

Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos  
Analya Roberta Fernandes Oliveira  
Francisca Gislene Albano-Machado  
(Organizadores)



# Floricultura, Plantas Ornamentais e Cultura de Tecidos de Plantas

**Atena**  
Editora  
Ano 2020

Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos  
Analya Roberta Fernandes Oliveira  
Francisca Gislene Albano-Machado  
(Organizadores)



# Floricultura, Plantas Ornamentais e Cultura de Tecidos de Plantas

**Atena**  
Editora  
Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação:** Geraldo Alves

**Edição de Arte:** Lorena Prestes

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>a</sup> Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof<sup>a</sup> Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

F635 Floricultura, plantas ornamentais e cultura de tecidos de plantas [recurso eletrônico] / Organizadoras Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos, Analya Roberta Fernandes Oliveira, Francisca Gislene Albano-Machado. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020.

Formato: PDF  
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.  
Modo de acesso: World Wide Web.  
Inclui bibliografia  
ISBN 978-85-7247-972-1  
DOI 10.22533/at.ed.721203001

1. Floricultura. 2. Plantas ornamentais – Cultivo. I. Silva-Matos, Raissa Rachel Salustriano da. II. Oliveira, Analya Roberta Fernandes. III. Albano-Machado, Francisca Gislene.

CDD 635.915

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

O setor de floricultura no Brasil vem crescendo com o passar dos anos, estando o país entre os 15 maiores produtores de flores mundiais. Este crescimento de produção está associado ao aumento da qualidade e durabilidade das flores produzidas, atribuindo uma maior satisfação aos consumidores. Sendo assim um mercado promissor para o agronegócio.

Entretanto, esse ramo da agricultura apresenta diversos desafios, dentre eles mão-de-obra capacitada, tecnologias aplicadas, clima e mercado. Diante dessas problemáticas, é necessário cada vez mais pesquisas voltadas para o crescimento da produção e comercialização de flores e plantas ornamentais dentro do território brasileiro, priorizando a qualidade do produto final.

A obra “Floricultura, Plantas Ornamentais e Cultura de Tecidos de Plantas” apresenta trabalhos que visam agregar conhecimentos através de informações técnicas sobre propagação, cultivos e comercialização de flores e ornamentais. Ressaltando a importância da pesquisa voltada para a propagação das culturas, práticas de manejos e tecnologias adequadas.

Os conteúdos presentes nos 13 capítulos da obra têm por objetivo proporcionar ao leitor um vasto aprendizado sobre uma temática pertinente para o agronegócio brasileiro, visando um conhecimento sobre pesquisas que contribuem com melhorias para o desenvolvimento e crescimento deste setor. Desejamos uma ótima leitura.

Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos  
Analya Roberta Fernandes Oliveira  
Francisca Gislene Albano-Machado

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
PRODUÇÃO DE CÁPSULAS DE ORQUÍDEA DE <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) BLUME	
Gabriella da Silva Mendonça Dickel Elisangela Bini Dorigon	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030011</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>12</b>
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> , FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS E PRODUÇÃO DE CALOS DE <i>Crinum americanum</i> L. (AMARYLLIDACEAE). UMA ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	
Rosana Silva Corpes Alberdan Silva Santos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030012</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>24</b>
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DESINFESTAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i>	
André Luís de França Dias James Correia de Melo Bianca Galúcio Pereira de Araújo Diógenes Virgínio do Nascimento Pauliana Gomes de Lima Yrlânia de Lira Guerra	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030013</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>31</b>
AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SUBSTRATOS NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Aechmea blanchetiana</i> (BACKER) L. B. SM	
Felipe Douglas Ferreira Sheila Maria Pereira de Andrade William Carlos Gonzaga Franco Marília Maia de Souza	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030014</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>44</b>
ASPECTOS BOTÂNICOS, MORFOLÓGICOS, GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	
Alessandra Carla Guimarães Sobrinho Alberdan Silva Santos Rosana Silva Corpes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030015</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>56</b>
BIOATIVIDADE DO D-LIMONENO NO CONTROLE DE <i>Botrytis cinerea</i> PERS.: FR. ISOLADO DE ROSEIRA	
Christian Aparecido Demetrio Jéssica Fernanda de Oliveira Jacob Patricia Fabretti Kreycki Paulo Hercílio Viegas Rodrigues	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030016</b>	

<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>62</b>
BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO E ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA EM <i>Dietes bicolor</i> (IRIDACEAE), UMA IMPORTANTE ESPÉCIE ORNAMENTAL	
Aryane Campos Reis Isabel Teresa Silva Souza Saulo Marçal de Sousa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030017</b>	
<b>CAPÍTULO 8 .....</b>	<b>71</b>
INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS NODAIS DE <i>Leucaena leucocephala</i> (FABACEAE) E AVALIAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS	
Danielle Carvalho Pinto Mairon César Coimbra Ana Hortência Fonsêca Castro	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030018</b>	
<b>CAPÍTULO 9 .....</b>	<b>83</b>
ACESSIBILIDADE – RISCOS E ACIDENTES ESTUDO DE CASO – PARQUE 13 DE MAIO (RECIFE-PE)	
Anne Katherine de Araújo Barros Jaqueline Coelho Renata Britto João Victor Martins Bamberg Vitória Jéssica Galvão	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7212030019</b>	
<b>CAPÍTULO 10 .....</b>	<b>93</b>
REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Pyrostegia venusta</i> A PARTIR DE CULTURAS DE MERISTEMA APICAL	
Caroline Rocha Neves Crema Mairon César Coimbra Ana Hortência Fonsêca Castro	
<b>DOI 10.22533/at.ed.72120300110</b>	
<b>CAPÍTULO 11 .....</b>	<b>105</b>
SEMENTES DE CÁRTAMO TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO	
Janine Farias Menegaes Ubirajara Russi Nunes Geovana Barbieri Facco Tiéle Stuker Fernandes Felipe de Lima Franzen Rogério Antônio Bellé Fernanda Alice Antonello Londero Backes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.72120300111</b>	
<b>CAPÍTULO 12 .....</b>	<b>117</b>
ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Swietenia macrophylla</i> KING EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	
Wirton Pires Pereira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.72120300112</b>	

<b>CAPÍTULO 13 .....</b>	<b>129</b>
<b>MORFOANATOMIA DOS ORGÃOS VEGETATIVOS DE ESPÉCIES DE PORTA- ENXERTO DE <i>Rosa</i> SP. CULTIVADAS NO MUNICÍPIO DE BARBACENA, MG</b>	
Patricia Azevedo Rodrigues Guedes	
André Pociano de Almeida	
Marília Maia de Souza	
Glauco Santos França	
<b>DOI 10.22533/at.ed.72120300113</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORAS .....</b>	<b>142</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO .....</b>	<b>143</b>

## PRODUÇÃO DE CÁPSULAS DE ORQUÍDEA DE *Phalaenopsis amabilis* (L.) BLUME

Data de aceite: 20/01/2020

### Gabriella da Silva Mendonça Dickel

Graduada em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil, mendonca.gabriella@hotmail.com;

### Elisangela Bini Dorigon

Mestre em Ciências da Saúde Humana, Especialista em Botânica Geral e Fitossanidade, Bióloga, Docente na Unoesc-Xanxerê, Santa Catarina-Brasil, ellibini@yahoo.com.br

**RESUMO:** As orquídeas são comercialmente cultivadas para venda em vaso e flores para arranjos ornamentais. Atualmente são largamente cultivadas no Brasil. Seu comércio movimentava grandes somas de dinheiro todos os anos em um mercado crescente. As *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, (flores albas) são consideradas acessíveis e as mais requisitadas em todo o mundo. O trabalho verificou o crescimento e desenvolvimento da cápsula de *Phalaenopsis amabilis* em clima temperado. O experimento foi conduzido em orquidário localizado em Abelardo Luz, Oeste Catarinense. Utilizou-se 40 plantas onde foram divididas em 10 plantas por estação do ano, com 5 flores cada planta, cada estação foi subdividida em dois grupos (Grupo 1 realiza-se a polinização da flor logo após sua abertura e Grupo 2 realiza-

se a polinização das flores somente após a abertura de todas as flores da haste floral). As cápsulas foram medidas através de paquímetro digital, realizou-se o aferimento do comprimento, diâmetro externo proximal, medial e distal, uma semana após a polinização e depois a cada 15 dias durante 7 meses. Foi registrado dados de temperaturas e umidade diariamente. Após a coleta foi aferido à massa fresca e seca das capsulas. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), teste T, correlação de Pearson, avaliados com a ferramenta ASSISTAT 7.7 Portanto, é possível produzir cápsulas de *Phalaenopsis amabilis* em clima temperado, especificamente na região do Oeste Catarinense durante a estação da primavera que apresentou-se 68% de produção de cápsulas, onde as condições climáticas são mais adequadas para o crescimento e desenvolvimento da mesma, a posição floral não demonstrou diferenças estatísticas, porém considerando a idade da floral as melhores flores são as mais jovens com 3 à 6 dias de idade após a abertura das pétalas.

**PALAVRA-CHAVE:** Orquídeas. Reprodução. Comércio. Orchidaceae. Ornamental.

### PRODUCTION OF ORCHID CAPSULES

#### *Phalaenopsis amabilis* (L.) BLUME

**ABSTRACT:** Orchids are grown commercially

for sale and potted flowers for ornamental arrangements. Currently they are widely grown in Brazil. Your trade moves large sums of money each year in a growing market. The *Phalaenopsis amabilis* (L) Blume (flowers alba) are considered the most accessible and required worldwide. The study investigated the growth and development of *Phalaenopsis amabilis* capsule in temperate zones. The experiment was conducted in nursery located in Abelardo Luz, Western Santa Catarina State. We used 40 plants which were divided into 10 plants per season with 5 flowers each plant, each station has been subdivided into two groups (Group 1 takes place pollination of the flower after its opening and Group 2 is carried out pollinating flowers only after the opening of all the flowers of the flower stem). The capsules were measured by digital caliper held benchmarking length, proximal, medial and distal outer diameter, one week after pollination and then every 15 days for 7 months. It was recorded data of temperatures and humidity daily. After the collection was checked for fresh and dry weight of the capsules. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), t test, Pearson correlation, evaluated with 7.7 ASSISTAT tool Therefore, it is possible to produce *Phalaenopsis capsules amabilis* in temperate climate, specifically in the Santa Catarina West region during the spring season that presented itself 68% of the production of capsules, where the climatic conditions are more suitable for the growth and development of the same, floral position did not show statistical differences, but considering the floral age the best flowers are younger with 3 to 6 days old.

**KEYWORDS:** Orchids. Reproduction. Trade. Orchidaceae. Ornamental.

## 1 | INTRODUÇÃO

As orquídeas do gênero *Phalaenopsis* pertencem a ordem Asparagales, família Orquidácea com cerca de 60 espécies incluindo nesse quadro a *Phalaenopsis amabilis* (L.) BLUME (SANTOS, 2013).

Espécies de orquídeas são comercialmente, atualmente o cultivo de orquídeas pode ser considerado uma fonte alternativa de renda, pois os preços variam de acordo com a espécie. A *Phalaenopsis amabilis* (flores albas) são consideradas acessíveis e mais requisitadas em todo o mundo. O retorno financeiro para os produtores de flores é significativo, apesar dos altos custos de produção. (FARIA et al., 2012).

As flores albas de espécies são de grande importância para a hibridação, pois possuem alelo recessivo. É possível reproduzir orquídeas a partir de polinizações controladas, gerando híbridos, esses cruzamentos entre espécies ou gêneros tem-se importância para melhorar a qualidade da planta e a sua diversidade, melhorando a variabilidade genética e, mesclando as cores e aromas (FARIA et al., 2012).

Há dificuldades na produção de cápsulas, pois a *Phalaenopsis amabilis* leva em torno de 6 a 8 meses para amadurecimento, nesse período, passa por mudanças climáticas, pode-se afetar o desenvolvimento ou até mesmo a perda da cápsula. (FARIA et al., 2012).

O clima no estado de Santa Catarina é de temperaturas mínimas em torno dos 20C e máxima de 30C maiores valores ocorrem quando há aproximação de frente fria, principalmente no litoral. No Oeste são observadas temperaturas bem elevadas no verão e amenas no inverno, com incidência de chuva no Oeste no período do inverno (GEOSUL, 2001).

No estado de Santa Catarina a produção, antes concentrada no norte do Estado, esta se difundindo lenta e continuamente, tendo por base as condições favoráveis de clima do Estado permitindo que 93% da área catarinense possa ser utilizada para o cultivo de plantas de jardim, controlando algumas tecnologias como o uso de estufas ou cultivo protegido que oneram o produto final (EPAGRI, 2014).

Contudo deseja-se produzir cápsula de *Phalaenopsis amabilis* em clima temperado.

## 2 | PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS E TECNICOS

O experimento foi conduzido em orquidário localizado em Abelardo Luz-SC, oeste catarinense. O Oeste catarinense é uma das mesorregiões do estado brasileiro de Santa Catarina, localizado no Sul do país. Possui uma área de 9.136,383 km<sup>2</sup>. Localizado na região Oeste, a 574 km de Florianópolis, a uma latitude 26°33'53" Sul e a uma longitude 52°19'42" Oeste estando a uma altitude de 760 metros, e pertence a Microrregião do Alto Irani (IBGE, 2010).

As matrizes utilizadas são da espécie *Phalaenopsis amabilis*, são plantas classificadas adultas, tendo 5 anos, onde cada planta apresenta apenas uma haste e cinco botões florais, As plantas que apresentavam mais que cinco botões, foram removidos para garantir a homogeneidade dos tratamentos.

As plantas ao chegar no viveiro, foram transferidas para cachepot de madeira Ipê e substrato de casca de pinus, musgo e pequena quantidade de carvão. As mesmas foram identificadas e permanecerão em um período de 30 a 40 dias para adaptação antes da primeira polinização realizada na estação do Outono.

As orquídeas foram divididas em dois grupos: considerando a idade floral e considerando a maturação da haste. No primeiro caso a polinização ocorre assim que as flores abrem, ou seja, todas com a mesma idade (juvenis), considerando nesse caso apenas a abertura como critério. No segundo grupo a polinização ocorre somente depois que todas as flores da mesma haste abrem. Nesse caso as flores apresentam idades diferentes que variam de 3 dias.

As plantas foram separadas em 8 tratamentos: T1 (Flores polinizadas no outono, logo após a abertura da flor), T2 (Flores polinizadas no outono, após abertura de todas as flores da haste), T3 (Flores polinizadas no inverno, logo após a abertura da flor), T4 (Flores polinizadas no inverno, após abertura de todas as flores da haste), T5 (Flores polinizadas na primavera, logo após a abertura da flor), T6 (Flores

polinizadas na primavera, após abertura de todas as flores da haste), T7 (Flores polinizadas no verão, logo após a abertura da flor) e T8 (Flores polinizadas no verão, após abertura de todas as flores da haste).

Realizou-se a polinização e após aferiu o desenvolvimento e crescimento das cápsulas com o auxílio de um paquímetro digital uma semana após a polinização e depois a cada 15 dias durante sete meses, aferiu o comprimento, largura próxima, medial e distal da capsula.

Após o desenvolvimento e crescimento das cápsulas durante os sete meses, as mesmas foram colhidas e aferiu-se o comprimento, largura proximal, medial e distal, diâmetro interno e o peso da capsula considerando como massa verde, após colocou-se para desidratar em estufa em 60C por 48hs. Após foi verificou-se o peso em massa seca.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. O experimento foi conduzido com 10 plantas por estação, cada planta com 5 flores, totalizando ao longo de uma estação 50 repetições, sendo polinizadas 5 plantas ou seja 25 com flores com mesma idade e 5 plantas ou seja 25 com flores de idades diferentes totalizando 200 flores ao longo da pesquisa (10X5X4).

Os resultados obtidos foram trabalhados em planilha de Excel com o uso de tabelas e gráficos, onde os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o dados com alterações significativas foram submetidos ao teste T. Para aferir a relação dos dados com fatores ambientais foi aplicada a correlação de Pearson. Os resultados obtidos foram avaliados com ferramenta ASSISTAT 7.7.

## **3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.1 Polinizações**

Realizou-se 200 polinizações em períodos sazonais, no qual obteve-se 100% de fecundação. Durante o desenvolvimento das cápsulas 38% das polinizações desenvolveram-se, ou seja, não abortaram.

