



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



TECLA DOS SANTOS SILVA

MORFOGÊNESE *in vitro* E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE
***Myracrodruon urundeuva* Fr. All.**

TECLA DOS SANTOS SILVA

**MORFOGÊNESE *in vitro* E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE
Myracrodruon urundeuva Fr. All.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Feira de Santana-BA
2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

S583m Silva, Tecla dos Santos

Morfogênese *in vitro* e triagem fitoquímica de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. / Tecla dos Santos Silva. – Feira de Santana, 2017.
104f.: il.

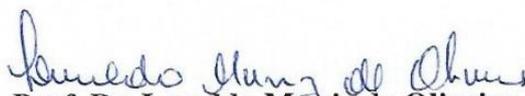
Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.

1. Germinação *in vitro*. 2. Calogênese. 3. Aroeira-do-sertão. 4. *Myracrodruon urundeuva*. 5. Anacardiaceae. I. Santana, José Raniere Ferreira de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.765

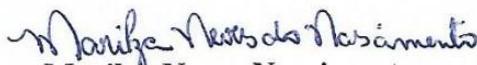
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Prof.ª. Dra. Daniela Garcia Silveira
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano
IF Baiano - Guanambi)



Prof.ª. Dra. Marilza Neves Nascimento
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Prof.ª. Dra. Alone Lima Brito
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

*Aos meus pais, meus primeiros professores, que através de suas lutas e sacrifícios
diários de amor, me oportunizaram estudar*

Ao meu esposo por acreditar e estar ao meu lado em todos os momentos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A conclusão dessa etapa da minha vida é repleta de gratidão, a maior delas é ao meu Senhor, o Deus Vivo a quem devo tudo! Se estou concluindo o Doutorado, é porque assim foi vontade dEle, pois no meio do caminho, quando a tempestade forte soprou em minha vida, Ele me sustentou e continua a me sustentar. Obrigada Senhor!

Agradeço à Família que fui agraciada em ter, aos meus pais Chane (José Dionísio) e Edineuza que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida e sei que sempre estarão; obrigada por tudo, por me amar, por cuidar de mim! Nós vencemos! Amo demais vocês!

Ao meu amado Esposo, Dinho (Marivaldo), meu companheiro de vida, meu amigo, meu amor! Agradeço ao Senhor por ter você. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e lutar junto, me dando apoio, carinho, força e amor! Amo você!

Aos meus irmãos amados Eudes e Manoel Neto, que são presentes que o Senhor me deu! Amo muito vocês. Agradeço ao pequeno Lipe (Felipe), meu sobrinho/afilhado que chegou a pouco tempo e já trouxe muita alegria para minha vida. Titia ama muito! Não esquecendo das minhas queridas cunhadas, em especial Mayara e Adriana pelo apoio e carinho nos momentos difíceis!

Agradeço à minha querida avó Nanan (Josefa), que sempre me amou muito e com quem posso contar em todas as situações. Obrigada por deixar tudo e vim cuidar de mim nos momentos em que mais precisei! Amo muito a senhora.

Agradeço a todos os meus tios e minhas tias, em especial à minha tia Ana Maria, Tia Nalva e Tia Dilma, que deixaram tudo para cuidar de mim quando estive internada, dividindo com minha mãe a dura tarefa e rotina de hospital. Ao carinho das minhas queridas afilhadas Bia (Beatriz) e Mai (Maíra). Obrigada por tudo, amo muito vocês!

Agradeço às minhas madrinhas “Tia Dinha” (Laura) e Neuza, por me trazerem ainda mais amor nas dificuldades!

Agradeço a todos meus primos e primas pelo carinho, pelo apoio e amizade. É muito bom poder ter cada um de vocês na minha vida! Em especial à Isa (Isabela), Mimi (Camila) e Lila (Kalila) pela convivência alegre e presença tão próxima nos momentos de luta, além do amor e carinho. Obrigada, amo vocês!

Agradeço à minha querida prima Cíntia, a Jairo e a Tia Lucinha pelo acolhimento, carinho e amor em nos receber em sua casa em Salvador no período em que estive internada! Muito obrigada por tudo!

Agradeço à família que ganhei ao me casar, por todo carinho, apoio e cuidado. Em especial à Tia Aurita (minha sogra) que nos momentos difíceis me acolheu com muito amor. Muito obrigada por tudo! Não esquecendo da pequena Eloise, minha sobrinha linda! Saiba que escutar você chamar “Tia Flor” traz alegria ao meu dia e me deixa muito feliz!

Agradeço ao Professor José Raniere pela orientação, que começou na iniciação científica, perpassou o Mestrado e agora no Doutorado. Agradeço a oportunidade e também o apoio e compreensão nos momentos difíceis. Muito obrigada!

Agradeço a toda equipe médica que cuidou e que continua a cuidar de mim, em Especial Dr. Eduardo Leite, Dr. Adson Neves e Dr^a Daniela Galvão pela humanidade em que acolheram a mim e a minha família no momento mais difícil da minha vida, além da competência e cuidado durante o tratamento. Muito obrigada!

Agradeço a todos os meus amigos por estarem do meu lado, trazendo alegria para os meus dias, em especial à Priscilla Souza, pela amizade de uma vida e presença ainda mais próxima durante o tratamento, obrigada por tudo amiga! E também a Karla por todo carinho e preocupação! Obrigada!

Agradeço a todos os colegas e amigos que o RGV me deu pelo apoio, carinho e solidariedade. Agradeço em especial às “amigas lindas” Rita Mércia, Kamilla Marcelino e Flávia Sousa; e a Janaíra (Jana), Marisol, Keila, Tamara, Raísa, Luma, Marcelo, Fabiana e Maiane. Vocês são presentes que encheram meus dias de alegria! Muito obrigada!

Agradeço à Flávia por todo carinho, amizade e preocupação comigo. Obrigada pelos gestos de carinho que fizeram muita diferença. Muito obrigada Fal. Obrigada pelo “#tamojunto” “#nãodesanima”.

Agradeço a Marisol Ferraz por fazer de um momento difícil, um pouco menos triste ao me presentear com muitos lenços artesanais feitos por ela mesmo, além do estímulo ao meu lado artístico. Muito obrigada, saiba que fez muita diferença poder contar com sua amizade.

Agradeço aos amigos do LCTV, em especial à Katiane, Andressa, Jéssica Vasconcelos, Lilian, Amanda, Dinah, Suzi, Bárbara, Jaque e Francisca. Agradeço o carinho de vocês, a amizade e apoio, além de deixar os dias de trabalho mais divertidos! Bom demais conviver com vocês!

Agradeço ao Júnior (Rosembrando Filho) que me acompanhou na maior parte do Doutorado e me ajudou na realização dos experimentos. Agradeço pela dedicação e comprometimento além da amizade e carinho. Muito obrigada “Filhote”!

Agradeço também à Thaylane pela ajuda na realização do trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e comprometimento, além do carinho! Muito obrigada Thay!

Agradeço à Karine Raísa pela grande ajuda nas análises fitoquímicas. Muito obrigada Rai por sua disponibilidade e carinho!

À Tamara Tanan pela ajuda nas análises bioquímicas. Muito obrigada Tamara, sua ajuda foi muito importante para concluir o trabalho.

Ao Marcelo Nascimento pela ajuda no fornecimento de material vegetal.

À Cristina Nepomuceno por sua amizade, e contribuição na minha formação profissional desde a Iniciação Científica. Obrigada por todo aprendizado, sou muito grata por tudo! Além do carinho e apoio sempre que precisei! Muito obrigada Cris!

Aos meus amigos que levei da Graduação, do LCTV, para a vida, Priscila Tavares, Bruno Alvim e Mara. Obrigada amigos!

À Alone Brito por sempre me receber com um sorriso e palavras de ânimo. Obrigada pelo carinho, preocupação, pela animação e organização dos nossos eventos super animados rs.

À professora Claudinéia Pelacani, coordenadora deste Programa, pela disponibilidade e compressão, além de sua preocupação e solidariedade. Obrigada!

Agradeço a todos os Professores do RGV pela contribuição na minha formação profissional em especial ao Professor Lenaldo Muniz e à Prof^a Marilza Nascimento. Obrigada!

Aos membros da Banca examinadora pela disponibilidade e contribuição. Obrigada!

Aos funcionários da Unidade Experimental Horto Florestal/UEFS pela disposição, carinho e alegria. Obrigada!

Agradeço ao Padre Luiz Nelcir Nazari, que muito me ajudou nos momentos de grande dificuldade. Suas palavras e apoio fizeram muita diferença para mim. Muito obrigada!

Agradeço a todos que intercederam em oração por mim além da solidariedade e amizade. Está concluindo esse trabalho é motivo de imensa alegria e gratidão. Muito obrigada!

À FAPESB pela concessão da Bolsa de Estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos da Universidade Estadual de Feira de Santana pela oportunidade de fazer o Doutorado.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

Muito obrigada!

“Se quiser conhecer uma pessoa não observe o que ela faz, mas o que ela ama.”
Santo Agostinho

RESUMO

Myracrodruon urundeuva Fr. All. (Anacardiaceae) é uma árvore ameaçada de extinção que possui potencial madeireiro e medicinal. Este trabalho objetivou estudar a indução de brotos *in vitro* de *M. urundeuva* e analisar o processo de calogênese, bem como avaliar qualitativamente a composição química de diferentes órgãos da espécie submetida a distintas condições de cultivo. Na indução de brotos avaliou-se o uso do nitrato de prata (AgNO_3) e dos reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), *meta*-topolina (*mT*) e ácido naftalenoacético (ANA) sob distintos explantes (cotilédones, pecíolo, segmentos nodais, cotiledonares e apicais). Para calogênese testou-se combinações de 2,4-D, CIN e glutamina em explantes foliares. Realizou-se a curva de crescimento dos calos durante 56 dias (intervalos de 7 dias) e quantificou-se os açúcares redutores (AR), sacarose e açúcares solúveis totais (AST). Para o estudo fitoquímico, utilizou-se extratos metanólicos advindos de material cultivado *in vitro*, casa de vegetação e em ambiente natural. É possível a indução de brotos em *M. urundeuva* a partir do explante nó cotiledonar com o uso de BAP combinado com ANA. A calogênese é potencializada com a combinação de 2,4-D, CIN e glutamina no meio nutritivo. A curva de crescimento dos calos apresenta forma sigmoidal. O conteúdo de carboidratos, excetuando os AR, apresenta comportamento distinto, variando de acordo com as fases da curva de crescimento dos calos. O tipo de cultivo influencia no rendimento de extratos de *M. urundeuva* e existem diferenças na produção de metabólitos secundários entre os diferentes órgãos da espécie.

Palavras-chave: Aroeira-do-sertão. Cultivo *in vitro*. Carboidratos. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva Fr. All. (Anacardiaceae) is an endangered tree that has wood and medicinal potential. This work aimed to study the induction of *in vitro* buds of *M. urundeuva* and to analyze the calogenesis process, as well as qualitatively evaluate the chemical composition of different organs of the species submitted to different culture conditions. In the induction of shoots, silver nitrate (AgNO₃) and plant regulators 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN), *meta*-topoline (*mT*) and naphthaleneacetic acid (NAA) were evaluated using different explants (cotyledons, petiole, nodal, cotyledonary and apical segments). For calogenesis, combinations of 2,4-D, KIN and glutamine in leaf explants were tested. The callus growth curve was performed for 56 days (7 day intervals) and the reducing sugars (RS), sucrose and total soluble sugars (TSS) were quantified. For the phytochemical study, we used methanolic extracts from material grown *in vitro*, in a greenhouse and in a natural environment. It is possible the induction of buds in *M. urundeuva* from the explant cotyledon node with the use of BAP combined with NAA. Calogenesis is potentiated with the combination of 2,4-D, KIN and glutamine in the nutrient medium. The growth curve of the callus is sigmoidal. The carbohydrate content, except for RA, presents a distinct behavior, varying according to the growth curve phases of the callus. The type of cultivation influences the yield of extracts of *M. urundeuva* and there are differences in the production of secondary metabolites between the different organs of the species.

Keywords: Aroeira-do-sertão. *In vitro* culture. Carbohydrates. Secondary metabolites.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1 – INDUÇÃO DE BROTOS <i>in vitro</i> VIA ORGANOGÊNESE DIRETA EM <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All.	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 2 – CALOGÊNESE EM <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All.	52
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 3 – TRIAGEM FITOQUÍMICA DE <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All. SOB DIFERENTES CULTIVOS	82
RESUMO	83
ABSTRACT	84
1 INTRODUÇÃO	85
2 MATERIAL E MÉTODOS	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	101
CONCLUSÕES GERAIS	104

INTRODUÇÃO GERAL

A família Anacardiaceae é constituída por aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, presentes em ambientes secos e úmidos (PELL et al., 2011). Dentre as espécies que constituem essa família, tem-se *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., uma árvore conhecida popularmente como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão (LIMA, 2011) (Figura 1), que possui ocorrência natural desde o Ceará até a Argentina e o Paraguai, sendo encontrada em formações vegetais de Caatinga, Cerrado e Floresta pluvial (ANDRADE et al., 2000).

É uma árvore caducifólia, cujo porte varia correspondentemente com a região onde é encontrada; a madeira é pardo-avermelhada, com sabor adstringente, muito dura e tida como imputrescível, bastante utilizada para obras externas, como postes, moirões, esteios, estacas, dormentes, vigas e armações de pontes, moendas de engenhos, na construção civil como caibros, tacos para assoalhos, ripas e para peças torneadas; a casca é subdividida em placas nos troncos mais velhos, sendo íntegra nas árvores jovens, encerrando 15% de tanino, usado na indústria de curtume (LORENZI, 1998; ANDRADE et al., 2000).

Além das características já descritas, a aroeira-do-sertão possui ainda uso medicinal, sendo empregada no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias e distúrbios no sistema digestório (MATOS, 1999). Sua entrecasca possui propriedades anti-inflamatórias, adstringentes, antialérgicas e cicatrizantes (VIANA et al., 1995); suas raízes são utilizadas no tratamento de reumatismo e suas folhas são indicadas para o tratamento de úlceras (ALMEIDA et al., 1998).

Em virtude dos múltiplos usos destinados à aroeira-do-sertão, esta vem sofrendo processo de exploração intensa, de forma predatória, causando a devastação de suas populações naturais. Além disso, a exploração seletiva para uso na indústria madeireira praticamente extinguiu os indivíduos de grande porte (BRANDÃO, 2000), sendo, portanto, considerada ameaçada de extinção (MMA, 2008).

De maneira geral, a exploração dessa planta na Caatinga é realizada de maneira desordenada, visto que não existe uma normatização, instituída em lei, para orientar o seu manejo; na prática, retiram-se da planta extensas áreas de tecido caulinar independentes da idade e do tamanho do vegetal, bem como da época do ano (MONTEIRO et al., 2005).

Nesse sentido, os processos biotecnológicos, como a cultura de tecidos vegetais, possuem importante papel na preservação e multiplicação de espécies que estejam em vias de extinção. Suas técnicas se baseiam na totipotencialidade celular, a partir da qual a célula vegetal possui capacidade de regenerar um indivíduo completo. As atividades inerentes à cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação

controladas, objetivando, principalmente, a otimização das respostas aos estímulos térmicos e fotoperíodo aplicados ao material *in vitro* (TEIXEIRA; TORRES, 1998). Dentre essas técnicas, tem-se a micropropagação, a qual permite a obtenção, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, de grande número de plantas com qualidade fitossanitária (NAGAO; PASQUAL; RAMOS, 1994).

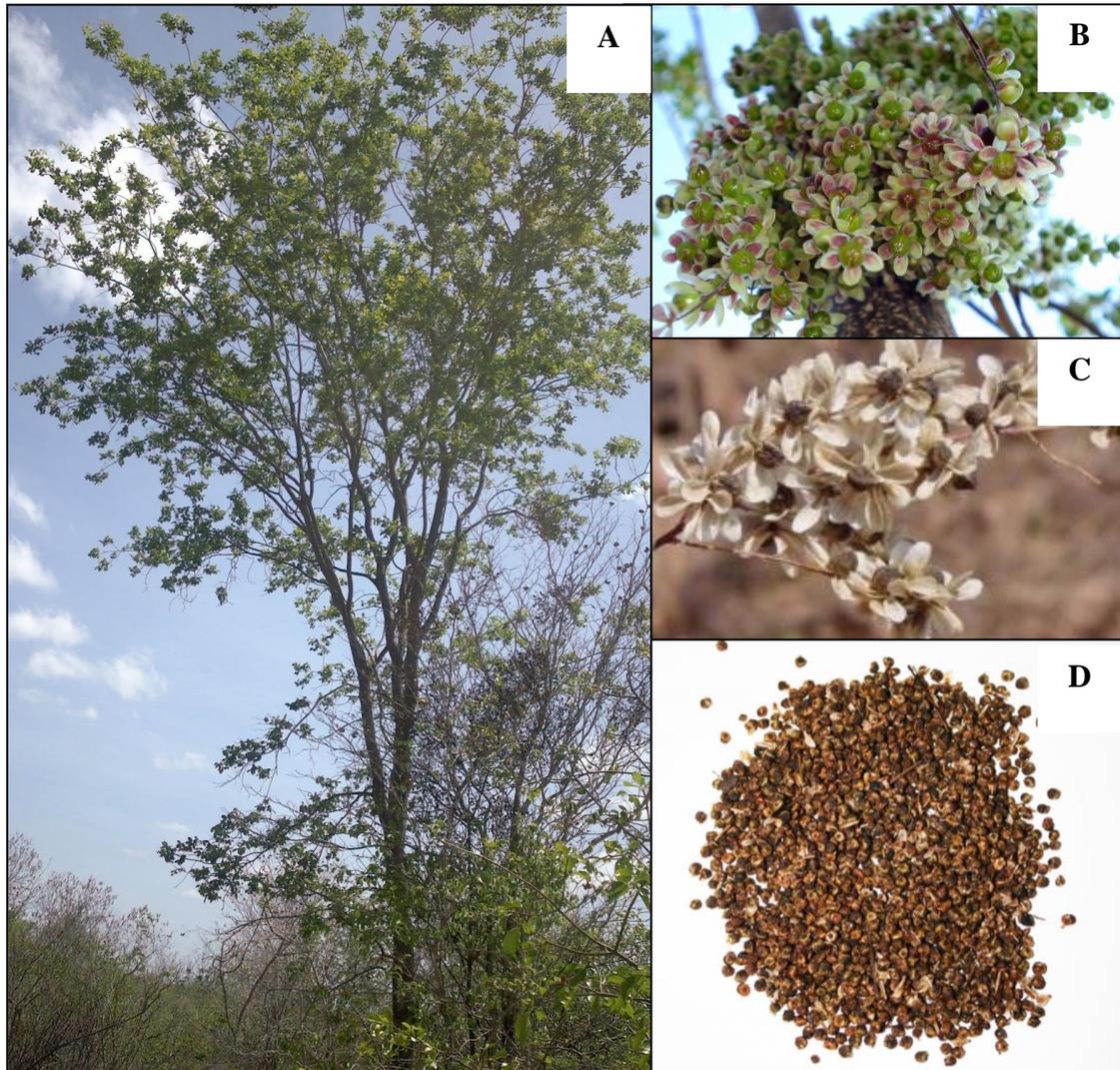


Figura 1: Caracterização botânica da *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **A-** Exemplar adulto (arbóreo); **B-** Inflorescência jovem; **C-** Inflorescência “seca” (época para coleta) e **D-** Frutos-sementes secos (Fonte das imagens: <<http://fotospiaui.blogspot.com.br/2013/01/aroeira.html>>; <http://www.tudosobreplantas.com.br/asp/plantas/ficha.asp?id_planta=1261>; <<http://www.tocadoverde.com.br/sementes-aroeira-preta-myracrodruon-urundeuva.html>>; <<http://ibflorestas.org.br/loja/semente-aroeira-preta.html>>, respectivamente).

A micropropagação vem sendo bastante requisitada para propagação de várias espécies vegetais, apresentando-se como uma alternativa viável para a produção de mudas em escala comercial e com alta fidelidade genética, o que é de importância singular para a conservação de espécies nativas e recuperação de áreas degradadas (MERKLE; NAIRN, 2005). A micropropagação pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática, sendo que ambas podem ocorrer por duas formas: via direta, através da regeneração de plantas diretamente do explante, sem passar pela fase de calo, apresentando alta fidelidade genética; e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Este calo caracteriza-se como um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante, sendo a friabilidade uma característica importante quando se objetiva a obtenção de embriões somáticos ou a produção de metabólitos secundários de interesse, via cultivo de células em suspensão (BARRUETO CID, 1992).

A organogênese conceitua-se como a formação de estruturas a partir de tecidos e/ou células, onde ocorre a diferenciação de novas gemas em brotações (cauligenese) e raízes (rizogênese) durante o desenvolvimento vegetal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Enquanto a embriogênese somática, também chamada de adventícia ou assexual, caracteriza-se como processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolve-se por meio de estádios embriogênicos, apresentando muitas características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico, constituindo-se de estruturas bipolares (ápice caulinar e radicular) com sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos do explante inicial (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Na obtenção dos processos morfogênicos *in vitro* são utilizados os fitorreguladores, como as auxinas e citocininas, que possuem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados dos locais produtores na planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares (KERBAUY, 2008). Enquanto as auxinas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, além de serem responsáveis pela dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2009) e promoção do enraizamento *in vitro*.

As citocininas mais utilizadas em cultura de tecidos vegetais são: a cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ) (GUERRA; NODARI, 2006). A definição do tipo e da concentração ideal de citocinina

durante a fase de multiplicação é um passo de grande importância, de maneira que experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros fitorreguladores são muito comuns para o ajustamento dos meios (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, sendo fundamental o aperfeiçoamento de protocolos de propagação para cada espécie (VIDAL; DINIZ; SILVA, 2013).

O uso do BAP tem sido relatado para multiplicação em diversas espécies lenhosas, entre essas estão *Amburana cearensis* (Allem.) A. C. Smith (CAMPOS et al., 2013), *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (BEZERRA et al., 2014), *Handroanthus chrysotrichus* Mart. ex A. DC. Mattos (PEREIRA; NAVROSKI; REINIGER, 2015), *Hancornia speciosa* Gomes (OLIVEIRA; FREIRE; ALOUFA, 2016), *Pterodon emarginatus* Vogel (CANATTO et al., 2016) e *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (PRUDENTE et al., 2016).

Uma outra citocinina que vem sendo utilizada em trabalhos de propagação *in vitro* é a *meta-topolina* (*mT*), a qual tem sido relatada na propagação de espécies lenhosas como *Corylus colurna* L. (GENTILE et al., 2016) e *Pyrus communis* L. (DIMITROVA; NACHEVA; BEROVA, 2016). A *mT* foi isolada primeiramente de folhas de álamo (*Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*) e apresenta-se como uma citocinina aromática que diferencia-se das isoprenóides em relação à sua bioquímica, receptores e atividade biológica (STRNAD et al., 1997). Excetuando-se o BAP, as citocininas do tipo purina são quimicamente instáveis, enquanto que os tipos não purínicos, como a *mT*, são geralmente estáveis e, portanto, têm a vantagem em procedimentos que envolvem esterilização (VINAYAK; DHAWAN; GUPTA, 2009). A utilização da *mT* tem sido relatada como uma alternativa para reduzir desordens fisiológicas causadas por outras citocininas, como relatado por Mirabbasi e Hosseinpour (2014) em estudos com *Ulmus glabra* Huds, através dos quais constataram que os explantes que foram tratados com *mT* produziram brotos mais vigorosos do que com BAP.

O uso mais freqüente das auxinas é verificada na indução do desenvolvimento de nós, formação de calos e desenvolvimento de raízes adventícias (CARVALHO; VIDAL, 2003). Segundo Guerra e Nodari (2006), do grupo das auxinas, as mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido μ -naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), 4-CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e picloran. De acordo com os mesmos autores, seu balanço com as citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea, ao passo que concentrações iguais promovem a produção de calos. No entanto,

para a indução de calos normalmente são usadas as auxinas 2,4-D e ANA (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Uma outra substância, o nitrato de prata (AgNO_3), comumente utilizado como inibidor de ação do hormônio etileno (AL-KHAYRI; AL-BAHRANY, 2001) tem apresentado efeito benéfico na multiplicação de espécies lenhosas. O uso desse inibidor aumentou o número de brotações de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul (NEPOMUCENO et al., 2007) e de *Olea europaea* (DONINI; FIGUEIREDO; SCHUCH, 2011). Já os compostos nitrogenados são considerados essenciais na composição dos meios nutritivos por atuarem nos vários eventos fisiológicos da planta, como controle do crescimento, diferenciação e morfogênese, o quais podem ser fornecidos na forma de nitrato, amônio ou aminoácidos, dentre eles a glutamina (SOARES, 2013). De acordo com Caldas, Haridasan e Ferreira (1998) dependendo da espécie em cultivo, pode-se observar um estímulo ou uma inibição do crescimento e desenvolvimento quando um aminoácido é adicionado isoladamente ou em mistura. Segundo os mesmos autores, a glutamina, precursora de diversos aminoácidos, tem sido utilizada com sucesso na complementação das fontes inorgânicas de nitrogênio, bem como fonte única desse elemento, estimulando o crescimento de tecidos diversos *in vitro*. O uso da glutamina tem sido relatado em estudos calogênicos, a exemplo de *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose (LOPES et al., 2016).

Com a espécie *M. urundeuva* foram encontrados poucos estudos utilizando as técnicas de cultura de tecidos vegetais, entre eles destacam-se os trabalhos de Andrade et al. (2000) e de Vasconcelos et al. (2012). No primeiro foram realizados estudos de micropropagação com a aroeira-do-sertão, via organogênese direta, em que foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de reguladores vegetais na organogênese a partir de explantes oriundos de sementes germinadas *in vitro*. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que é possível a regeneração de plantas a partir de segmentos nodais e apicais, sendo ainda possível, posteriormente, prosseguir com as etapas de enraizamento e aclimatização das plantas. No entanto, foi constatada alta taxa de oxidação nos explantes, os quais originaram uma única brotação. Enquanto Vasconcelos et al. (2012) induziram calos a partir de segmentos foliares usando 2,4-D e caracterizaram esses calos quanto aos aspectos morfológicos e bioquímicos. Contudo, os autores obtiveram apenas calos compactos e não-embriogênicos.

