizadas nas regiões terminais e duas em regiões distendidas. O tamanho cromossômico total foi em torno de 89,16 com tamanho médio do cromossomo em torno de 1,06 μm .

A dupla coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI revelou a presença de oito cromossomos com bandas CMA₃⁺, sendo quatro localizadas nas regiões terminais e quatro nas regiões subterminais no indivíduo PBPE UNI (Figura 1c), com tamanho cromossômico

total em torno de 73,48 μm e cromossomos com tamanho médio em torno de 0,88 μm . Não foram observadas bandas DAPI⁺ nos indivíduos estudados.

Os dados obtidos do número de bandas e na quantidade de heterocromatina constitutiva no presente estudo revelam a existência de heteromorfismo intraespecífico entre os indivíduos observados, com exceção do PBPE 14 e PBPE 15 que apresentaram o mesmo padrão de bandas. Variação intraespecífica na quantidade de heterocromatina é uma das características bem relatada para várias espécies na literatura, embora Nasario (2014) tenha afirmado que o padrão de bandas CMA₃/DAPI é uma característica que parece ser conservada nas espécies de *Pseudobombax*. Nesse caso, apesar do pouco número de genótipos analisados no presente trabalho, verifica-se uma considerável variabilidade entre os indivíduos. Nasario (2014) observou um padrão de seis bandas CMA⁺ conservadas nas espécies *Pseudobombax* sp. (nova), *P. tomentosum* e *P. grandiflorum*.

Tabela 1. Dados citogenéticos de quatro genótipos da espécie *Pseudobombax simplicifolium*, com destaque para o número cromossômico, número de bandas CMA⁺, VVC- Variação do Comprimento Cromossômico, CCM- Comprimento Cromossômico Médio, e TC- Tamanho do Cariótipo). Petrolina, PE, 2015.

Indivíduo	2n	Nº de Bandas CMA ₃ ⁺ /DAPI	VCC (μm)	CCM (μm)	TC (μm)
PBPI 12	84	16	0,63-1,45	0,97	81,38
PBPE 14	84	6	0,6-1,44	0,99	83,04
PBPE 15	84	6	0,68-1,67	1,06	89,16
PBPEUNI	84	8	0,59-1,30	0,88	73,48

O indivíduo PBPE UNI, apesar de ser coletado em ambientes próximos dos indivíduos PBPE 14 e PBPE 15, apresentou maior divergência quanto aos tamanhos médio e total dos cromossomos.

As análises citogenéticas e moleculares são ferramentas importantes para a compreensão e identificação de processos envolvidos na divergência e evolução das espécies. Devido a carência de informações citogenéticas e moleculares, estudos citológicos adicionais são necessários para um melhor entendimento do processo evolutivo da espécie *P. simplicifolium*.