A cápsula (fruto das orquídeas) armazena as sementes. Quando maduro, abre-se ao longo da estrutura das folhas carpelares, liberando milhares de minúsculas sementes, onde alguns autores mencionam a presença de um milhão de semente por cápsula (SHIRAKI et. al, 2012).

Portanto, a produção de 76 cápsula obtidas do experimento é suficiente para a pratica de micropropagação, onde apenas uma cápsula com bom crescimento e desenvolvimento poderá dar origem a milhares de plantas saudáveis, assim evitando desperdício tanto dos recursos investidos, tanto do gasto de energia que a planta investe.

### 3.2 Temperatura e Umidade

A necessidade climática das orquídeas para um cultivo comercial segue um padrão de temperatura diurna oscilando de 25C a 35C, sendo muito prejudicial aquelas abaixo de 15C, as temperaturas extremas diminuem a capacidade do crescimento e desenvolvimento da planta (SHIRAKI, 2012).

Durante a pesquisa obteve-se uma média de temperatura máxima de 25 C e mínima de 11 C, onde o outono teve seus picos da média de temperatura máxima e mínima de 22C e 7C , o inverno 20C e 5C , primavera 29C e 8C e verão 33C e 16C. A umidade relativa do ar apresentou-se média ao longo do ano de máxima de 88% e mínima de 44% e durante as estações obteve-se registros da média da máxima e mínima de 90% e 48% no outono, 88% e 46% no inverno, 91% e 39% na primavera e no verão 89% e 35%. Conforme tabela 1.

	Número de cápsulas	Temperatura máxima C	Temperatura mínima C	Umidade máxima %	Umidade mínima %
<b>Outono</b>	19	22,1	9,8	90	48
<b>Inverno</b>	14	18,7	4,8	85	50
<b>Primavera</b>	34	26,9	12,6	90	43
<b>Verão</b>	9	32,4	19,3	88	35

Tabela 1 – Média dos fatores ambientais aferido.

Fonte: Dickel (2015)

As respostas às variações de temperatura seriam parcialmente reguladas por hormônios endógenos. Em orquídeas, um aumento nos teores endógenos de citocininas (divisão celular) e açúcares foram associados à diminuição da temperatura (VAZ et. al., 2004).

A *Phalaenopsis* desenvolve-se preferencialmente em clima quente, alta umidade do ar e meia-sombra sem luz solar direta. Quanto mais elevada a umidade do ambiente, melhor será seu desenvolvimento, no entanto a orquídea não deve-se permanecer molhada para não apodrecer ( PUTINATTI, 2014).

Um dos fatores essenciais ao crescimento das orquídeas é a umidade relativa do ar, que por meio de estruturas especializadas das orquídeas do gênero *Dendrobium* conseguem absorver tal umidade (MACEDO, 2013).

Para a relevância da pesquisa foi correlacionada o número de cápsulas com fatores ambientais, considerando o coeficiente igual ou maior que 0,350, (Tabela 2) para o nível de significância de 5 % (POSSOLI, 1984 e MAIA, 1997).

	Número de cápsulas
Média da umidade máxima relativa do ar-UR %	0,587721*
Média da umidade mínima relativa do ar- UR %	0,207791

Tabela 2. Número de cápsulas correlacionadas com fatores ambientais.

Fonte: Dickel (2015)

\* Correlação significativa

Verificou-se que apenas a umidade máxima interferiu no experimento, quanto maior a umidade relativa maior o número de cápsulas.

Um dos fatores essenciais ao crescimento das orquídeas é a umidade relativa do ar, que por meio de estruturas especializadas das orquídeas conseguem absorver tal umidade (MOTTA, 2013).

As orquídeas apresentam um tecido especializado em reter a umidade relativa do ar. O velame das orquídeas, estrutura das raízes, funciona como uma esponja (a entrada de água é puramente passiva), permitindo que a raiz mobilize uma reserva temporária, mas altamente acessível, de água e sais minerais por capilaridade, onde o velame apresenta células vivas, ocorre absorção de água e nutrientes. Além do velame, a hipoderme (por outros autores denominada exoderme) pode diminuir a transpiração da raiz (PITA et. al., 2012).

A média de 19 cápsulas ao longo do ano foi satisfatória, porém a primavera destacou-se por apresentar produção de 34 cápsulas, onde apresentou alta umidade relativa do ar favorecendo a produção, já o verão com 9 cápsulas teve-se a umidade mais baixa das estações.

### 3.3 Crescimento e desenvolvimento

A floração de algumas orquídeas é afetada pela duração da luz do dia ou foto período. O florescimento da *Phalaenopsis* é ocasionado pelo estresse da oscilação da estação do ano (CARDOSO, 2007). O fornecimento de luz suficiente durante o cultivo das orquídeas é de importância para o crescimento da folhagem e das raízes, a luminosidade deve ser indireta ou difusa intensa ( TAKANE, 2010).

A biomassa da planta é resposta da fotossíntese, onde clima com temperaturas mais altas apresentam maior taxa de respiração favorecendo o crescimento e desenvolvimento da planta, porem as temperaturas extremamente altas podem ocorrer fenômenos de desnaturação de proteínas, já com temperaturas extremamente baixas as reações bioquímicas ficam mais lentas e dispõem de pouca energia (SEVERIANO, 2007).

Os resultados mostraram que a melhor estação para a realização da polinização

para a produção de cápsula de *Phalaenopsis amabilis*, é a primavera, considerando melhores resultados em todos os parâmetros aferidos (comprimento, diâmetro externo proximal, medial, distal, massa fresca e seca). Conforme tabela 2.

Tratamento	Nº . de cápsulas	Comprimento	Diâmetro proximal	Diâmetro medial	Diâmetro distal	Massa fresca	Massa Seca
Outono	1.90 ab	46.12 ab	4.84ab	7.16ab	6.54 a	2.01 b	0.15 b
Inverno	1.40 b	38.84ab	3.84 ab	8.10 ab	8.00 a	0.34 c	0.07 b
<b>*Primavera</b>	<b>3.40 a</b>	<b>83.34 a</b>	<b>6.94 a</b>	<b>9.44 a</b>	<b>9.46 a</b>	<b>5.14 a</b>	<b>0.34 a</b>
Verão	0.90 b	14.66 b	1.06 b	2.02 b	2.20 a	1.29 bc	0.10 b

Tabela 2. Comparação das médias por estação de todos os parâmetros aferidos.

Fonte: Dickel (2015)

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Os tratamentos da primavera T5 (maturação da flor) e T6 (maturação da haste), apresentaram melhores resultados para o crescimento e desenvolvimento da cápsula, (aumento do volume da massa vegetal) considerando o comprimento, massa seca e fresca, significando que as cápsulas produzidas possuem maiores quantidades de sementes e possivelmente melhor vigor das mesmas. Conforme tabela 3.

Tratamento	Comprimento	Massa fresca	Massa seca
T1 Outono (maturação da flor)	47.61 ab	3.26 b	0.25 abc
T2 Outono (maturação da haste)	15.65 c	0.75 c	0.05 d
T3 Inverno (maturação da flor)	8.06 c	0.23 c	0.06 d
T4 Inverno (maturação da haste)	11.88 c	0.45 c	0.09 cd
<b>T5 Primavera (maturação da flor)</b>	<b>67.22 a</b>	<b>5.72 a</b>	<b>0.41 a</b>
<b>T6 Primavera (maturação da haste)</b>	<b>52.78 a</b>	<b>4.55 ab</b>	<b>0.28 ab</b>
T7 Verão (maturação da flor)	23.37 bc	2.38 bc	0.18 bcd
T8 Verão (maturação da haste)	2.93 c	0.21 c	0.01 d

Tabela 3. Comparativo dos tratamentos considerando: comprimento e massa da capsula.

Fonte: Dickel (2015).

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

### 3.4 Posição floral x idade floral

O fato de a percepção fotoperiódica ocorrer nas folhas enquanto a floração se dá no meristema caulinar sugere a necessidade de transmissão de um sinal floral químico entre esses dois órgãos distantes na planta, possivelmente através do floema, onde as primeiras flores (mais velhas) receberam o retorno de nutrientes

primeiro que as demais (FLOSS, 2004).

Verificou-se que não houve diferença estatística em relação a posição das flores. Conforme tabela 4.

Tratamento	Comprimento	Diâmetro externo medial	Massa fresca	Massa seca
1ª Flor	46.48 a	3.85 a	3.56 a	0.27 a
2ª Flor	66.42 a	6.32 a	3.49 a	0.43 a
3ª Flor	58.22 a	4.70 a	2.53 a	0.30 a
4ª Flor	51.75a	4.82a	2.16 a	0.33 a
5ª Flor	45.85 a	4.57 <sup>a</sup>	2.73 a	0.25 a

Tabela 4. Comparativo de médias considerando a posição da flor nas quatro estações do ano.

Fonte: Dickel (2015)

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Verificou-se que não houve diferenças estatísticas entre a idade floral. Conforme tabela 5.

Tratamento	Comprimento	Diâmetro externo medial	Massa fresca	Massa seca
1ª Flor aberta	24.20 a	2.00 a	3.56a	0.10 a
2ª Flor aberta	28.15 a	4.05 a	3.49 a	0.15 a
3ª Flor aberta	48.70 a	7.40 a	2.53 a	0.17 a
4ª Flor aberta	41.70 a	5.57 a	2.16 a	0.17 a
5ª Flor aberta	48.00 a	6.90 a	2.73 a	0.30 a

Tabela 5. Comparativo de médias considerando a idade da flor nas quatro estações do ano.

Fonte: Dickel (2015)

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Ao observar a posição e maturação das flores durante as estações não identificou-se diferenças significativas, porém a pesquisa demonstrou que na primavera obteve-se melhores resultados.

### 3.5 Idades / posição x primavera

Ao analisar os tratamentos quanto a posição e maturidade das flores da melhor estação (primavera), verificou-se que não ocorreu diferenças nos parâmetro aferido. Conforme tabela 6.

Primavera	Nº de cápsulas	Comp.	Diâmetro proximal	Diâmetro medial	Diâmetro distal	Massa fresca	Massa Seca
<b>T5 – Posição</b>	3.60 a	74.44a	5.56 a	8.08 a	7.94 a	6.38 a	0.42 a
<b>T6 -Maturidade</b>	3.20 a	83.34 a	6.94 a	9.44 a	9.46 a	6.60 a	0.40 a

Tabela 6. Comparação das médias de todos os parâmetros na primavera.

Fonte: Dickel (2015)

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Foi aferido qual a melhor posição floral e idade floral dentro da estação (primavera) para crescimento e desenvolvimento. Identificou-se que a melhor posição floral para polinizá-la, a fim de garantir o desenvolvimento e crescimento da cápsula é a primeira flor. Conforme tabela 7.

Tratamento	Comprimento	Diâmetro externo medial	Massa fresca	Massa seca
1ª Flor	105.88 a	9.84 a	7.42 a	0.53 a
2ª Flor	0.000 c	0.00 b	0.00 b	0.00 b
3ª Flor	85.94 ab	10.32 a	7.19 a	0.54 a
4ª Flor	91.08 ab	9.98 a	8.72 a	0.64 a
5ª Flor	53.24 b	6.26 a	5.290 a	0.33 ab

Tabela 7. Comparativo de médias considerando a posição da flor na primavera.

Fonte: Dickel (2015)

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Para a melhor idade floral na primavera, obteve-se melhores resultados para a primeira flor aberta, ou seja, as flores com média de 15 dias após a abertura das pétalas. Conforme tabela 8.

Tratamento	Comprimento	Diâmetro externo medial	Massa fresca	Massa seca
<b>1ª Flor aberta</b>	<b>92.56 a</b>	<b>8.48 a</b>	<b>7.96 a</b>	<b>0.41 a</b>
2ª Flor aberta	53.86 ab	7.78 a	4.50ab	0.38 a
3ª Flor aberta	18.34 b	1.88 a	0.80 b	0.07 a
4ª Flor aberta	66.10 ab	7.58 a	6.52ab	0.41a
5ª Flor aberta	33.06 ab	4.120 a	2.97 ab	0.15 a

Tabela 8. Comparativo de médias considerando a idade da flor na primavera.

Fonte: Dickel (2015)

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Segundo Dickel (2015), durante a estação do outono, a posição da flor na haste floral não ocasionou melhor crescimento e desenvolvimento das cápsulas de *Phalaenopsis amabilis*, Já a maturidade floral teve influência nas alterações da formação da cápsula, pois identificou-se que as flores jovens polinizadas logo após a abertura apresentarão cápsulas com maiores médias para comprimento, diâmetro interno e externo e massa seca, principalmente a terceira flor (9 dias), sendo aproximadamente quatro vezes superior nas flores polinizadas logo após a abertura e aproximadamente três vezes superior para diâmetro externo.

A função do rostelo nas *Phalaenopsis* é a produção de uma substância adesiva envolvida com a aderência das massas polínicas, no estigma, nos processos de alogamia e autogamia, além de atuar como um sensor e transmitir os efeitos da retirada das massas polínicas pelo agente polinizador ou ainda os efeitos de uma eventual polinização, através do desencadeamento de atividades fisiológicas (DE MORAES, 2002).

Na maturação das células do pólen, o citoplasma se encontra denso e contém um grande núcleo vegetativo. Dentro deste núcleo pode-se encontrar um denso e homogêneo nucléolo. Vacúolos são pequenos, mitocôndrias numerosas e plastídeos são abundantes (DE MORAES, 2002).

Analisou-se que as primeiras flores a abrirem, as mais velhas com 15 dias, apresentaram melhores resultados na primavera para a posição e maturação floral, devido serem flores com suas políneas mais saudáveis e estarem no alge da maturação do pólen.

## 4 | CONCLUSÃO

Conclui-se que é possível produzir cápsulas de *Phalaenopsis amabilis* em clima temperado, especificamente na região do Oeste Catarinense durante a estação da primavera, onde as condições climáticas são mais adequadas para o crescimento e desenvolvimento da mesma, a posição floral não demonstrou diferenças estatísticas, porém considerando a idade da floral as melhores flores são as mais jovens com 3 à 6 dias de idade após a abertura das pétalas.

## REFERÊNCIAS

CARDOSO, Jean Carlos. **Ácido giberélico(GA3) na indução do florescimento de orquídeas.** 2007. 50 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/88122>>.

DICKEL, Gabriella da Silva Mendonça. DORIGON, Elisangela Bini;. **Produção de cápsulas de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume com diferente grau de maturidade floral no outono no oeste catarinense.** Seminário de Iniciação Científica, Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e Mostra científica, 2015.

FARIA, R. T., ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de Orquídeas em Laboratório**. Londrina: Mecenaz, 2012.

FLOSS EI. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê** – UPF – 2014.

MACEDO, ALBERTO MOTTA. **EFEITO DA LUMINOSIDADE EM DENDROBIUM**. UNINGÁ Review, v. 14, n. 1, 2013.

PITA, Patrícia B.; MENEZES, NANUZA L. **Root anatomy in species of *Dyckia* Schult. f. and *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) from Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil), with special emphasis to velamen**. Brazilian Journal of Botany, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2002.

POSSOLI, S. **Técnicas de análise multivariada para avaliação das condições de saúde dos municípios do Rio Grande do Sul, Brasil**. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 18, p. 288-300, 1984.

PUTINATTI, Raquel. **Celebridade Mundial – *Phalaenopsis*. Cultivo de orquídeas** ed. Casadois vol. 2, 2014.

SANTOS, Jose M. M. **A Paixão Pelas Orquídeas – Manual do Orquidófilo**, 1. ed. Lisboa: Dinalivro, 2013.

SEVERIANO, Carlos Alberto de Mello. **Controle climático no ciclo produtivo em floricultura**. Bahia, 2007.

SHIRAKI, JUSCELINO NOBUO. DIA, ELAINE MARTINEZ. **Divisão técnica escola de jardinagem**. São Paulo 2012.

VAZ Apa, HP Santos, LBP Zaidan, GB KERBAUY - **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: 2004.

## GERMINAÇÃO *IN VITRO*, FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS E PRODUÇÃO DE CALOS DE *Crinum americanum* L. (AMARYLLIDACEAE). UMA ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 04/11/2019

### Rosana Silva Corpes

Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará

Link para currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3492916607882520>

### Alberdan Silva Santos

Doutor em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Professor associado das faculdades de Química e Biotecnologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará.