Vários trabalhos de micropropagação já foram realizados para outras espécies da família Anacardiaceae, entre eles: *Tapirira guianensis* Aubl., em qual foi verificado que é possível a indução de brotos adventícios, a partir do segmento cotiledonar, cultivados em meio de cultura suplementado com 4,44 μM de BAP (GUTIÉRREZ et al., 2013) e *Schinus*

terebinthifolius Raddi., para qual foi constatado que o explante mais indicado para o estabelecimento *in vitro* é o segmento nodal (considerando os parâmetros número e altura média dos brotos) e que 4,5 μ M de BAP é a concentração indicada para a regeneração da espécie (PAIVA; ALOUFA, 2009).

Em estudos farmacognósticos com as cascas de *M. urundeuva*, Kato e Akisue (2002) detectaram a presença de compostos fenólicos, taninos e óleos essenciais. Enquanto Monteiro et al. (2005) ao investigar a quantidade média dos taninos presentes na casca, encontraram valores que variaram de 35,20 a 51,90 mg (7,04 a 10,38%, respectivamente). A presença desses compostos químicos em *M. urundeuva*, responsáveis pelas potencialidades medicinais atribuídas à espécie, deve-se às substâncias presentes nas plantas, visto que os vegetais produzem grande variedade de compostos orgânicos que parecem não possuir função direta no seu crescimento e desenvolvimento, tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas como por exemplo, a proteção contra patógenos, no qual podem atuar como antibacterianos, antifúngicos e antivirais, assim como, agindo com atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas através da síntese de fitoalexinas (FUMAGALI et al., 2008). Esses metabólitos em grande parte conferem ação medicinal às plantas que os produzem.

Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabólitos primários e secundários, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes (MORAIS et al., 2012). Essa ferramenta biotecnológica permite a produção de metabólitos secundários *in vitro*, assegurando assim, formas alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente em ecossistemas ameaçados (MORAIS et al., 2012); bem como, a síntese e a quantidade dos compostos secundários nas plantas podem ser diferentes no cultivo *in vitro* quando comparados ao cultivo *in vivo* (KIRAKOSYAN et al., 2000).

Dessa maneira, as análises fitoquímicas fornecem informações relevantes sobre a presença de metabólitos secundários nas plantas, para que assim possa-se chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010), sendo a triagem fitoquímica um procedimento importante para bioprospecção das espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional de interesse farmacológico e/ou toxicológico (BESSA et al., 2013).

Em estudos de prospecção fitoquímica com extratos etanólicos obtidos a partir das folhas e cascas de *M. urundeuva* coletadas na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (Caxias/MA), Silva, Miranda e Conceição (2010), identificaram a presença de esteroides/triterpenos e taninos nas folhas e alcaloides e saponinas (fraco positivo) tanto nas folhas como na casca. Enquanto Cardoso (2009) em estudos para avaliação da concentração de compostos fenólicos de *Myracrodruon urundeuva* sob diferentes formas de cultivo (folhas secas das plântulas germinadas *in vitro* e cultivadas em casa de vegetação provenientes de sementes osmocondicionadas e não osmocondicionadas, além das amostras dos calos liofilizados) verificou que a concentração de compostos fenólicos foi maior nas plantas cultivadas *ex vitro* e provenientes do osmocondicionamento.

Nesse contexto, este trabalho objetivou estudar a indução de brotos *in vitro* de *Myracrodruon urundeuva*, visando o aumento da sua taxa de multiplicação e analisar o processo de calogênese, bem como avaliar qualitativamente a composição química de diferentes órgãos da espécie submetida a distintas condições de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2- isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 291-298, 2001.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188p.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Ciências e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174- 180, 2000.
- BARRUETO CID, L.P.B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, n.18, p. 2-7, 1992.
- BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n. 4, p. 692-707, 2013.
- BEZERRA, R. M. F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.
- BRANDÃO, M. Caatinga. In: MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. (Orgs). **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas e Fundação Zêo-Botânica de Belo Horizonte, 2000, p. 75-85.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, 1998, p. 87-132.
- CAMPOS, V. C. A. et al. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.
- CANATTO, R. A.; ALBINO, B. E. S.; CORDEIRO, A. T. Propagação *in vitro* de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel): uma espécie florestal nativa. **Fórum Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 76-88, 2016.
- CARDOSO, N. S. N. **Avaliação da *Myracrodruon urundeuva* Fr. ALLEMÃO Sob diferentes formas de cultivo: crescimento, atividade antimicrobiana e compostos fenólicos**. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana.
- CARVALHO, F. M. J; VIDAL, S. M. **Noções básicas de cultura de tecidos**. Documentos 116. Embrapa. Out., 2003. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/273469/1/DOC116.PDF>>. Acesso em: 22 fev 2017.

DIMITROVA, N.; NACHEVA, L.; BEROVA, M. Effect of meta-topolin on the shoot multiplication of pear rootstock OHF-333 (*Pyrus communis* L.). **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 15, n. 2, p. 43-53, 2016.

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira 'Arbequina'. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GENTILE, A. et al. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, p. 1-11. 2016.

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2013.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999. v. 2. p. 533-568.

GUTIÉRREZ, I. E. M. et al. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 043-052, 2013.

KATO, E. T.; AKISUE, G. Estudo farmacognóstico de cascas *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 1, p. 69-76, 2002.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008. 431p.

KIRAKOSYAN, A. et al. Stimulation of production of hipericins by manman in *Hipericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, v. 53, p. 345-348, 2000.

LIMA, B. G. **Caatinga: Espécies lenhosas e herbáceas**. Mossoró-RN: EDUfersa, 2011. 316p.

LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaita vermelha. **Agrária**, v.11, n.1, p. 21-25, 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2: ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 352 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas de medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: Edições UFC, 80p. 1999.

MERKLE, S. A.; NAIRN, C. J. Hardwood tree biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, v. 41, p. 602-619, 2005.

MIRABBASI, S. M. HOSSEINPOUR, B. Prevention of shoot tip necrosis, hyperhydricity and callus production associated with *in vitro* shoot culture of *Ulmus glabra*. *Journal of Novel Applied Sciences*, v. 3, n. 6, p. 683-689, 2014.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>
Data de Acesso: março de 2015.

MONTEIRO, J. M. et al. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, v. 29, n. 6, p. 999- 1005, 2005.

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.

NAGAO, E. O; PASQUAL, M; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “in vitro” de brotações de porta-enxerto de citros. *Bragantia*, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.

NEPOMUCENO, C. F. et al. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M. ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Floresta*, v. 46, n. 3, p. 335 - 342, 2016.

PAIVA, A.M.S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 3, p. 300-304, 2009.

PELL, S. K. et al. Anacardiaceae. In KUBBITZKI (ed). **The families and genera of vascular plants. X. Floering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales**. Springer, Berlin. 2011. p 7-50.

PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). *Nativa*, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.

PRUDENTE, D. O. et al. Micropropagação de candeia, uma espécie nativa do cerrado brasileiro. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 15, n. 3, p. 305-311, 2016.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SOARES, T. C. **Indução da morfogênese *in vitro* em cultivares de algodoeiro**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba.

STRNAD, M. et al. *Meta-topolin*, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis* Moench., cv. *Robusta*). **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 213-218, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, 1998, p. 71-86.

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

VIANA, G. S. B. et al. **Aroeira-do-sertão**: estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1995. 164p.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 64-70, 2013.

VINAYAK, V. DHAWAN, A. K.; GUPTA, V. K. Efficacy of non-purine and purine cytokinins on shoot regeneration *in vitro* in surgane. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 227-231, 2009.

Capítulo I

**INDUÇÃO DE BROTOS *in vitro* VIA ORGANOGÊNESE
DIRETA EM *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.**

RESUMO

Myracrodruon urundeuva Fr. All. é uma árvore pertencente à família Anacardiaceae, ameaçada de extinção, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão que possui potencial madeireiro e medicinal. Este trabalho objetivou estudar a indução de brotos *in vitro* de *M. urundeuva*, visando o aumento da taxa de multiplicação da espécie. Realizou-se cinco experimentos: 1- testou-se diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) (0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 μM) combinadas com ANA (ácido naftalenoacético) (0,0; 1,5 e 3,0 μM) em diferentes explantes (cotilédone, hipocótilo e nó cotiledonar); 2- testou-se segmentos nodais e pecíolo em meio contendo BAP ou CIN (cinetina) nas concentrações 0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 μM ; 3- avaliou-se a interação entre BAP (0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 μM) e ANA (0,0; 1,5 e 3,0 μM) sob segmentos nodais; 4- testou-se nós cotiledonares e segmentos nodais em meio contendo 8,0 μM de BAP suplementado com diferentes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 μM) de nitrato de prata (AgNO_3); 5- avaliou-se a ação de distintas concentrações (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 μM) de *mT* (*meta*-topolina) sob distintos explantes (segmento nodal basal biaxilar; mediano uniaxilar e apical). Após 45 dias avaliou-se: a porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos e que formaram calos, número de brotos e folhas e comprimento da parte aérea. É possível a indução de brotos em *M. urundeuva* a partir do explante nó cotiledonar com o uso de BAP combinado com ANA. O uso do AgNO_3 reduz a taxa de calos nos explantes.

Palavras-chave: Aroeira-do-sertão. Lenhosa. Cultivo *in vitro*. Planta medicinal.

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva Fr. All. Is a tree belonging to the family Anacardiaceae, threatened with extinction, popularly known as aroeira-do-sertao, which has wood and medicinal potential. This work aimed to study the induction of *in vitro* buds of *M. urundeuva*, aiming to increase the rate of multiplication of the species. Five experiments were performed: 1- different concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) (0.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 μM) were tested in combination with NAA (naphthaleneacetic acid) (0.0, 1.5 and 3.0 μM) in different explants (cotyledon, hypocotyl and cotyledon node); 2- nodal segments and petiole were tested in medium containing BAP or KIN (kinetin) at concentrations of 0.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 16.0 μM ; 3- the interaction between BAP (0.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 μM) and NAA (0.0, 1.5 and 3.0 μM) under nodal segments; 4- cotyledonary nodes and nodal segments were screened in medium containing 8.0 μM BAP supplemented with different concentrations (0.0, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 μM) of silver nitrate (AgNO_3); 5- the concentration of different concentrations (0.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 32.0 μM) of *mT* (*meta*-topoline) under different explants (basal axillary nodal segment; medial uniaxillary and apical). After 45 days, the percentage of shoots responsible for bud formation and callus formation, number of shoots and leaves, and shoot length were evaluated. It is possible the induction of buds in *M. urundeuva* from the explant cotyledon node with the use of BAP combined with NAA. The use of AgNO_3 reduces the callus rate in the explants.

Keywords: Aroeira-do-sertão. Woody. *In vitro* culture. Medicinal plant.

1 INTRODUÇÃO

Myracrodruon urundeuva Fr. All. é uma árvore pertencente à família Anacardiaceae conhecida popularmente como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão (LIMA, 2011), cuja ocorrência natural acontece desde o Ceará até a Argentina e o Paraguai, sendo encontrada em formações vegetais de Caatinga, Cerrado e Floresta pluvial (ANDRADE et al., 2000).

A aroeira-do-sertão possui madeira valorizada para obras externas, peças torneadas (LIMA, 2011) e indústria civil (ANDRADE et al., 2000), possuindo ainda uso medicinal, sendo empregada no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias e distúrbios no sistema digestório (MATOS, 1999).

Em virtude dos múltiplos usos destinados à espécie, esta vem passando por processo de exploração intensa, de forma predatória, causando devastação de suas populações naturais. Além disso, a exploração seletiva para uso na indústria madeireira praticamente extinguiu os indivíduos de grande porte (BRANDÃO, 2000), sendo, portanto, considerada uma espécie ameaçada de extinção (MMA, 2008).

Nesse sentido, os processos biotecnológicos, como a cultura de tecidos vegetais, possuem importante papel na preservação e multiplicação de espécies que estejam em vias de extinção, visto que através de uma de suas técnicas, a micropropagação, permite a obtenção, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, de grande número de plantas com qualidade fitossanitária (NAGAO; PASQUAL; RAMOS, 1994).

Na obtenção dos processos morfogênicos *in vitro* são utilizados os fitorreguladores, como as auxinas e citocininas, que possuem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados dos locais produtores na planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares (KERBAUY, 2008). Enquanto as auxinas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, além de serem responsáveis pela dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2009) e promoção do enraizamento *in vitro*.

Dentre as citocininas mais utilizadas em cultura de tecidos vegetais estão a cinetina (CIN) e a 6-benzilaminopurina (BAP) (GUERRA; NODARI, 2006). Sabe-se que o tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Uma outra citocinina que vem sendo utilizada em trabalhos de propagação *in vitro* é a *meta*-topolina (*mT*), a qual, isolada primeiramente de folhas de álamo (*Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*),

apresenta-se como uma citocinina aromática que difere das isoprenóides em relação à sua bioquímica, receptores e atividade biológica (STRNAD et al., 1997). Com exceção do BAP, as citocininas do tipo purina são quimicamente instáveis, enquanto que estes tipos não purínicos são geralmente estáveis e, portanto, têm a vantagem em procedimentos que envolvem esterilização (VINAYAK; DHAWAN; GUPTA, 2009). O uso da *mT* tem sido relatado como uma alternativa para reduzir desordens fisiológicas causadas por outras citocininas, como descrito por Mirabbasi e Hosseinpour (2014) em estudo com *Ulmus glabra* Huds, através do qual constataram que os explantes que foram tratados com *mT* produziram brotos mais vigorosos do que com BAP.

Na literatura existem muitos relatos de propagação *in vitro* de espécies lenhosas com a utilização das citocininas BAP e CIN e *mT* a exemplo de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (GUTTIÉRREZ et al., 2011), *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (SILVA et al., 2013), *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (BEZERRA et al., 2014), *Handroanthus chrysotrichus* Mart. ex A. DC. Mattos (PEREIRA; NAVROSKI; REINIGER, 2015), *Hancornia speciosa* Gomes (OLIVEIRA; FREIRE; ALOUFA, 2016), *Pterodon emarginatus* Vogel (CANATTO; ALBINO; CORDEIRO, 2016), *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (PRUDENTE et al., 2016), *Corylus colurna* L. (GENTILE et al., 2016) e *Pyrus communis* L. (DIMITROVA; NACHEVA; BEROVA, 2016).

Uma outra substância, o nitrato de prata (AgNO_3), geralmente utilizado como inibidor de ação do hormônio etileno (AL-KHAYRI; AL-BAHRANY, 2001) tem apresentado efeito benéfico na multiplicação de espécies lenhosas. O uso dessa substância aumentou o número de brotações de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul (NEPOMUCENO et al., 2007) e de *Olea europaea* L. (DONINI; FIGUEIREDO; SCHUCH, 2011).

Em estudo com *M. urundeuva*, Andrade et al. (2000) avaliaram o efeito da utilização de distintas concentrações de BAP sob diferentes explantes (segmentos nodal e apical) durante a multiplicação *in vitro* via organogênese direta da espécie, no qual os autores relataram a ocorrência da regeneração de explantes, no entanto, estes se desenvolveram em uma única brotação.

Nesse sentido, o presente estudo objetivou estudar a indução de brotos *in vitro* de *M. urundeuva*, visando o aumento da taxa de multiplicação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

2.2 Material vegetal

Para o estabelecimento *in vitro* das culturas foram utilizadas sementes de *M. urundeuva* provenientes da Embrapa - (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Semiárido, Petrolina- PE. O estabelecimento do cultivo *in vitro* foi baseado na metodologia utilizada por Andrade et al. (2000) com modificações. Os frutos-semente da espécie passaram por processo de desinfestação superficial em água corrente com algumas gotas de detergente neutro por 20 minutos, em seguida foi feita a remoção do endocarpo através de fricções em peneira e, por fim, permaneceram por mais 10 minutos em água corrente. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com imersão em etanol 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos sendo, posteriormente, lavadas três vezes consecutivas com água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em meio de cultura para serem utilizadas como fonte de explantes após 30 e 60 dias da semeadura.

2.3 Meio de cultura e recipiente

Em todos os experimentos foram utilizados tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com 87,64 mM de sacarose e solidificado 7 g. L⁻¹ de ágar, tendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N) antes da autoclavagem à temperatura de 121° C por 15 minutos. Após a inoculação os tubos foram vedados com película de polivinilcloreto (PVC).

2.4 Experimento 1: Efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido naftalenoacético (ANA) sobre diferentes explantes na indução de brotos

Diferentes explantes [cotilédone (inteiro), hipocótilo (± 10 mm) e nó cotiledonar (± 10 mm)], oriundos de plantas com 30 dias de idade, foram inoculados verticalmente, com exceção do cotilédone (inoculado horizontalmente com região abaxial em contato com o meio de cultura), em tubos de ensaio contendo meio de cultura suplementado com diferentes

concentrações de BAP (0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 μM) combinadas com ANA (0,0; 1,5 e 3,0 μM). O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial 3 x 5 x 3 (tipos de explantes x concentrações de BAP x concentrações de ANA), totalizando 45 tratamentos com 6 repetições, cada uma composta por 5 parcelas (tubos de ensaio).

2.5 Experimento 2: Efeito das citocininas na indução de brotos em diferentes explantes

Segmentos nodais (± 10 mm) e pecíolos (± 8 mm) originários de plantas com 60 dias de idade foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura suplementado com diferentes concentrações (0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 μM) das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) ou CIN (cinetina).

O delineamento estatístico foi o DIC, com arranjo fatorial 2 x 2 x 5 (tipos de explantes x tipos de citocininas x concentrações de citocininas), totalizando 20 tratamentos, com 6 repetições e cada uma contendo 5 unidades experimentais (tubos de ensaio).

2.6 Experimento 3: Efeito da interação da citocinina (BAP) e auxina (ANA) na indução de brotações

Segmentos nodais oriundos de plantas com 60 dias de idade foram inoculados verticalmente em meio de cultura, acrescido com diferentes concentrações (0,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 μM) de BAP combinadas com diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,5; 3,0 μM). O delineamento estatístico utilizado foi o DIC composto por arranjo fatorial 5 x 3 (concentrações de BAP x concentrações de ANA) totalizando 15 tratamentos constituído por 6 repetições com cinco unidades experimentais (tubos de ensaio) cada.

2.7 Experimento 4: Efeito do nitrato de prata (AgNO_3) sobre diferentes explantes na indução de brotações

Nós cotiledonares e segmentos nodais com 30 e 60 dias da sementeira, respectivamente, foram inoculados em meio de cultura contendo 8,0 μM de BAP suplementado com diferentes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 μM) de AgNO_3 . O delineamento experimental utilizado foi o DIC com arranjo em fatorial 5 x 2 (concentrações AgNO_3 x tipo de explante), totalizando 10 tratamentos, composto por 6 repetições com 5 unidades experimentais (tubos de ensaio) cada.

2.8 Experimento 5: Efeito de diferentes concentrações da citocinina *meta-topolina (mT)* sobre diferentes explantes na indução de brotações

Os explantes segmento nodal basal biaxilar (± 10 mm) (1° par de folhas), segmento nodal mediano uniaxilar (± 10 mm) e segmento contendo a gema apical (± 8 mm) oriundos de plantas com 60 dias de idade foram inoculados verticalmente em meio de cultura contendo diferentes concentrações de *mT* (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 μM). O delineamento estatístico foi o DIC, com arranjo fatorial 3 x 6 (explantes x concentrações de *mT*), totalizando 18 tratamentos com 6 repetições, cada uma composta por 5 parcelas (tubos de ensaio). Os explantes foram excisados em solução de ácido ascórbico (1,14 mM), permanecendo imersos nesta por 10 minutos até serem inoculados.

2.9 Condições experimentais, variáveis e análise estatística

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, com exceção dos experimentos 3, 4 e 5, os quais permaneceram os primeiros sete dias de cultivo em condições de escuro. Após 45 dias da inoculação avaliou-se em todos os experimentos: a porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos, número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea (mm) e porcentagem de explantes que formaram calos.

Os dados foram avaliados estatisticamente com auxílio programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Estes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida realizada à análise de variância, sendo então transformados pela função $(x + 1)^{0,5}$, exceto os dados de porcentagem, os quais foram submetidos à transformação em arco-seno $\sqrt{\%}$. Quando o valor de “F” foi significativo, os dados qualitativos e ajustes foram submetidas à comparação de médias por meio do teste de Tukey e os dados quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram registradas elevadas taxas de oxidação em todos os ensaios realizados (dados não mostrados). A oxidação pode causar a morte direta dos explantes ou inviabilizar o tecido para morfogênese. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), esse problema é especificamente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos. Outros autores já relataram a oxidação de explantes de espécies lenhosas, a exemplo de mirtilo (*Vaccinium spp.*) (ROSA et al., 2009), *Punica granatum* L.

(DIAS; NIETSCHKE; PEREIRA, 2013), *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (SARTOR et al., 2013) e *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (BEZERRA et al., 2014).

3.1 Experimento 1: Efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido naftalenoacético (ANA) sobre diferentes explantes na indução de brotos

Observou-se o desencadeamento de respostas regenerativas para produção de brotos apenas com os explantes nó cotiledonar e hipocótilo. A ausência de responsividade do cotilédone para regeneração de brotos pode ter ocorrido, provavelmente, por falta de competência celular em responder aos estímulos a que foram submetidos para desdiferenciação e rediferenciação a fim de conferir novas competências às células presentes nos explantes. Nesse sentido os dados estatísticos analisados foram apenas para as brotações oriundas do hipocótilo e do nó cotiledonar.

A análise de variância demonstrou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação tripla entre os fatores “BAP x ANA x Explante” para todas as variáveis analisadas, exceto para a porcentagem de explantes que formaram calos (%FC), a qual sofreu efeito altamente significativo do fator duplo “BAP x Explante” (Tabela 1).

Para a porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos, a maior taxa (76,67%) de responsividade foi obtida com a utilização do nó cotiledonar na presença de 3,0 μM de ANA combinado com 2,0 e 4,0 μM de BAP. Esses resultados corroboram Cordeiro et al. (2014) em clones de *Eucalyptus globulus* Labill no qual foi evidenciado efeito positivo da relação auxina/citocinina para regeneração de brotos. O explante hipocótilo apresentou baixa taxa de regeneração na maioria dos tratamentos testados, atingindo a maior porcentagem (36,67%) com uso de 2,0 μM de BAP na ausência de ANA (Tabela 2).

As médias para número de brotos demonstraram que os melhores resultados (1,97 e 1,63) foram obtidos quando ANA esteve presente no meio de cultura na concentração de 3,0 μM combinado com 2,0 e 4,0 μM de BAP, respectivamente, utilizando-se o explante nó cotiledonar (Tabela 2). Os valores obtidos para número de brotos em *M. urundeuva* no presente estudo são superiores aos observados por Andrade et al. (2000) em trabalhos de micropropagação com a mesma espécie, no qual os autores obtiveram uma única brotação com o uso dos explantes segmento nodal e apical na presença de 4,5 μM de BAP.

Tabela 1: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER), número de brotos (NB) e folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e porcentagem de explantes que formaram calos (%FC) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes (EXP) hipocótilo e nó cotiledonar de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). Feira de Santana-BA, 2017.

FV	GL	Quadrados médios				
		%ER ^x	NB ^z	NF ^z	CPA(mm) ^z	%FC ^x
BAP	4	0,42**	0,08**	0,64**	1,27**	7,03**
ANA	2	0,91**	0,27**	1,92**	2,05**	0,10 ^{ns}
EXP	1	2,20**	0,89**	5,53**	5,60**	6,11**
BAP x ANA	8	0,49**	0,15**	1,15**	1,09**	0,24 ^{ns}
BAP x EXP	4	0,13 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,44*	0,20 ^{ns}	2,77**
ANA x EXP	2	1,07**	0,26**	1,92**	1,98**	0,03 ^{ns}
BAP x ANA x EXP	8	0,69**	0,20**	1,35**	1,61**	0,23 ^{ns}
Resíduo	150	0,09	0,02	0,15	0,27	0,14
CV (%)		210,11	14,20	32,18	41,97	29,63

** , * , ^{ns} Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. ^zDados transformados pela função $(x + 1)^{0.5}$. ^x Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

O maior valor médio para número de brotos observado com o uso dos fatores combinados BAP e ANA mostra a importância do efeito sinérgico destes reguladores para regeneração a partir do nó cotiledonar. No entanto, foi observado que em meio isento de auxina também houve formação de brotos, o que se deve, provavelmente, ao modo da atuação do BAP, pois o mesmo é capaz de promover a quebra da dominância apical e da dormência das gemas laterais culminando, assim, com a formação de novos brotos (GEORGE, 1993), o que está de acordo com resultados reportados por outros autores em trabalhos de micropropagação de espécies lenhosas a exemplo de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (PRUDENTE et al., 2016) e *Pterodon emarginatus* Vogel (CANATTO; ALBINO; CORDEIRO, 2016).

Ao avaliar o número de folhas, constatou-se que, ao adicionar 3,0 µM de ANA no meio de cultura, os melhores resultados foram registrados com o uso explante nó cotiledonar na presença de 2,0 e 4,0 µM de BAP, cujas média foram de 7,20 e 7,03, respectivamente (Tabela 3). Quando o meio de cultura esteve isento de ANA obteve-se maior média (4,73) com a utilização de 16,0 µM de BAP também com o nó cotiledonar, sem diferença estatística da

média (1,20) observada com o uso do mesmo explante em meio adicionado com 8,0 μM de BAP (Tabela 3).