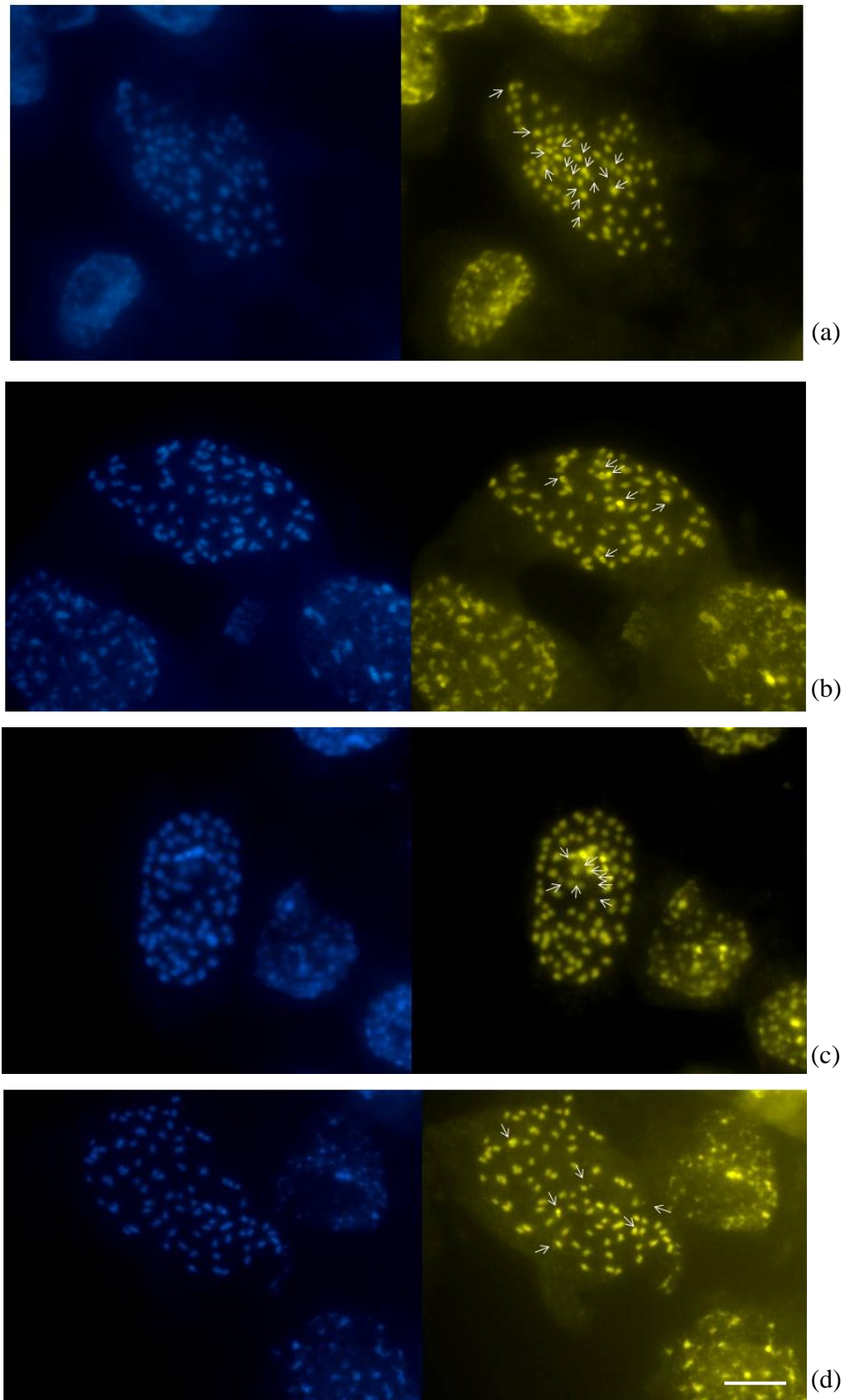


Figura1. Metáfases com dupla coloração CMA₃/DAPI, setas indicando a localização de blocos CMA₃⁺ em oito pares cromossômicos em PBPI 12 (a), três pares em PBPE 14 (b), quatro pares em PBPE UNI (c) e três pares em PBPE 15 (d). Barra em (d) = 10 μm.

Tabela 2. Comprimentos cromossômicos absolutos médios (CA) em μm e comprimento relativo (CR) em quatro genótipos de *Pseudobombax simplicifolium*, $2n=84$.

Indivíduo	Pares de cromossomos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
PBPI 12	CA	0,63 \pm 0,07	0,68 \pm 0,1	0,71 \pm 0,1	0,73 \pm 0,12	0,74 \pm 0,13	0,76 \pm 0,15	0,78 \pm 0,16	0,80 \pm 0,14	0,81 \pm 0,14	0,83 \pm 0,15	0,84 \pm 0,16
	CR	1,55%	1,67%	1,74%	1,80%	1,82%	1,87%	1,92%	1,97%	1,99%	2,03%	2,06%
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	CA	0,86 \pm 0,15	0,88 \pm 0,15	0,88 \pm 0,14	0,89 \pm 0,16	0,89 \pm 0,16	0,90 \pm 0,15	0,91 \pm 0,15	0,91 \pm 0,15	0,93 \pm 0,15	0,94 \pm 0,16	0,95 \pm 0,16
	CR	2,11%	2,16%	2,16%	2,19%	2,19%	2,21%	2,23%	2,23%	2,29%	2,31%	2,33%
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	CA	0,96 \pm 0,17	0,97 \pm 0,18	0,98 \pm 0,18	1,0 \pm 0,18	1,02 \pm 0,18	1,03 \pm 0,18	1,04 \pm 0,18	1,06 \pm 0,18	1,08 \pm 0,19	1,09 \pm 0,20	1,15 \pm 0,19
	CR	2,35%	2,38%	2,40%	2,46%	2,51%	2,53%	2,56%	2,61%	2,65%	2,68%	2,82%
		34	35	36	37	38	39	40	41	42		
	CA	1,13 \pm 0,21	1,15 \pm 0,20	1,17 \pm 0,20	1,19 \pm 0,2	1,21 \pm 0,2	1,25 \pm 0,23	1,26 \pm 0,21	1,33 \pm 0,24	1,45 \pm 0,27		
	CR	2,83%	2,82%	2,88%	2,92%	2,97%	3,07%	3,09%	3,26%	3,56%		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PBPE 14	CA	0,60 \pm 0,05	0,68 \pm 0,04	0,72 \pm 0,05	0,74 \pm 0,04	0,76 \pm 0,05	0,77 \pm 0,04	0,78 \pm 0,05	0,80 \pm 0,06	0,83 \pm 0,06	0,84 \pm 0,07	0,85 \pm 0,07
	CR	1,45%	1,64%	1,74%	1,78%	1,83%	1,86%	1,88%	1,93%	2,0%	2,02%	2,04%
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	CA	0,86 \pm 0,08	0,88 \pm 0,08	0,89 \pm 0,08	0,90 \pm 0,09	0,91 \pm 0,1	0,92 \pm 0,09	0,94 \pm 0,08	0,96 \pm 0,09	0,97 \pm 0,09	0,98 \pm 0,09	0,99 \pm 0,09
	CR	2,07%	2,12%	2,14%	2,17%	2,19%	2,21%	2,26%	2,31%	2,33%	2,36%	2,39%
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	CA	1,0 \pm 0,09	1,01 \pm 0,08	1,02 \pm 0,09	1,04 \pm 0,09	1,05 \pm 0,1	1,07 \pm 0,08	1,08 \pm 0,08	1,08 \pm 0,08	1,10 \pm 0,09	1,12 \pm 0,08	1,13 \pm 0,09
	CR	2,41%	2,43%	2,46%	2,51%	2,53%	2,58%	2,60%	2,60%	2,65%	2,70%	2,72%
		34	35	36	37	38	39	40	41	42		
	CA	1,14 \pm 0,09	1,16 \pm 0,09	1,19 \pm 0,1	1,21 \pm 0,11	1,24 \pm 0,11	1,27 \pm 0,12	1,31 \pm 0,11	1,36 \pm 0,09	1,44 \pm 0,09		
	CR	2,75%	2,79%	2,87%	2,91%	2,99%	3,06%	3,16%	3,28%	3,47%		