Link para currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5976702134131016>

**RESUMO:** *Crinum americanum* L. é uma planta monocotiledônea pertencente à família Amaryllidaceae de importância econômica por conter alcalóides que apresentam ação anticolinesterásica em sua composição química. Técnicas biotecnológicas têm se constituído como ferramentas para a produção de biomassa de diversas plantas visando o acúmulo de metabólitos secundários. Este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* desta espécie, visando à produção e aumento de biomassa de calos para obtenção de suspensões celulares, com aplicação na área

de embriogênese somática e/ou produção de metabólitos secundários desta espécie. Para o estabelecimento do protocolo de cultivo, foram utilizadas sementes de *C. americanum*, as quais após germinadas, tornaram-se fontes doadoras de explante. A indução de calos e morfogênese foi conduzida em meio Murashige e Skoog (MS), suplementado com sacarose 3% (m/v), solidificado com phytigel 0,2 % (m/v), contendo diferentes combinações de reguladores de crescimento. Os explantes utilizados foram os embriões das sementes, bulbos e raízes de *C. americanum*, nos quais em cultivo *in vitro* foi observado que a presença dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP em diferentes concentrações possibilitaram o surgimento de calos nos explantes, com destaque para os tratamentos de 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg/L<sup>-1</sup> de BAP e 3,0 mg/L<sup>-1</sup> de 2,4 D e 0,1 mg/L<sup>-1</sup> de BAP que apresentaram-se mais eficientes em relação ao número de indução de calos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amaryllidaceae, alcalóides, biotecnologia vegetal, cultivo *in vitro*.

**ABSTRACT:** *Crinum americanum* L. is a monocotyledonous plant belonging to the amaryllidaceae family of economic importance because it contains alkaloids that show anticholinesteric action in its chemical composition. Biotechnological techniques have been constituted as tools for biomass production

of several plants aiming the accumulation of secondary metabolites. The objective this study was establish an in vitro culture protocol of this species, aiming at the production and increase of biomass of friable callus to obtain cell suspensions, with application in the area of somatic embryogenesis and / or production of secondary metabolites of this species. For the establishment of the cultivation protocol, *C.americanum* seeds were used, which after germination became explant donor sources. Callus induction and morphogenesis were conducted in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3% (w/v) sucrose, solidified with 0.2% (w/v) phytigel, containing different combinations of growth regulators. The explants used were the embryos of seeds, bulbs and roots of *C. americanum*, in which in vitro cultivation it was observed that the presence of growth regulators 2,4-D and BAP in different concentrations made possible the callus appearance in the explants. highlighting the treatments of 1.0 mg / L<sup>-1</sup> of 2.4-D and 0.2 mg / L<sup>-1</sup> of BAP and 3.0 mg / L<sup>-1</sup> of 2.4 D and 0.1 mg. / L<sup>-1</sup> of BAP which were more efficient in relation to the number of callus induction.

**KEYWORDS:** Amaryllidaceae, alkaloids, plant biotechnology, in vitro cultivation.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais de Amaryllidaceae

As plantas da família amaryllidaceae se destacam por conter espécies que apresentam um grande potencial ornamental. Segundo LORENZI, (2008) a maioria das espécies deste grupo apresentam flores grandes, vistosas e coloridas. O gênero mais comercializado atualmente no Brasil é o *Amaryllis*, porém espécies pertencentes a outros gêneros como *Hippeastrum*, *Crinum* e *Hymenocallis* são frequentemente encontrados em regiões tropicais e subtropicais (ALEXANDRE, 2011). As plantas bulbosas ornamentais são cultivadas e comercializadas tanto para consumo de corte, quanto para vasos, paisagismo e jardinagem (TOMBOLATO et. al., 2010). Para AMARAL, (2007) o setor produtor de flores e plantas ornamentais no Brasil é quase exclusivamente baseado em espécies de plantas introduzidas, embora a florística brasileira seja bastante notória. Neste aspecto, fazer a investigação de espécies de ocorrência na Amazônia e no Brasil, também pode ser interessante para o mercado de plantas ornamentais. Na figura 1 é possível observar espécies de amaryllidaceae com potencial ornamental.

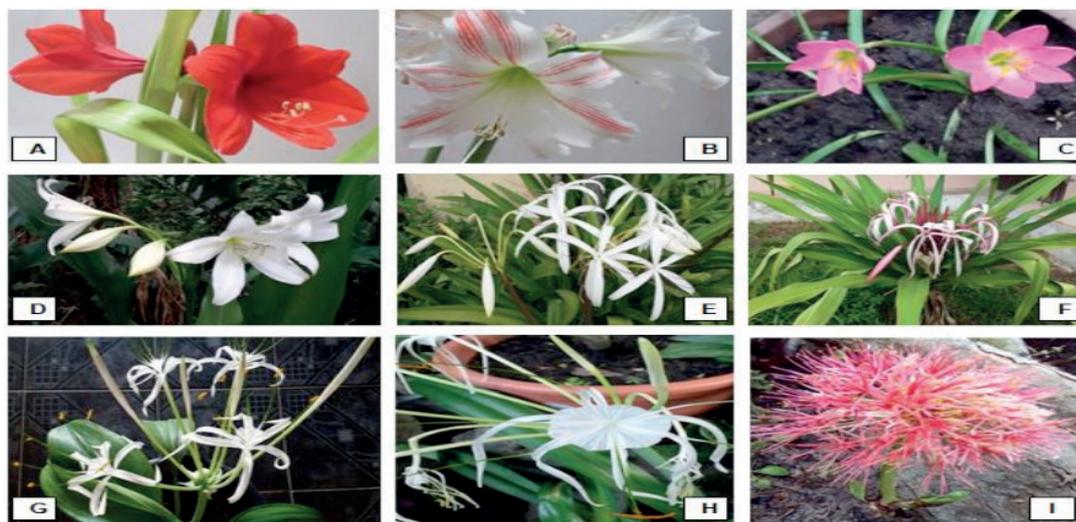


Figura 1: espécies de Amaryllidaceae com potencial ornamental

*Hippeastrum Hybridum Red Lion (Amaryllis)* (A); *Hippeastrum hybridum* (B); *Zephyranthes grandiflora* (C); *Crinum jagus* (D) *Crinum americanum* L. (E) ; *Crinum procerum* var. *splendens* (F) ; *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (G); *Hymenocallis caribaea* (I). Herb.; (H) *Scadoxus multiflorus* ssp. *multiflorus* (Martyn) Raf (I)

Fonte: CORPES (2019)

## 1.2 Considerações gerais sobre *Crinum americanum* L. e o cultivo in vitro desta espécie

*Crinum americanum* L. é uma planta pertencente à família Amaryllidaceae, e nativa do sul dos Estados Unidos, porém amplamente distribuída em regiões alagadas, pântanos e rios do litoral americano (RIBEIRO et al., 2009). Esta planta possui como característica positiva um rápido crescimento, além de flores belíssimas, algo comum em plantas pertencentes a esta família e também muito importante para esta espécie, pois os autores ULRICH et al., (1999) relatam que a mesma possui tolerância ao clima seco, além de características desejáveis para profissionais de paisagismo.

Esta planta é uma herbácea bulbosa popularmente chamada de Lírio-do-banhado. A planta mede entre 30 e 60 cm de altura. As folhas são verde-claras, lustrosas, grandes e lanceoladas. Na época de floração, entre Setembro e Junho, as inflorescências atingem entre 60 e 90 cm de altura, e portam em média seis flores aromáticas, com sépalas brancas e estames e estiletos brancos na base tornando-se púrpura da porção mediana em direção aos ápices, essas flores aparecem em grupos de 2-6 no topo das hastes durante a Primavera, Verão e Outono. Suas anteras apresentam coloração violácea e o fruto é uma cápsula de 2 cm de largura que contém de três a seis sementes (STUMPF; BARBIERI; HEIDEN; 2009).

Muitas espécies de Amaryllidaceae já foram caracterizadas por conter propriedades biológicas e farmacológicas marcantes atribuídas aos alcaloides, entre elas se destacam a atividade anticolinesterásica, onde a galantamina é utilizada como um inibidor competitivo da acetilcolinesterase e é utilizado para o tratamento

da doença de Alzheimer (BASTIDA, 2011).

A cultura de células vegetais torna-se importante para as indústrias farmacêuticas, pelo fato de esta possibilitar às mesmas a produção de um determinado composto ativo, que é oriundo de uma matriz vegetal sem a necessidade de extinguir uma determinada espécie, além de eliminar problemas de sazonalidade. Segundo CUNHA, (2010) o uso rotineiro de matérias-primas provenientes de plantas nativas ou cultivadas pode muitas vezes representar dificuldades ao setor de produção de medicamentos, algo que as indústrias tentam de toda forma evitar.

As culturas celulares de plantas podem acelerar a síntese de grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um curto período, o que o torna favorável a produção em plantas, para as quais o acúmulo destes metabólitos pode variar, desde uma estação (plantas anuais) ou diversos anos (plantas perianuais) (CROTEAU et al., 2000; SANTOS et al., 2007).

Estudos realizados por CORPES, et al. (2019) com *Piper divaricatum* objetivando realizar a comparação do perfil volátil, compostos fenólicos e atividade antioxidante desta espécie cultivada in vitro com a planta silvestre demonstraram que plantas cultivadas in vitro podem apresentar semelhanças na composição química em relação as plantas cultivadas in vivo, entre os compostos encontrados destacaram-se o metil eugenol, E- $\beta$ -ocimeno e  $\beta$ -elemeno.

Com base nestas informações o presente trabalho tem como objetivo apresentar o desenvolvimento de um protocolo voltado para a o cultivo in vitro de plântulas, axênicas de *C. americanum* formadas a partir de embriões zigóticos sendo estes utilizados para a produção de explantes que serão utilizados na geração de um processo de produção de células que poderão ser cultivadas na forma de calos ou de suspensões celulares, afim de se investigar com maior precisão o estudo referente ao acúmulo de metabólitos alvos nesta espécie.

## 2 | METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no LabISisBio (Laboratório de Investigação sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade molecular) da Universidade Federal do Pará dentro da linha de pesquisa de Biotecnologia Vegetal. A pesquisa foi direcionada à produção de plântulas e calos visando cultura de células a partir de explantes provenientes da germinação de sementes *in vitro* de *C. americanum*.

### 2.3 Obtenção do Material Botânico e Assepsia

O material selecionado para ser utilizado como fonte de explantes foram sementes de *C. americanum* coletadas na Universidade Federal do Pará, Campus

Guamá. (0,1° 28' 5.93" S e 0,48° 27' 41.3" W). A espécie em questão está devidamente cadastrada com registro de atividades de acesso ao Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AA2BB8A. As sementes foram submetidas a uma assepsia inicial constando de lavagens com água corrente, imersão em NaClO a 2%(v/v) por 12 horas, uma lavagem com água destilada estéril com a adição de Tween 80, imersão em fungicida Derosal a 5% (v/v) por 120 min, seguido de duas lavagens com água destilada estéril e imersão em cefalexina 100 mg. L<sup>-1</sup> por 12 horas.

#### 2.4 Produção de plântulas *in vitro* e Indução de calos a partir de sementes de *C.americanum* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com reguladores de crescimento 2,4- D e BAP

Para produção de plântulas *in vitro* e posterior indução de calos, os embriões zigóticos de *C. americanum* foram excisados do endosperma da semente e em seguida, todo este material foi manipulado em câmara de fluxo laminar. Os embriões isolados foram imersos em Polivinilpirrolidona (PVP) a 3% (v/v) por 5 min, etanol a 70% (v/v) por um minuto, NaClO a 10% por 5 minutos, além de serem submetidos a 5 lavagens com água destilada estéril. Todos os embriões foram imersos em solução de rifampicina 0,1% (v/v) por 10 minutos e posteriormente inoculados em meio de cultura MS para germinação. Uma vez desenvolvidos, estes embriões formaram plântulas e houve a seleção das melhores progênies para serem potenciais fontes doadoras de explante. Após serem selecionados, os explantes foram submetidos a oito diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP (Tabela 1).

TRATAMENTO	2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )
T1	2,0	0,1
T2	0,5	0,1
T3	0,2	0,1
T4	1,0	0,2
T5	0,2	0,2
T6	0,5	0,0
T7	1,0	0,5
T8	3,0	0,1

Tabela 1: Tratamentos utilizados com de reguladores de crescimento para indução de calos de *C.americanum* em meio MS.

#### 2.5 Estabelecimento da cultura de calos e obtenção das amostras

A obtenção de cultura de calos foi iniciada a partir da escolha dos explantes obtidos de embriões e Plântulas axênicas cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D (2,4 – Diclorofenoxiacético) e BAP

(Benzilaminopurina). Estas concentrações foram estabelecidas de acordo com a matriz experimental apresentada na tabela 1. Durante o processo de desenvolvimento e proliferação celular foi avaliada a capacidade de cada órgão para produção de calos, inclusive os embriões, bainhas foliares, bulbo e raízes. Foram adotadas como variáveis a temperatura, pH, tempo e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura. Para a análise dos dados, calculou-se o percentual de indução de cada explante. (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados em relação à capacidade de indução de calos de cada explante envolvendo os oito tratamentos com diferentes combinações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP demonstram que o embrião pode ser indicado como explante para indução de calos e também, quando há conversão desses em plântula, a excisão de diferentes partes dessas plântulas, como raízes e bulbo também podem ser recomendados como explante. Neste estudo, constatou-se que na concentração 3,0 mg/L<sup>-1</sup> de 2,4 D e 0,1 mg/L<sup>-1</sup> de BAP as raízes apresentam 100% de capacidade para formação de calos friáveis e o embrião possui 90% de capacidade para formação de calos embriogênicos na concentração 1,0mg/L<sup>-1</sup>de 2,4-D e 0,2 mg/L<sup>-1</sup> de BAP em pH 6,5. O bulbo também possuiu capacidade para produção de calos embriogênicos de 70% nesta mesma concentração e pH. A temperatura que apresentou maior eficiência para a calogênese foi a de 30°C. As bainhas foliares induziram apenas um percentual de 20% formação de calos em todas as concentrações testadas, sendo esta considerada menor percentagem de todos os tecidos testados. A capacidade para indução de cada explante foi avaliada por um período de 90 dias. Os resultados podem ser melhor visualizados através das tabelas a seguir:

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Raiz	25	25	5,8	2,0	0,1	23
T2	Raiz	25	25	5,8	0,5	0,1	0
T3	Raiz	25	25	5,8	0,2	0,1	14
T4	Raiz	25	25	5,8	1,0	0,2	17
T5	Raiz	25	25	5,8	0,2	0,2	20
T6	Raiz	25	25	5,8	0,5	0,0	4
T7	Raiz	25	25	5,8	1,0	0,5	8
T8	Raiz	25	25	5,8	3,0	0,1	25

Tabela 2: Indução de calos friáveis oriundos de raízes de *C.americanum* T°C 25 e pH 5,8

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Embrião	25	25	5,8	2,0	0,1	0
T2	Embrião	25	25	5,8	0,5	0,1	0
T3	Embrião	25	25	5,8	0,2	0,1	13
T4	Embrião	25	25	5,8	1,0	0,2	29
T5	Embrião	25	25	5,8	0,2	0,2	23,4
T6	Embrião	25	25	5,8	0,5	0,0	0
T7	Embrião	25	25	5,8	1,0	0,5	25
T8	Embrião	25	25	5,8	3,0	0,1	12

Tabela 3: Indução de calos embriogênicos oriundos de embriões de *C.americanum* T°C 25 e pH 5,8

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Bulbo	25	25	5,8	2,0	0,1	20
T2	Bulbo	25	25	5,8	0,5	0,1	10
T3	Bulbo	25	25	5,8	0,2	0,1	13,4
T4	Bulbo	25	25	5,8	1,0	0,2	25
T5	Bulbo	25	25	5,8	0,2	0,2	17
T6	Bulbo	25	25	5,8	0,5	0,0	0
T7	Bulbo	25	25	5,8	1,0	0,5	21
T8	Bulbo	25	25	5,8	3,0	0,1	19

Tabela 4: Indução de calos friáveis oriundos de bulbos de *C.americanum* T°C 25 e pH 5,8