Tabela 2: Porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER) e número de brotos (NB) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes hipocótilo (HIP) e nó cotiledonar (NC) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações dos reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). Feira de Santana-BA, 2017.

BAP μM	%ER		NB	
	HIP	NC	HIP	NC
0,0 μM ANA				
0,0	0,00aA	13,33aAB	0,00aA	0,20aAB
2,0	36,67aA*	13,33aAB	0,37aA	0,13aB
4,0	0,00aA	0,00aB	0,00aA	0,00aB
8,0	0,00aA	0,00aB	0,00aA	0,43aAB
16,0	0,00bA	46,67aA*	0,00bA	1,03aA*
1,5 μM ANA				
0,0	0,00aA	6,67aA	0,00aA	0,07aA
2,0	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA
4,0	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA
8,0	0,00aA	6,67aA	0,00aA	0,13aA
16,0	0,00aA	10,00aA	0,00aA	0,17aA
3,0 μM ANA				
0,0	0,00aA	0,00aB	0,00aA	0,00aB
2,0	0,00bA	76,67aA*	0,00bA	1,97aA*
4,0	0,00bA	76,67aA*	0,00bA	1,63aA*
8,0	0,00bA	26,67aB	0,00aA	0,43aB
16,0	3,33aA	0,00aB	0,07aA	0,00aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna (para cada variável) em relação a cada concentração de ANA, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de ANA considerando a respectiva de BAP e o mesmo tipo de explante ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 3: Médias para número de folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes hipocótilo (HIP) e nó cotiledonar (NC) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações dos reguladores vegetais benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). Feira de Santana-BA, 2017.

BAP μ M	NF		CPA (mm)	
	HIP	NC	HIP	NC
0,0 μM ANA				
0,0	0,00aA	0,00aB	0,00aA	1,50aA
2,0	0,70aA	0,33aB	4,33aA*	2,20aA
4,0	0,00aA	0,00aB	0,00aA	0,00aA
8,0	0,00aA	1,20aAB	0,00aA	1,17aA
16,0	0,00bA	4,73aA*	0,00bA	3,37aA
1,5 μM ANA				
0,0	0,00aA	0,10aA	0,00aA	0,53aA
2,0	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA
4,0	0,00aA	0,00aA	0,00aA	0,00aA
8,0	0,00aA	0,20aA	0,00aA	0,17aA
16,0	0,00aA	0,17aA	0,00aA	0,30aA
3,0 μM ANA				
0,0	0,00aA	0,00aB	0,00aA	0,00aB
2,0	0,00bA	7,20aA*	0,00bA	8,67aA*
4,0	0,00bA	7,03aA*	0,00bA	6,73aA*
8,0	0,00aA	1,03aB	0,00aA	0,97aB
16,0	0,07aA	0,00aB	0,10aA	0,00aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna (para cada variável) em relação a cada concentração de ANA, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de ANA considerando a respectiva de BAP e o mesmo tipo de explante ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Esses resultados colaboram para o entendimento de que o uso do nó cotiledonar para obtenção de folhas se mostrou como melhor explante, alcançando melhores resultados na maior concentração de ANA testada em combinação com concentrações intermediárias de

BAP. Isso demonstra a importância do balanço hormonal para a produção de folhas em *M. urundeuva*, visto que ao elevar-se as concentrações da citocinina, obteve-se um decréscimo na produção de folhas. Os resultados obtidos são semelhantes àqueles encontrados em trabalhos com *Erythrina velutina* Willd. por Costa, Nepomuceno e Santana (2010), que ao utilizarem o nó cotiledonar como explante e ao aumentar a concentração de BAP e ANA acima de 4,44 μM e 1,34 μM , respectivamente, verificaram que houve decréscimo no número de folhas, o que foi associado a uma possível fitotoxicidade do regulador de crescimento BAP.

Para a variável comprimento de parte aérea foi verificado que na ausência de ANA a maior média (4,33 mm) foi registrada com o uso do explante hipocótilo em meio de cultura adicionado com 2,0 μM de BAP e na concentração de 16,0 μM de BAP com a utilização do nó cotiledonar, cuja média foi de 3,37 mm. Com a adição de 1,5 μM de ANA, não houve diferença estatística entre as médias resultantes, ao passo que na concentração 3,0 μM de ANA, os maiores valores médios (8,67 mm e 6,73 mm) foram registradas com 2,0 e 4,0 μM de BAP, respectivamente, com o uso do nó cotiledonar (Tabela 3).

A utilização de BAP em meio de cultura isento de ANA promoveu aumento do comprimento da parte aérea, no entanto, ao interagir com a maior concentração de ANA testada percebeu-se um acréscimo significativo no tamanho dos brotos, evidenciado a importância da interação hormonal sob esta variável. Esse resultado difere do obtido por Silva et al. (2013), no qual foi verificado que a adição de reguladores vegetais [BAP, CIN, ANA e thidiazuron (TDZ)] no meio de cultura reduziu o comprimento da parte aérea de *Caesalpinia pyramidalis*. Pasqual (2001) relata que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações. Isso ocorre porque o uso das citocininas estimulam a brotação, visto a sua atuação na quebra da dominância apical, culminando na redução do tamanho das plantas.

Ao analisar a variável porcentagem de explantes que formaram calos, foi possível identificar comportamento quadrático descendente ($p < 0,01$) em relação às concentrações de BAP para o explante hipocótilo, onde a curva de resposta indica que na concentração de 14,94 μM é atingido o valor mínimo estimado de 20,82%. Para o nó cotiledonar foi registrado comportamento quadrático ascendente, na qual a equação matemática aponta que o ponto de máxima (superior a 100%) é atingido com o uso de 2,28 μM de BAP (Figura 1).

A formação de calos nos explantes na fase de multiplicação por via direta, representa um fator negativo, causado possivelmente por desbalanços hormonais que se estabelecem entre concentrações de reguladores exógenos com hormônios endógenos, que podem culminar na produção de calos em detrimento de brotos.

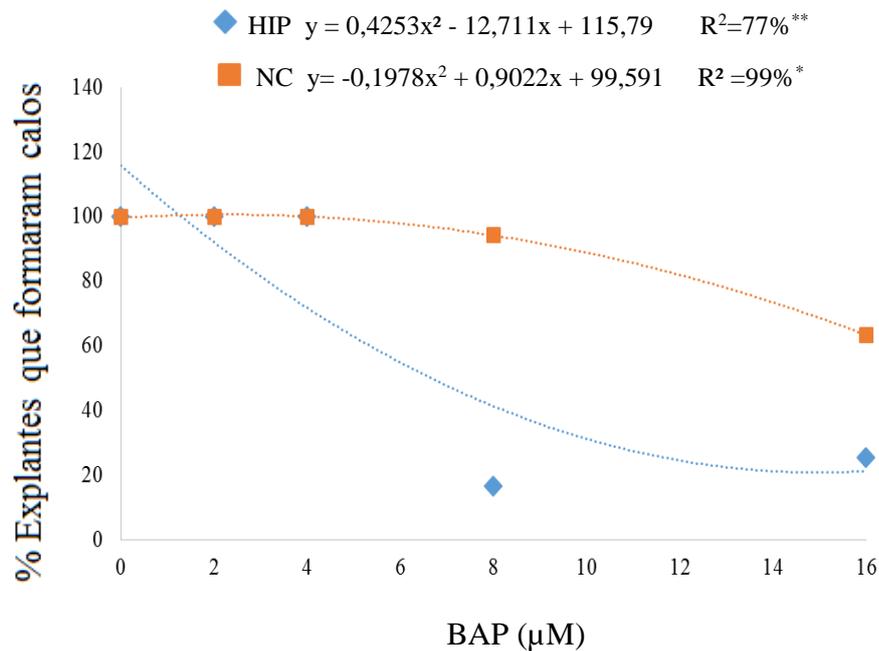


Figura 1: Porcentagem de explantes que formaram calos obtidos a partir dos explantes hipocótilo (HIP) e nó cotiledonar (NC) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações de BAP (**, * significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana-BA, 2017.

3.2 Experimento 2: Efeito das citocininas na indução de brotos em diferentes explantes

Não foram observadas respostas regenerativas para produção de brotos com o explante “pecíolo” em nenhum dos tratamentos testados, de maneira que esse explante foi retirado da análise estatística. Enquanto que para o segmento nodal, a análise de variância apresentou efeito não significativo para todas as variáveis analisadas em todos os tratamentos testados (Tabela 4).

A tabela 5 mostra as médias gerais das variáveis analisadas independente do tratamento, visto que esses não divergiram estatisticamente entre si. As médias gerais para porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos (22,41%), número de brotos (0,33), número de folhas (0,79) e comprimento de parte aérea (1,71 mm) não foram satisfatórias. Estes resultados podem ter sido influenciados pela alta taxa de oxidação e formação de calos em todos os tratamentos (dados não mostrados).

Tabela 4: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER), número de brotos (NB), número de folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir de segmentos nodais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN). Feira de Santana-BA, 2017.

FV	GL	Quadrados médios			
		%ER ^x	NB ^z	NF ^z	CPA (mm) ^z
CIT	1	0,00003 ^{ns}	0,004 ^{ns}	0,025 ^{ns}	0,135 ^{ns}
CONC	4	0,341 ^{ns}	0,053 ^{ns}	0,189 ^{ns}	0,571 ^{ns}
CIT x CONC	4	0,154 ^{ns}	0,016 ^{ns}	0,080 ^{ns}	0,315 ^{ns}
Resíduo	48	0,331	0,056	0,231	0,676
CV(%)		185,45	20,82	38,24	56,96

^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F respectivamente. ^z Dados transformados pela função $(x + 1)^{0.5}$. ^x Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

A formação de calos observada nos tratamentos possivelmente estabeleceu-se por desbalanços hormonais que podem ter inibido a produção de brotos. Além disso, a alta taxa de oxidação pode causar a morte direta dos explantes ou inviabilizar o tecido e conseqüentemente o desenvolvimento fisiológico do mesmo. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), esse problema é especificamente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos.

Tabela 5: Médias gerais para porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER), número de brotos (NB), número de folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir de segmentos nodais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN). Feira de Santana-BA, 2017.

%ER	NB	NF	CPA (mm)
22,41	0,33	0,79	1,71

As plantas lenhosas possuem estabelecimento e crescimento *in vitro* dificultados ou limitados pela liberação de exsudados derivados da oxidação de compostos fenólicos (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). Neste caso, no momento em que é feito o procedimento de corte do tecido para dar origem ao explante, o tecido ferido libera compostos fenólicos que são precursores da síntese de lignina, tem-se um acúmulo de polifenóis e derivados da oxidação, como a cutina e suberina, em torno da superfície injuriada que acabam

modificando a condição do meio de cultura e comprometendo a estrutura do explante, levando-o a morte (ANDRADE et al., 2000).

3.3 Experimento 3: Efeito da interação da citocinina (BAP) e auxina (ANA) na indução de brotações

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação entre os fatores “BAP x ANA” apenas para a variável porcentagem de explantes que formaram calos (%FC). Enquanto o fator isolado “BAP” apresentou influência significativa ($p < 0,05$) somente para número de folhas (NF) (Tabela 6). Para a demais variáveis analisadas não foi verificado efeito significativo de nenhum dos fatores avaliados.

Tabela 6: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER), número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e porcentagem de explantes que formaram calos (%FC) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir de segmentos nodais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA). Feira de Santana, BA. 2017.

FV	GL	Quadrados médios				
		%ER ^x	NB ^z	NF ^z	CPA (mm) ^z	%FC ^x
BAP	4	1,00 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,56 [*]	0,94 ^{ns}	0,45 [*]
ANA	2	0,12 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,07 ^{ns}	10,78 ^{**}
BAP x ANA	8	0,18 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,66 ^{**}
Resíduo	75	0,43	0,04	0,19	0,50	0,18
CV(%)		161,08	17,58	33,83	48,97	61,76

** , * , ns Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. ^z Dados transformados pela função $(x + 1)^{0,5}$. ^x Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

Ao analisar a variável número de folhas obtidas a partir de segmentos nodais em diferentes concentrações de BAP, registrou-se comportamento linear crescente ($p < 0,01$) (Figura 2), o que sugere que concentrações acima de 16 μM de BAP ainda podem ser testadas para aumento da quantidade de folhas produzidas.

A utilização de BAP para indução das brotações e conseqüentemente formação de folhas é uma resposta relevante para inferir o potencial do trabalho para servir de base na

multiplicação *in vitro* da espécie estudada. Costa, Nepomuceno e Santana (2010), em trabalhos com *Erythrina velutina*, e Silva et al. (2013) com *Caesalpinia pyramidalis*, ao utilizar segmentos nodais e concentrações de BAP, relataram diferentes resultados para o número de folhas, onde o primeiro citado obteve efeito linear crescente com a utilização de BAP e o segundo obteve baixo número de folhas (inferior a 1) demonstrando assim a necessidade de definir o balanço hormonal ideal para cada espécie.

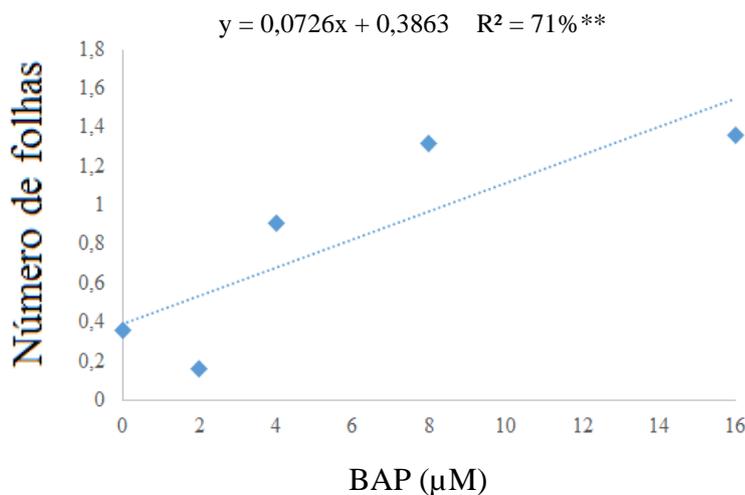


Figura 2: Número de folhas obtido a partir de segmentos nodais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) (** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana-BA. 2017.

Para a porcentagem de explantes que formaram calos foi constatado comportamento linear decrescente ($p < 0,01$) na ausência de ANA em relação às concentrações de BAP. Para as demais concentrações da auxina não foi possível o ajuste de um modelo matemático significativo (Figura 3).

Máximas taxas (100%) de explantes que formaram calos foram observadas em meio isento de ANA com todas as concentrações de BAP avaliadas, exceto na concentração de 16,0 µM, cujo valor médio foi de 40%. Os calos foram encontrados tanto na base do explante como no corpo do mesmo. Silva et al. (2013) em estudos com *Caesalpinia pyramidalis*, também observaram a formação de calos com o uso da citocinina BAP na indução de brotações.

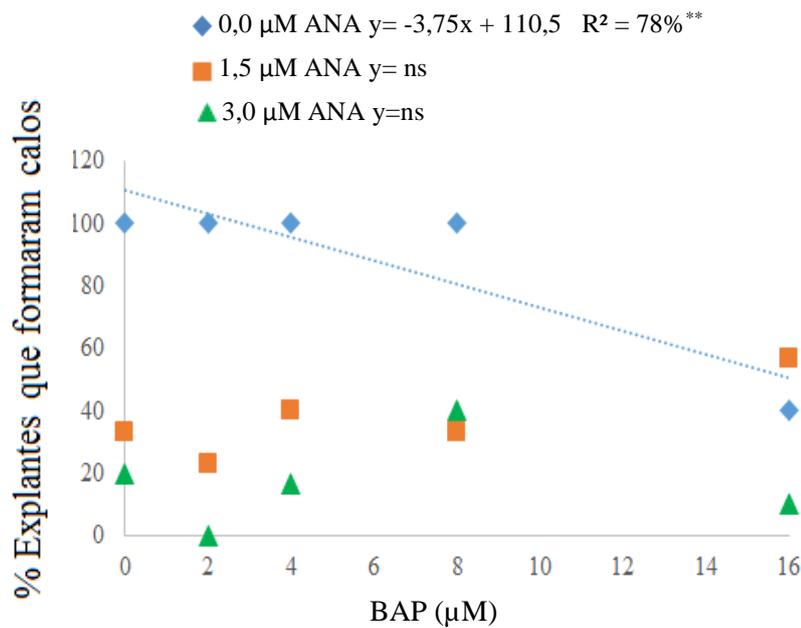


Figura 3: Porcentagem de explantes que formaram calos obtidos a partir de segmentos nodais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) combinadas com distintas concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) (ns,** Não significativo e significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana-BA, 2017.

3.4 Experimento 4: Efeito do nitrato de prata (AgNO₃) sobre diferentes explantes na indução de brotações

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação entre os fatores “AgNO₃ x Explante” para a variável porcentagem de explantes que formaram calos (%FC), enquanto que para a variável porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos (%ER) o resultado foi significativo ($p < 0,05$) (Tabela 7). Para as demais variáveis não houve influência significativa dos fatores.

Ao analisar a porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos, obteve-se comportamento quadrático ascendente ($p < 0,01$) com o uso do explante nó cotiledonar, no qual a resolução da equação polinomial indica que o ponto de máxima (superior a 100%) para a variável em análise é atingido com a utilização de 27,79 µM de AgNO₃. Para o segmento nodal não foi possível o ajuste de uma equação matemática significativa (Figura 4A).

A resposta observada para regeneração de brotos dos explantes *M. urundeuva* com a adição de nitrato de prata se deve possivelmente há alguma ação citocínica que este composto, geralmente utilizado como inibidor da ação do etileno, deve ter em condições *in vitro*. Ozden-

Tokatli, Ozudogru e Akcin (2005) ao avaliarem a resposta de segmentos nodais de *Pistacia vera* L. cv. Kirmizi ao AgNO_3 , verificaram que a adição de $48,0 \mu\text{M}$ de AgNO_3 no meio de cultura aumentou a frequência de múltiplas brotações (superior a 83,3%).

Tabela 7: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER), número de brotos (NB) e folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e porcentagem de explantes que formaram calos (%FC) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes (EXP) nó cotiledonar e segmento nodal de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3). Feira de Santana-BA, 2017.

FV	GL	Quadrados médios				
		%ER ^x	NB ^z	NF ^z	CPA (mm) ^z	%FC ^x
AgNO₃	4	1,71 ^{**}	0,11 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,82 ^{ns}	0,33 ^{**}
EXP	1	0,02 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,30 ^{ns}	1,10 ^{ns}	0,37 ^{**}
AgNO₃ x EXP	4	0,95 [*]	0,06 ^{ns}	0,42 ^{ns}	1,49 ^{ns}	0,33 ^{**}
Resíduo	50	0,37	0,04	0,26	0,93	0,03
CV(%)		57,66	15,28	26,46	36,36	219,13

^{**}, ^{*}, ^{ns} Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. ^xDados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

Ao verificar a variável porcentagem de explantes que formaram calos, foi observado comportamento quadrático descendente ($p < 0,01$) para o explante segmento nodal em função das concentrações de AgNO_3 , cuja taxa mínima foi obtida em meio de cultura suplementado com as maiores concentrações de nitrato de prata avaliada ($10,0$; $20,0$ e $40,0 \mu\text{M}$) (Figura 4B).

A média geral obtida para número de brotos foi de 0,95 (dados não mostrados) independente do tipo de explante ou concentração de nitrato de prata testada, visto não ter apresentado diferença estatística entre os tratamentos. Em sistemas de micropropagação o número de brotos durante a fase de multiplicação é uma das variáveis mais importante para definição do sucesso do protocolo. A baixa taxa de multiplicação *in vitro* encontrada para *M. urundeuva* corrobora os resultados observados em várias outras espécies lenhosas, como *Caesalpinia pyramidalis* com 0,97 broto/explante (SILVA et al., 2013), *Luehea divaricata* Mart & Zucc. com 1,6 brotos/explantes (FLÔRES et al., 2011) e *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. com 1,66 brotos/explante (ROCHA et al., 2007).

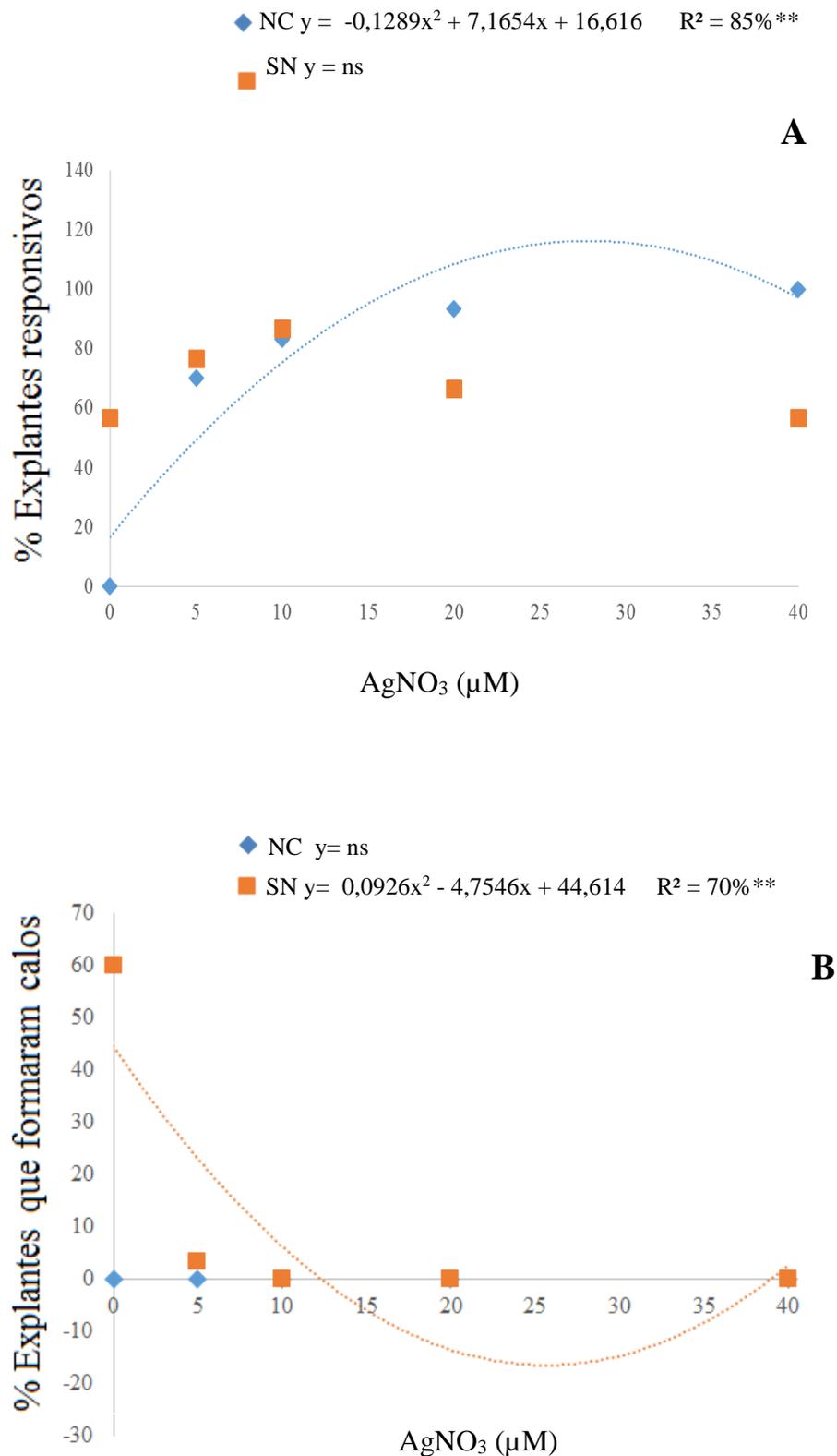


Figura 4: Porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos (A) e calos (B) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir do nó cotiledonar (NC) e do segmento nodal (SN) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO₃) (ns, ** Não significativo e significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana-BA, 2017.

Apesar de não ter influenciado no número de brotos produzidos da aroeira-do-sertão, as brotações obtidas com a utilização do nitrato de prata apresentaram-se com aspecto vigoroso, sem a presença de calos, o que representa uma característica positiva para prosseguimento das etapas de micropropagação.

3.5 Experimento 5: Efeito de diferentes concentrações da citocinina *meta-topolina* (*mT*) sobre diferentes explantes na indução de brotações

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação “*mT* x Explantes” para todas as variáveis analisadas, exceto para a porcentagem de explantes que formaram calos (%FC), cujo efeito foi significativo ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos (%ER) e calos (%FC), número de brotos (NB) e folhas (NF) e comprimento da parte aérea (CPA) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes (EXP) segmento nodal basal (1° par de folhas, biaxilar), segmento nodal mediano (uniaxilar) e segmento apical de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações de *meta-topolina* (*mT*). Feira de Santana-BA, 2017.

FV	GL	Quadrados médios				
		%ER ^x	NB ^z	NF ^z	CPA(mm)	%FC ^x
<i>mT</i>	5	0,231 ^{ns}	0,171 ^{**}	0,715 ^{**}	48,373 ^{**}	1,057 ^{**}
EXP	2	2,984 ^{**}	0,063 ^{ns}	0,048 ^{ns}	247,034 ^{**}	0,993 ^{**}
<i>mT</i> x EXP.	10	0,506 ^{**}	0,095 ^{**}	0,483 ^{**}	40,880 ^{**}	0,281 [*]
Resíduo	90	0,149	0,022	0,136	13,257	0,093
CV (%)		42,02	10,60	21,82	43,23	77,09

^{**}, ^{*}, ^{ns} Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. ^zDados transformados pela função $(x + 1)^{0,5}$. ^x Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

Ao avaliar a porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos, observou-se que na ausência da *mT* a maior média 92,50% foi registrada com o uso do explante segmento apical, no entanto sem diferença estatística das demais médias obtidas com o uso do mesmo explante em função das concentrações de *mT* (Tabela 9).