Tabela 2. Comprimentos cromossômicos absolutos médios (CA) em μm e comprimento relativo (CR) em quatro genótipos de *Pseudobombax simplicifolium*, $2n=84$. (Continuação)

Indivíduo	Pares de cromossomos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
PBPE 15	CA	0,68 ± 0,04	0,72 ± 0,04	0,75 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,84 ± 0,05	0,88 ± 0,06	0,90 ± 0,06	0,91 ± 0,07	0,92 ± 0,07	0,93 ± 0,07
	CR	1,53%	1,62%	1,68%	1,77%	1,84%	1,89%	1,97%	2,02%	2,04%	2,06%	2,09%
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	CA	0,95 ± 0,07	0,96 ± 0,07	0,97 ± 0,07	0,97 ± 0,07	0,98 ± 0,08	1,0 ± 0,06	1,01 ± 0,06	1,02 ± 0,07	1,03 ± 0,07	1,04 ± 0,06	1,04 ± 0,06
	CR	2,13%	2,15%	2,18%	2,18%	2,20%	2,24%	2,27%	2,29%	2,31%	2,33%	2,33%
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	CA	1,06 ± 0,07	1,08 ± 0,07	1,09 ± 0,06	1,10 ± 0,07	1,11 ± 0,07	1,11 ± 0,08	1,15 ± 0,09	1,16 ± 0,09	1,16 ± 0,1	1,18 ± 0,1	1,19 ± 0,1
	CR	2,38%	2,42%	2,45%	2,47%	2,49%	2,49%	2,58%	2,60%	2,60%	2,65%	2,67%
		34	35	36	37	38	39	40	41	42		
	CA	1,21 ± 0,1	1,23 ± 0,09	1,25 ± 0,1	1,28 ± 0,1	1,33 ± 0,1	1,34 ± 0,1	1,38 ± 0,12	1,45 ± 0,08	1,67 ± 0,15		
	CR	2,72%	2,76%	2,80%	2,87%	2,98%	3,0%	3,10%	3,25%	3,75%		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PBPE UNI	CA	0,59 ± 0,04	0,63 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,67 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,03	0,77 ± 0,03
	CR	1,61%	1,72%	1,77%	1,82%	1,88%	1,93%	1,96%	1,99%	2,04%	2,07%	2,10%
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	CA	0,78 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,81 ± 0,04	0,82 ± 0,04	0,83 ± 0,04	0,84 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,85 ± 0,05	0,86 ± 0,04
	CR	2,12%	2,15%	2,18%	2,18%	2,20%	2,23%	2,26%	2,29%	2,29%	2,31%	2,34%
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	CA	0,87 ± 0,04	0,87 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,89 ± 0,05	0,90 ± 0,05	0,91 ± 0,05	0,93 ± 0,05	0,94 ± 0,06	0,95 ± 0,06	0,96 ± 0,06	0,97 ± 0,07
	CR	2,37%	2,37%	2,40%	2,42%	2,45%	2,48%	2,53%	2,56%	2,59%	2,61%	2,64%
		34	35	36	37	38	39	40	41	42		
	CA	0,99 ± 0,06	1,02 ± 0,06	1,04 ± 0,09	1,08 ± 0,12	1,11 ± 0,15	1,13 ± 0,17	1,15 ± 0,17	1,18 ± 0,19	1,30 ± 0,21		
	CR	2,70%	2,78%	2,83%	2,94%	3,02%	3,08%	3,13%	3,21%	3,54%		