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Bainha foliar	25	25	5,8	2,0	0,1	0
T2	Bainha foliar	25	25	5,8	0,5	0,1	0
T3	Bainha foliar	25	25	5,8	0,2	0,1	0
T4	Bainha foliar	25	25	5,8	1,0	0,2	0
T5	Bainha foliar	25	25	5,8	0,2	0,2	0
T6	Bainha foliar	25	25	5,8	0,5	0,0	0
T7	Bainha foliar	25	25	5,8	1,0	0,5	0
T8	Bainha foliar	25	25	5,8	3,0	0,1	0

Tabela 5: Indução de calos friáveis oriundos de bainhas foliares de *C.americanum* T°C 25 e pH 5,8

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Raiz	25	30	6,5	2,0	0,1	60
T2	Raiz	25	30	6,5	0,5	0,1	28
T3	Raiz	25	30	6,5	0,2	0,1	31
T4	Raiz	25	30	6,5	1,0	0,2	40
T5	Raiz	25	30	6,5	0,2	0,2	47
T6	Raiz	25	30	6,5	0,5	0,0	10
T7	Raiz	25	30	6,5	1,0	0,5	37
T8	Raiz	25	30	6,5	3,0	0,1	100

Tabela 6: Indução de calos friáveis oriundos de raízes de *C.americanum* T°C 30 e pH 6,5

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Embrião	25	30	6,5	2,0	0,1	80
T2	Embrião	25	30	6,5	0,5	0,1	17
T3	Embrião	25	30	6,5	0,2	0,1	52
T4	Embrião	25	30	6,5	1,0	0,2	90
T5	Embrião	25	30	6,5	0,2	0,2	50
T6	Embrião	25	30	6,5	0,5	0,0	2
T7	Embrião	25	30	6,5	1,0	0,5	70
T8	Embrião	25	30	6,5	3,0	0,1	18

Tabela 7: Indução de calos embriogênicos oriundos de embriões de *C.americanum* T°C 30 e pH 6,5

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Bulbo	25	30	6,5	2,0	0,1	58
T2	Bulbo	25	30	6,5	0,5	0,1	27
T3	Bulbo	25	30	6,5	0,2	0,1	23
T4	Bulbo	25	30	6,5	1,0	0,2	70
T5	Bulbo	25	30	6,5	0,2	0,2	42
T6	Bulbo	25	30	6,5	0,5	0,0	10
T7	Bulbo	25	30	6,5	1,0	0,5	60
T8	Bulbo	25	30	6,5	3,0	0,1	65

Tabela 8: Indução de calos friáveis oriundos de bulbos de *C.americanum* T°C 30 e pH 6,5

Tratamentos	Fonte de explante	N° de explantes	T°C	pH	Regulador de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )		% de indução
					2,4-D	BAP	
T1	Bainha foliar	25	30	6,5	2,0	0,1	20
T2	Bainha foliar	25	30	6,5	0,5	0,1	0
T3	Bainha foliar	25	30	6,5	0,2	0,1	0
T4	Bainha foliar	25	30	6,5	1,0	0,2	0,5
T5	Bainha foliar	25	30	6,5	0,2	0,2	0
T6	Bainha foliar	25	30	6,5	0,5	0,0	0
T7	Bainha foliar	25	30	6,5	1,0	0,5	0,2
T8	Bainha foliar	25	30	6,5	3,0	0,1	0,8

Tabela 9: Indução de calos friáveis oriundos de bainhas foliares de *C.americanum* T°C 30 e pH 6,5

A partir da metodologia utilizada foi possível otimizar a germinação *in vitro* de embriões de *C. americanum*, o que resultou na geração de um protocolo para assepsia tanto de sementes como embriões desta espécie para a obtenção de plântulas a serem utilizadas como fontes de explantes na cultura de células, o que possibilitou a geração de um processo de produção de biomassa em larga escala desta espécie para indução de calos.

O embrião de *C. americanum* é capaz de se desenvolver e é possível observar o mesmo em processo de germinação com desenvolvimento da plântula a partir do 30º dia de cultivo (Figura 2), uma vez desenvolvida, esta pode ser utilizada como fonte de explante nas diferentes regiões (Figura 3). Na etapa de indução de calos houveram diferentes tipos calos gerados a partir de embriões e raízes de *C.americanum*. Os mesmos estão ilustrados nas a Fotomicografias de calos embriogênicos e friáveis (Figura 4). A figura 5 ilustra os calos obtidos em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP ainda na presença do agente solidificante Phytigel. Os calos oriundos de raízes apresentaram características friáveis obtidos devido ao balanço hormonal utilizado no experimento envolvendo citocininas, pois as mesmas podem estimular ou inibir uma variedade de processos metabólicos, fisiológicos e bioquímicos em plantas superiores. Segundo VIEIRA; MONTEIRO (2002), estas estão envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação, incluindo a divisão celular, dominância apical, formação de órgãos, retardamento da quebra de clorofila, desenvolvimento dos cloroplastos, senescência das folhas, abertura e fechamento dos estômatos, desenvolvimento das gemas e brotações, além de atuar no metabolismo dos nutrientes que são úteis na regulação da expressão dos genes. Mediante a estas funções de destaque, também é possível explicar a presença de calos que apresentaram aspecto clorofilado. Por serem indispensáveis para a divisão

celular, também promovem a multiplicação de células com a formação de tecidos e órgãos *in vitro*. Segundo KERBAUY, (2013) as citocininas são muito importantes para a clonagem de plantas via micropropagação e também para a obtenção de plantas haploides, para o cultivo e a fusão de protoplastos, além de serem úteis para produção de substâncias comercialmente importantes envolvendo plantas transgênicas.

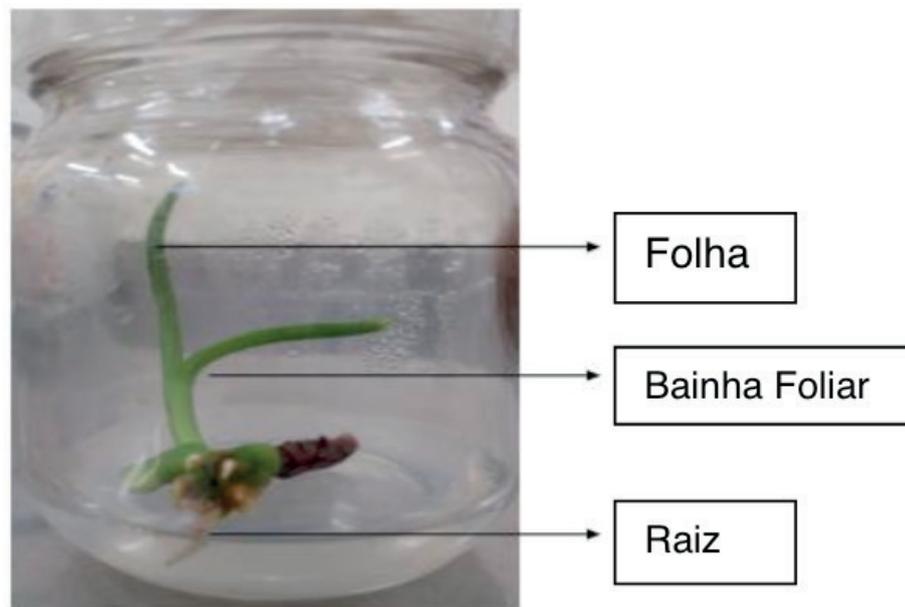


Figura 02: Germinação do embrião zigótico de *C.americanum* e desenvolvimento da plântula em meio MS aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Fonte: CORPES, (2019)

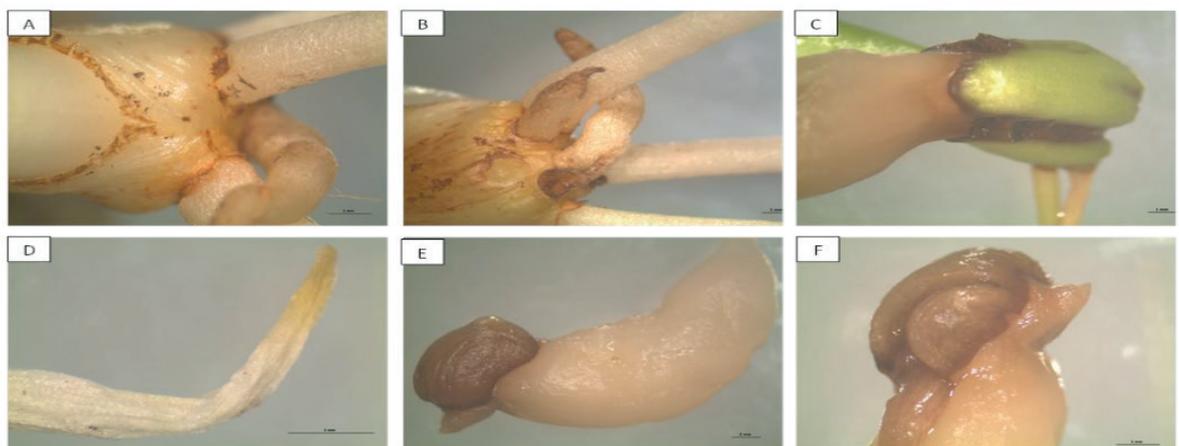


Figura 03: Fotomicografias ilustrando as principais regiões utilizadas como fonte de explante de *C.americanum* obtidas através de microscópio estereoscópico. A: região do bulbo; B: região da raiz; C: embrião com início protrusão da raiz primária; D: ápice da raiz; E e F embrião da semente.

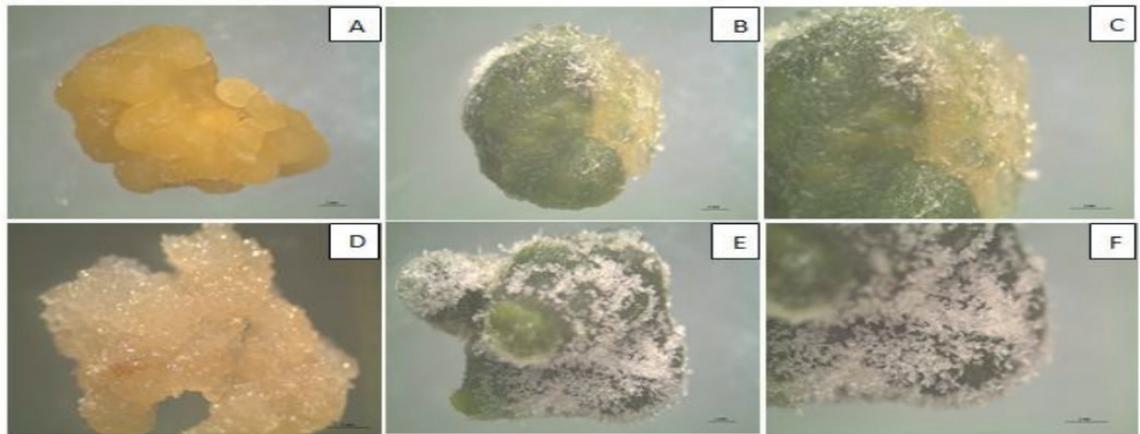


Figura 04: Fotomicrografias ilustrando os diferentes tipos calos gerados a partir de embriões e raízes de *C.americanum*. A: calo embriogênico; B e C calo embriogênico com produção de clorofila; D: calo friável; E e F calo em processo de diferenciação celular.



Figura 05: calo embriogênico de *C. americanum* obtido na concentração  $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$  de 2,4-D e  $0,2 \text{ mg/L}^{-1}$  de BAP (A) e calo friável gerado na concentração  $3,0 \text{ mg/L}^{-1}$  de 2,4 D e  $0,1 \text{ mg/L}^{-1}$  de BAP (B).

Fonte: CORPES, (2019)

## 4 | CONCLUSÕES

A assepsia adotada para o processo de iniciação a cultura e geração de possíveis fontes de explante foi muito eficiente, o que posteriormente possibilitou também o estabelecimento da cultura de calos.

Para a indução de calos em *C. americanum* são recomendados como fonte de explantes embriões zigóticos e segmentos de raízes provenientes de plântula.

Há o desenvolvimento de embriões zigóticos e é possível observar a formação de plântulas in vitro em meio básico de cultura MS a partir do 30° dia de cultivo.

Embriões zigóticos e raízes são as principais fontes de explantes para indução de calos embriogênicos e friáveis em *C. americanum* sendo as células de raízes altamente recomendadas para o crescimento de proliferação de biomassa de calos friáveis.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, Adrielle Câmara. Amaryllidaceae Jaume St.-Hil: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil e estudos de multiplicação *in vitro*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Distrito Federal, 114p. 2007.
- ALEXANDRE, M. A. V et al. *Hippeastrum mosaic virus* diagnosed in *Hippeastrum* and *Eucharis* in ,Brazil. **Journal Plant Pathology**, v.93, n.3, p.643-649, 2011.
- BSTIDA, J., et al. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**. v. 2, p. 65-100, 2011.
- CORPES, R. S. et al. Comparison of Volatile Profile and Antioxidant Activity of *Piper divaricatum* G. Meyer (Piperaceae) Using Cuttings and Cell Tissue. **Journal Brazilian Chemical Society**. v.00, n. 00, p. 1-7, 2019
- CROTEAU R, KUTCHAN TM, LEWIS NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.
- CUNHA, A. P. da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2010.
- LORENZI, H.; MATOS, E.J.A. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- RIBEIRO, J. P. N.; MATSUMOTO, R. S.; LEANDRO K. TAKAO<sup>1</sup>, VALQUÍRIA M. VOLTARELLI<sup>1</sup> e MARIA INÊS S. LIMA. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum*L. **Revista Brasileira de Botânica**, V.32, n.1, p.183-188, 2009.
- SANTOS A.S, et al. A Dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.17, p.538-541, 2007
- STUMPF, E. R. T; BARBIERI, R. L; HEIDEN, G. Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 276 p; 2009.
- TOMBOLATO, A. F. C. et al. **Bulbosas Ornamentais no Brasil**.Revista Brasileira de Horticultura Ornamental. V. 16, Nº. 2, p. 127-138, 2010.
- ULRICH M. R.; JR, F. T. D.; CHEONG KOH, Y.; DURAY, S. A.; EGILLA, J. N. Micropropagation of *Crinum 'Ellen Bosanquet'* by tri-scales. **Scientia Horticulturae**, v. 82; p. 95-102, 1999.
- VIEIRA, E. L.; MONTEIRO, C. A. Hormônios vegetais. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, cap.6, p. 79-104, 2002.

## AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DESINFESTAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA CULTIVO *IN VITRO*

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 11/11/2019

### **André Luís de França Dias**

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
Recife - PE

<http://lattes.cnpq.br/3147738422511163>

### **James Correia de Melo**

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
Recife – PE

<http://lattes.cnpq.br/8161570393643833>

### **Bianca Galúcio Pereira de Araújo**

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
Recife – PE

<http://lattes.cnpq.br/7174138631931424>

### **Diógenes Virgínio do Nascimento**

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
Recife – PE

<http://lattes.cnpq.br/2512760119418458>

### **Pauliana Gomes de Lima**

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
Recife – PE

<http://lattes.cnpq.br/6974357240366884>

### **Yrlânia de Lira Guerra**

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste  
Recife – PE

<http://lattes.cnpq.br/4467078454069774>

**RESUMO:** A micropropagação de plantas é uma técnica que proporciona alta taxa

de multiplicação com qualidade genética e fitossanitária, o que permite atender, com mais rapidez, às necessidades do mercado sucroenergético. Este trabalho teve como objetivo avaliar métodos de desinfestação de gemas axilares de cana-de-açúcar da variedade RB92579. Os ápices caulinares de cana-de-açúcar foram desbastados e desinfestados das seguintes formas: (T1) álcool 70% 1 min + NaClO 2% 10 min + tratamento térmico 51,5°C 10 minutos, (T2), tratamento térmico 51,5°C 10 minutos + álcool 70% 1 min + 2 banhos em NaClO 1,8% e (T3) tratamento térmico 51,5°C 10 minutos + álcool 70% 1 min + 2 banhos em NaClO 1,5%, em seguida os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 1 g.L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN), 2 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 0,13 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (Ga<sub>3</sub>), 0,05 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 0,05 g.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de inositol, 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Após 15 dias da introdução, foi avaliado: contaminação bacteriana e fúngica, oxidação e taxa de sobrevivência. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 80 repetições. Aplicou-se ANOVA e o teste de Tukey a 5% para comparação das médias, realizada com o auxílio do programa SISVAR versão 5.7 (2019). O procedimento de introdução de ápices caulinares de cana-de-açúcar com apenas uma imersão em NaClO (T1) foi o método

mais eficiente no controle da contaminação, associado ao baixo nível de oxidação dos tecidos dos explantes e maior taxa de sobrevivência. Todos os tratamentos foram eficientes no controle da contaminação fúngica (abaixo de 1,3%).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Saccharum* spp; Contaminação; Micropropagação

## EVALUATION OF STEM CUTTINGS SHOOT TIP CLEANED METHODS FOR *IN VITRO* SUGARCANE

**ABSTRACT:** Plant micropropagation is a technique that provides high multiplication rate with genetic and phytosanitary quality, which allows to efficiently meet the needs of the energy sugar market. This study aimed to evaluate methods of disinfestation of sugarcane axillary buds of the variety RB92579. Sugarcane stem apices were chopped and disinfected as follows: (T1) alcohol 70% immersion for 1 minute + sodium hypochlorite (NaClO) 2% immersion for 10 minutes + heat treatment at 51.5°C for 10 minutes; (T2) alcohol 70% immersion for 1 minute + two immersions NaClO 1.8% + heat treatment at 51.5°C for 10 minutes and (T3) + alcohol 70% immersion for 1 minute + two immersions NaClO 1,5% + heat treatment at 51.5°C for 10 minutes, then explants were inoculated in MS culture medium supplemented with 1 g.L<sup>-1</sup> kinetin (KIN), 2 mg.L<sup>-1</sup> indolacetic acid (AIA), 0.13 mg.L<sup>-1</sup> gibberellic acid (Ga3), 0.05 g.L<sup>-1</sup> citric acid, 0.05 g.L<sup>-1</sup> ascorbic acid, 0.1 g.L<sup>-1</sup> inositol, 8 g.L<sup>-1</sup> agar and 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose. After 15 days of introduction, bacterial and fungal contamination, oxidation and survival rate were evaluated. The experimental design was completely randomized with 80 replications. Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey test at 5% were used to compare the means, performed with the aid of the statistical analysis and design of SISVAR version 5.7 (2019). The procedure (T1) for introducing sugarcane stem apices with only one NaClO immersion was the most efficient method to control contamination, associated with the low oxidation level of explant tissues and higher survival rate. All treatments were effective in controlling fungal contamination (below 1.3%).

**KEYWORDS:** *Saccharum* spp; Contamination; Micropropagation

## 1 | INTRODUÇÃO

O continente americano possui mais da metade de toda produção mundial de cana-de-açúcar sendo o Brasil o maior produtor, com uma área total a ser colhida de aproximadamente 8,3 milhões de hectares e uma produtividade estimada para a temporada 2019/2020 de 74,217 Kg/ha (CONAB, 2019).

A elevada demanda do setor sucroenergético impulsiona a produção de novas variedades de cana-de-açúcar no Brasil por meio de programas de melhoramento genético, cuja finalidade sustenta-se no aumento da produtividade, tolerância ao déficit hídrico, resistência às pragas e doenças (JUNGHANS & SOUZA, 2013). Dessa forma, a propagação convencional da cana-de-açúcar é consideravelmente limitante para a rápida disseminação no campo e disponibilização no mercado (REINHARDT

& CUNHA, 1999).

A micropropagação de plantas é uma técnica que proporciona alta taxa de multiplicação com qualidade genética e fitossanitária, o que permite contribuir, com mais eficiência e rapidez, com as necessidades do mercado da cultura da cana-de-açúcar, bem como em combater suas limitações (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998; GÜBBÜK & PEKMEZCI, 2004).

A etapa de introdução é a que apresenta maiores dificuldades, pela necessidade de combater a contaminação e evitar a morte do explante quando isolado (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998). A presença de bactérias endógenas em algumas espécies vem dificultando o estabelecimento de protocolos de micropropagação de muitos materiais (SOUZA & JUNGHANS, 2006). Por isso, diversas estratégias são adotadas para reduzir os riscos de contaminação e de mortalidade dos explantes, como adição de fungicidas no meio (ISHIBASHI et al., 2017), cloreto de mercúrio (FLORES et al., 2006), formol (SANTOS & SANTOS, 2019), dentre outros.

Desta forma, é de elevada importância a busca por métodos que aprimorem o uso desta tecnologia por meio do isolamento de ápices caulinares, visando reduzir a taxa de contaminação, suavizar os índices de oxidação no meio e nos tecidos vegetais, e conseqüentemente, elevar o sucesso no estabelecimento *in vitro* desses explantes de cana-de-açúcar.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A variedade de cana-de-açúcar utilizada foi a RB92579, fornecida pela Usina Trapiche (PE) com idade de 10 meses.

### 2.1 Condições Experimentais

O experimento foi conduzido na Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) localizado em Recife-PE. Os segmentos de colmo com 5 cm de comprimento foram tratados termicamente a 52°C por 30 min e em seguida, com fungicida Kasumin® (1 mL L<sup>-1</sup>). Para proporcionar a brotação, esses colmos foram plantados em bandejas contendo substrato comercial a base de pinus (Basaplant®). Após 45 dias do início das brotações, as plantas com tamanho aproximado de 30 cm foram isolados com auxílio de bisturis e levados para o laboratório, para obtenção dos palmitos, que por sua vez, foram lavados com água corrente e detergente neutro.

Os ápices caulinares de cana-de-açúcar foram desbastados e desinfestados em câmaras de fluxo laminar que caracterizaram os seguintes tratamentos: (T1) álcool 70% por 1 minuto, NaClO 2% por 10 minutos, tratamento térmico 51,5°C por

10 minutos; (T2) tratamento térmico 51,5°C por 10 minutos, álcool 70% por 1 minuto e 2 banhos em NaClO 1,8% por 10 minutos cada e, por fim, (T3) tratamento térmico 51,5°C por 10 minutos, álcool 70% por 1 min e 2 banhos em NaClO 1,5% por 10 minutos cada. Os meios de cultura tiveram para a sustentação dos explantes: (T1) meio semissólido, (T2) e (T3) meio líquido com pontes de papel de filtro qualitativo. Os tratamentos químicos com álcool 70% e hipoclorito de sódio foram submetidos sob agitação e no final de seus processos, os palmitos foram enxaguados em água purificada estéril por três vezes e, por fim, permaneceram imersos em solução estéril de ácido cítrico (50 mg L<sup>-1</sup>) até a realização da introdução *in vitro* dos ápices caulinares, para minimizar oxidação nos tecidos vegetais.

Finalizados os procedimentos de desinfestação, os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 1 g.L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN), 2 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 0,13 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (Ga<sub>3</sub>), 0,05 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 0,05 g.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de inositol, 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

## 2.2 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 80 repetições. Aplicou-se ANOVA e o teste de Tukey a 5% para comparação das médias, realizada com o auxílio do programa SISVAR versão 5.7 (2019). Os valores dos parâmetros avaliados foram parametrizados atribuindo-se notas (1 para presença, e 0 para ausência) utilizando a fórmula  $\sqrt{x} + 0,5$  como ferramenta.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação para incidência de contaminação bacteriana (Figura 1) foi observada diferença significativa no T3 (29,7%) com menores **índices em** aparecimentos de colônias bacterianas, tanto no meio nutritivo, quanto na superfície dos tecidos dos explantes. Os demais tratamentos apresentaram contaminação por bactérias com valores acima de 50%, demonstrando que os tratamentos não foram muito eficientes. Chaddad (2013), obteve resultados similares com a variedade SP803280, com taxa de contaminação bacteriana em torno de 43,75% utilizando tratamento químico com álcool 70% por 1 min e NaClO a concentração de 0,5%. Em contrapartida, Eurico et al 2014, verificou que é possível obter taxas de mais de 75% de material limpo utilizando hipoclorito de sódio de 1% a 2% de cloro ativo por 30 minutos, com explantes inoculador diretamente no meio nutritivo semissólido.

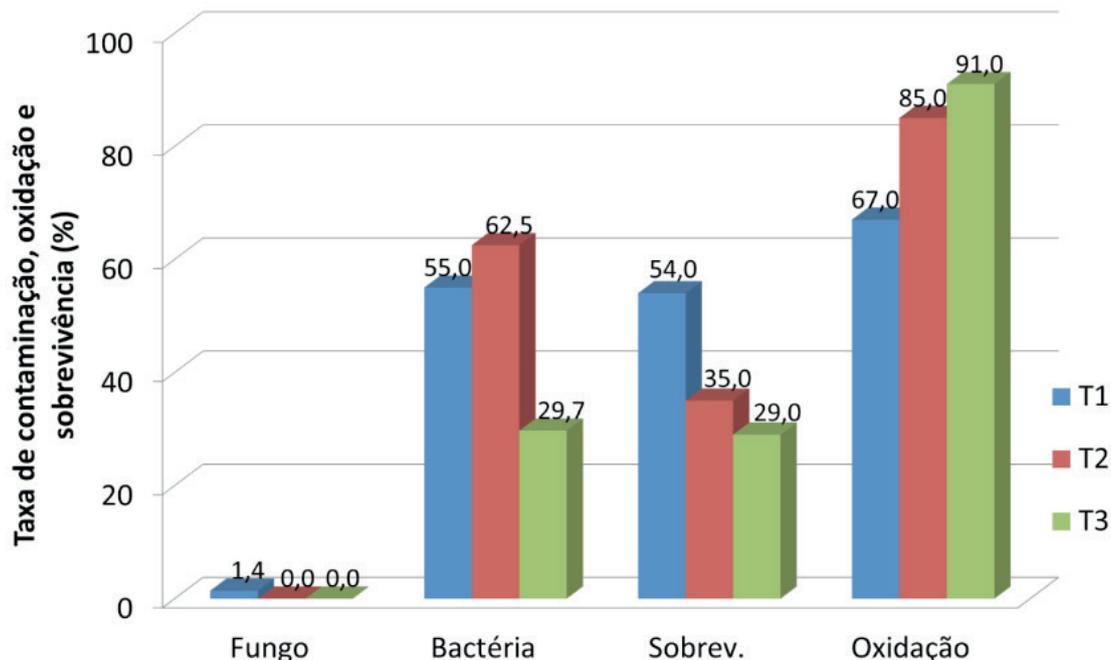


Figura 1 - Percentual de contaminação fúngica e bacteriana, taxa de sobrevivência e índice de oxidação no cultivo.

Todos os tratamentos foram eficientes no controle da contaminação fúngica com valores abaixo de 1,3% (Figura1). Esses dados apontam que os tratamentos foram excelentes no combate do crescimento de fungos. Resultados semelhantes foram obtidos ao estabelecer cana-de-açúcar da variedade SP803280 com utilização de álcool 70% por 1 minuto e NaClO na concentração de 0,5%, obtendo uma taxa de contaminação por fungos de 3,13% (CHADDAD, 2013).

Ao analisar a taxa de sobrevivência dos explantes (Figura1) os maiores valores foram obtidos no tratamento (T1 - 54%) indicando que o método de desinfestação adotado foi o menos agressivo para o crescimento e desenvolvimento dos explantes, associado ao fato da inoculação do explante ter ocorrido diretamente no meio nutritivo. A média das taxas de sobrevivência de 13 variedades de cana-de-açúcar que passaram por desinfestação em álcool 70% por 2 minutos e em hipoclorito de sódio (2,5%) por 20 minutos foi de 48,65 (MAYER et al., 2014), valor que está abaixo do nosso melhor resultado para esta variável (T1- 54%).

No que se refere à taxa de oxidação dos explantes e do meio de cultura, percebeu-se que todos os tratamentos apresentaram elevadas taxas de produção de compostos fenólicos (Figura 1), porém, o tratamento T1 destacou-se com o menor percentual. Isso sugere que os antioxidantes, ácido cítrico e ácido ascórbico (67%), foram mais eficientes em combater a oxidação em comparação com os tratamentos compostos com suportes de papel (T2-85% e T3-91%). Além disso, a dupla dose de hipoclorito de sódio pode ter ocasionado danos nos tecidos dos explantes. O processo de oxidação tem como função sinalizadora no metabolismo

a defesa celular, que em casos severos apresentam elevada taxa de oxidação dos tecidos pelas enzimas poliferases, acarretando toxicidade e, conseqüente, inibição do crescimento e escurecimento do material vegetal e do meio nutritivo (SATO et al., 2001; KHAN & KHATRI, 2006; LIMA, 2010). Franca et al., (2016) utilizando o procedimento de desinfestação dos palmitos de cana-de-açúcar da variedade RB 966928 com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos, observaram que a taxa de oxidação teve com possível causa o balanço hormonal entre BAP e CIN.

#### 4 | CONCLUSÃO

O procedimento de introdução de ápices caulinares de cana-de-açúcar com apenas uma imersão em NaClO (T1) foi o método mais eficiente no controle da contaminação, associado ao baixo nível de oxidação dos tecidos dos explantes e maior taxa de sobrevivência.

#### REFERÊNCIAS

- CHADDAD, M. M. **Termoterapia associada à cultura de tecidos para obtenção de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de Leifsonia xyli subsp. xyli**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento safra brasileira de cana-de-açúcar**, v. 6 - Safra 2019/20, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, 2019, 14p.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) **Hicken. C Rural** 36: p. 845-851; 2006.
- FRANCA, Mariana Almeida. **Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. - Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.A. - **Micropropagação**. Brasília, 1998. p. 99-200.
- GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of some new banana types (Musa spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 28, p. 355-361, 2004.
- ISHIBASHI, V. et al. Estabelecimento in vitro de *Acacia mearnsii* De Wild.(Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.13, n.1, p.15-21. 2017.
- JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 280 p, 2013.
- KHAN, I. A.; KHATRI, A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: Histological studies. **Pakistan Journal of Botany**, v.38, n.3, p. 631-636, 2006.
- LIMA, G. V. M. **Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento in vitro de variedades de cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.)** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade

Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Recife, 2010.

MAYER, K. C. DE A.; DONINI, L. P.; ZACARIAS, F. M.; OLIVEIRA, R. J. S.; DUTRA, L. F. **Comportamento de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* L.) de ciclo precoce e médio-tardio durante estabelecimento *in vitro***, 2014.

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

REINHARDT, D. H. R. C.; CUNHA, G. A. P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G. A. P. da; CABRAL, J. R. C.; SOUZA, L. F. da S. (Org.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p. 105- 138.

SANTOS, M.; SANTOS, C. H. G. Desinfestação De Sementes De Myrciaria Dubia (Kunth) Mcvaugh para Obtenção de Protocolo De Estabelecimento *in vitro*. **Revista Multidisciplinar Pey Kéyo**, v.5, n.1, p. 39-54, 2019.

SATO, A. Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L. A.; et al. Micropropagação de Celtis sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n2, p.117-123, 2001.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE SUBSTRATOS NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE *Aechmea blanchetiana* (BACKER) L. B. SM

Data de aceite: 20/01/2020

Data de Submissão: 11/11/2019

### Felipe Douglas Ferreira

Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia  
Viçosa – MG  
<http://lattes.cnpq.br/0771250723935771>

### Sheila Maria Pereira de Andrade

Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia  
Viçosa – MG  
<http://lattes.cnpq.br/1873530165168758>

### William Carlos Gonzaga Franco

Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia  
Viçosa – MG  
<http://lattes.cnpq.br/1103787838057378>

### Marília Maia de Souza

Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Barbacena  
Barbacena – MG  
<http://lattes.cnpq.br/5054854939552132>

**RESUMO:** *Aechmea blanchetiana* é nativa da flora brasileira, com características que atraem o interesse do seu uso em projetos paisagísticos e ornamentações. A crescente utilização desta espécie e a falta de um sistema de cultivo comercial têm acarretado

na extração predatória desta *Bromeliaceae*. A técnica de micropropagação de bromélias tem apresentado resultados satisfatórios devido a rápida germinação, ao rápido desenvolvimento dos explantes e a alta confiabilidade genética. O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *A. blanchetiana* em meio nutritivo MS em três concentrações nutritivas (25, 50 e 100%) interagindo com quatro suportes (ágar, esponja, hidrogel e ponte de papel), estabelecendo a melhor condição para a planta. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com quatro repetições e a parcela era constituída por três sementes por tubo e o delineamento de tratamentos sendo um fatorial 3x4 (concentrações nutritivas x suporte), sendo o experimento conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – *Campus Barbacena*. Após 30 dias da semeadura, foram avaliados: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação diário (IVG), número de folhas, desenvolvimento radicular, massa fresca e massa seca. O tratamento T1 (ágar + MS 100) apresentou a maior porcentagem de germinação (60%) e o T9 (papel + MS 25) a menor porcentagem (25%). O ágar apresentou o maior IVG (0,437), enquanto o hidrogel o menor índice (0,329). Na interação concentração nutritiva x suporte, os tratamentos

T4 (hidrogel + MS 100) e T9 (papel + MS 25) apresentaram a menor média de número de folhas. Após a análise estatística, concluiu-se que os tratamentos com o suporte ágar apresentaram melhores médias gerais em todas as características analisadas sendo nele a concentração de 100% a melhor.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bromeliaceae*, Micropropagação, Planta ornamental, IVG.