A regeneração de brotos em *M. urundeuva* com o incremento da *mT* no meio de cultura pode ser associado à característica que as citocininas possuem de regular a divisão celular, agindo nos pontos de controles que governam a passagem da célula pelo ciclo de divisão (TAIZ; ZEIGER, 2009), sendo indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução

de gemas axilares (GRATTAPAGALIA; MACHADO, 1998), o que possivelmente favoreceu a morfogênese de brotos. Os resultados obtidos para aroeira-do-sertão no presente estudo corroboram Andrade et al. (2000) que também relataram altas taxas de regeneração (90%) com a mesma espécie utilizando os explantes segmento nodal e apical na presença de 4,5 μM de BAP. Já Benmahioul et al. (2012) em culturas de *Pistacia vera*, reporta que ao comparar as citocininas benziladenina (BA), CIN e *mT*, as taxas mais elevadas de regeneração de brotos foram alcançadas nos explantes tratados com BA e *mT*, sendo que nesta última obtiveram 100% em todas as concentrações testadas.

Tabela 9: Médias para porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes segmento nodal basal, mediano e apical *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações da citocinina *meta-topolina* (*mT*). Feira de Santana-BA, 2017.

<i>mT</i> (μM)	Explantes		
	Basal	Mediano	Apical
0,0	10,00cB	55,83bA	92,50aA
2,0	76,39abA	55,00bA	87,50aA
4,0	56,66bA	70,00abA	93,33aA
8,0	47,22bA	62,50bA	94,44aA
16,0	71,67bA	83,33aA	74,17aA
32,0	73,33aA	79,17aA	82,50aA

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

No entanto, mesmo em meio isento de citocinina foi constatado a formação de brotos (Tabela 9). Esse comportamento indica que não houve a necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a formação de brotações para a espécie. Diferente do que foi observado por Dimitrova, Nacheva e Berova et al. (2016) em culturas de *Pyrus communis* L., nas quais não foram obtidas brotações laterais em meio isento de *mT*, sendo que a taxa de multiplicação se elevou à medida que as concentrações dessa citocinina aumentaram. Outros autores também reportaram a formação de brotos em espécies lenhosas na ausência de reguladores vegetais, como em *Hancornia speciosa* (OLIVEIRA; FREIRE; ALOUFA, 2016), *Caesalpinia pyramidalis* (SILVA et al., 2013), *Tapirira guianensis* Aubl. (GUTIÉRREZ et al., 2013) e *Luehea divaricata* (FLÔRES et al., 2011).

Para número de brotos, constatou-se comportamento quadrático ascendente ($p < 0,01$) dos explantes segmento nodal basal e mediano em relação às concentrações de *mT*. No

entanto, para o explante apical, não houve um modelo matemático representativo. A equação quadrática obtida para o segmento basal indica que a utilização 24,59 μM de *mT* atinge o maior valor estimado, 1,86 brotos/explante (Figura 5A). Já para o explante mediano, a curva de resposta sugere que no valor calculado de 20,05 μM alcança-se 1,30 brotos por explante. (Figura 5A). Esses resultados superam os obtidos em estudos anteriores com a mesma espécie por Andrade et al. (2000), onde os autores obtiveram uma única brotação a partir dos explantes segmentos nodal e apical com a utilização da citocinina BAP (4,5 μM).

O uso da *mT* aumentou o número médio de brotos da aroeira-do-sertão, representando resultado positivo para o protocolo de micropropagação da espécie, visto a importância desta variável para esse propósito. Esse resultado corrobora Gentile et al. (2016) que relataram aumento na taxa de multiplicação de *Corylus coluna* com o uso de *mT*. Ao passo que Mirabbasi e Hosseinpour (2014), em estudos com *Ulmus glabra* constataram que os explantes que foram tratados com *mT* produziram brotos mais vigorosos do que com BAP, no entanto, diferente do que foi observado para *M. urundeuva*, a *mT* não elevou a taxa de multiplicação, sendo os maiores valores observados na ausência de citocinina e adicionado com 1,78 μM de BAP (5,05 e 4,39 brotos por explante, respectivamente).

Em estudos com os porta-enxertos *Prunus domestica* L. e *Prunus insititia x domestica* Gentile et al. (2014), comparando diferentes concentrações de *mT* com 2,1 μM de benziladenina, não registraram aumento no número de brotações com a adição de *mT*. No entanto, esses autores relatam que ao avaliarem apenas *P. insititia x domestica* na mesma concentração de BA e *mT* (2,1 μM) perceberam que apesar de não ter melhorado a proliferação de brotos, a *mT* influenciou positivamente o crescimento e a qualidade das brotações.

Para a variável número de folhas, a análise de regressão revelou comportamento quadrático ascendente ($p < 0,01$) para os explantes segmento nodal basal e mediano, ao passo que para o explante apical não houve modelo matemático ajustável (Figura 5B). O ponto máximo da curva para o segmento nodal basal indica que na concentração de 20,77 μM de *mT* atinge-se 3,76 folhas/explante. Já para o segmento nodal de origem mediana a equação quadrática sinaliza que na presença de 18,29 μM da citocinina atinge-se 3,20 folhas/explante. (Figura 5B).

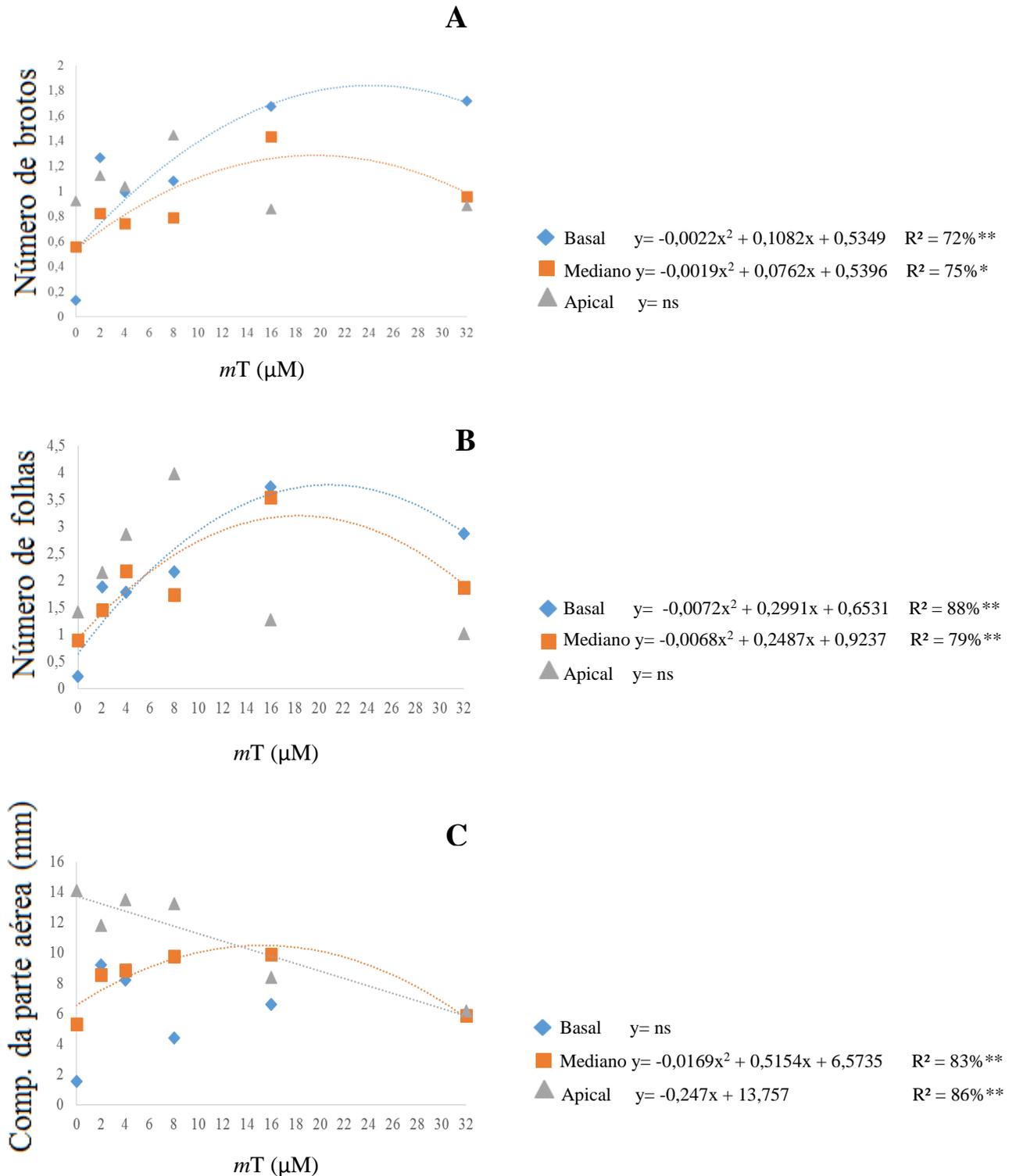


Figura 5: Número de brotos (A), número de folhas (B) e comprimento da parte aérea (C) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir do segmento nodal basal, segmento nodal mediano e segmento apical de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações de *meta*-topolina (*mT*) (ns,*,** não significativo, significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente). Feira de Santana-BA, 2017.

Observou-se que as folhas das brotações oriundas do segmento apical apresentaram-se mais expandidas e muitas vezes evidenciando aspectos hiperídricos e quebradiços, principalmente nos tratamentos contendo concentrações mais elevadas de *mT*, não sendo interessante para trabalhos de propagação *in vitro*. O número de folhas é uma variável importante em estudos de micropropagação, visto que na inserção entre o caule e a folha existe a produção de gema, a qual poderá dar origem a um novo broto e, conseqüentemente, aumentar a produção de novas mudas (COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010).

Ao avaliar o comprimento da parte aérea, o modelo de regressão apresentou comportamento quadrático ascendente ($p < 0,01$) para o explante segmento nodal mediano, com o qual estima-se atingir o valor máximo de comprimento (10,50 mm) na concentração calculada de 15,25 μM de *mT*. Incrementos da citocinina superiores ao valor máximo estimado, tendem a desfavorecer o comprimento das brotações (Figura 5C). Para o explante de origem apical, o comportamento matemático obtido foi o linear decrescente ($p < 0,01$). Ao passo que para o explante de origem basal, não foi possível a obtenção de um modelo matemático com significado biológico. Esses resultados são inferiores aos obtidos por Andrade et al. (2000) em trabalhos de micropropagação com a mesma espécie, no qual foram registrados brotos com média de 13 mm de altura a partir dos segmentos nodais e apicais inoculados em meio de cultura suplementado com 4,5 μM de BAP. Gentile et al. (2016) também registraram valores médios superiores aos obtidos no presente estudo em culturas de *Corylus colurna*, cujos brotos atingiram 30 mm de comprimento na presença da maior concentração de *mT* testada (8,2 μM). Enquanto em estudos com *Prunus insititia x domestica* quando foi comparado o uso das citocininas *mT* e benziladenina na concentração de 2,1 μM foi verificado aumento no comprimento de brotos, atingindo 31,9 mm com o uso de *mT* (GENTILE et al., 2014).

A formação de calos foi observada em todos os tratamentos testados. Quando o meio de cultura foi adicionado com 32 μM de *mT*, obteve-se taxa de 80% de explantes que formaram calos com a utilização do segmento nodal de origem basal, no entanto sem diferença estatística do explante mediano (75%) na mesma concentração de *mT*; não diferindo também das porcentagens (55,56; 66,33%) observadas com o mesmo explante nas concentrações 2,0 e 16 μM de *mT*, respectivamente (Tabela 10).

O aumento na taxa de explantes que formaram calos com a adição da citocinina no meio de cultura, principalmente nas concentrações mais altas, se deve possivelmente a desbalanços hormonais que se estabeleceram. Ressaltando que os explantes utilizados para

indução de brotos foram oriundos de material vegetal germinado *in vitro*, que possivelmente deve conter elevadas concentrações de auxinas endógenas.

Tabela 10: Porcentagem de explantes que formaram calos aos 45 dias da inoculação obtidos a partir dos explantes segmento nodal basal, mediano e apical de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações da citocinina *meta*-topolina (*mT*). Feira de Santana-BA, 2017.

<i>mT</i> (μM)	Explantes		
	Basal	Mediano	Apical
0,0	3,33aC	10,83aC	10,83aA
2,0	55,56aAB	65,83aAB	20,83bA
4,0	38,33aBC	49,17aABC	35,030aA
8,0	13,89aC	29,17aBC	30,56aA
16,0	63,33aAB	46,67abABC	19,17bA
32,0	80,00aA	75,00aA	25,83bA

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

A formação de calos observada nos explantes de *M. urundeuva* influenciou negativamente a qualidade dos brotos, principalmente quando estes se formaram na região do explante muito próximo às gemas (dados não mostrados). A formação de calos na base dos explantes durante a fase de multiplicação pode comprometer a proliferação de gemas axilares e o alongamento das brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro* (PEREIRA; NAVROSKI; REINIGER, 2015).

A formação de calos em explantes na propagação *in vitro* durante a etapa de indução de brotos já foi relatada em culturas de outras espécies a exemplo de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (BEZERRA et al., 2014) e *Handroanthus chrysotrichus* (PEREIRA; NAVROSKI; REINIGER, 2015).

4 CONCLUSÃO

É possível a indução de brotos em *M. urundeuva* a partir do explante nó cotiledonar com o uso de BAP combinado com ANA.

A utilização da *mT* favorece a proliferação de brotos em segmentos nodais de origem basal e mediana, no entanto a grande formação de calos influencia a qualidade dos brotos.

O uso do nitrato de prata reduz a taxa de calos nos explantes.

REFERÊNCIAS

- AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2- isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 291-298, 2001.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- BENMAHIOUL, B et al. Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.) **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 108, p. 353-358, 2012.
- BEZERRA, R. M. F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.
- BRANDÃO, M. Caatinga. In: MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. (Orgs). **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas e Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte, 2000, p. 75-85.
- CANATTO, R. A.; ALBINO, B. E. S.; CORDEIRO, A. T. Propagação *in vitro* de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel): uma espécie florestal nativa. **Fórum Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 76-88, 2016.
- 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.
- DIAS, M. M.; NIETSCHKE, S.; PEREIRA, M. C. T. Carvão ativado e estiolamento no estabelecimento *in vitro* de romãzeira. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.7, n.1, p.1-5, 2013.
- DIMITROVA, N.; NACHEVA, L.; BEROVA, M. Effect of meta-topolin on the shoot multiplication of pear rootstock OHF-333 (*Pyrus communis* L.). **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 15, n. 2, p. 43-53, 2016.
- DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira ‘Arbequina’. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042. 2011.
- FLÔRES, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

GENTILE, A. et al. Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 118, p. 373-381, 2014.

GENTILE, A. et al. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 128, p. 693-703, 2016.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 1.ed. Dordrecht: Springer, 1993. 574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1. 1998, 864p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2013.

GUTIÉRREZ, I. E. M. et al. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 143-151, 2013.

GUTIÉRREZ, I. E. M. de et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41 n. 2, p. 260-265, 2011.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008. 431p.

LIMA, B. G. **Caatinga: Espécies lenhosas e herbáceas**. Mossoró-RN: EDUfersa, 2011. 316p.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**, v. 15, p. 415, 1980.

MATOS, F. J. A. **Plantas de medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: Edições UFC, 1999, 80p.

MIRABBASI, S. M. HOSSEINPOUR, B. Prevention of shoot tip necrosis, hyperhydricity and callus production associated with *in vitro* shoot culture of *Ulmus glabra*. **Journal of Novel Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 683-689, 2014.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa n° de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf> Data de Acesso: 05 de fevereiro de 2017.

NAGAO, E. O; PASQUAL, M; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “*in vitro*” de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.

- NEPOMUCENO, C. F. et al. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013
- OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M. ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335-342, 2016.
- OZDEN-TOKATLI, Y., OZUDOGRU, E. A., AKCIN A. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 3, p. 415-426, 2005.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.
- PRUDENTE, D. O. et al. Micropropagação de candeia, uma espécie nativa do cerrado brasileiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 3, p. 305-311, 2016.
- ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.
- ROSA, L. P. P. et al. Efeito de Antibiótico e do período de escuro no estabelecimento *in vitro* de mirtilo *Vaccinium* spp. **Revista da FZVA**, v.16, n. 2, p. 265-277, 2009.
- SARTOR, F. R. et al. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.
- SILVA, T. S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13. p. 1-6. 2013.
- STRNAD, M. et al. *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis moench.*, cv. *Robusta*). **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 213-218, 1997.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- VINAYAK, V. DHAWAN, A. K.; GUPTA, V. K. Efficacy of non-purine and purine cytokinins on shoot regeneration *in vitro* in surgane. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 227-231, 2009.

Capítulo II

CALOGÊNESE EM *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.

RESUMO

Myracrodruon urundeuva Fr. All. é uma árvore pertencente à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão, que possui utilização madeireira e medicinal e está ameaçada de extinção. Esse trabalho objetivou estudar a calogênese da aroeira-do-sertão, bem como analisar bioquimicamente os calos produzidos. Explantes foliares foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM) de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), (0,0; 2,5 e 5,0 μM) CIN (cinetina) e (0,0; 0,34; 0,68, e 1,37 μM) glutamina. Para a curva de crescimento, pesou-se a massa fresca dos explantes com e sem calos até o 56º dia de cultivo, em intervalos de 7 dias. Foi determinado os açúcares redutores (AR), a sacarose e os açúcares solúveis totais (AST) em cada período da curva de crescimento. A utilização de 2,4-D é eficiente para a indução de calos em *M. urundeuva* e a calogênese é potencializada com a combinação de 2,4-D, CIN e glutamina no meio nutritivo. A curva de crescimento dos calos de *M. urundeuva* apresenta forma sigmoide com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. O conteúdo de sacarose e AST apresentou comportamento distinto de acordo com as diferentes fases de crescimento dos calos, exibindo acúmulo de açúcares no período de preparação para o crescimento, degradação na fase exponencial e novamente volta a acumular esses carboidratos nos estágios finais (desaceleração e estacionária). O conteúdo de AR, excetuando o dia “zero”, se manteve estável durante todos os períodos avaliados.

Palavras-Chave: Aroeira-do-sertão. Carboidratos. Planta Medicinal. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva Fr. All. Is a tree belonging to the family Anacardiaceae, popularly known as aroeira-do-sertao, which has wood and medicinal use and is threatened with extinction. This work aimed to study the calogenesis of the aroeira-do-sertão, as well as to analyze biochemically the callus produced. Leaf explants were inoculated in MS culture medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) supplemented with different concentrations (0.0; 2.5, 10.0 and 20.0 μM) of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), (0.0, 2.5 and 5.0 μM) KIN (kinetin) and (0.0, 0.34, 0.68, and 1.37 μM) glutamine. For the growth curve, the fresh mass of the explants with and without calli was weighed until the 56th day of culture, at intervals of 7 days. Reducing sugars (RS), sucrose and total soluble sugars (TSS) were determined at each period of the yield curve. The use of 2,4-D is efficient for callus induction in *M. urundeuva* and calogenesis is potentiated with the combination of 2,4-D, KIN and glutamine in the nutrient medium. The growth curve of the calluses of *M. urundeuva* presents sigmoidal form with five distinct phases: lag, exponential, linear, deceleration and stationary. The content of sucrose and TSS presented different behavior according to the different stages of callus growth, showing accumulation of sugars in the period of preparation for growth, degradation in the exponential phase, and again accumulating these carbohydrates in the final stages (deceleration and stationary). The RS content, except for day "zero", remained stable during all evaluated periods.

Keywords: Aroeira-do-sertão. Carbohydrates. Medicinal plant. *In vitro* culture.

1 INTRODUÇÃO

A família Anacardiaceae é constituída por aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, presentes em ambientes secos e úmidos (PELL et al., 2011). Dentre as espécies que constituem essa família, tem-se *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., uma árvore popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão (LIMA, 2011), cujo porte varia correspondentemente com a região onde é encontrada. A madeira é pardo-avermelhada, com sabor adstringente, muito dura e tida como imputrescível, bastante utilizada para obras externas, como postes, moirões, esteios, estacas entre outros; e casca é subdividida em placas nos troncos mais velhos, sendo íntegra nas árvores jovens, encerrando 15% de tanino, usado na indústria de curtume (LORENZI, 1998; ANDRADE et. al., 2000).

A aroeira-do-sertão possui ainda uso medicinal, sendo empregada no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias e distúrbios no sistema digestório (MATOS, 1999). Sua entrecasca possui propriedades anti-inflamatórias, adstringentes, antialérgicas e cicatrizantes (VIANA et al., 1995); suas raízes são utilizadas no tratamento de reumatismo e suas folhas são indicadas para o tratamento de úlceras (ALMEIDA et al., 1998).

Devido aos diversos usos atribuídos à espécie, esta vem passando por um processo de exploração intensa, de forma predatória, causando a devastação de suas populações naturais sendo, portanto, considerada uma espécie ameaçada de extinção (MMA, 2008). Dentro desse contexto, tem-se a cultura de tecidos vegetais, cujas técnicas baseiam-se na capacidade da célula vegetal regenerar um indivíduo completo, o que é denominado de totipotencialidade celular. As técnicas que envolvem a cultura de tecidos têm importantes contribuições para a propagação de plantas, possibilitando a multiplicação clonal de indivíduos superiores com rápido crescimento (GEORGE, 2008). As atividades inerentes à cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controladas, visando entre outros fatores, a otimização das respostas aos estímulos térmicos e fotoperíodo aplicados ao material *in vitro* (TEIXEIRA; TORRES, 1998).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, tem-se a micropropagação, a qual permite a obtenção de um grande número de plantas com qualidade fitossanitária em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano (NAGAO; PASQUAL; RAMOS, 1994). A micropropagação pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática, sendo que ambas podem ocorrer por duas formas: via direta, através da regeneração de plantas diretamente do explante, sem passar pela fase de calo, apresentando alta fidelidade genética; e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Este calo caracteriza-se como um aglomerado de

células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante, sendo a friabilidade uma característica importante quando se objetiva a obtenção de embriões somáticos ou a produção de metabólitos secundários de interesse, via cultivo de células em suspensão (BARRUETO CID, 1992).

Na organogênese ocorre a diferenciação de novas gemas em brotações (cauligênese) e raízes (rizogênese) durante o desenvolvimento vegetal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LEMOS, 2010). Já a embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas que manifestam um sistema vascular fechado sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial; esta característica, aliada à bipolaridade diferem os embriões somáticos dos propágulos oriundos do processo da organogênese (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999)

Na obtenção dos processos morfogênicos *in vitro* são utilizados os fitorreguladores, como as auxinas e citocininas, que possuem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados dos locais produtores na planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As auxinas estão envolvidas com a indução e a iniciação de embriões somáticos e, em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica quando se cultiva o explante em meio com 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), no entanto, em alguns casos o uso de citocininas também tem favorecido a produção de calo embriogênico (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A caracterização morfológica, bioquímica e ultra-estrutural dos calos pode evidenciar as mudanças que ocorrem nas diferentes fases do crescimento dos mesmos, fornecendo informações importantes relacionadas ao processo morfogenético *in vitro* de tecidos vegetais; esses estudos podem auxiliar ainda na identificação de fatores que desencadeiam mudanças fisiológicas nos explantes, como a aquisição da friabilidade ou desenvolvimento de embriões somáticos (VASCONCELOS et al., 2012). Durante o cultivo *in vitro* destaca-se ainda a relevância de estabelecer a curva de crescimento de calos da espécie vegetal estudada, cuja importância está justamente na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento (NOGUEIRA et al., 2008).

Vasconcelos et al. (2012) realizaram estudos de calogênese com *M. urundeuva* com a utilização de 2,4-D, no entanto, os autores relataram que os calos obtidos apresentaram textura compacta e características não-embriogênicas.

Nesse sentido, esse trabalho objetivou estudar a calogênese da aroeira-do-sertão, bem como analisar bioquimicamente os calos produzidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) e no Laboratório de Germinação (LAGER) localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

2.2 Material vegetal

Para o estabelecimento das culturas *in vitro* foram utilizadas sementes de *M. urundeuva* provenientes da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Semiárido, localizada em Petrolina-PE. O estabelecimento do cultivo *in vitro* foi baseado na metodologia utilizada por Andrade et al. (2000) com modificações. Os frutos-semente da espécie passaram por processo de desinfestação superficial em água corrente com algumas gotas de detergente neutro por 20 minutos, em seguida foi feita a remoção do endocarpo através de fricções em peneira e por fim permaneceram por mais 10 minutos em água corrente. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com imersão em etanol 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos sendo, posteriormente, lavadas três vezes consecutivas com água destilada estéril. Após este processo, as sementes foram inoculadas em meio de cultura WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; McCOWN, 1980).

2.3 Indução de calos

Foram utilizados como explantes segmentos foliares (seccionados nas extremidades longitudinais) com $\pm 0,5 \text{ cm}^2$, oriundos de plantas germinadas *in vitro* com aproximadamente 70 dias de idade. Estes foram excisados em solução de ácido ascórbico (1,14 mM), permanecendo imersos na mesma por 10 minutos e então inoculados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), (0,0; 2,5 e 5,0 μM) CIN (cinetina) e (0,0; 0,34; 0,68 e 1,37 μM) glutamina.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 x 4 (concentrações de 2,4-D, concentrações de CIN, concentrações de glutamina), totalizando 60 tratamentos. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco unidades experimentais (cinco explantes por placa de Petri).

As culturas foram mantidas em câmara de incubação, tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), com temperatura de $25 \pm 3^\circ \text{C}$, na ausência de luz por 45 dias (Figura 1) e em seguida foram avaliadas: a porcentagem dos explantes que formaram calos, massa fresca dos explantes com e sem calos, a porcentagem da área do explante recoberta por calos (de acordo com a seguinte escala visual: 0 % - ausência de calos, aproximadamente 25%, aproximadamente 50%, aproximadamente 75% e 100% da área do explante recoberta por calos), coloração [Branco, verde, marrom e escuro (cinza, preto e aspectos oxidados)] e textura (friável ou compacto) e porcentagem de explantes que apresentaram formação de estruturas com formas globulares.