CR= Comprimento médio do par de homólogos/ (Comprimento total do cariótipo / 2); CTC= Soma dos comprimentos dos cromossomos

CONCLUSÕES

Análises citológicas mostraram $2n=84$ cromossômicos e núcleo interfásico do tipo semirreticulado nos quatro genótipos de *Pseudobombax simplicifolium* A. Robyns.

A análise com dupla coloração CMA₃/DAPI permitiu a visualização de variabilidade intraespecífica para o número de bandas e tamanho cromossômico total na espécie *P. simplicifolium* sendo possível observar variação entre os genótipos da mesma localidade.

REFERÊNCIAS

- BAKER, H. G; BAKER, I. Chromosome numbers in the Bombacaceae. **Botanical Gazette**, v. 129, n. 4, p. 294-296, 1968.
- BAUM, D. A.; OGINUMA. K. A review of chromosome numbers in Bombacaceae new counts for *Andansonia*. **Taxon**, v.43, n.1, p. 11-20, 1994.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C; CUADRADO, A.; BRAMMER, S.P.; BENKI-ISEPPON A.M.; GUERRA, M. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploids *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.2, p.308-313, 2005.
- CARVALHO SOBRINHO, J. G.. **O gênero *Pseudobombax* Dugand (Malvaceae s. l., Bombacoidade) no estado da Bahia, Brasil**. 2006. 166f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, BA.
- FORNI-MARTINS, E. R. e MARTINS, F. R. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, 2000.
- GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Guanabara. Rio de Janeiro.1998.
- GUERRA, M; SOUZA M. J. **Como Observar os Cromossomos**: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. In: Guerra M., Souza M. J. (eds.) Como analisar os cromossomos mitóticos. FUNPEC, São Paulo, pp.23-38, 2002.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras** – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. V.2. 2ªed. Editora Plantarum. Nova Odessa – SP. p.368, 2002.
- MACIEL, J. R.; FERREIA, J. V. A.; SIQUEIRA FILHO, J. A. de. Modelagem de distribuição de espécies arbóreas na recuperação de áreas degradadas da caatinga. In: SIQUEIRA FILHO, J. A. de (orgs.). **Flora das Caatingas do Rio São Francisco**: História natural e conservação. 1ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, p. 230-259.2012.

MORAWETZ, W. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematic and Evolution**, v. 152, p. 49-100, 1986.

NASARIO, J. P. S. Biologia Floral, reprodutiva e cariótipo de espécies de *Pseudobombax* Dugand (Bombacoideae, Malvaceae) do Sudeste do Brasil. Campinas, 2014.

ROBYNS, A. Flora of Panama. Bombacaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.51, p.37-68,1964. Disponível em: <http://biostor.org/reference/11852>, Acesso em: 20/07/2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio WPM acrescido com o antioxidante PVP mostrou-se mais eficiente no estabelecimento do cultivo *in vitro* de baraúna.

Na baraúna, a adição de BAP ao meio de cultura não favoreceu a multiplicação *in vitro* da espécie.

A adição de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado ao meio de cultura favorece o aumento no comprimento e número de brotos da espécie imbiruçu.

Concentrações mais diluídas do meio DKW podem ser utilizadas no estabelecimento do cultivo *in vitro* do imbiruçu, pois além de proporcionar resultados positivos na fase de estabelecimento reduz o custo final do processo de micropropagação.

Concentrações acima de $4,92$ e $6,64 \mu\text{M.L}^{-1}$ de AIB inibiram a multiplicação *in vitro* das duas espécies.

Análises citológicas evidenciaram estabilidade no número cromossômico ($2n=84$ na espécie *P. simplicifolium*).

A análise com dupla coloração CMA₃/DAPI permitiu a visualização de variabilidade intraespecífica para o número de banda e tamanho do cariótipo na espécie *P. simplicifolium* sendo possível observar variação entre os genótipos da mesma localidade