## IN VITRO SUBSTRATES EVALUATION ON THE GERMINATION AND DEVELOPMENT OF *Aechmea blanchetiana* (BACKER) L. B. SM

**ABSTRACT:** *Aechmea blanchetiana* is native from Brazilian flora with characteristics that attract the use in landscape projects and as ornaments. The increasing use of this species and the lack of a commercial cultivation system have led to the predatory extraction of this *Bromeliaceae*. The bromeliads micropropagation technique has shown satisfactory results due to the fast speed of germination, the fast development of explants and high genetic reliability. The aim of this study was to evaluate and to compare the *in vitro* propagation development and germination of *A. blanchetiana* in MS nutrient medium in three nutrient concentrations (25, 50 and 100%), interacting with four seeds supports (agar, sponge, hydrogel and paper bridge), setting the best condition for the plant development. The experimental design was completely randomized with four replicates and the plots were consisted on three seeds per tube and the treatments design was a factorial 3x4 (nutrient concentration x support). The experiment was conducted at Plant Tissue Culture Laboratory located at Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – *Campus Barbacena* Thirty days after seed inoculation, the percentage of germination, speed of germination (SG), number of leaves, root development, fresh mass, and dry mass were evaluated. The treatment T1 (agar + MS 100) had the highest germination percentage (60%) and T9 (paper + MS 25) had the lowest percentage (25%). Agar had the highest ESI (0.437), while the hydrogel the lowest index (0.329). In the nutrient concentration x support interaction, treatments T4 (hydrogel + MS 100) and T9 (paper + MS 25) had the lowest average number of leaves. After the statistical analysis, it was concluded that the treatments with the agar support presented better general averages in all the characteristics analyzed being the concentration of 100% better than others concentrations.

**KEYWORDS:** *Bromeliaceae*, Micropropagation, Ornamental plant, SG.

## 1 | INTRODUÇÃO

Há anos, as bromélias vêm ganhando apreciação como plantas ornamentais, especialmente em países desenvolvidos como os Estados Unidos, Austrália, Japão e países europeus, onde seu cultivo e seu comércio movimentam considerável quantia na economia de cada país (PAULA e SILVA, 2004).

A espécie *Aechmea blanchetiana* possui folhas de cor verde-clara a tons amarelados, folhas sem espinhos nas bordas e inflorescência com brácteas

avermelhadas. Sua altura varia de 60 a 90 cm. Estas características atraem para o uso desta espécie em projetos paisagísticos e/ou decorações internas.

Com o aumento da procura por exemplares de *Bromeliaceae*, há também maior preocupação em aumentar a produção destas plantas assim como em gerar plantas atrativas e de alta qualidade em menor tempo. A produção comercial de plantas ornamentais é de suma importância ao evitar o extrativismo destas em seu ambiente natural, contendo assim a possibilidade de perda genética (ROCHA et al., 2010).

A propagação vegetativa *in vitro* tem se sobressaído como alternativa para o aumento da produção comercial de bromélias, na substituição de técnicas convencionais por técnicas avançadas que garantem a qualidade das plantas. A cultura de tecidos tem se mostrado eficiente na produção, em escala comercial, de plantas uniformes, livres de doenças, com alto padrão genético e com boas características fisiológicas.

A técnica de propagação *in vitro* é caracterizada como alternativa a ser utilizada para melhorar a qualidade dos produtos agrícolas. O sucesso da aplicação dessa tecnologia está relacionado a fatores que estão envolvidos em protocolos eficientes de regeneração. Se o meio nutritivo básico não for compatível com as exigências nutricionais das plantas, em virtude de alguns de seus ingredientes, a obtenção de clones é comprometida. Portanto, a escolha do meio nutritivo para o cultivo vegetal é crucial para propagação *in vitro*.

Os meios de cultivos são compostos por substâncias nutritivas consideradas essenciais ao desenvolvimento das culturas e por elementos denominados de aditivos. As substâncias essenciais são compostas principalmente por elementos inorgânicos, orgânicos, sacarose e reguladores de crescimento. Os aditivos são os elementos que complementam o meio, que são as complexas substâncias naturais e as de função de agentes gelificantes. Os meios podem ser líquidos ou sólidos, sendo que a cultura em meio líquido exige alguns tipos de suporte, que incluem “pontes” de papel de filtro (HELDER 1949 *apud* TORRES et al., 1998). Para cultivo em meio sólido são adicionadas substâncias que atuam como agentes gelificantes do meio de cultivo. O ágar é o agente geleificante mais utilizado na micropropagação, porém o seu custo comercial é alto. É um desafio encontrar suporte de sustentação alternativo, que forneça o melhor desenvolvimento para o explante, visto que cada espécie contém necessidades únicas.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo germinativo e o desenvolvimento de *Aechmea blanchetiana* em meio nutritivo MS, variando-se as concentrações de macronutrientes em 25%, 50% e 100%, com quatro tipos de agentes de suporte: ágar, hidrogel, papel de filtro e esponja de espuma.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais situado no Departamento de Química do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – *Campus Barbacena*, IF Sudeste MG, em Barbacena/MG, no período de 03 de agosto a 01 de novembro de 2016.

### 2.1 Coleta de sementes

Sementes obtidas de bagas maduras de *Aechmea blanchetiana* foram coletadas em agosto de 2016 no jardim da residência da professora Marília Maia de Souza, em Barbacena, MG. Foi realizado a lavagem das sementes removendo o excesso de mucilagem. Adiante, foram selecionadas 600 sementes, que foram divididas em quatro grupos com o número igual de sementes e assim pesadas em balança de precisão com o objetivo de manter homogeneidade entre as sementes. Cada grupo com 150 sementes apresentou o peso médio de  $0,235 \pm 0,003$  gramas.

### 2.2 Estabelecimento do cultivo *in vitro* a partir de sementes de *Aechmea blanchetiana*

Para o estabelecimento das sementes da bromélia *Aechmea blanchetiana*, foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de mio-inositol e o pH ajustado a 5,8.

Assim o experimento foi composto por 12 tratamentos (T) variando-se a porcentagem da concentração de macronutrientes da composição do meio MS e o tipo de suporte a explantes mantidos *in vitro*, conforme o seguinte esquema: **T1**: ágar + MS 100; **T2**: ágar + MS 50; **T3**: ágar + MS 25; **T4**: hidrogel + MS 100; **T5**: hidrogel + MS 50; **T6**: hidrogel + MS 25; **T7**: papel + MS 100; **T8**: papel + MS 50; **T9**: papel + MS 25; **T10**: esponja + MS 100; **T11**: esponja + MS 50; **T12**: esponja + MS 25.

No preparo do meio MS a concentração dos macronutrientes variou em função do tratamento analisado, utilizando-se três concentrações: 25%, 50% e 100% da concentração original do meio MS. Para dar a sustentação aos explantes sobre o meio de cultivo em tubos de ensaio, foram testados quatro tipos de suportes: ágar, hidrogel (da marca *Forth*, Tietê/SP), pontes de papel, esponja de espuma.

Os suportes utilizados como agentes gelificantes do meio de cultura foram o ágar e o hidrogel, e apenas como suporte em meio líquido foram as pontes de papel e esponjas de espuma da marca *Scotch Brite* (Fabricante: 3M, Sumaré/SP). No preparo do ágar foi utilizado  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  de meio, que foi acondicionado em um frasco de vidro com água, e para pré-dissolução, foi submetido a uma temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$  e em seguida, foi incorporado ao meio de cultura. As partículas de hidrogel, na granulometria em pó, foram incorporadas ao meio de cultura na dosagem de 12

g L<sup>-1</sup> de meio, proporcionando-se a gelificação do meio. Os suportes de pontes de papel foram preparados com tiras de papel de filtro (0,19 mm de espessura, 3 cm de largura e 7 cm de comprimento), estas tiras foram acondicionadas dentro dos tubos de ensaio de modo que as duas extremidades das tiras ficassem mergulhadas no meio líquido e a parte superior ao nível da solução ficou dobrada. No suporte esponjas de espuma foram retirados pedaços retangulares de aproximadamente 3 cm de comprimento por 3 cm de largura e acondicionados no fundo dos tubos de ensaio de maneira que ficassem embebidas com o meio de cultura.

Em tubos de ensaio de vidro (25 x 125 mL) foram vertidos 10 mL do meio nutritivo juntamente com o suporte. Os tubos foram tampados com tampas de polietileno e foram autoclavados a 121° C em pressão de uma atmosfera, por 40 minutos.

Após a esterilização dos tubos de ensaio como os meios de cultura, estes foram transferidos à câmara de fluxo laminar para a inoculação das sementes. Antes da inoculação, as sementes foram submetidas à desinfestação utilizando solução de etanol na concentração de 70% por 2 minutos, seguida de imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio (da marca *Classic*), contendo 2,5% de cloro ativo em sua solução, durante 20 minutos sob constante agitação do béquer, e enxaguadas por três vezes com água destilada autoclavada. Após desinfestadas as sementes, com auxílio de uma espátula, foram inoculadas nos meios de acordo com os tratamentos. Fornecendo melhor visualização da estrutura do experimento, a Figura 1 mostra as plântulas desenvolvidas em cada tipo de suporte utilizado no experimento.

O material foi incubado em sala de crescimento à temperatura de 24 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas-luz e irradiância média de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (cerca de 2.200 lux). A germinação foi avaliada diariamente pelo período de 30 dias. Consideraram-se como germinadas as sementes que emitiram radícula. Além da germinação, durante este período foram avaliados o número de folhas e o desenvolvimento ou não do sistema radicular. Após os 30 dias, foi calculada a porcentagem total de germinação (%G) de cada tratamento, assim como a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana. Para o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962), na qual:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde:

G1, G2, Gn = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem, respectivamente.

N1, N2, Nn = número de dias desde a primeira, segunda, até a última contagem, respectivamente.

Na contagem da massa fresca, o material foi retirado dos tubos e agrupado em

tratamentos e em seguida pesados em balança de precisão. Após pesados, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel de pardo, sendo cada tratamento em um saco de papel diferente, e em seguida levados à estufa de desidratação onde permaneceram 36h sob temperatura de 60°C. Passada as 36h horas, retirou-se os sacos de papel da estufa e o material foi levado até a sala de pesagem onde foi aferido, em balança de precisão, o peso da matéria seca de cada tratamento.



Figura 1 - Plântulas de *Aechmea blanchetiana* desenvolvidas sobre quatro suportes  
Suportes em ordem: ágar, hidrogel, ponte de papel e esponja.

### 2.3 Delineamento Estatístico

O delineamento de experimento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada parcela constituída por quatro tubos de ensaio contendo sementes por tubo, totalizando 16 tubos e 48 sementes por tratamento. A soma total dos tubos e sementes utilizadas nos tratamentos foi de 192 tubos e 576 sementes. A análise dos tratamentos foi em fatorial 3x4 (tratamento de concentração de nutrientes x suporte).

Após a coleta dos dados, foi realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *Scott-Knott* (1974) a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas em software estatístico SISVAR.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados da análise de variância, demonstrado na Tabela 1, pôde-se aferir que na porcentagem de germinação e o número de folhas houveram interação concentração de nutrientes x suporte, onde apresentou diferenças estatísticas significativas. Nas avaliações do índice de velocidade de germinação e no número de

sementes que apresentaram raízes, o suporte surtiu efeito sob o desenvolvimento da plântula. Em seguida, foram analisados os fatores que influenciaram na germinação e no desenvolvimento de *A. blanchetiana in vitro*.

<b>Causas de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM (%G)</b>	<b>QM (IVG)</b>	<b>QM (NF)</b>	<b>QM (PR)</b>
Dose	2	68,912	0,017	0,434	0,628
Suporte	3	142,086	0,026*	0,304	10,755*
Dose*Suporte	6	381,030*	0,005	1,066*	0,465
Repetição	3	557,758	0,001	1,115	0,968
CV (%)		31,13	23,29	29,98	31,04

Tabela 1 - Quadro de análise de variância de porcentagem de germinação, IVG, número de folhas e presença de raízes de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. submetida a 12 tratamentos germinativos

\*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974). Grau de liberdade (GL), quadrado médio (QM), porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), número de folhas (NF) e presença de raízes (PR).

### 3.4 Porcentagem de Contaminação, Germinação e IVG

O experimento foi avaliado por período de 30 dias após a semeadura das sementes de *Aechmea blanchetiana*. Dos 192 tubos utilizados na condução do teste, 31 tubos apresentaram crescimento microbiano acelerado, totalizando a porcentagem de 16,2% de perda por contaminação. Não foi afetada a condução e os resultados estatísticos obtidos no projeto, visto que a contaminação fúngica ocorreu de forma espontânea em parcelas de todos os tratamentos. Ao comparar o resultado do trabalho com o de Rosa (2010), que ao utilizar sementes de *A. blanchetiana* na propagação *in vitro* e relatou a presença de fungos em 14,3% de seus tratamentos. A contaminação pode estar relacionada com falhas de assepsia, de manuseio e devido aos restos de mucilagem ainda presentes nas sementes. Grossi (2000) afirma que a maioria das sementes de bromélias estão envoltas em mucilagem, o que dificulta a sua assepsia.

Na Tabela 2, são apresentadas as quantidades de sementes germinadas e a porcentagem de germinação, com diferenças entre cada tratamento, para um total de 48 sementes utilizadas por tratamento avaliado. O T1 (água + MS 100) obteve o melhor resultado, no qual houve 60% de germinação, seguido dos T6 (hidrogel + MS 25), T10 (esponja + MS 100) e T12 (esponja + MS 25), com 56,25% de germinação das sementes. Nos trabalhos de Bellintani et al. (2007) e Silva (2008), utilizando espécies diferentes de bromélias, foram observados porcentagem de germinação de 90 a 100% quando utilizado o suporte água. Rosa (2010) testou a germinação *in vitro* de *Aechmea distichanth*, em água e meio líquido, e obteve valor germinativo de 46 a 60%.

Tratamento	Suporte	Dose	Nº Sementes Germinadas	% Germinação
T1	Ágar	100	29	60,42
T2	Ágar	50	22	45,83
T3	Ágar	25	26	54,17
T4	Hidrogel	100	20	41,67
T5	Hidrogel	50	24	50,00
T6	Hidrogel	25	27	56,25
T7	Papel	100	26	54,17
T8	Papel	50	26	54,17
T9	Papel	25	15	31,25
T10	Esponja	100	27	56,25
T11	Esponja	50	22	45,83
T12	Esponja	25	27	56,25

Tabela 2 - Quadro de análise do número de sementes germinadas e a porcentagem de germinação de sementes de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. submetidas a 12 tratamentos germinativos

Pela análise de variância, a porcentagem de germinação de sementes da espécie utilizada neste experimento obteve diferença significativa apenas no T9 (papel + MS 25), quando analisado o desdobramento da interação concentração de nutrientes/suporte, comparado aos demais tratamentos, como demonstrado na Tabela 3. Neste tratamento também houve valor inferior de germinação (31,25%). A possível causa do baixo valor germinativo pode estar ligada à baixa concentração do meio MS, impedindo assim a sua germinação.

Dose do Meio MS	Média
25%	31,250 a <sup>1</sup>
50%	54,165 a <sup>2</sup>
100%	54,168 a <sup>2</sup>

Tabela 3 – Quadro de análise de variância do desdobramento de dose dentro do suporte papel para a porcentagem de germinação de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm.

Médias seguidas pela mesma letra e número, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974).