Figura 1: Culturas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. incubadas em câmara tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). Feira de Santana-BA, 2017.

2.4 Curva de crescimento de calos

Para realização da curva de crescimento dos calos foi utilizado o tratamento contendo $2,5 \mu\text{M}$ de 2,4-D combinado com $2,5 \mu\text{M}$ de CIN e $0,34 \mu\text{M}$ de glutamina. Essa curva foi baseada na metodologia descrita por Nogueira et al. (2008) com modificações, a qual foi determinada pela quantificação da massa fresca (mg) dos explantes com e sem calos formados, a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação) até 56 dias, em intervalos de 7 dias, totalizando 9 períodos. Foram utilizadas quatro repetições (placas de Petri), sendo cada repetição constituída por cinco unidades experimentais (cinco explantes). A curva de crescimento foi realizada a partir da média das quatro repetições e para cada repetição foi realizada a média dos cinco explantes em cada período de avaliação. O percentual de

crescimento dos calos foi determinado por meio da equação: $Pf - Pi/Pf \times 100$ onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (LAMEIRA, 1997 apud SOUSA, 2015).

2.5 Análises do conteúdo de carboidrato

As amostras para a determinação de carboidratos foram retiradas em cada período de incubação (em intervalos de 7 dias), contados a partir do dia “zero” (explantos antes da inoculação).

Para determinação dos açúcares redutores (AR), açúcares solúveis totais (AST) e sacarose, foram utilizados 100 mg de explantes frescos (com e sem calos) macerados com auxílio de almofariz e pistilo em 10 mL de água destilada. Em seguida foram colocados em tubos de centrífuga e permaneceram em banho-maria à temperatura de 40°C por 30 minutos e logo após, centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi recolhido e congelado (± -6 °C) para posterior análise. A quantificação dos AST foi realizada pelo método de Antrona (YEMM; WILLIS, 1954) e do AR pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando solução de glicose como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm para AR e 620 nm para AST. As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicada pelo fator 0,95, segundo Martim (2003).

2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Estes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida realizada a análise de variância, sendo então transformados pela função $(x + 1)^{0,5}$, exceto os dados de porcentagem, os quais foram submetidos à transformação em arco-seno $\sqrt{\%}$. Quando o valor de “F” foi significativo, testou-se as médias originais pelo Teste Scott-Knott.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina na calogênese

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ($p < 0,05$) do fatorial triplo “2,4-D x CIN e glutamina” para todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos para a formação de calos (%FC), massa fresca dos explantes com e sem calos (MFC), porcentagem da área do explante recoberto por calo (%AERC) e porcentagem de explantes que apresentaram formações globulares (%FG) aos 45 dias da inoculação obtidos a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina (GLU). Feira de Santana-BA, 2017.

FV	GL	Quadrados médios			
		%FC ^x	MFC ^z (mg)	%AERC ^x	%FG ^x
2,4-D	4	24,75 ^{**}	181,38 ^{**}	4,90 ^{**}	4,08 ^{**}
CIN	2	0,10 ^{ns}	12,64 ^{**}	0,04 ^{ns}	2,05 ^{**}
GLU	3	0,65 ^{**}	12,06 ^{**}	0,40 ^{**}	0,70 ^{**}
2,4-D x CIN	8	0,20 ^{**}	8,94 ^{**}	0,21 ^{**}	0,55 ^{**}
2,4-D x GLU	12	0,45 ^{**}	12,77 ^{**}	0,47 ^{**}	0,16 [*]
CIN X GLU	6	0,27 ^{**}	11,16 ^{**}	0,14 ^{**}	0,22 ^{**}
2,4-D x CIN x GLU	24	0,16 ^{**}	6,66 ^{**}	0,12 ^{**}	0,33 ^{**}
Resíduo	240	0,06	1,99	0,03	0,07
CV (%)		20,70	19,07	36,40	91,88

^{**}, ^{*}, ^{ns} Significativo ao nível de 1%, 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F respectivamente. ^z Dados transformados pela função $(x + 1)^{0.5}$. ^x Dados transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

Ao analisar a variável porcentagem de explantes responsivos para formação de calos, observou-se que em meio isento de CIN e adicionado com 2,5 μ M dessa citocinina, registrou-se elevadas taxas para esta variável na maioria dos tratamentos que conteve a auxina, ao passo que em meio ausente de glutamina, atingiu-se porcentagens de 100% de responsividade em todos os tratamentos adicionados com 2,4-D (Tabela 2). Quando o meio de cultura foi suplementado com 5,0 μ M de CIN, também foram registradas elevadas taxas de explantes responsivos para formação de calos na maioria dos tratamentos, atingindo 100% em grande parte dos que continham 2,4-D (Tabela 2).

Os resultados demonstraram que a adição de 2,4-D teve efeito positivo na indução de calos em *M. urundeuva*, visto que, com exceção do tratamento isento de 2,4-D, CIN e glutamina (4,0%) e do tratamento contendo apenas CIN na concentração de 5,0 μ M (4,0%), não houve formação de calos em meio de cultura isento da auxina (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de explante responsivos para formação de calos obtidos a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação submetidos a diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina. Feira de Santana-BA, 2017.

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	4,00aB	0,00aC	0,00aC	0,00aB
2,5	100,00aA	100,00aA	100,00aA	96,00aA
5,0	100,00aA	72,00bB	56,00cB*	96,00aA
10,0	100,00aA	88,00aA	52,00bB*	100,00aA
20,0	100,00aA	100,00aA	96,00aA	100,00aA
2,5 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aC	0,00aB	0,00aB
2,5	100,00aA	100,00aA	100,00aA	100,00aA
5,0	100,00aA	40,00bB*	100,00aA*	100,00aA
10,0	100,00aA	100,00aA	84,00bA*	100,00aA
20,0	100,00aA	100,00aA	96,00aA	100,00aA
5,0 μM CIN				
0,0	4,00aB	0,00aC	0,00aC	0,00aB
2,5	92,00aA	80,00aB*	100,00aA	92,00aA
5,0	92,00aA	72,00bB	84,00bB*	100,00aA
10,0	100,00aA	100,00aA	100,00aA*	100,00aA
20,0	92,00aA	100,00aA	100,00aA	100,00aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Para a massa fresca dos calos verificou-se que na ausência de CIN foi obtido valor médio de 91,58 mg com a utilização de 2,5 μM de 2,4-D combinado com 0,34 μM de glutamina, não diferindo das demais médias (86,71; 72,27 e 74,10 mg) registradas com o uso da mesma concentração de 2,4-D em meio de cultura isento e adicionado com 0,34; 0,68 e 1,37 μM de glutamina, respectivamente, assim como não diferiu dos valores médios (67,03 e 73,67 mg) alcançados com 0,34 μM de glutamina combinadas com 5,0 e 10,0 μM de 2,4 – D, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Massa fresca dos explantes (mg) com e sem calos obtidos a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina Feira de Santana-BA, 2017.

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	34,67aB	10,11aB	22,10aB	12,67aC
2,5	86,71aA	91,58aA	72,27aA*	74,10aA*
5,0	70,92aA	67,03aA	26,98bB*	71,02aA
10,0	65,60aA	73,67aA	36,39bB	67,52aA
20,0	37,92aB	37,78aB	52,71aA	44,65aB
2,5 μM CIN				
0,0	30,08aB	10,05aB	23,44aC	25,52aB
2,5	66,68cA	97,10bA	166,73aA*	106,70bA*
5,0	73,93aA	32,66bB	79,93aB	47,63bB
10,0	61,28aA	72,31aA	62,59aB	75,77aA
20,0	44,08bB	28,56bB	40,90bC	98,19aA*
5,0 μM CIN				
0,0	36,51aB	14,73aB	19,55aC	19,12aC
2,5	56,24bB	78,63bA	113,96aA*	41,21bC*
5,0	82,52bA	45,33cB	82,76bB	144,15aA*
10,0	50,87bB	79,30bA	112,41aA*	64,89bB
20,0	41,84aB	43,23aB	66,48aB	70,29aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Os resultados alcançados no presente estudo são superiores aos relatados por Vasconcelos et al. (2012) em trabalhos de calogênese com a mesma espécie, no qual os autores obtiveram as maiores médias (87,50 e 82,50%) com a utilização de 4,52 e 6,78 μM de 2,4-D, respectivamente.

Os resultados observados nesse trabalho corroboram aqueles reportados por Lopes et al. (2016) em culturas de *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose, submetidas às concentrações de 2,4-D e glutamina, que também constataram efeito positivo da presença

dessa auxina em meio de cultura para indução da calogênese e assim como foi verificado para *M. urundeuva*, os autores relataram que as distintas concentrações de glutamina não influenciaram na formação dos calos.

Outros autores já descreveram efeito positivo da combinação de auxinas e citocininas na indução de calos, a exemplo de Reis et al. (2017) que ao combinar o uso 2,4-D com CIN sob distintos explantes (segmento foliar e internodal) de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, relataram taxa máxima (100%) de formação de calos em explantes foliares no período de 30 dias com a utilização de 4,53 μM de 2,4-D combinado com 4,65 μM de CIN. Já Santos et al. (2016) verificaram a maior porcentagem (100%) de indução de calos em folhas *Piper permucronatum* Yunck. na combinação de 4,52 μM de 2,4-D e 4,44 μM de BAP.

O comportamento observado para *M. urundeuva* na presença de 2,4-D pode ser atribuído ao fato de que as auxinas, entre elas o 2,4-D, são consideradas responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação e rediferenciação, alterando determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA, TORRES; TEIXEIRA, 1999) o que conseqüentemente favorece a calogênese. Essas características são requeridas quando se objetiva a indução de calos, visto as particularidades que esta estrutura apresenta. Importante destacar que além dos estímulos exógenos necessários para indução da calogênese, deve-se considerar também a capacidade da célula vegetal em responder a tais estímulos. De acordo com Guerra, Torres e Teixeira (1999) os hormônios são compostos químicos endógenos facilmente transportados para células responsivas, onde estão diretamente envolvidos com o controle da atividade gênica na transcrição e na tradução, em um vasto número de processos; nesse sentido, supõe-se que estas células responsivas são caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e então iniciam a resposta na célula. Dessa maneira, o tecido vegetal oriundo dos explantes foliares de *M. urundeuva* mostraram-se responsivos ao estímulo hormonal empregado para indução de calogênese.

Ao adicionar 2,5 μM de CIN no meio de cultura, constatou-se maior média (166,73 mg) para massa fresca quando os explantes foliares foram inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 μM de 2,4-D associado a 0,68 μM de glutamina. Ao acrescentar 5,0 μM de CIN no meio de cultura, averiguou-se média de 144,15 mg com a suplementação 5,0 μM de 2,4-D combinado com 1,37 μM de glutamina no meio de cultura (Tabela 3).

Os resultados obtidos para *M. urundeuva* são inferiores aos observados por Lopes et al. (2016) em estudo com *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rosea, no qual foi alcançado uma média de 4.600 mg de matéria fresca de calos em meio de cultura adicionado com 18,12

μM de 2,4-D. Já Rocha (2014) em culturas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis verificou que ao combinar uma auxina (2,4-D) com uma citocinina (BAP) para indução de calos em explantes foliares constatou as maiores médias (18.190 mg de massa fresca) utilizando apenas a citocinina BAP (17,76 μM de BAP).

Ao analisar a variável porcentagem da área do explante recoberto por calo, verificou-se que em meio de cultura isento de CIN e contendo apenas 5,0 μM de 2,4-D, obteve-se taxa de 95,00% para esta variável. Quando foi combinado 0,34 μM de glutamina com 2,5 μM de 2,4-D foi observada porcentagem de 70%, a qual não diferiu estatisticamente das taxas (67,50; 62,00 e 56,00%) alcançadas com a mesma concentração de 2,4-D em meio de cultura isento e suplementado com 0,68 e 1,37 μM de glutamina, respectivamente, assim como não diferiu das porcentagens (52,00 e 57,08%) registradas com a mesma concentração de glutamina combinada com 10, 0 e 20,0 μM de 2,4-D, respectivamente (Tabela 4).

Quando foi adicionado 2,5 μM de CIN no meio de cultura, foi registrada 86% de área do explante recoberta por calo com o uso de 10,0 μM de 2,4-D combinado com 1,37 μM de glutamina, sem diferença significativa da porcentagem alcançada com 20,0 μM de 2,4-D (74,00%) na mesma concentração de glutamina (Tabela 4). Ao suplementar o meio de cultura com 5,0 μM de 2,4-D na ausência de glutamina foi observada taxa de 81%, entretanto sem diferença significativa da porcentagem (70,00%) atingida com a utilização de 10,0 μM de 2,4-D também em meio de cultura isento de glutamina (Tabela 4).

Ao adicionar 5,0 μM de CIN no meio de cultura, obteve-se taxa de 84,00% de área do explante recoberto por calo com a combinação de 5,0 μM de 2,4-D e 1,37 μM de glutamina, (Tabela 4). Esses resultados diferem dos obtidos por Rocha (2014) em estudos de indução de calos em *Cissus verticillata*, onde foi verificado as maiores porcentagens de área foliar coberta por células de calo, nos tratamentos suplementados por 4,44 e 17,76 μM de BAP na ausência de 2,4-D, onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da área foliar coberta por calos. Já Nogueira et al. (2007) relataram a maior porcentagem de área do explante coberta por calos (99,18%) em *Byrsonimia intermedia* A. Juss, com a utilização 10,87 μM de 2,4-D.

Para a espécie estudada, a análise dos resultados possibilita a inferência de que a elevação nas concentrações de 2,4-D testadas assim como sua combinação com CIN não foram fatores decisivos para o aumento na área foliar ocupada por calo. Dessa maneira, pode-se afirmar que foi necessária a presença da auxina para a indução da calogênese e, conseqüentemente, extensão de tecido contendo calo ao longo do explante, no entanto, o mais

importante para *M. urundeuva* é estabelecer balanços hormonais ideais que promova o aumento na média da variável estudada.

Tabela 4: Porcentagem da área do explante recoberta por calo obtidos a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina. Feira de Santana-BA, 2017.

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	0,00aC	0,00aC	0,00aC	0,00aB
2,5	67,50aB	70,00aA	62,00aA	56,00aA
5,0	95,00aA	37,00cB	16,00dB*	70,00bA
10,0	54,00aB	52,00aA*	22,00bB*	53,00aA
20,0	56,00aB	57,08aA	49,00aA	60,00aA
2,5 μM CIN				
0,0	0,00aC	0,00aB	0,00aC	0,00aC
2,5	48,00bB	59,50bA	78,00aA	60,00bB
5,0	81,00aA	13,75cB*	52,00bB	44,00bB*
10,0	70,00bA	65,00bA	41,00cB*	86,00aA*
20,0	59,00aB	65,00aA	58,00aB	74,00aA
5,0 μM CIN				
0,0	1,00aB	0,00aC	0,00aC	0,00aD
2,5	58,00aA	40,92bB*	61,67aA	25,00bC*
5,0	61,00bA*	30,00cB	41,00cB	84,00aA
10,0	62,00aA	74,00aA	62,00aA*	62,50aB
20,0	54,00aA	64,00aA	56,00aA	64,00aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Pôde-se verificar que regiões dos calos permaneceram, em todos os tratamentos e independente do tamanho, com áreas ainda contendo tecido foliar (Figura 2). Isso pode ter ocorrido pela localização em que foram feitas as incisões no explante, as quais podem não ter sido suficientes para promover maior contato do explante com o meio de cultura (Figura 2A).

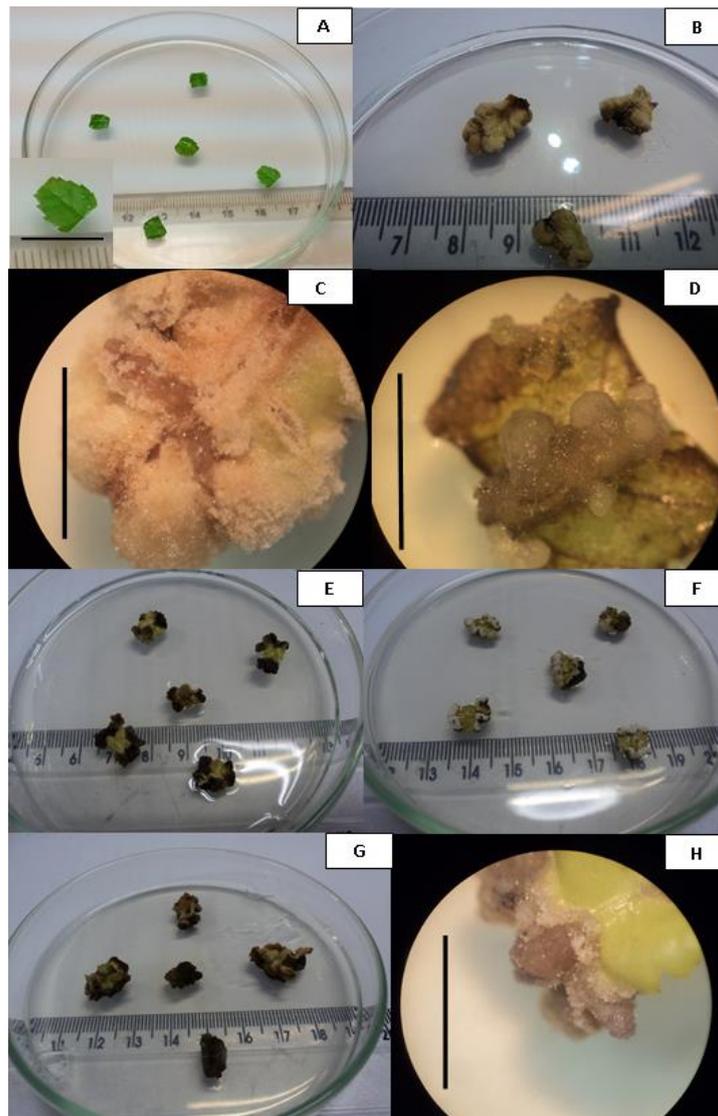


Figura 2: Aspectos morfológicos de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **A-** explantes no dia da inoculação; após 45 dias: **B e C-** 20 μM de 2,4-D + 0,0 μM de CIN + 0,34 μM de glutamina; **D-** 20 μM de 2,4-D + 2,5 μM de CIN + 0,34 μM de glutamina; **E-** 2,5 μM de 2,4-D + 2,5 μM de CIN + 0,34 μM de glutamina; **F-** 2,5 μM de 2,4-D + 2,5 μM de CIN + 1,37 μM de glutamina; **G-** 2,5 μM de 2,4-D + 2,5 μM de CIN + 0,68 μM de glutamina; **H-** 2,5 μM de 2,4-D + 0,0 μM de CIN + 1,37 μM de glutamina. Barra 25 mm (**C**) e 50 mm (**D e H**). Feira de Santana-BA, 2017.

Detectou-se, através de análises morfológicas dos calos, a presença de estruturas globulares, de forma que foi contabilizada a porcentagem de explantes com tais formações. Essas estruturas apresentaram formato semelhantes à embriões somáticos no estágio globular (Figura 3). Nepomuceno (2012) em estudos com *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J. F. B. Pastore também visualizou estruturas globulares em calos obtidos a partir de explantes foliares em meio suplementado com 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de CIN.

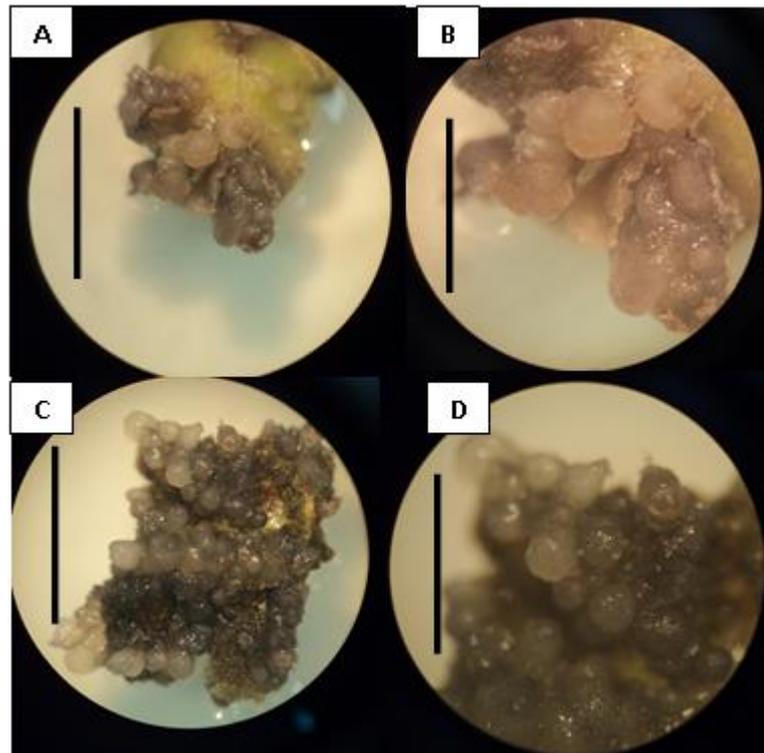


Figura 3: Aspectos morfológicos de calos em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. após 45 dias de cultivo. **A e B**- 2,5 μ M de 2,4-D + 2,5 μ M de CIN + 0,34 μ M de glutamina; **C e D**- 2,5 μ M de 2,4-D + 0,0 μ M de CIN + 0,68 μ M de glutamina. Barras: 50 mm (**A e C**); 25 mm (**B e D**) Feira de Santana-BA, 2017.

Quando o meio de cultura esteve isento da citocinina CIN, obteve-se taxa de 60% de explantes com formações globulares com a combinação de 2,5 μ M de 2,4-D com 1,37 μ M de glutamina, no entanto, sem diferir estatisticamente dos demais valores (45,00 30,00 e 36,00%) atingidos com a mesma concentração de 2,4-D combinada com a demais concentrações de glutamina (0,0; 0,34 e 0,68 μ M), respectivamente (Tabela 5).

Quando foi adicionado 2,5 μ M de CIN no meio de cultura atingiu-se taxa máxima de explantes (100%) que apresentaram formações globulares com a suplementação de 2,5 μ M de 2,4-D em combinação com 0,34 μ M de glutamina, não diferindo estatisticamente da porcentagem (80%) registrada com a utilização de 1,37 μ M na mesma concentração de 2,4-D (Tabela 5). Ao ser acrescentado 5,0 μ M de CIN no meio de cultura, constatou-se maior taxa (80%) para a mesma variável com a junção de 20 μ M de 2,4-D e 0,34 μ M de glutamina, não apresentando diferença estatística do tratamento contendo 10,0 μ M da auxina na mesma concentração de glutamina, cuja taxa foi de 60% (Tabela 5).

Tabela 5: Porcentagem de explantes que apresentaram em sua morfologia formações globulares obtidas a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. aos 45 dias da inoculação com diferentes concentrações do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN) e glutamina (GLU). Feira de Santana-BA, 2017.

2,4-D (μM)	Glutamina (μM)			
	0,0	0,34	0,68	1,37
0,0 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aB	0,00aB	0,00aB
2,5	45,00aA	30,00aA	36,00aA	60,00aA
5,0	4,00aB	8,00aB	0,00aB	4,00aB
10,0	4,00aB	0,00aB	4,00aB	4,00aB*
20,0	12,00bB	35,00aA*	0,00bB	8,00bB
2,5 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aC	0,00aB	0,00aC
2,5	54,00bB	100,00aA*	48,00bA	80,00aA
5,0	28,00aA	15,00aC	8,00aB	8,00aC
10,0	4,00bB	15,00bC	20,00bB	48,00aB
20,0	32,00bA	60,00aB	68,00aA*	88,00aA*
5,0 μM CIN				
0,0	0,00aB	0,00aC	0,00aB	0,00aC
2,5	52,00aA	36,00bB	56,00aA	24,00bB*
5,0	20,00bB	28,00bB	12,00Bb	52,00aA*
10,0	0,00cB	60,00aA*	28,00Bb	45,00aA
20,0	4,00bB	80,00aA	12,00Bb	28,00bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na coluna em relação a cada concentração de CIN, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Médias seguidas por * diferem das demais entre as concentrações de CIN em relação às concentrações respectivas de 2,4-D e GLU ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Na maioria dos modelos de embriogênese induzidos *in vitro*, as auxinas e, entre elas o 2,4-D, são consideradas responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação e rediferenciação (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). No entanto, alguns autores têm relatado o uso de citocininas objetivando a produção de embriões somáticos, a exemplo de Carneiro et al. (2014) que observaram a indução de calos embriogênicos em *Agave sisalana* com a combinação de 2,4-D (13,6 μM) com uma citocinina, que no estudo foi o BAP na concentração 88,8 μM .

Apesar dos vários relatos disponíveis na literatura sobre a indução e desenvolvimento de embriões somáticos ainda não existe um protocolo padrão para a indução e maturação de culturas embriogênicas em plantas (FLOH; SANTOS; DEMARCO, 2015). No presente estudo foi verificado que a adição de citocinina apresentou efeito positivo no aumento da presença de estruturas globulares nos calos de *M. urundeuva*. De acordo com Taiz e Zeiger (2009), embora as citocininas regulem muitos processos celulares, o controle da divisão celular é o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal. Nesse sentido, apesar de não ter sido requerido para a indução de calos na espécie vegetal estudada, sua presença favoreceu o aumento na produção de calos.

Além da adição da citocinina combinada com a auxina, o uso da glutamina também influenciou a indução de calos com formações globulares. Todavia, Lopes et al. (2016), verificaram que a utilização apenas da glutamina não exerceu influência no desenvolvimento dos calos de *Hilocereus undatus*, não apresentando diferenças visíveis nem estatísticas, no entanto esses autores constataram que a suplementação do meio de cultura com 2,4-D e glutamina induziu a formação de calos.

Em relação à coloração, os calos apresentaram-se com cores que variaram entre marrom, verde e escuro (tons de cinza e preto, oxidados) na maioria dos tratamentos, sendo que maior parte destes apresentaram mais de uma cor representativa (Tabela 6). A coloração escurecida encontrada na maioria dos calos de *M. urundeuva* pode ser associada à oxidação observada durante o cultivo dos mesmos.

Em relação a textura, obteve-se calos friáveis, compactos e ainda calos com parte friáveis e compactas simultaneamente, sendo que, grande parte dos tratamentos apresentou textura friável (Tabela 6). Ao relacionar a coloração observada com a textura dos calos foi possível identificar que os calos com colorações mais escuras (marrons e escuros) apresentaram porcentagens maiores de calos friáveis e friáveis/compactos (Tabela 6).

Diferente do observado nesse estudo, Vasconcelos et al. (2012) observaram a predominância de calos marrons, compactos e indiferenciados, independente da concentração de 2,4-D utilizada em trabalho de calogênese com a mesma espécie. Enquanto Santos, Souza e Paz (2017) e Santos et al. (2016) relataram formação de calos friáveis e esbranquiçados em culturas de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño e *Piper permucronatum*, respectivamente. Ao passo que Menezes et al. (2012) observaram formação de calos em *Saccharum* spp. com textura friável e coloração amarela. De acordo Vasconcelos et al. (2012), para a obtenção de culturas embriogênicas é indispensável à indução de calos friáveis, por conter células arredondadas e com características meristemáticas.

Tabela 6: Coloração dos calos e porcentagem de calos compactos (%CC), calos friáveis (%CF) e calos com partes compactas e friáveis (%CCF) obtidos a partir de segmentos foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. aos 45 dias inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), CIN (cinetina) e glutamina (GLU). Feira de Santana-BA, 2017.

GLU (μM)	2,4-D (μM)	Coloração*	%CC	%CF	%CCF
0,0 μM CIN					
0,0	0,0	Branco	4	-	-
	2,5	Cinza/Marrom/Escuro	-	100	-
	5,0	Escuro/Verde/Branco	-	100	-
	10,0	Escuro/Marrom	-	64	36
	20,0	Escuro/Marrom	12	60	28
0,34	0,0	-	-	-	-
	2,5	Verde/Escuro	-	90	10
	5,0	Verde/Branco	20	36	16
	10,0	Escuro/Branco/Verde	36	28	24
	20,0	Verde/Branco	25	65	10
0,68	0,0	-	-	-	-
	2,5	Verde	4	92	4
	5,0	Branco/Verde	12	36	8
	10,0	Verde	16	28	8
	20,0	Escuro/Verde	16	72	8
1,37	0,0	-	-	-	-
	2,5	Escuro/Verde/Marrom	-	76	20
	5,0	Escuro/Marrom/Verde	8	40	48
	10,0	Escuro	16	44	40
	20,0	Escuro	12	60	28
2,5 μM CIN					
0,0	0,0	-	-	-	-
	2,5	Verde/Cinza	4	60	36
	5,0	Escuro	-	72	28
	10,0	Escuro	12	76	12
	20,0	Escuro	20	48	32
0,34	0,0	-	-	-	-
	2,5	Escuro/Verde	24	8	68
	5,0	Escuro/Marrom	-	25	10
	10,0	Escuro/Verde	20	35	45
	20,0	Escuro/Verde claro	4	68	28

Tabela 6: Continuação.

	0,0	-	-	-	-
0,68	2,5	Escuro/Marrom	-	60	40
	5,0	Escuro/Verde	20	56	24
	10,0	Escuro/Verde	24	56	4
	20,0	Escuro	4	80	12
	0,0	-	-	-	-
1,37	2,5	Escuro/marrom	36	24	40
	5,0	Escuro	24	44	32
	10,0	Escuro	4	52	44
	20,0	Escuro	28	44	28
	5,0 µM CIN				
0,0	0,0	Branco	4	-	-
	2,5	Verde	56	12	24
	5,0	Escuro	4	28	60
	10,0	Escuro	12	48	40
	20,0	Escuro	24	24	44
0,34	0,0	-	-	-	-
	2,5	Verde/Escuro	28	24	28
	5,0	Escuro/Verde	48	8	16
	10,0	Escuro/Verde/marrom	-	68	32
	20,0	Escuro/Marrom	-	68	32
0,68	0,0	-	-	-	-
	2,5	Verde/Escuro	28	32	32
	5,0	Branco/Verde	8	56	20
	10,0	Escuro/Verde	8	84	4
	20,0	Escuro/Verde	8	56	36
1,37	0,0	-	-	-	-
	2,5	Verde/Escuro	40	4	48
	5,0	Escuro	24	20	56
	10,0	Escuro/Verde	20	35	45
	20,0	Escuro	36	40	24

* coloração obtida a partir de observações de aspectos visuais percebidos durante a avaliação. Verde: compreendeu tons claros, médios e escuros de verde; Escuro: compreendeu tons de cinza, preto e aspectos oxidados.

3.2 Análise da curva de crescimento de calos embriogênicos

Ao analisar a curva de crescimento dos calos de *M. urundeuva*, foi possível constatar padrão sigmoideal, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (Figura 4). Em estudos com a mesma espécie Vasconcelos et al. (2012) também observaram padrão típico de crescimento de calos sigmoideal durante o período de 70 dias com

tendência de ganho de massa seca até o 56º dia após a inoculação, caracterizando o início da fase de desaceleração.

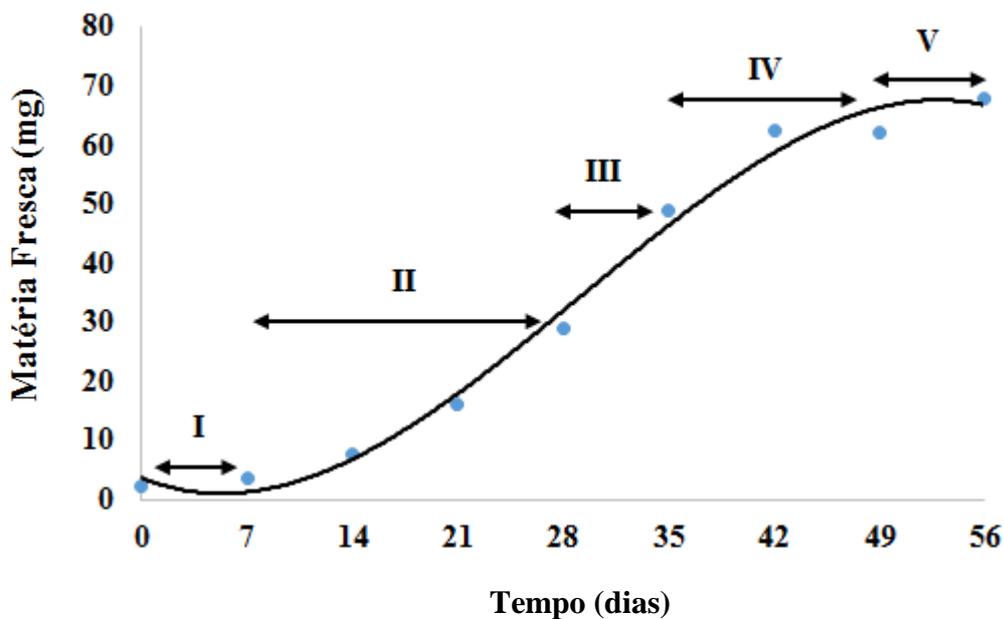


Figura 4: Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* Fr All. inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 μM de 2,4-D + 2,5 μM de CIN + 0,34 μM de glutamina durante 56 dias de incubação. Fase I- lag; Fase II- exponencial; Fase III- linear; Fase IV- desaceleração e Fase V- estacionária. Feira de Santana-BA, 2017.

Lopes et al. (2016) também verificaram cinco fases diferentes para curva de crescimento de calos de *Hilocereus undatus* durante o período de 112 dias, no entanto para essa espécie as fases relatadas foram a exponencial, linear, estacionária, desaceleração e declínio. Diferente do que foi averiguado para a aroeira-do-sertão, os mesmos autores não observaram a fase lag durante o período de avaliação. Para a espécie em estudo, essa fase ocorreu antes do 7º dia após a inoculação, cuja taxa foi de 33,86% de crescimento (Figura 4).

A fase lag é o período em que as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia (FEITOSA et al., 2013), durante esse período, verifica-se número estacionário de células, início da mobilização de metabólitos e síntese de proteínas, ou seja, ocorre uma preparação para a fase de divisão celular (STEIN et al., 2010). Em estudos com *Jatropha curcas* L., Feitosa et al. (2013) verificaram que a fase lag permaneceu de 0 a 15 dias de cultivo, ao passo que Santos, Souza e Paz (2017) relataram que essa fase na curva de crescimento dos calos obtidos a partir de folhas de *Capsicum annuum* var. *annuum*

cv. Iberaba Jalapeño ocorreu desde o dia da inoculação até o 12º dia de cultivo. Já Stein et al. (2010) verificaram que essa mesma fase em culturas de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. ocorreu até o 40º dia.

A segunda fase, a exponencial decorreu do 7º até o 28º dia, e foi constatado crescimento de 87,24% (Figura 4). Durante essa fase foi possível observar aumento considerável na taxa de crescimento dos calos da aroeira-do-sertão, isso ocorreu porque de acordo com Stein et al. (2010) é nesse período que acontece a máxima divisão celular. A fase exponencial observada na curva de crescimento de calos de *M. urundeuva* ocorreu precocemente quando comparada com a curva de crescimento de calos relatadas por Santos et al. (2016), obtida a partir de explantes foliares de *Piper permucronatum*, na qual a fase exponencial foi constatada do 21º ao 49º dia de cultivo. Já Santos, Souza e Paz (2017) descrevem que para a curva de calos de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño essa fase foi observada do 12º ao 25º dia. Para a espécie em estudo a formação de calos nos explantes foi observada a partir do 14º dia (Figura 5A).

A fase linear foi observada entre o 28º e o 35º dia da inoculação, cujo percentual de crescimento foi de 40,95% (Figura 4). Nesse período a visualização das formações calosas nos explantes é bem evidente (Figura 5B e 5C). O período da fase linear caracteriza-se como uma fase, na qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular (FEITOSA et al., 2013). Para *Hilocereus undatus* esse período foi observado entre 14 e 28 dias (LOPES et al., 2016). Ao analisar a fase de desaceleração da curva de crescimento dos calos de *M. urundeuva*, observa-se que essa fase compreendeu o período de 35 a 49 dias, com crescimento de 21,31% (Figura 4 e Figura 5C, D e E). A fase de desaceleração é onde há maior produção de metabólitos secundários e é no final dessa fase que deve ser iniciada o processo de repicagem dos calos (GUERRA; NODARI, 2006). Para *Piper permucronatum* essa fase ocorreu entre o 56º ao 63º dia após a inoculação dos explantes foliares (SANTOS et al., 2016).

Finalmente, a fase estacionária iniciou ao 49º e se manteve até o último período de avaliação (56 dias) (Figura 4 e Figura 5E e F). Essa fase pode ser caracterizada como praticamente imóvel com relação ao ganho em massa fresca, pois não há mais divisão celular, o calo está, portanto, em subsistência (LOPES et al., 2016). Isso pode ser percebido inclusive com o próprio percentual de crescimento dos calos da aroeira-do-sertão que foi de apenas 8,25%. Feitosa et al. (2013) observaram que a fase estacionária dos calos de *Jatropha curcas* L. ocorreu entre 45 e 50 dias.

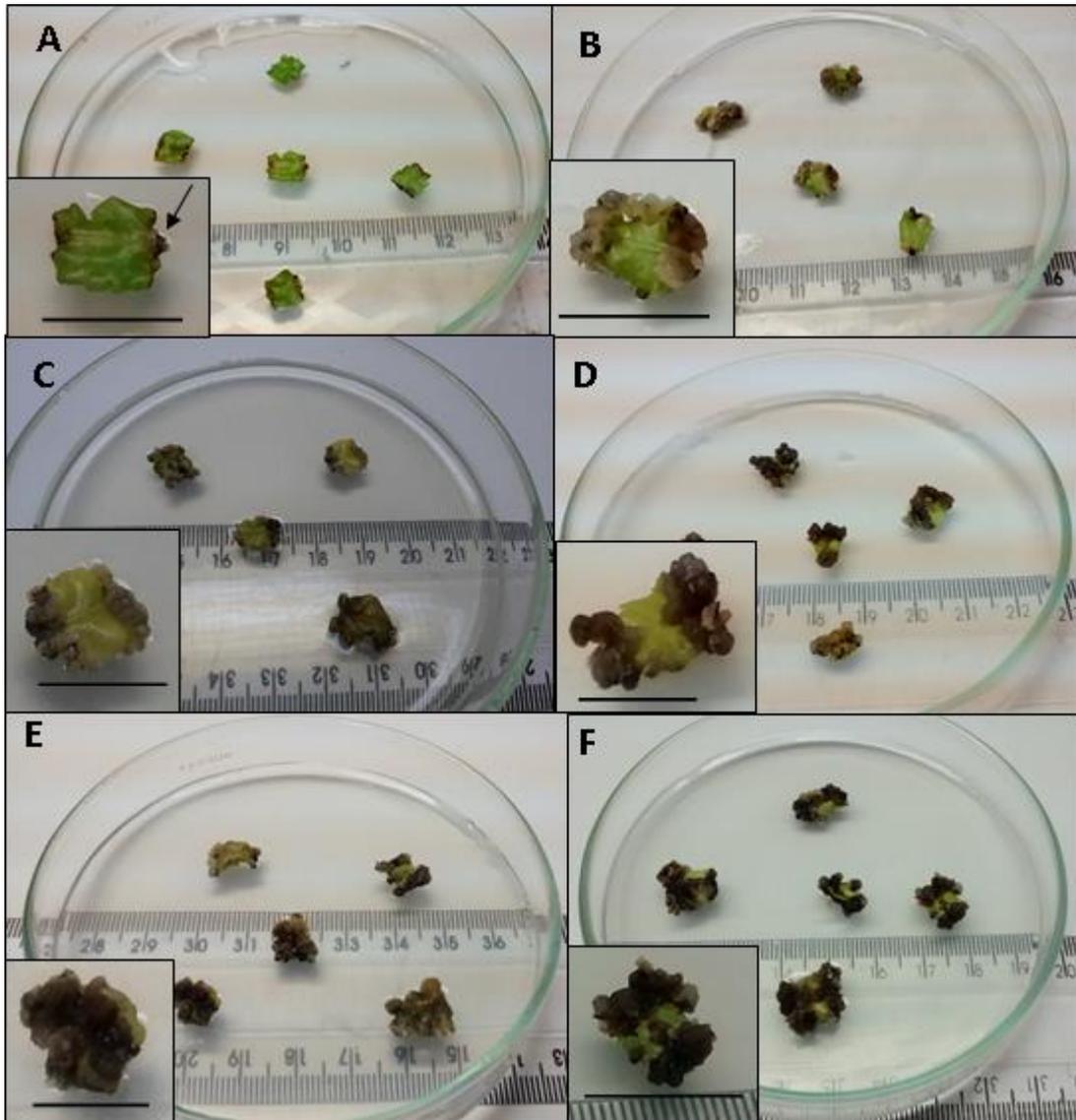


Figura 5: Aspectos morfológicos dos calos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. induzidos a partir de explantes foliares inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 μM de 2,4-D + 2,5 μM de CIN + 0,34 μM de glutamina, durante diferentes períodos de cultivo [A- 14 dias (seta indicando localização de calo); B- 28 dias; C- 35 dias; D- 42 dias; E- 49 dias e F- 56 dias]. Barra: 1 cm. Feira de Santana-BA, 2017.

3.3 Análises do conteúdo de carboidrato

Através da análise do conteúdo de carboidratos durante o período de 56 dias de cultivo dos calos de *M. urundeuva* foi possível detectar a presença de açúcares redutores (AR), sacarose e açúcares solúveis totais (AST) (Figura 6).

O menor conteúdo de carboidratos foi observado no período que compreendeu o dia “zero” (explantes antes da inoculação) e se estendeu até o 28º dia (Figura 6), coincidindo com as fases lag e exponencial da curva de crescimento dos calos (Figura 4). Os conteúdos de

carboidratos se mantiveram semelhantes nas fases lag e exponencial, com exceção dos açúcares redutores, os quais apresentaram menor conteúdo no dia da inoculação dos explantes (dia zero) tendo aumento a partir do dia 7, quando se iniciou a fase exponencial (Figura 6). Esse resultado é contrário ao observado por Santos et al. (2008) que ao analisarem o conteúdo de açúcares redutores de calos formados a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* 'Apoatã' verificaram que o teor máximo de açúcares redutores ocorreu no dia da inoculação dos explantes (0 dia de cultivo, início da fase lag), a partir do qual sofreu redução, atingindo um teor mínimo no 84º dia, que foi o último de cultivo.

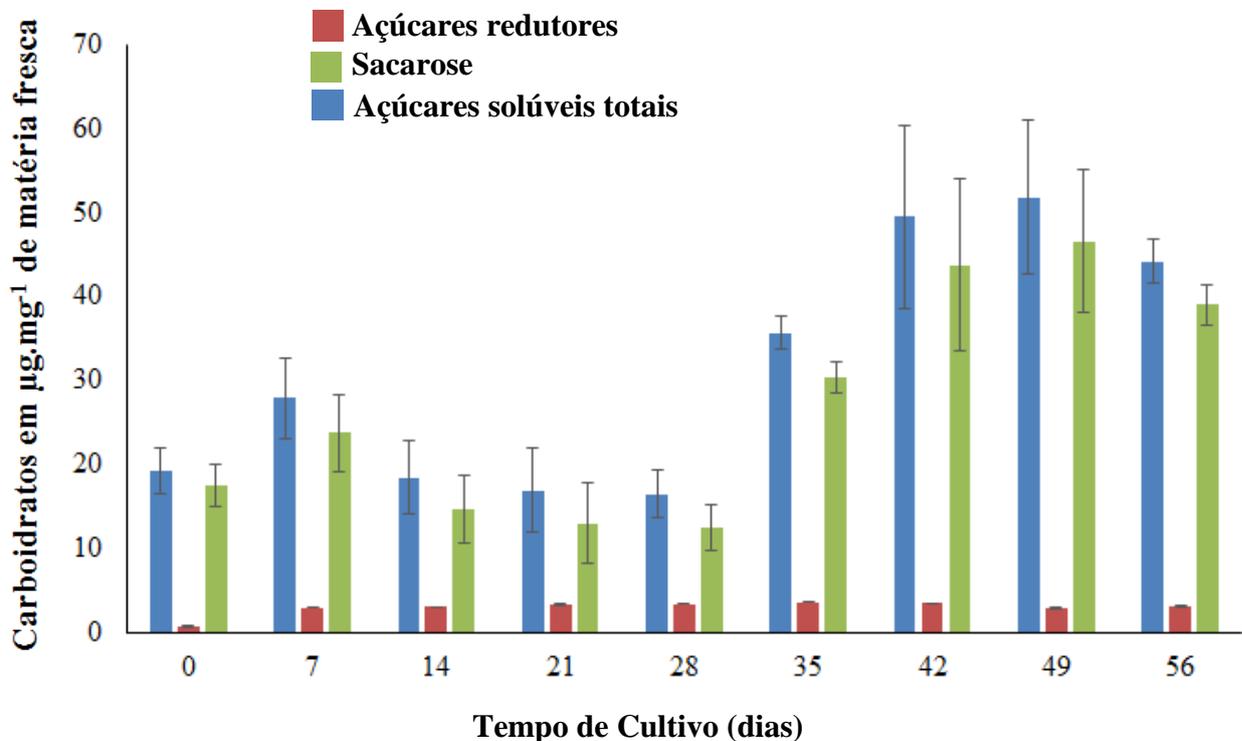


Figura 6: Conteúdo de carboidratos dos calos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. formados a partir de explantes foliares inoculados em meio de cultura suplementado com 2,5 µM de 2,4-D + 2,5 µM de CIN + 0,34 µM de glutamina, durante 56 dias de incubação (média ± desvio padrão, n= 3). Feira de Santana-BA, 2017.

Os açúcares encontrados nos explantes foliares analisados no dia da inoculação são oriundos da planta mãe doadora de explantes cultivadas *in vitro*, que em cultura heterotrófica absorveu carboidratos disponíveis no meio de cultura. Nesse sentido, durante o período da fase lag (0 a 7 dias) o aumento de AST, AR e sacarose observado pode ter ocorrido, provavelmente, por causa da degradação do amido armazenado nos cloroplastos do explante

foliar, em sacarose, assim como também pode ter havido absorção de carboidratos do meio de cultura para serem utilizados no crescimento, visto que esta é uma fase de preparação para este objetivo. O amido é o principal carboidrato de reserva nas plantas, e condições de escuro dão início à degradação do amido dos cloroplastos para manter a exportação de sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2009). Entretanto, o teor de amido não foi avaliado nesse estudo.

No 7º dia, o conteúdo de sacarose e de AST foram superiores aos obtidos no 28º dia cultivo (Figura 6), esses períodos correspondem ao início e final da fase exponencial, respectivamente. Sabe-se que no início dessa fase os explantes se preparavam para a fase de intensa divisão por qual passariam na fase seguinte, de modo que os mesmos acumularam AST, AR e sacarose absorvendo do meio de cultura e/ou quebrando as reservas contidas no explante. Dessa maneira, no 28º dia, final da fase exponencial, percebe-se que houve redução no conteúdo de sacarose e conseqüentemente do AST, indicando que a sacarose foi possivelmente utilizada na síntese de proteínas e/ou açúcares estruturais como a celulose. Esses resultados diferem de Sousa (2015) em análise bioquímica de culturas de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth no qual foi observado que os teores dos açúcares solúveis totais (AST) dos calos se mantiveram baixos até o 7º dia de cultivo, sendo o acúmulo máximo registrado no 14º dia, havendo declínio no teor a partir desse ponto. Para os açúcares redutores, o mesmo autor relatou que a análise demonstrou que os teores também foram baixos inicialmente, aumentando progressivamente do 7º ao 21º dia, seguido de declínio a partir desse ponto.

Nogueira et al. (2008) em estudos calogênicos de *Byrsonima intermedia* verificaram que os teores de açúcares solúveis totais, presentes nos calos formados a partir de explantes foliares, apresentaram tendência geral de declínio, exibindo teores mais elevados no dia da inoculação. Os mesmos autores notaram que, estes teores declinaram até o 40º dia, ocorrendo um novo incremento até o 70º dia após a inoculação, seguido, novamente, de declínio, sendo que essa elevação da concentração de AST nesse período de cultivo assim como observado para *M. urundeuva* coincide com a fase de desaceleração na curva de crescimento dos calos.

A partir do dia 35º dia foi observado aumento significativo no conteúdo de AST e de sacarose em comparação aos períodos anteriores, no entanto a quantidade de açúcares produzidos com 35 dias de cultivo são inferiores aos períodos seguintes (Figura 6). O comportamento observado aconteceu porque foi nesse período que se findou a fase linear e se iniciou a fase de desaceleração. A fase linear caracteriza-se por atividade mitótica menor que a exponencial, no entanto continua a ocorrer acréscimo no peso dos calos, obtido provavelmente, pelo aumento na área celular. Santos et al. (2010) em estudos bioquímicos de *Jatropha curcas* analisando o conteúdo de carboidratos ao longo de 112 dias verificaram que

os teores de AST se mantiveram baixos desde o dia da inoculação até os 77 dias de cultivo. Diferente do que foi verificado para *M. urundeuva*, os mesmos autores relataram que para os teores de AR observados inicialmente foram baixos até os 35 dias, apresentando posterior aumento dos 63 até os 77 dias, sendo que ao término do cultivo os teores são elevados desde os 98 até os 112 dias finais.

Os conteúdos dos açúcares redutores com exceção do período antes da inoculação (0 dias), se mantiveram aparentemente estáveis durante todo período de cultivo (Figura 6). Sabe-se que a sacarose é um açúcar de reserva prontamente disponível e estável para a planta, e sua hidrólise resulta nos açúcares redutores: frutose e glicose. Esses açúcares redutores provavelmente, assim que produzidos, foram metabolizados rapidamente para serem usados como fonte de energia e esqueleto de carbono para outras estruturas, de maneira que resultou nessa estabilidade observada nos níveis desses açúcares nos períodos de cultivo. Os açúcares redutores possuem grupos aldeídos e cetonas livres na sua estrutura, podendo assim sofrer reação de oxidação e, por conta dessas características, os mesmos não são transportados pela planta, e se não forem logo utilizados, podem ser convertidos em sacarose, que é a forma estável de transporte.

Diferente do que foi observado nesse estudo, Nogueira et al. (2007) observaram declínio de AR de *Byrsonima intermedia* que se estendeu desde o dia da inoculação até 120 dias de cultivo. Os autores inferiram que este decréscimo constante no teor desses açúcares sugere que os calos da espécie utilizaram somente a reserva de AR contida no explante no dia da inoculação, originada da planta-mãe, pois assim como observado nesse estudo, a fotossíntese estava ausente visto que o cultivo foi realizado no escuro e de forma heterotrófica e, assim, o açúcar foi consumido para manter o crescimento.

Nos períodos seguintes, com 42 e 49 dias, o comportamento de acúmulo de carboidratos foi mantido estável. No entanto, é possível verificar que o acúmulo de AST e sacarose são notavelmente maiores quando comparados com os períodos iniciais (Figura 6). Esses períodos estão compreendidos dentro da fase de desaceleração, provavelmente nessa fase houve absorção de sacarose do meio de cultura, no entanto o consumo foi menor, visto que a etapa de intensa atividade celular já havia cessado. Esse resultado corrobora Santos et al. (2010) em cultivo de *Jatropha curcas*, no qual foi observado que tanto o AST quanto o AR apresentaram como tendência baixo teor a partir da inoculação e nível superior nos períodos finais de cultivo. Os resultados obtidos para *M. urundeuva* permitem inferir que houve redução das atividades metabólicas nesse período, visto o acúmulo de AST e sacarose, além

da inalteração do conteúdo de açúcares redutores, comportamento que se manteve no período seguinte (56 dias) confirmando a fase estacionária em que se encontrou o calo.