Quando há o desdobramento de suporte dentro de cada nível de concentração, o papel com o meio MS 25 foi o único com valor estatístico significativo, quando comparado aos outros suportes (Tabela 4), aumentando a hipótese que a concentração tenha interferido na germinação das sementes sob esse suporte.

Suporte	Média
Papel	31,250 a <sup>1</sup>
Ágar	54,168 a <sup>2</sup>
Hidrogel	56,250 a <sup>2</sup>
Esponja	56,250 a <sup>2</sup>

Tabela 4 – Quadro de análise de variância do desdobramento de suporte dentro do nível de dose MS a 25% para a porcentagem de germinação de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm.

Médias seguidas pela mesma letra e número, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974).

Souza et al. (2003) observaram a inibição de germinação de sementes de *Lychnophora pinaster* em meio MS com altas concentrações salinas, e maiores taxas de germinação em meios com menos concentrações de nutrientes. Assim, é importante conhecer todos os fatores que podem afetar o sucesso germinativo e desenvolvimento de cada espécie a fim de obter resultado de qualidade no estabelecimento de plântulas *in vitro*. A escolha do suporte é de fundamental importância para a boa germinação e desenvolvimento da planta. O início da germinação teve início sete dias após a semeadura e estendeu-se até o 26º dia de contagem. Foi avaliado o índice de velocidade de germinação (IVG) e observado que os tratamentos utilizando os suportes ágar e esponja apresentaram melhor índice do que aqueles com papel e hidrogel. (Tabela 5). Os tratamentos utilizando o ágar como suporte apresentaram o melhor IVG (0,437), seguido pela esponja com o IVG de 0,398, pelo papel com IVG de 0,362, e com o IVG de 0,329 no tratamento com hidrogel. Quando realizado o desdobramento dose/suporte, cada nível de dose não apresentou diferenças estatísticas pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade.

Suporte	Média
Hidrogel	0,329 a <sup>1</sup>
Papel	0,362 a <sup>1</sup>
Esponja	0,398 a <sup>2</sup>
Ágar	0,437 a <sup>2</sup>

Tabela 5 - Quadro de análise de variância mostrando a influência do suporte para o índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm.

Médias seguidas pela mesma letra e número, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974).

Estes resultados são comparados aos de Arrigoni-Blank et al. (2013) que obteve índices que variaram de 0,60 a 0,62 na germinação de sementes de *Bromelia laciniosa* em meio líquido e gelificado com ágar. Reis et al. (2008), estudando a germinação *in vitro* de sementes de *Melissa officinalis*, encontrou os valores mais baixos para a mesma variável quando foram utilizados sais de MS a 100%. De acordo com esse autor, é possível que a alta concentração de sais no meio afete o

potencial osmótico e, conseqüentemente, a disponibilidade de água a ser absorvida pelas sementes durante a germinação.

### 3.5 Avaliações do número de folhas, presença de raízes e pesagem da massa fresca e massa seca das plântulas

No diagnóstico do desenvolvimento de número de folhas, a dose utilizada teve efeito sobre os suportes de hidrogel e papel. A Tabela 6 mostra que o tratamento T4 (hidrogel + MS 100) teve resultados estatisticamente inferiores aos demais com o suporte hidrogel: T5 (hidrogel + MS 50) e T6 (hidrogel + MS 25). O tratamento T9 (papel + MS 25) obteve média menor de número de folhas do que os tratamentos com o meio nutritivo MS nas doses 100 e 50% (T7 e T8).

Doses Meio MS	Média (Hidrogel)	Média (Papel)
25%	2,215 a <sup>2</sup>	1,271 a <sup>1</sup>
50%	2,250 a <sup>2</sup>	2,722 a <sup>2</sup>
100%	1,334 a <sup>1</sup>	2,090 a <sup>2</sup>

Tabela 6 - Quadro de análise de variância do desdobramento de dose dentro dos suportes hidrogel e papel para o número de folhas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm.

Médias seguidas pela mesma letra e número, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974).

Na Tabela 7 mostra que no desdobramento do suporte dentro das doses, a concentração de 25% do meio nutritivo MS afetou o número de folhas nos tratamentos com o suporte papel. Este resultado confere com o de Pessotti (2009), que analisou a propagação *in vitro* de *Vriesea sucrei* (Bromeliaceae) utilizando diferentes concentrações de meios MS e K (Knudson) em suportes ágar e ponte de papel. O teste apontou que os tratamentos no suporte de papel resultaram em menor número e comprimento de folhas, já o suporte ágar obteve os melhores índices.

Suporte	Média
Papel	1,271 a <sup>1</sup>
Esponja	2,202 a <sup>2</sup>
Hidrogel	2,215 a <sup>2</sup>
Ágar	2,257 a <sup>2</sup>

Tabela 7 - Quadro de análise de variância do desdobramento de suporte dentro do nível de dose MS a 25% para o número de folhas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm.

Médias seguidas pela mesma letra e número, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974).

Quanto ao número de sementes que apresentaram raízes, todos os níveis de concentração de nutrientes não interferiram no desenvolvimento dos tratamentos. No trabalho de Pessotti (2009) também não houve diferenças estatísticas quanto a

presença e ao número de raízes emitidas por sementes de *Vriesea sucrei* inoculadas em diferentes concentrações de meios MS e K (Knudson) interagindo com suportes ágar e papel.

Entretanto, o suporte hidrogel inibiu o crescimento radicular em todas as dosagens do meio nutritivo (Tabela 8). Além da ausência de raízes nos tratamentos com hidrogel, foram também observadas folhas deficientes em clorofila e folhas com acúmulo excessivo de água no interior das células. Este polímero hidroabsorvente tem como objetivo manter a umidade e fornecer água ao explante. Devido ao observado, é provável que tenha acontecido um caso de hiperhidricidade (vitrificação). Oliveira et al. (2008) observaram sintomas parecidos em plântulas de *Bidens pilosa* mantidas *in vitro* e inoculadas em meio MS gelificadas com ágar.

Suporte	Média
Hidrogel	0,000 a <sup>1</sup>
Esponja	0,089 a <sup>2</sup>
Ágar	0,423 a <sup>2</sup>
Papel	0,508 a <sup>2</sup>

Tabela 8 - Quadro de análise de variância do desdobramento de dose dentro de cada nível de suporte na presença de raízes nas sementes de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Sm. submetidas a 12 tratamentos germinativos

Médias seguidas pela mesma letra e número, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste *Scott-Knott* (1974).

Fuentes (2007) testou o efeito dos agentes geleificantes ágar e hidrogel no enraizamento *in vitro* de *Aloe vera* e os explantes que foram cultivados no hidrogel apresentaram aspecto translúcido e coloração pálida, típico de plantas vitrificadas, quando comparadas às que cresceram em meio ágar. Fernandez-Garcia et al. (2011) afirmaram que a hiperhidricidade é um dos principais problemas na micropropagação de plantas e esta anormalidade é recorrente em exemplares que são cultivadas em meios semi-sólidos ou líquidos. Constatam também que brotos hiperídricos não enraízam ou possuem menor formação radicular, sendo um processo geralmente considerado como reversível por ser de caráter fisiológico.

Na análise estatística do peso da massa fresca e massa seca, não foi possível realizar a pesagem individual em balança de precisão devido ao pouco material vegetal nas repetições de cada tratamento.

## 4 | CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho permitem concluir que:

- a concentração MS 25% apresentou número inferior de folhas e menor porcentagem de germinação quando interagidas com o suporte papel;

- dos suportes gelificantes, o ágar é o mais recomendado para o melhor desenvolvimento de *A. blanchetiana* quando em dose MS 100%;
- dos suportes para o meio líquido, a esponja é a mais recomendado para o melhor desenvolvimento de *A. blanchetiana* quando em dose MS 25%;
- os tratamentos utilizando hidrogel como suporte, não apresentaram desenvolvimento radicular e geraram hiperhidricidade;
- na busca de um suporte de fácil preparo, menor custo e bom desenvolvimento da planta, o suporte esponja em meio MS 25% apresentou as melhores condições;
- são necessários mais estudos para verificar o desenvolvimento dos explantes no processo de aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. In vitro germination of seeds and acclimatization of Macambira (*Bromelia laciniosa* Martius ex Schultes f.) seedlings. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 56, 2013.
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento in vitro de *Orthophytum mucugense* Neoregelia mucugensis, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1101-1103, 2007.
- FERNANDEZ-GARCIA, N. et al. ROS as biomarkers of hiperhydricit. In: GUPTA, D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. London Local: Sciences Publishers, Cap.12, p.249-272, 2011.
- FUENTES, R.; GONZÁLEZ, J. Efecto del agente gelificante y la concentración de ácido indolbutírico en el enraizamiento in vitro de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f). **Rev. Fav. Agron. (LUZ)**. 24 Supl. 1: 114-118, 2007.
- GROSSI, F. Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, J.E.Z.; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D. Caracterização isozimática e atividade de peroxidase em folhas de plantas hiperídrica, intermediária e normal de *Bidens pilosa* L. mantidas in vitro. **Ciências Agrotécnicas, Lavras**, v. 32, n. 1, p. 32-36, Feb, 2008.
- PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de bromélia**. Vicosa: UFV, 106p. 2004.
- PESSOTTI, K. **Propagação e conservação in vitro de *Vriesea sucrei* (L.B. Smith & R.W. Read): Bromeliaceae em perigo de extinção da Mata Atlântica**. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.
- REIS, E.S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v.55, n.3, p.160-7, 2008.
- ROCHA, M.A.C. **Multiplicação e conservação de bromeliáceas ornamentais**. 2010. 99 f. Tese

(Doutorado em Ciências Agrárias: Fitotecnia.) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2010.

ROSA, S. **Propagação e conservação in vitro de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. Tese de Pós-Graduação. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

SOUZA A.V., PINTO J.B.P., BERTOLUCCI S.K.Z., CORRÊA R.M.; CASTRO E.M. Germinação de embriões e multiplicação In Vitro de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciências Agrotécnicas**. Edição especial: p. 1532-1538, 2003.

TORRES, A.C.; CALDAS; I. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, Brasília, v. 1, 1998.

## ASPECTOS BOTÂNICOS, MORFOLÓGICOS, GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 04/11/2019

### Alessandra Carla Guimarães Sobrinho

Doutoranda no Programa de Pós-Graduação da Rede Bionorte no Museu Paraense Emílio Goeldi / Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará

Link para o currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/1785362621025680>

### Alberdan Silva Santos

Doutor em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Professor associado das Faculdades de Química e Biotecnologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará.

Link para o currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/5976702134131016>

### Rosana Silva Corpes

Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará.

Link para o currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/3492916607882520>

**RESUMO:** *Hibiscus sabdariffa* L. é originária do continente asiático, sendo posteriormente introduzida na África, de onde foi trazida ao Brasil na época do tráfico de escravos, devido ao clima das regiões tropicais e subtropicais a espécie é considerada naturalizada na flora

brasileira. Trata-se de uma espécie com poucas informações encontradas para análise de suas sementes bem a avaliação das estruturas presentes no crescimento e desenvolvimento da plântula. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi caracterizar a biométrica e determinar o padrão germinativo de sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. A biometria das sementes foi estabelecida através da caracterização 100 sementes, a qual foi distribuída em classes de frequência através de medidas de posição. O peso de mil sementes foi determinado utilizando oito sub amostras de 100 sementes. A curva de absorção de água das sementes, foi elaborada utilizando-se duas repetições de 10 sementes, pesadas em 21 intervalos para sementes normais e escarificadas. Os resultados demonstram que os aspectos biométricos das sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentaram valores máximos de largura, comprimento e espessura sendo 5,29 mm, 4,63 mm e 2,71 mm respectivamente. A absorção de água das sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentou padrão trifásico com necessidade de quebra de dormência. A germinação é do tipo epígea fanerocotiledonar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Índices biométricos, embebição, germinação, *Hibiscus*.

**ABSTRACT:** *Hibiscus sabdariffa* L. is originally from the Asian continent, and was later

introduced in Africa, from where it was brought to Brazil at the time of the slave trade, due to the climate of tropical and subtropical regions the species is considered naturalized in Brazilian flora. It is a species with little information found to analyze its seeds well the evaluation of the structures present in seedling growth and development. In this sense, the objective of this study was to characterize the biometric and to determine the germination pattern of *Hibiscus sabdariffa* L. seeds. Seed biometrics were established through the characterization of 100 seeds, which was distributed in frequency classes through position measures. The weight of Thousand seeds was determined using eight sub samples of 100 seeds. The seed water absorption curve was elaborated using two replicates of 10 seeds, weighed in 21 intervals for normal and scarified seeds. The results show that the biometric aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. seeds presented maximum values of width, length and thickness being 5.29 mm, 4.63 mm and 2.71 mm respectively. The water absorption of *Hibiscus sabdariffa* L. seeds presented three-phase pattern summable in need of dormancy smash. The germination is phanerocotylar and epigeal.

**KEYWORDS:** Biometric indices, soaking, germination, Hibiscus.

## 1 | INTRODUÇÃO

A família Malvaceae engloba aproximadamente 244 gêneros com 4225 espécies de ervas, arbustos e árvores (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016) como por exemplo, o *Hibiscus sabdariffa* L. Esta espécie possui diversos nomes populares, sendo os mais usados no inglês roselle, sorrel, red sorrel, florida cranberry, jamaica sorrel e em alguns países da África mais conhecida como karkadé (KINUPP; LORENZI, 2014). No Brasil é conhecido como vinagreira, hibisco, rosela, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, azeda-da-guiné, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosélia, bissap, oseille de guinée, karkadeh, groselha, quiabo-de-angola, groselheira, hibisco (BORRÁS-LINARES et al., 2015; SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016).

O *Hibiscus sabdariffa* L. trata-se de uma espécie com poucas informações encontradas para análise de suas sementes bem como eventos que regulam seu crescimento e desenvolvimento. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfometricamente sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. através de características biométricas, pois análises biométricas de sementes possibilitam análises de desvios na simetria de suas dimensões lineares (SANTIAGO; PAOLI, 2007), sendo associado com as informações sobre seu comportamento em função dos tratamentos de superação de dormência, pois a germinação das sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. é dificultada por uma série de fatores, assim a definição da metodologia mais adequada para sua germinação e de grande importância, uma vez que não há recomendações para esta espécie nas Regras para análise de Sementes (BRASIL, 2009), para assim ampliar o conhecimento existente acerca

dos aspectos germinativos no desenvolvimento pós-seminal para a espécie, de forma a compreender e ilustrar os aspectos morfológicos das sementes e plântulas caracterizando o processo de germinação do *Hibiscus sabdariffa* L.

## 1.1 Descrição botânica

A classificação botânica da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. é apresentada na Tabela 1 (OSMAN et al., 2011).

<b>Categorias Taxonômica</b>	<b>Grupos Taxonômicos</b>
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Subclasse	Dilleniidae
Ordem	Malvales
Família	Malvaceae
Gênero	<i>Hibiscus</i> L.
Espécie	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

Tabela 1. Classificação botânica da espécie *Hibiscus sabdariffa* L.

Fonte: OSMAN et al., (2011)

A espécie *Hibiscus sabdariffa* L. é uma herbácea anual, podendo atingir 2,4 m de altura, Os ramos são lisos de coloração verde ou avermelhada, crescem verticalmente e paralelos ao caule, tem raiz principal profunda, as folhas são alternadas, sem pelos e tricomas, de coloração verde e com margem serrilhada (KINUPP; LORENZI, 2014). As flores são solitárias, nas axilas das folhas e com pedúnculo curto, contendo cinco pétalas, de cor amarelas ou cremes. Os cálices possuem cinco grandes sépalas de intensa cor vermelha, no interior das capsulas estão as sementes, que possuem formato de rim e coloração marrom, de 3-5 mm de comprimento e cobertas por tricomas (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009).

## 1.2 Ocorrência e cultivo da espécie

O *Hibiscus sabdariffa* L. é originário do continente asiático, sendo posteriormente introduzido na África, de onde foi trazido ao Brasil na época do tráfico de escravos, sendo de fácil cultivo encontrado em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na Índia, Arábia Saudita, China, Malásia, Indonésia, Filipinas, Vietnã, Sudão, Egito, Nigéria e México (BORRÁS-LINARES et al., 2015; SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016). O clima das regiões tropicais e subtropicais favoreceram a permanência e

propagação desta espécie (MOHAMED, 2012). Neste sentido, acredita-se que este fator propiciou que a mesma conseguisse se naturalizar na flora brasileira. Na região norte do Brasil, há registros de naturalização de *Hibiscus sabdariffa* L. no Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima, em áreas de preservação ambiental (COELHO; AMORIM, 2019).