4 CONCLUSÃO

A utilização de 2,4-D é eficiente para a indução de calos em *M. urundeuva*.

A calogênese é potencializada com a combinação de 2,4-D, CIN e glutamina.

A curva de crescimento dos calos de *M. urundeuva* apresenta forma sigmoideal e o conteúdo de sacarose e AST apresentam comportamento distinto de acordo com as diferentes fases de crescimento dos calos.

O conteúdo de AR, excetuando o dia “zero”, se mantém estável durante o crescimento dos calos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188p.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Ciências e Agrotecnologia**, v. 24. n. 1. p. 174- 180. 2000.

BARRUETO CID, L.P.B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, n.18, p.2-7, 1992.

CARNEIRO et al. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 294-303, 2014.

FEITOSA, L. S. et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

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

FLOH, E. L. S.; SANTOS, A. L. W.; DEMARCO, D. **Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas**. Cap. 3, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/283710872_Embriogenese_vegetal_abordagens_basicas_e_biotecnologicas> Acesso em: Agosto de 2017.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**. v. 1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 01–28.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, 864p. 1998.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999. v.2. p.533-568.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2013.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L.P.B. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, EMBRAPA. 2010. p.103-127.

LIMA, B. G. **Caatinga**: Espécies lenhosas e herbáceas. Mossoró-RN: EDUfersa, 2011. 316p.

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

LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Agrária**, v.11, n.1, p.21-25, 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 352 p.

MARTIM, S. A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar: potencial de uso em mudas submetidas à deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate**. 2003. 67f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MATOS, F. J. A. **Plantas de medicina popular do Nordeste**: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: Edições UFC, 80p. 1999.

MENEZES, T. S. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Geintec**, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.

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

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf> Data de Acesso: março de 2015.

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

- NAGAO, E. O; PASQUAL, M; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “in vitro” de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.
- NEPOMUCENO, C. F. **Propagação e conservação in vitro de *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) J.F.B. PASTORE**. 2012. 179f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.44-48, 2008.
- PELL, S. K. et al. Anacardiaceae. In KUBBITZKI (ed). **The families and genera of vascular plants. X. Flooring plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales**. Springer, Berlin. 2011. p 7-50.
- REIS, A. et al. Callus induction and betacyanin quantification by HPLC/MS-MS in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **Hoehnea** v. 44, n. 1, p. 90-95, 2017.
- ROCHA, J. F. **Indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**. 2014. 42p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). Universidade Federal de Rondônia.
- SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- SANTOS, D. N. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v.40, n.11, 2010.
- SANTOS, M. R. A. et al. Induction and growth pattern of callus from *Piper permucronatum* leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.142-148, 2016.
- SANTOS, M. R. A.; SOUZA, C. A.; PAZ, E. S. Growth pattern of friable calluses from leaves of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n. 3, p. 523-530, 2017.
- SOUSA, F. P. **Micropropagação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae)**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana.
- STEIN, V. C. et al. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159-163, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e**

Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, 1998, p. 71-86.

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

VIANA, G. S. B. et al. **Aroeira-do-sertão:** estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1995. 164p.

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

Capítulo III

**TRIAGEM FITOQUÍMICA DE *Myracrodruon urundeuva* Fr.
AII SOB DIFERENTES CULTIVOS**

RESUMO

Myracrodruon urundeuva Fr. All. é uma árvore popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão, bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias, distúrbios no sistema digestório, reumatismo, entre outros. Este trabalho objetivou avaliar qualitativamente a composição química de diferentes órgãos de *M. urundeuva* submetidos a distintas condições de cultivo. Foram utilizados extratos metanólicos obtidos a partir de brotos, folhas, caule, raízes de plantas cultivadas em condições de campo e germinadas *in vitro* [tubos de ensaio e frascos de 500 mL (co- cultivo)] e também cascas e folhas coletadas em ambiente natural. Foram calculados o rendimento de todos os extratos e então realizada a triagem fitoquímica através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e da prospecção preliminar. Foram observadas taxas de rendimento que variaram entre 17,94 a 46,04% nos extratos analisados. A triagem fitoquímica dos extratos obtidos através dos diferentes cultivos possibilitou detectar a presença de uma variedade de metabólitos secundários (esteroides/triterpenoides, fenólicos taninos, cumarinas e flavonóides). O tipo de cultivo altera o rendimento de extratos, mas não influencia o perfil fitoquímico das plantas de *M. urundeuva*, entretanto, existem diferenças na produção de metabólitos entre os distintos órgãos da espécie estudada.

Palavras-chave: Lenhosa medicinal. Cultivo *in vitro*. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva Fr. All. Is a tree popularly known as aroeira-preta or aroeira-do-sertão, widely used in folk medicine for the treatment of hemorrhages, respiratory, urinary infections, disorders in the digestive system, rheumatism, among others. This work aimed to qualitatively evaluate the chemical composition of different organs of *M. urundeuva* submitted to different culture conditions. Methanolic extracts were obtained from shoots, leaves, stems, roots of plants grown under field conditions and germinated *in vitro* [test tubes and vials of 500 mL (co-cultivation)] and also peels and leaves collected in a natural environment. The yield of all the extracts were calculated and then the phytochemical screening was carried out through Thin Layer Chromatography (TLC) and preliminary prospecting. Yield rates ranged from 17.94 to 46.04% in the analyzed extracts. Phytochemical screening of the extracts obtained through the different cultures allowed to detect the presence of a variety of secondary metabolites (steroids / triterpenoids, phenolic tannins, coumarins and flavonoids). The type of crop changes the yield of extracts, but does not influence the phytochemical profile of the plants of *M. urundeuva*, however, there are differences in the production of metabolites among the different organs of the species studied.

Keywords: Medicinal woody. *In vitro* culture. Secondary metabolites.

1 INTRODUÇÃO

O uso da natureza para fins terapêuticos é tão antigo quanto a própria civilização humana, e por um longo período, os produtos naturais oriundos de minerais, plantas e animais foram fundamentais para a área da saúde no tratamento e na prevenção de diversas doenças (BRASIL, 2012).

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, contando com uma rica flora, que desperta interesses de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos (SOUZA; FELFILI, 2006). Nas últimas décadas, vem sendo observado um grande avanço científico no estudo dos vegetais, isso porque, os processos vitais de biossíntese são os responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células que formam os diversos tecidos dos organismos animais e vegetais (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

Os vegetais produzem grande variedade de compostos orgânicos que parecem não possuir função direta no seu crescimento e desenvolvimento, tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Fumagali et al. (2008) afirmam que os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas como por exemplo, a proteção contra patógenos, no qual podem atuar como antibacterianos, antifúngicos e antivirais, assim como, agindo com atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas através da síntese de fitoalexinas. Esses metabólitos em grande parte conferem ação medicinal às plantas que os produzem. Plantas medicinais são assim chamadas por apresentarem propriedades curativas e/ou preventivas para determinadas doenças (CZELUSNIAK et al., 2012).

Nesse sentido, a fitoterapia qualifica-se como uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais nas diferentes formas farmacêuticas (CZELUSNIAK et al., 2012), representando fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde humana. Além da comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente, a fitoterapia representa parte importante da cultura de um povo, sendo também elemento de um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo de várias gerações. Essa prática popular vem contribuindo para pesquisas científicas e divulgação de propriedades terapêuticas, validando ou não o uso de determinadas plantas medicinais (TOMAZZONI et al., 2006).

Sabe-se que as três principais classes de metabólitos secundários são os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os terpenos podem

ser classificados em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos entre outros, sendo que dentre os derivados dos triterpenos, tem-se os esteroides (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os esteroides/triterpenóides possuem atividade anti-inflamatória (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010), ao passo que existem evidências de que alguns fitoesteroides são eficazes contra doenças cardiovasculares, reduzindo os níveis de colesterol sendo, por tanto, considerados alimentos funcionais e usados atualmente em alguns alimentos industrializados (QUEIROZ, 2009).

Os compostos fenólicos estão entre os principais antioxidantes presentes nas plantas (SILVA et al., 2010), dos quais fazem parte as cumarinas, flavonoides, taninos, antraquinonas e lignanas. As cumarinas apresentam ação biológica no combate às enfermidades do trato respiratório, devido às ações broncodilatadora, expectorante, anti-inflamatória e antialérgica, comprovadas pelos diversos estudos realizados (CZELUSNIAK et al., 2012). Os flavonoides apresentam atividades anti-inflamatória, antialérgica, anticancerígena; enquanto os taninos ajudam no tratamento da hipertensão arterial, queimaduras, bactericida e fungicida (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

Como um dos representantes dos compostos nitrogenados, os alcaloides constituem uma grande família com mais de 15.000 metabólitos secundários encontrados em aproximadamente 20% das espécies vegetais vasculares, sendo que, entre os alcaloides farmacologicamente úteis tem-se a morfina (analgésico), a codeína e a escopolamina (TAIZ; ZEIGER, 2009), além de apresentarem ação antitumoral, antitussígeno e antiviral (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais tem sido assinalada como valioso instrumento para o estudo dos metabólitos primários e secundários, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes (MORAIS et al., 2012). Essa ferramenta biotecnológica permite a produção de metabólitos secundários *in vitro*, assegurando assim, formas alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente em ecossistemas ameaçados (MORAIS et al., 2012).

A síntese e a quantidade dos compostos secundários nas plantas podem ser diferentes no cultivo *in vitro* quando comparados ao cultivo *in vivo* (KIRAKOSYAN et al., 2000), visto o controle das condições físicas e químicas possíveis nas condições *in vitro*. Dessa maneira, as análises fitoquímicas fornecem informações relevantes sobre a presença de metabólitos secundários nas plantas, para que assim possa-se chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010), sendo a triagem fitoquímica um procedimento importante para bioprospecção das espécies

vegetais utilizadas na medicina tradicional de interesse farmacológico e/ou toxicológico (BESSA et al., 2013).

Dentre as espécies de utilização medicinal popular tem-se a *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae), uma árvore popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão (LIMA, 2011), empregada no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias e distúrbios no sistema digestório (MATOS, 1999). Sua entrecasca possui propriedades anti-inflamatórias, adstringentes, antialérgicas e cicatrizantes (VIANA et al., 1995); suas raízes são utilizadas no tratamento de reumatismo e suas folhas são indicadas para o tratamento de úlceras (ALMEIDA et al., 1998).

Diante do exposto, esse trabalho objetivou avaliar qualitativamente a composição química de diferentes órgãos da *M. urundeuva* submetidas a distintas condições de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Laboratório de Extração (LAEX), em casa de vegetação, localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e no Laboratório de Bioprospecção Vegetal (LABIV) situado no Campus da UEFS.

2.2 Material vegetal

2.2.1 Material cultivado em casa de vegetação

Sementes de *M. urundeuva* (após remoção do endocarpo dos frutos-sementes com fricções em peneira) foram colocadas em copos plásticos (500 mL) contendo terra vegetal, e mantidas em casa-de-vegetação com luminosidade de 70%. Após 60 dias, as folhas, o caule e as raízes foram excisadas para preparação dos extratos (Figura 1 A e 1 B).

2.2.2 Material cultivado *in vitro*

2.2.2.1 Germinação em tubos de ensaio e em frascos (co-cultivo)

Sementes foram desinfestadas de acordo com o item 2.2 (capítulo 1) e inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) (Figura 1 C) e em frascos (500 mL) (Figura 1 D) contendo 10 e 70 mL de meio de cultura WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; McCOWN, 1980), respectivamente. Foi colocada apenas uma semente por tubo de ensaio e dez sementes em cada frasco (condição de co-cultivo). Após 60 dias, as folhas, o caule e as raízes foram excisadas para obtenção dos extratos vegetais.

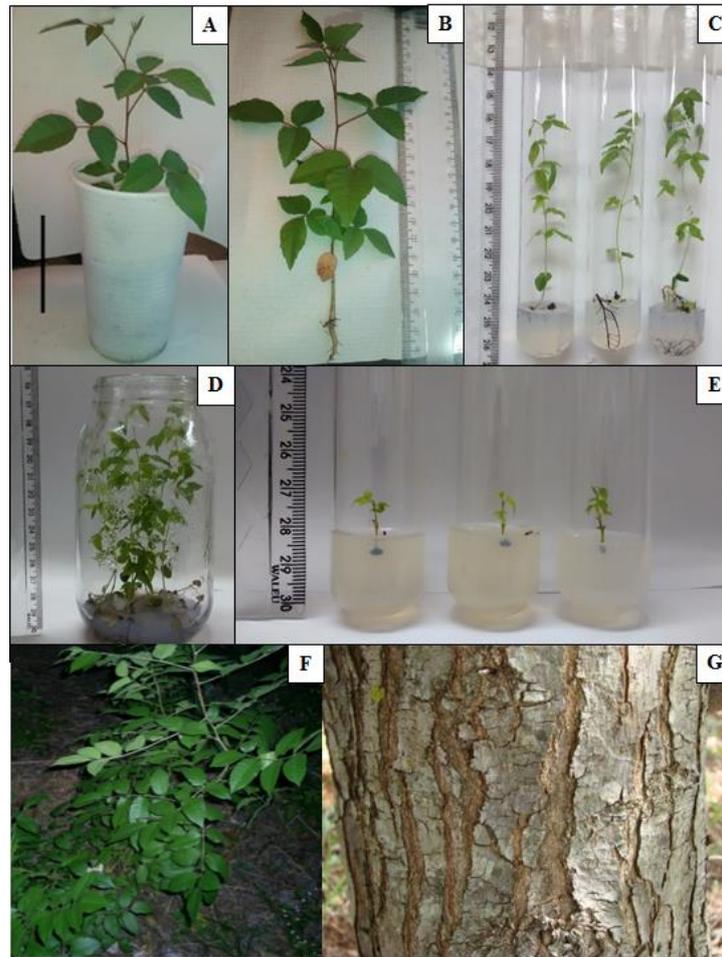


Figura 1: Plantas de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob distintos cultivos. **A** e **B**- plantas cultivadas em casa de vegetação; **C**- plantas germinadas *in vitro* em tubos de ensaio; **D**- plantas germinadas *in vitro* em frascos de 500 ml (co-cultivo); **E**- brotos obtidos via organogênese direta; **F**- detalhe de um ramo vegetativo (Fonte: Morais, 2006, adaptado) e **G**- Exemplo de casca de indivíduo adulto em ambiente natural (Fonte: <<http://www.dellafina.com.br/Noticiass1.asp?cod=282>>). (Barra - A: $\pm 5,0$ cm). Feira de Santana-BA, 2017.

2.2.2.2 Brotos induzidos *in vitro*

Foram utilizadas brotações obtidas a partir de segmentos nodais de plantas germinadas *in vitro*, induzidas em meio de cultura WPM com a utilização de $8,0 \mu\text{M}$ de BAP combinada com $10,0 \mu\text{M}$ de AgNO_3 e suplementada com 1 g de PVP (polivinilpirrolidona). Após 45 dias, a parte aérea foi excisada para preparação do extrato (Figura 1E).

O meio de cultura em todos os tipos de cultivos *in vitro* foi suplementado com $87,64 \text{ mM}$ de sacarose e solidificado com 7 g. L^{-1} de ágar.

2.2.3 Material *in situ*

Folhas e cascas coletadas de indivíduos adultos localizados no município de Petrolina-PE (Longitude: 367622°, Latitude: 9053666° e Altitude: 409 m) foram utilizadas para preparação dos extratos (Figura 1 F e G).

2.3 Preparo do material

Todo material coletado foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 40°C até obter peso constante, posteriormente pulverizado para obtenção dos extratos. O material pulverizado foi pesado em balança semi-analítica para posterior cálculo de rendimento, obtido através da equação (RODRIGUES et al., 2011):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso do extrato bruto}}{\text{Peso da massa seca vegetal}} \times 100$$

2.4 Preparo do extrato

O extrato bruto foi obtido através da técnica de maceração utilizando metanol como solvente extrator em temperatura ambiente (25°C) (Figura 2), a partir do qual foram realizadas três extrações consecutivas, através da filtragem em papel filtro e funil de vidro, em um intervalo de 72 horas. A cada extração, houve agitação ocasional e renovação do líquido extrator. Em seguida, a solução obtida foi concentrada eliminando todo o solvente, originando o extrato bruto metanólico.

Foram calculados o teor de rendimento de todos os extratos metanólicos de *M. urundeuva* obtido através de diferentes sistemas de cultivo: folhas, caules e raízes oriundas de plantas cultivadas em condições de casa de vegetação (folha campo, caule campo e raiz campo, respectivamente); folhas, caules e raízes oriundas de plantas cultivadas *in vitro* em tubos de ensaio (folha tubo, caule tubo e raiz tubo, respectivamente); folhas, caules e raízes oriundas de plantas cultivadas *in vitro* em frascos sob condições de co-cultivo (folha co-cultivo, caule co-cultivo e raiz co-cultivo, respectivamente); brotos induzidos *in vitro* via organogênese direta (brotos) e cascas e folhas coletadas em ambiente natural de ocorrência (casca *in situ* e folha *in situ*, respectivamente).

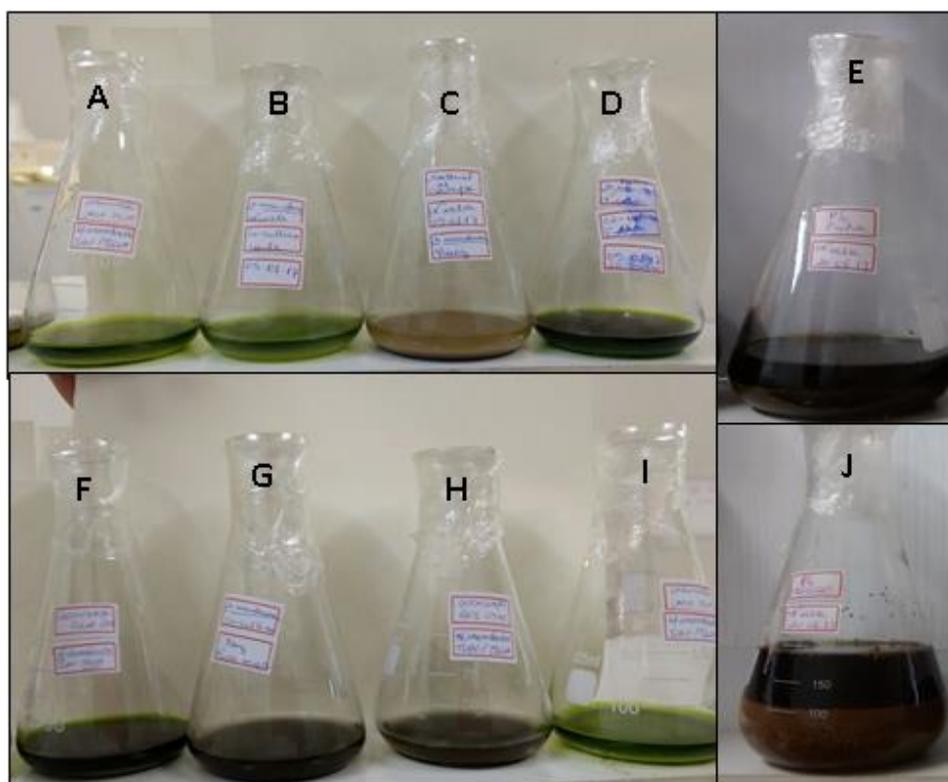


Figura 2: Preparo de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. através da técnica de maceração utilizando metanol como solvente extrator. **A e I-** caule tubo; **B-** caule co-cultivo; **C-** raiz campo; **D-** folha co-cultivo; **E-** folha *in situ*; **F-** folha tubo; **G-** raiz co-cultivo; **H-** raiz tubo; **J-** casca *in situ*. Feira de Santana-BA, 2017.

2.5 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada pela metodologia da prospecção preliminar e pela Cromatografia em Camada Delgada (CCD) a partir dos extratos metanólicos obtidos.

2.5.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Os testes foram realizados seguindo a metodologia descrita por Vogel (1989) e Chaves (1997) apud Silva, Miranda e Conceição (2010) através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para todos os extratos com exceção daqueles oriundos da casca e das folhas coletadas em ambiente natural (casca *in situ* e folha *in situ*).

A presença ou ausência dos grupos de metabólitos secundários e de alguns constituintes da espécie estudada foi verificada a partir da observação da reação característica esperada ou não, indicando a presença de resultado positivo ou negativo para cada grupo e constituinte analisado.

2.5.1.1 Preparação de placas

Para cromatografia em camada delgada, espalhou-se uniformemente, uma pasta do adsorvente (sílica gel Kieselgel 60 PF254) sobre lâminas de vidro e então, foram levadas para serem ativadas em estufa a 60°C durante 30 minutos, estando em seguida prontas para uso.

2.5.1.2 Aplicação da amostra para análise

As amostras foram solubilizadas em metanol. A aplicação da amostra na placa foi feita com o auxílio de um tubo capilar. Tocou-se a extremidade na superfície de fase estacionária e o líquido foi transferido por capilaridade para a superfície da placa, penetrando-a (Figura 3).

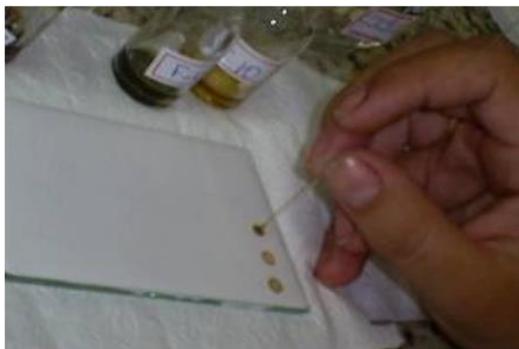


Figura 3: Aplicação do extrato na placa cromatográfica para análise fitoquímica. Fonte: Silva, Miranda e Conceição (2010).

2.5.1.3 Desenvolvimento e visualização da placa

Para o desenvolvimento da placa utilizou-se metodologia descrita por Silva, Miranda e Conceição (2010) com adaptações. Inicialmente testou-se diferentes sistemas para melhor separação das substâncias nas placas contendo sílica gel. As fases móveis utilizadas foram os solventes clorofórmio/metanol (9:1). Os cromatogramas foram obtidos por uma técnica de ascensão, na qual a placa foi imersa até uma profundidade em torno de 0,5 cm no solvente de desenvolvimento em cuba cromatográfica. Em seguida foram retiradas e colocadas em luz ultravioleta (UV) (Figura 4) para visualização e então foram aplicados os reveladores adequados com o auxílio de frasco borrifador.

Os reveladores utilizados foram específicos para cada classe de metabólitos pesquisados. Para fenólicos/taninos, borrifou-se a placa com solução de cloreto férrico 3%; para a identificação de alcaloides utilizou-se o reagente de Dragendorff como revelador; para as cumarinas utilizou-se o hidróxido de potássio (KOH) 10% e para esteroides/triterpenoides, usou-se o reagente de Liebermann-Burchard (MATOS, 2009).

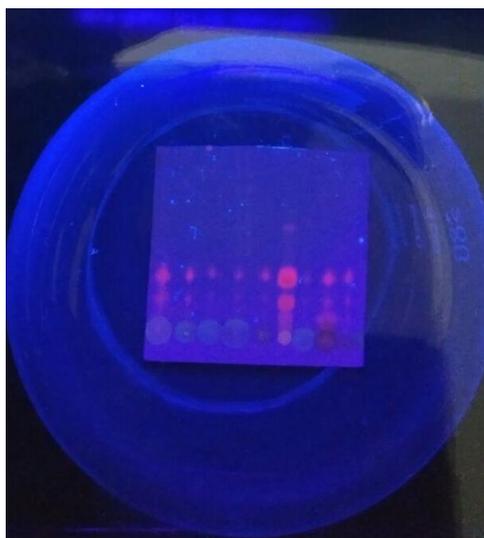


Figura 4: Cromatograma obtido após o desenvolvimento da placa cromatográfica, de extratos de *M. urundeuva* visualizado em luz ultravioleta (UV). Feira de Santana-BA, 2017.

2.5.2 Prospecção preliminar

Os testes qualitativos foram utilizados para detecção das principais classes de metabólitos secundários tais como compostos fenólicos/taninos, fenólicos/flavonoides, fenólicos/cumarinas, triterpenos/esteroides e nitrogenados/alcaloides seguindo a metodologia descrita por Matos (2009) através de reações colorimétricas e/ou formação de precipitados, utilizando reagentes específicos para cada classe química. Os testes de prospecção preliminar foram aplicados para os extratos oriundos de casca e folha *in situ* para detecção de todas as classes de compostos químicos investigadas, e para os demais extratos essa técnica foi aplicada para a investigação de compostos fenólicos/flavonoides.

A presença ou ausência dos grupos de metabólitos secundários de *M. urundeuva* foi verificada a partir da observação da reação característica esperada ou não, indicando a presença de resultado positivo ou negativo para cada grupo e constituinte analisado:

a) Fenólicos/taninos: Reação com cloreto férrico a 2% (FeCl_3), acetato de chumbo (10%) e acetato de cobre (3%).

Os extratos foram solubilizados em água destilada, posteriormente filtrados e distribuídos em tubos de ensaios. Em cada tubo de ensaio contendo 2 ml da solução aquosa de cada extrato, foi adicionado 3 gotas de solução de FeCl_3 a 2%, acetato de chumbo a 10% e acetato de cobre a 3%. Cada reação foi analisada separadamente utilizando os extratos dos

órgãos da espécie. A presença de compostos taninos é identificada pela mudança de coloração do verde a marrom ou aparecimento de precipitado.

b) Flavonoides: Reação de Shinoda [fragmentos de magnésio e ácido clorídrico (HCl) concentrado] e hidróxidos alcalinos [hidróxido de sódio (NaOH)].

Os extratos foram solubilizados em álcool 70% e aquecidos em banho-maria durante 15 minutos. Após serem filtrados, os extratos foram transferidos para tubos de ensaio para a realização da reação de Shinoda e com hidróxidos alcalinos.

Para reação de Shinoda, foi adicionado 3 mL de cada extrato em dois tubos. No primeiro tubo foram colocados alguns fragmentos de magnésio e acrescentou-se lentamente 1 mL de HCl concentrado, fazendo-se comparações da coloração obtida com o extrato contido no segundo tubo. A reação é positiva, indicando a presença de flavonoides, quando ocorre o aparecimento de coloração variando de rósea a vermelha do tubo 1.

Para reação com hidróxidos alcalinos, foram adicionados 2 mL de cada extrato em dois tubos de ensaio e adicionado 0,5 mL de solução de NaOH 1N em um dos tubos (tubo 1). Foram realizadas comparações da coloração obtida com o extrato contido no tubo sem reagente (tubo 2). A reação é positiva, indicando a presença de flavonoides, quando ocorre a intensificação da coloração amarelada no tubo 1.

A reação com NaOH não foi realizada para o extrato oriundo do caule cultivado em tubo de ensaio (caule tubo).

c) Esteroides e triterpenoides: Reação de Lieberman- Burchard (anidrido acético com ácido sulfúrico concentrado).

Os extratos foram solubilizados em 2 mL de clorofórmio e então filtrados com auxílio de funil fechado com algodão coberto com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e passada para um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, agitando-se suavemente.

O aparecimento da coloração azul seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres, enquanto que o aparecimento da coloração entre parda a vermelha indica a presença de triterpenoides livres.

d) Cumarinas:

Dissolveu-se os extratos em éter etílico e a partir desse extrato etanólico pingou-se uma gota em dois locais em um pedaço de papel filtro não fluorescente, e em seguida,

aplicou-se uma gota de NaOH 10% sobre uma mancha. Os mesmos foram colocados em uma câmara com incidência de luz UV por cerca de 2 minutos e observados se houve o aparecimento de uma mancha fluorescente. O desenvolvimento de fluorescência azulada bem visível indica a presença da cumarina.

e) Alcaloides: Reativo de Mayer e Dragendorff.

Os extratos foram dissolvidos em 5 mL de solução de ácido clorídrico a 5% e aqueceu-se por 10 minutos em banho maria (60° C). A solução foi distribuída em tubos de ensaio e então adicionadas 3 gotas dos reagentes de Dragendorff e Mayer. A presença de precipitados floculosos avermelhados e brancos respectivamente para cada reagente, indica a presença de alcaloides.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento dos extratos

Foram observadas taxas de rendimento que variaram entre 17,94 a 46,04% nos extratos analisados, sendo o menor rendimento (17,94%) verificado no extrato bruto das cascas coletadas em ambiente natural, *in situ* (Tabela 1). Constatou-se aumento no rendimento dos extratos oriundos do cultivo *in vitro*, independentemente do tipo de material vegetal, quando comparado com os extratos obtidos a partir de material cultivado em condições de campo (casa de vegetação) e coletados *in situ* (Tabela 1). Estes resultados sugerem que a quantidade de metabólitos secundários produzidos *in vitro* são maiores que os obtidos em condições de campo e de ambiente natural, o que representa um fator positivo para produção de metabólitos de interesse, visto a quantidade de material vegetal demandado para produção dos mesmos.

O rendimento de extratos metanólicos [Metanol-água 4:1 (v/v)] de *M. urundeuva* oriundos de ambiente natural, obtido a partir do tronco da espécie procedente do cerrado do Triângulo Mineiro, foi relatado por Queiroz, Morais e Nascimento (2002), onde foi encontrado rendimento de 18,07%. Enquanto Bessa et al. (2013), em estudos de prospecção fitoquímica com espécies de plantas medicinais nativas do cerrado, situado a 15 km do perímetro urbano de Gurupi, no sul do Estado do Tocantins, obtiveram rendimento de 12,4% em extrato etanólico de folhas de *M. urundeuva*. De acordo com Rodrigues et al. (2011), o cálculo do rendimento de extratos é fundamental no cultivo e colheita de plantas medicinais, visto que implicará diretamente na massa fresca necessária para obter-se, por dado processo

de secagem, determinado teor de extrato, com redução das estimativas de custo e menor perda na cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos.

Nesse sentido, o cultivo *in vitro* mostrou-se eficiente para redução da quantidade de material vegetal necessário para produção de metabólitos secundários, principalmente, quando se objetiva a produção de fitoterápicos em escala comercial, visto que, podem ser utilizadas quantidades inferiores de material vegetal, se comparadas com as demais formas de cultivo avaliadas, para a produção de concentrações semelhantes de metabólitos. Salientando ainda, que a extração de material vegetal em ambiente natural, como por exemplo a casca, pode levar a planta à morte, acentuando os problemas causados pela extração não sustentável da espécie, a qual contribuiu para que esta tenha sido, de acordo com o MMA (2008), listada como ameaçada de extinção.

Tabela 1: Massas secas vegetais e rendimentos dos extratos metanólicos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. obtidos a partir de: cascas e folhas coletadas em ambiente natural (casca *in situ* e folha *in situ*, respectivamente); folhas, caules e raízes de plantas cultivadas em casa de vegetação (folha campo, caule campo e raiz campo, respectivamente); folhas, caules e raízes de plantas cultivadas *in vitro* em tubos de ensaio (folha tubo, caule tubo e raiz tubo, respectivamente); folhas, caules e raízes de plantas cultivadas *in vitro* sob condições de co-cultivo (folha co-cultivo, caule co-cultivo e raiz co-cultivo, respectivamente) e brotos induzidos *in vitro* (brotos). Feira de Santana-BA, 2017.

EXTRATOS	MASSA SECA (mg)	RENDIMENTO (%)
casca <i>in situ</i>	82856,6	17,94
folha <i>in situ</i>	23260,6	30,83
folha campo	5703,1	32,80
folha Tubo	383,5	40,70
folha co-cultivo	235,2	34,57
caule campo	1661,6	18,22
caule tubo	316	46,04
caule co-cultivo	185,6	37,93
raiz campo	1465,5	18,07
raiz tubo	205,2	42,79
raiz co-cultivo	200,9	42,26
Brotos	209,6	45,04

3.2 Triagem fitoquímica qualitativa

A triagem fitoquímica dos extratos por CCD dos diferentes tipos de cultivos possibilitou detectar a presença de uma variedade de metabólitos secundários. Ao analisar os resultados obtidos para esteroides/triterpenoides, observou-se o surgimento de manchas verdes ao borrifar-se a placa cromatográfica com o reagente de Lieberman-Buchard, indicando a presença dessa classe química na maioria dos extratos, exceto em “caule tubo” e em todos os cultivos de raízes. Já para cumarina, os resultados demonstraram a ausência dessa classe química nos extratos de caule e raízes cultivadas em condições de campo, estando presente nos demais extratos analisados (Tabela 2).

Tabela 2: Triagem fitoquímica qualitativa dos extratos vegetais de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. obtidos a partir de: cascas e folhas coletadas em ambiente natural (casca *in situ* e folha *in situ*, respectivamente); folhas, caules e raízes de plantas cultivadas em casa de vegetação (folha campo, caule campo e raiz campo, respectivamente); folhas, caules e raízes de plantas cultivadas *in vitro* em tubos de ensaio (folha tubo, caule tubo e raiz tubo, respectivamente); folhas, caules e raízes de plantas cultivadas *in vitro* sob condições de co-cultivo (folha co-cultivo, caule co-cultivo e raiz co-cultivo, respectivamente) e brotos induzidos *in vitro* (brotos). Feira de Santana-BA, 2017.

EXTRATOS	CLASSE QUÍMICA				
	Esteroides/ Triterpenóides	Fenólicos/ Cumarinas	Fenólicos/ Taninos	Fenólicos/ Flavonoides	Nitrogenado /Alcaloides
casca <i>in situ</i>	-	+	+	+	-
folha <i>in situ</i>	+	+	+	+	-
folha campo	+	+	+	+	-
folha tubo	+	+	+	+	-
folha co-cultivo	+	+	+	+	-
caule campo	+	-	+	+	-
caule tubo	-	-	+	-	-
caule co-cultivo	+	-	+	+	-
raiz campo	-	-	+	+	-
raiz tubo	-	+	+	+	-
raiz co-cultivo	-	+	+	+	-
Brotos	+	+	+	+	-

Legenda: (+) Positivo; (-) Negativo

Para detecção de compostos fenólicos/taninos a pulverização com cloreto férrico, apresentou resultado positivo (presença de coloração azul escuro) para todos os extratos vegetais. Enquanto que não foi identificada a presença de alcaloides em nenhum dos extratos de *M. urundeuva* avaliados, não sendo observada mudança de coloração na placa cromatográfica ao ser borrifado o reagente de Dragendorff (Tabela 2).

Para os extratos advindos do material vegetal de ambiente natural, *in situ*, verificou-se que o teste de prospecção fitoquímica, através da Reação de Lieberman- Burchard para detecção de esteroides/triterpenóides, apresentou reação positiva (mudança de coloração para verde) para folha (Figura 5A) e negativa para casca (Figura 5B). Esses mesmos extratos também apresentaram resultados positivos para presença de cumarina, os quais exibiram o aparecimento de manchas fluorescente após incidência de luz ultravioleta (Figura 6A) (Tabela 2).

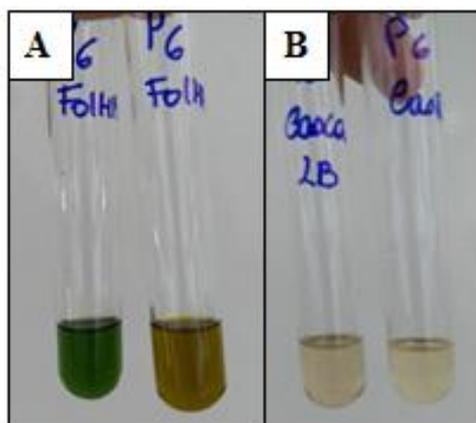


Figura 5: Reação Lieberman- Burchard para esteroides obtidos em extratos metanólicos de folhas (A) e cascas (B) coletadas em ambiente natural (casca *in situ* e folha *in situ*, respectivamente) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Feira de Santana-BA, 2017.

Ao avaliar a presença de fenólicos/taninos através da prospecção fitoquímica observou-se mudança de coloração, indicando a presença desses fenóis com a adição da solução alcoólica de FeCl_3 2% para os extratos obtidos tanto de folhas como de cascas coletadas em ambiente natural (Tabela 2). A presença de taninos foi evidenciada com a mudança de coloração para o marrom e aparecimento de precipitado através da reação com solução aquosa de FeCl_3 3%, acetato de chumbo a 10% e acetato de cobre a 3% (Figura 6B) (Tabela 2). Esses resultados corroboram Pedroso, Silva e Furlan (2009) em estudos com *Porophyllum ruderale* [Jaco.] Cass e *Solidago sp.*, nos quais também foi verificado a presença de precipitados coloridos durante a identificação de taninos nessas espécies. No entanto, segundo os mesmos autores, apesar da verificação da formação de precipitados coloridos,

indicando a presença de taninos condensados, há a necessidade de testes mais específicos para a confirmação ou não destes compostos bioativos nas espécies, uma vez que a época de colheita e o estágio vegetativo podem interferir nos resultados.

M. urundeuva tem sido relatada como uma espécie que apresenta altas concentrações de compostos fenólicos, especialmente os taninos (MONTEIRO et al., 2012). De acordo com Trentin et al. (2013), os taninos encontrados na espécie foram capazes de inibir a formação de biofilme (aglomerados de bactérias envolvidos por uma membrana) devido à sua capacidade de danificar membranas bacterianas, comprovando sua atividade bacteriostática.

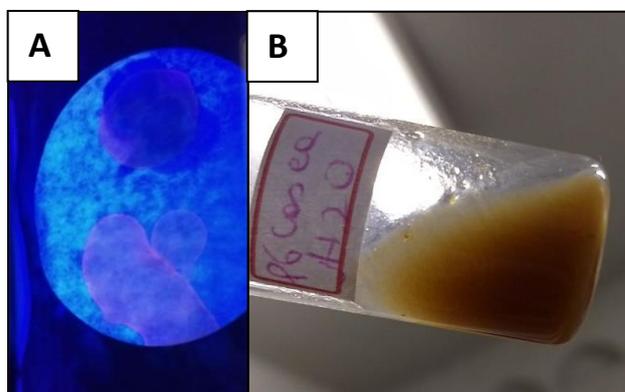


Figura 6: Visualização em luz ultravioleta de gotas de extrato de folhas coletadas em ambiente natural (folha *in situ*) e em papel filtro acrescido com gotas de KOH 10% para detecção de cumarina (A) e reação com solução aquosa de FeCl₃ 2%, acetato de chumbo a 10% e acetato de cobre a 3% em extratos de cascas coletadas em ambiente natural (casca *in situ*) para detecção de fenólicos/taninos (B) de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Feira de Santana-BA, 2017.

A presença de fenólicos/flavonoides, com exceção do caule tubo, foi detectada em todos os extratos analisados (Tabela 2), através de reações de coloração positiva (reação de Shinoda e hidróxido de sódio). A Reação de Shinoda confirmou a presença dessa classe química apenas nos extratos de folha campo (Figura 7A), casca *in situ* e folha *in situ*, confirmadas pelo aparecimento da coloração de parda a vermelha. Nos demais extratos, a presença de flavonoides foi confirmada pela reação com NaOH, com exceção do caule tubo (Figura 7 B-S). De acordo com Pedroso, Silva e Furlan (2009), o desenvolvimento de coloração nesta reação ocorre a partir da redução dos flavonoides em compostos antociânicos, com cor mais intensa. Enquanto, os reativos de hidróxido de sódio desenvolvem coloração pela reação com hidroxilas fenólicas, presentes na estrutura química dos flavonoides e, embora essas reações não sejam específicas para esses compostos, pois é possível encontrar nos vegetais outras substâncias fenólicas como os taninos e os antraderivados, por exemplo,

elas são importantes como ensaios complementares para a caracterização da classe de flavonoide presente (PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009).

Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com o descrito na literatura para a presença de flavonoides em *M. urundeuva*, como relata Bessa et al. (2013) em trabalhos de prospecção fitoquímica preliminar com a espécie, nos quais os autores identificaram a presença de flavonoides em extratos etanólicos obtidos a partir das folhas da aroeira-do-sertão. Assim como Machado (2013) que em estudos de caracterização do extrato metanólico obtido a partir de folhas de *M. urundeuva*, também detectou a presença de flavonoides.

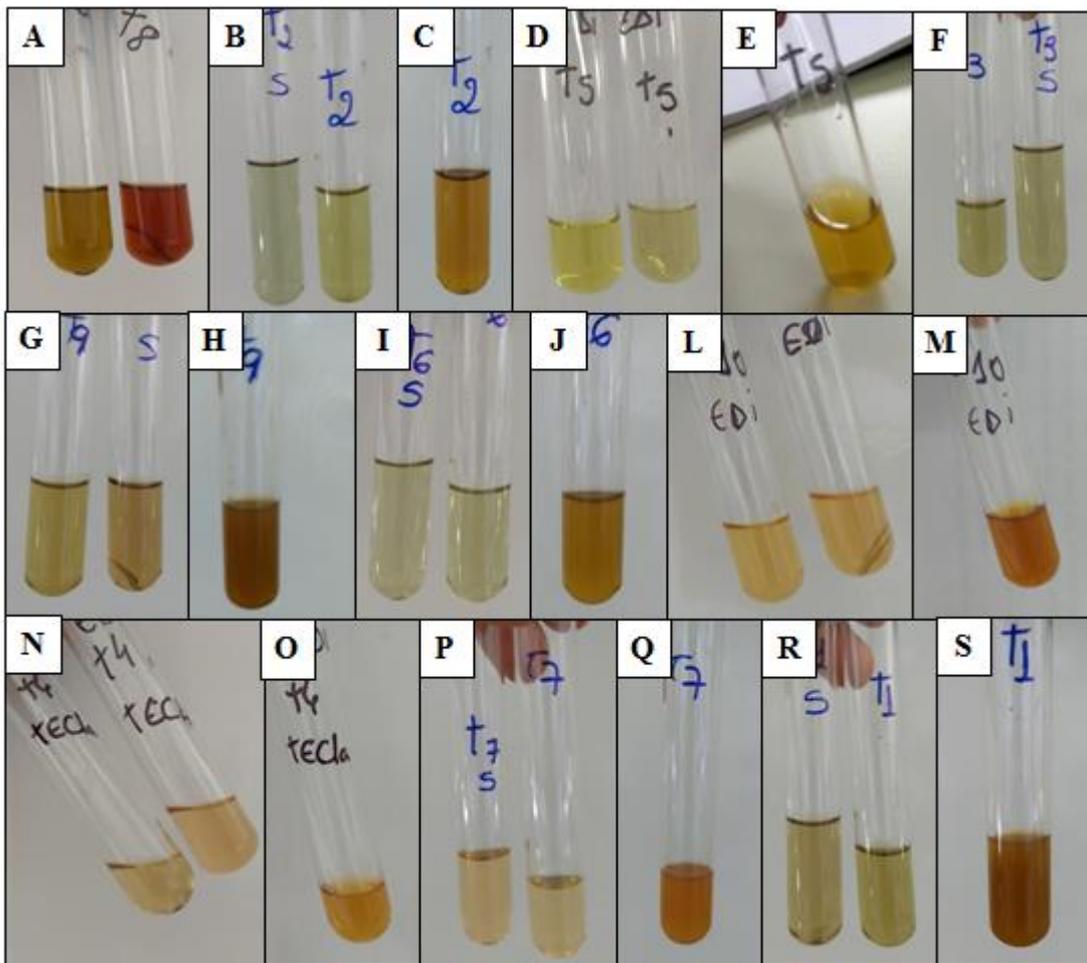


Figura 7: Reação de Shinoda e reação com NaOH para identificação de flavonoides. **A-** folha campo (reação de Shinoda); **B-** folha tubo (reação de Shinoda); **C-** folha tubo (reação com NaOH); **D-** folha co-cultivo (reação de Shinoda); **E-** folha co-cultivo (reação com NaOH); **F-** caule tubo (reação de Shinoda); **G-** caule campo (reação de Shinoda); **H-** caule campo (reação com NaOH); **I-** caule co-cultivo (reação de Shinoda); **J-** caule co-cultivo (reação com NaOH); **L-** raiz campo (reação de Shinoda); **M-** raiz campo (reação com NaOH); **N-** raiz tubo (reação de Shinoda); **O-** raiz tubo (reação com NaOH); **P-** raiz co-cultivo (reação de Shinoda); **Q-** raiz co-cultivo (reação com NaOH); **R-** brotos (reação de Shinoda) e **S-** brotos (reação com NaOH) obtidos a partir de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetidos a diferentes condições de cultivo. Feira de Santana-BA, 2017.

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, sendo encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos (SILVA et al., 2015), sendo classificados em grupos diferentes, a exemplo de antocianinas, flavonas, flavonóis e as isoflavonas (TAIZ; ZEIGER, 2009). A utilização dos flavonoides como um potente agente profilático e terapêutico para muitas doenças tem sido crescente, abrangendo assim, seus efeitos como anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, antiviral, antiangiogênico, imunomodulador e antimicrobiano (SILVA, 2015). Nesse sentido grande parte da atividade medicinal da aroeira-do-sertão pode ser relacionada com a presença dessa classe química.

Com exceção dos alcaloides, que não foram detectados em nenhum dos extratos analisados (Tabela 2), as diferentes classes de metabólitos secundários encontrados no presente estudo corroboram Silva, Miranda e Conceição (2010) em trabalhos de prospecção fitoquímica com extratos etanólicos obtidos a partir das folhas e cascas de *M. urundeuva* coletadas na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (Caxias/MA), nos quais foram detectadas a presença de esteroides/triterpenos e taninos nas folhas e alcaloides e saponinas (fraco positivo) tanto nas folhas como na casca. Enquanto Colacite (2015), em estudos fitoquímicos de *Schinus terebinthifolia* Raddi., *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. verificou a presença de taninos e alcaloides na composição de todos os extratos das plantas analisadas.

O *screening* fitoquímico dos extratos de *M. urundeuva* evidenciou que, independente do tipo de cultivo, mantêm o mesmo perfil fitoquímico geral (Tabela 2). Esse resultado é de grande relevância, principalmente para interesses farmacêuticos que visam a produção dos metabólitos encontrados em *M. urundeuva*, e estimulam mais estudos visando a produção em larga escala da aroeira-do-sertão através de técnicas da cultura de tecidos vegetais, que representa uma alternativa sustentável para exploração da espécie.

Os diferentes órgãos vegetais diferiram entre si quanto a presença ou ausência de metabólitos para os esteroides, cumarinas e flavonoides. Essa diferença pode ser explicada pela própria característica dos metabólitos secundários, os quais geralmente são produzidos em diferentes regiões das plantas possuindo ainda, ação em região distinta de onde ocorre a produção. No entanto, o fato do extrato oriundo do caule cultivado no tubo e a raiz cultivada em campo terem apresentado resultado negativo para a presença de esteroides/triterpenoides, flavonóides e cumarinas, respectivamente (Tabela 2), pode ter ocorrido por conta do próprio tipo de cultivo ou pela quantidade desse metabólito no extrato não ter sido suficiente para detecção através do método utilizado.

Alguns constituintes químicos presentes nos extratos de plantas medicinais podem responder majoritariamente pela atividade biológica, embora sua forma de ação seja normalmente conjugada a determinada bioatividade (BESSA et al., 2013). Portanto, as características medicinais atribuídas à *M. urundeuva* ocorrem fitoquimicamente por conta das diferentes classes de compostos químicos resultantes do metabolismo secundário vegetal, dentre esses estão os esteroides/triterpenóides e os compostos fenólicos cumarinas, taninos e flavonoides, cujas presenças foram detectadas em grande parte dos extratos analisados. Cada composto identificado possui características que podem justificar as propriedades medicinais dessa planta.

4 CONCLUSÃO

O perfil fitoquímico de *M. urundeuva* não foi alterado nas condições de cultivo avaliadas, existindo diferenças na produção de metabólitos entre os diferentes órgãos da espécie estudada.

O tipo de cultivo influencia no rendimento de extratos da espécie estudada.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188p.
- BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n. 4, p.692-707, 2013.
- BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31) Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.
- COLACITE, J. Triagem Fitoquímica, análise antimicrobiana, e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 3, p. 509-516, 2015.
- CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n. 2, p.400-409, 2012.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

KIRAKOSYAN, A. et al. Stimulation of production of hipericins by manman in *Hipericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, v. 53, p. 345-348, 2000.

LIMA, B. G. **Caatinga**: Espécies lenhosas e herbáceas. Mossoró-RN: EDUfersa, 2011. 316p.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**, v. 15, p. 415, 1980.

MACHADO, A. C. **Caracterização do extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos**. 2013. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas). Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3 Ed. - Fortaleza, Edições UFC, 2009, 150 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas de medicina popular do Nordeste**: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: Edições UFC, 1999. 80p.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf> Data de Acesso: março de 2015.

MONTEIRO, J. M. et al. Valuation of the Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): perspectives on conservation. **Acta Botanica Brasilica** v. 26, n.1, p. 125-132, 2012

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.

MORAIS, J. P. S. et al. **Estudos sobre a propagação *in vitro* da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão)**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado) Pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará.

PEDROSO, R.; SILVA, C. P.; FURLAN, C. M. Comparação dos principais constituintes químicos de duas espécies de arnica: Cravórana (*Porophyllum Ruderale* [Jacq.] Cass) e varão-de-ouro (*Solidago sp.*) **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 22, 2009

QUEIROZ, G. S. **Análise de esteroides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora***. Relatório apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial da disciplina de Estágio Supervisionado II (QMC 5512). 2009. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/99787/Gustavo.pdf>> Acesso em 15 de agosto de 2017.

- QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n. 4, p.485-492, 2002.
- RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, especial, p.587-590, 2011.
- SILVA, A. R. **Herbicida natural derivado de *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão**. 2015. 50f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. Rio Verde – GO.
- SILVA M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.
- SILVA, R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n 1, p. 135-142, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.
- TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 1-13. 2013.
- VIANA, G. S. B. et al. **Aroeira-do-sertão**: estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1995. 164p.

CONCLUSÕES GERAIS

A indução de brotos em *M. urundeuva* é possível a partir do explante nó cotiledonar em meio de cultura com o uso combinado de BAP e ANA. Enquanto a utilização do nitrato de prata reduz a taxa de calos nos explantes.

Recomenda-se e a realização de outros estudos para aumentar a taxa de multiplicação e altura dos brotos, bem como controlar a oxidação nas culturas.

A utilização de 2,4-D é eficiente para a indução de calos em *M. urundeuva*, sendo que a combinação de 2,4-D, CIN e glutamina no meio nutritivo potencializa a calogênese.

A curva de crescimento dos calos de *M. urundeuva* apresenta forma sigmoidal e o conteúdo de sacarose e AST apresentam comportamento distinto de acordo com as diferentes fases de crescimento dos calos. No entanto, o conteúdo de AR, excetuando o dia “zero”, se mantém estável durante o crescimento dos calos.

Sugere-se a realização de estudos para investigação da presença de embriões somáticos em *M. urundeuva*, entre estes, estudos anatômicos.

O perfil fitoquímico de *M. urundeuva* não foi alterado nas condições de cultivo avaliadas, existindo diferenças na produção de metabólitos entre os diferentes órgãos da mesma. O tipo de cultivo influencia no rendimento dos extratos da espécie estudada.

Sugere-se o estudo utilizando técnicas específicas, tais como espectroscópicas e espectrométricas para quantificação e isolamento de metabólitos secundários da espécie cultivadas sob diferentes condições.