### 1.3 Morfologia da semente

Os caracteres morfológicos ou biométricos contribuem para estudos ecológicos relacionados ao conhecimento da espécie, mecanismos de dispersão, sucessão ecológica e regeneração natural, (GOGOSZ, 2015). Para Ferreira e Borghetti (2004), sementes consideravelmente maiores são associadas na literatura às plântulas com alto vigor, fotossinteticamente ativas, o que favorecerá sua sobrevivência em ambientes com baixa iluminação.

### 1.4 Aspectos da germinação

#### 1.4.1. Dormência das sementes

O fenômeno de dormência em sementes, geralmente ocorre após atingirem a maturidade fisiológica, estes advêm da adaptação da espécie as condições ambientais em que ela se reproduz (GUIMARÃES et al., 2006). Diversos métodos têm sido empregados visando à superação da dormência, principalmente quando se refere ao impedimento da entrada de água, tais como: a escarificação mecânica e química. Contudo, a aplicação e eficiência desses tratamentos dependem do grau de dormência, que é variável entre diferentes espécies, procedências e anos de coleta (OLIVEIRA et al., 2003).

As sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. são pequenas, brilhantes, de cor preta no final do estágio de maturação, e cerca de 20 a 30 sementes por fruto são geralmente encontradas. O tegumento é duro e maciço, o que pode estar associado a possíveis mecanismos de dormência (EICHELBERGER; MORAES, 2001) tendo dificuldade de absorção de água apresentando um mecanismo diferente para evitar a germinação. As camadas duras permitem a captação de água pelo embrião até certo ponto, mas impõem uma restrição mecânica à captação total de água necessária para a conclusão da germinação (SPERBER et al., 2017). Assim, um estudo de embebição (absorção de água) de sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. normais e escarificadas seria uma forma exploratória de se observar a absorção de água pelas sementes, pois o teor de água nestas, tem diferentes efeitos no processo de germinação, podendo influenciar tanto a porcentagem de germinação quanto a uniformidade (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010).

### 1.4.2 Germinação das sementes

A germinação é uma das fases mais sensíveis no ciclo de vida dos vegetais, que tem início com a hidratação dos tecidos. A absorção de água resulta na reidratação dos tecidos com a consequente intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que culminam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários à retomada de crescimento do eixo embrionário (REGO et al., 2011), sendo essencial para o desenvolvimento da germinação saber as condições ideais para que este processo ocorra normalmente, principalmente pelo fato de que as espécies podem apresentar respostas variadas em função de diferentes fatores (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. foram coletadas em um sítio particular localizado na Vila de Pau D'Arco município de Santa Bárbara do Pará estando a matriz localizada na área com as seguintes coordenadas geográficas S: 1° 15' 3,88"; O: 48° 16' 36,8 em 14 de julho de 2018 (Figura 1), com registro de atividades de acesso ao Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AF05B99.

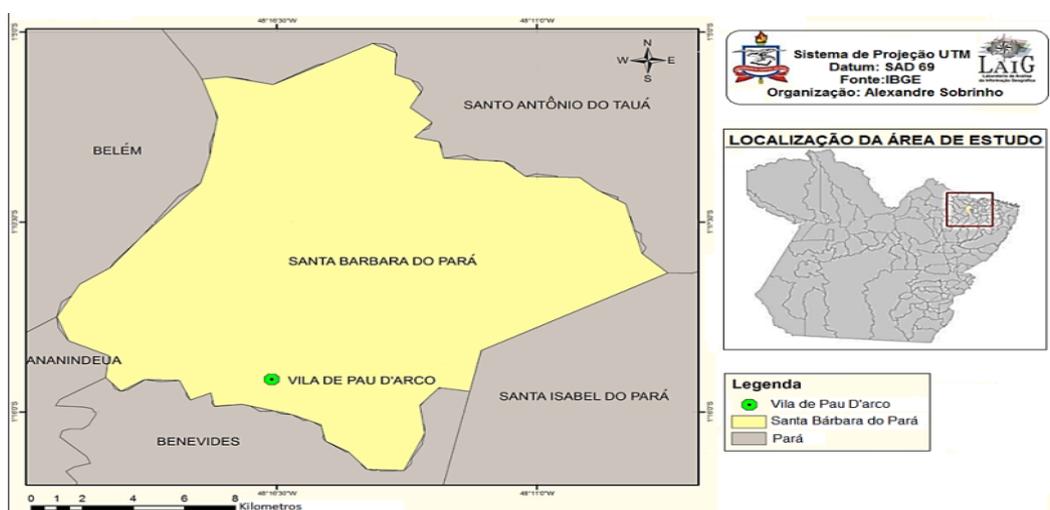


Figura 1: Área de coleta de *Hibiscus sabdariffa* L, no município de Santa Bárbara do Pará.

Fonte: LAIG/UFPa - Organização, 2019.

### 2.1 Beneficiamento das sementes

As sementes de *Hibiscus sabdariffa* L, foram coletadas manualmente dos cálices e acondicionadas em embalagem de papel e transportadas até o Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (*LabISisBio.*), localizado na Rua Augusto Correa, 01, Guamá, 66075-110 Belém, PA, da Universidade Federal do Pará.

Os ensaios consistiam em caracterização morfométrica das sementes (biometria) através de variáveis físicas (comprimento, largura, espessura e massa) observando-se valores máximos, mínimos e calculou-se a média, variância, desvio padrão e coeficiente de variação, e a caracterização tecnológica das sementes (determinação do grau de umidade, curva de embebição e germinação) todas analisadas em planilha eletrônica do software Microsoft EXCEL 2010.

## 2.2 Biometria das sementes

Foi executada a caracterização biométrica, através da seleção aleatória de 100 sementes normais dos lotes apresentados, divididos, visualmente, em três classes (pequena, média e grande), nas quais foram tomadas as medidas de comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm), com o auxílio de um paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm, enquanto a massa (g) das sementes foi determinada em balança analítica. Os dados de biometria das sementes foram analisados por meio das medidas de posição (médias, valores mínimo e máximo) e medidas de dispersão (desvio padrão e coeficientes de variação).

## 2.3 Determinação do grau de umidade por método de estufa

A determinação do grau de umidade das sementes foi feita pelo método de estufa à temperatura 105 °C por 24h com três repetições. Posteriormente para calcular o grau de umidade utilizou-se a equação descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

$$\% \text{ (umidade)} = 100 * (P-p)/P-t$$

Onde: P= peso inicial (peso do recipiente + peso da semente úmida); p = peso final (peso do recipiente + peso da semente seca); t= peso do recipiente com a tampa.

## 2.4 Peso de mil sementes e curva de embebição

O peso de mil sementes foi determinado de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se oito sub amostras de 100 sementes. Após a pesagem das oito sub amostras foi calculada a média, a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas pesagens. Além disso, realizou-se a curva de absorção de água para lotes de sementes normais e lotes com superação de dormência através da escarificação mecânica com lixa, friccionando-as manualmente na região oposta ao eixo embrionário (SILVA et al., 2011). Para cada lote utilizaram-se duas repetições para cada tempo de embebição. Antes de iniciar a embebição, cada lote contendo 10 sementes foram pesadas em

balança analítica digital com precisão de 0,1 mg para obtenção do peso inicial.

A embebição foi realizada em tubos cônicos de 10 mL contendo água destilada e acondicionadas em câmaras de germinação, tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B. O. D), reguladas com temperatura 30°C, após o início da embebição, em intervalos regulares, as sementes foram retiradas dos tubos cônicos, secadas em papel toalha e pesadas em balança de precisão. Os intervalos de pesagem foram a cada 2 horas durante o período de 12 horas e, subsequentemente, foram pesadas a cada 12 horas até atingir o ponto de saturação de água na semente e emissão da radícula, com os níveis de absorção nos seguintes intervalos em horas: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192. A curva de embebição foi calculada conforme metodologia descrita por Oliveira e Bosco (2013), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$GP = (Pf - Pi/Pi) \times 100$$

Onde: GP= ganho de peso; Pf= peso final; Pi= peso inicial das sementes antes da embebição

## 2.5 Desenvolvimento pós-seminal de plântulas de *hibiscus sabdariffa*

Para as análises das estruturas presentes nas etapas do desenvolvimento pós-seminal foi usado um vaso contendo substrato constituído por areia lavada mais areia preta, em proporção volumétrica de 1:1. Foram dispostas 50 sementes no vaso, cada uma a 0,5 cm de profundidade, observando diariamente os diferentes estádios de desenvolvimento das plântulas desde o entumescimento da semente até o surgimento das folhas verdadeiras. Os elementos vegetativos descritos foram radícula, tegumento, raiz principal, hipocótilo, cotilédone, epicótilo, raiz lateral.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Biometria e grau de umidade das sementes de *hibiscus sabdariffa*

Ao analisar os dados biométricos (Tabela 2) das sementes de *Hibiscus sabdariffa* L., observa-se valores máximos de largura, comprimento e espessura e estes foram 5,29 mm, 4,63 mm e 2,71 mm respectivamente a 9,28 % de umidade.

Biometria de sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.					
Estatística	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Massa (g)	Grau de umidade (%)
Mínimo	3,35	3,88	1,97	0,016	
Máximo	4,63	5,29	2,71	0,03	
Média	4,03	4,55	2,36	0,03	9,28
DP	0,23	0,31	0,15	0,01	
CV(%)	5,65	6,72	6,59	13,75	

Tabela 2. Parâmetros relacionados às características biométricas de sementes de *Hibiscus sabdariffa* L.

DP: desvio padrão. CV: coeficiente de variação.

Os parâmetros das sementes foram semelhantes aos encontrados por Omobuwajo et al. (2000), esses pesquisadores relataram uma faixa de largura de semente de 5,2 a 6,0 mm, uma faixa de comprimento de 4,7 a 5,6 mm e uma faixa de espessura de 2,5 a 3,1 mm, a 7,7% de umidade. O grau de umidade das sementes pode influenciar negativamente na germinação das mesmas, uma vez que baixos teores, em determinados casos, podem causar a morte do embrião. Além disso, é uma variável imprescindível em testes de laboratórios podendo influenciar diretamente no número de sementes por quilograma (SARMENTO et al., 2015).

### 3.2 Peso de mil sementes

O peso de mil sementes médio observado *Hibiscus sabdariffa* L. foi de 23,52 g, valor superior ao encontrado por Degu (2015), para a variedade WG-Hibiscus-Jamaica (22,53 g). A distinção das sementes por peso é uma que está relacionada ao nível e/ou estado de dormência, uma vez que sementes maiores e mais pesadas tendem a acumular mais reservas, fazendo com que a viabilidade de germinação seja acentuada, principalmente em sementes que possuem dormência tegumentar (ALVES et al., 2007).

### 3.3 Curva de embebição das sementes

No presente estudo a curva de embebição das sementes *Hibiscus sabdariffa* L. (Figura 2) se ajustaram ao modelo trifásico proposto por Bewley e Black (1994), com acelerada absorção de água nas primeiras 60 horas de embebição (Fase I), esta fase é caracterizada por ser um processo rápido, uma vez que se trata de uma atividade inteiramente física a qual depende somente da ligação da água a matriz das sementes, ocorrendo independentemente da semente ser viável ou não, seguida de absorção mais lenta até 144 horas (Fase II), diferente do primeiro estágio, esta fase possui duração bastante variável, no entanto, em sementes dormentes ela

pode ser consideravelmente prolongada e caracteriza uma etapa de pouca absorção de soluto e elevada atividade metabólica. Esta etapa é de enorme relevância para o sucesso do processo germinativo, pois segundo Guimarães et al., (2008), são ativados processos metabólicos inerentes ao crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo. A fase III é caracterizada por um aumento no conteúdo de água da semente, devido à emissão dos primórdios radiculares caracterizando o final da germinação.

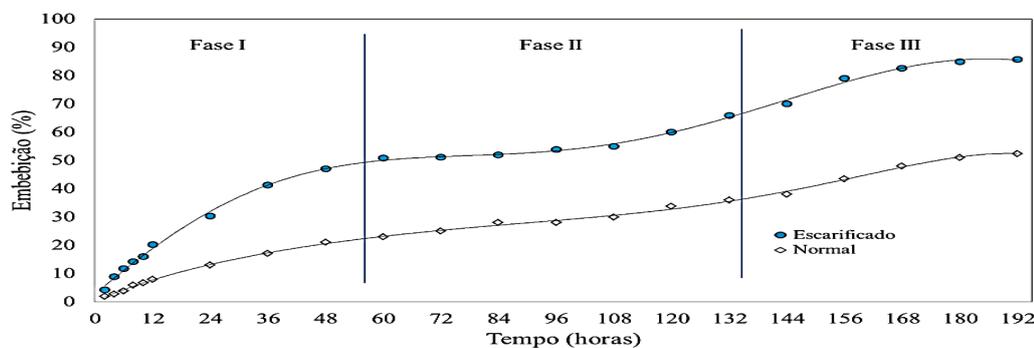


Figura 2: Curva de embebição sementes normais e escarificadas de *Hibiscus sabdariffa* L.

Fonte: Sobrinho et al., (2019)

Observou-se que as sementes que sofreram escarificação mecânica apresentaram um favorecimento a embebição, encurtando a primeira fase de germinação o que pode levar ao desenvolvimento hipocótilo em menor período de tempo (MORAIS et al., 2017). Estes resultados estão de acordo com os encontrados para espécies do gênero *Hibiscus* (AMARO et al., 2013), os resultados demonstram uma provável dormência física no *Hibiscus sabdariffa* L. impostas pelo tegumento, e as sementes que receberam escarificação prévia, apresentaram maior absorção de água em relação às sementes normais.

### 3.4 Fases de germinação das sementes de *hibiscus sabdariffa*

Importantes características de desenvolvimento foram observadas na germinação das sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. (Figura 3). As plântulas apresentaram-se com hipocótilo desenvolvido, cercado por cotilédones de cor verde desenvolvidos, com margens foliares fortemente serrilhadas e com sistema radicular estabelecido do tipo pivotante. Nos estágios iniciais de germinação, houve pouco desenvolvimento em tamanho e espessura da raiz principal sendo observado a presença de raízes laterais localizadas no terço superior e inferior da raiz principal.

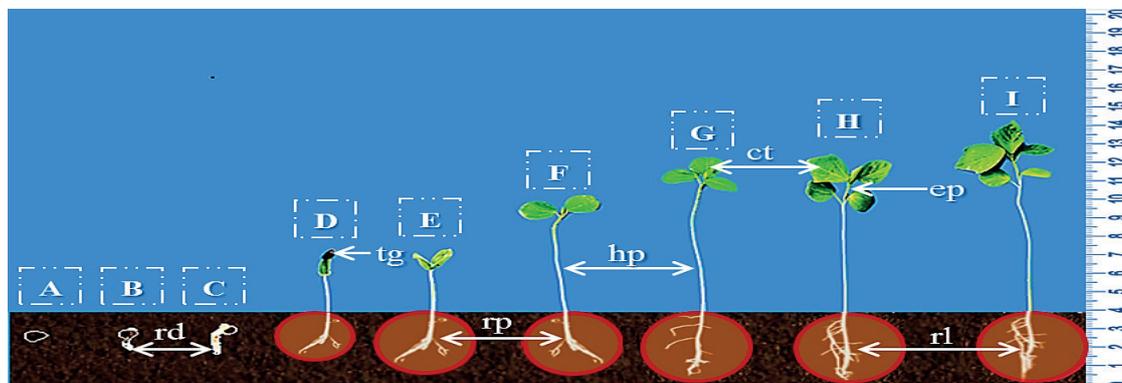


Figura 3: *Hibiscus sabdariffa* L. Estruturas presentes nas etapas do desenvolvimento pós seminal. (A)- Semente entumescida; (B)- Protusão da radícula; (C)- Alongamento da radícula; (D)- Diferenciação da alça hipocotilar, cotilédones presos ao tegumento, alongamento da raiz; (E)- Cotilédones totalmente livre do tegumento; (F)- Cotilédones totalmente desdobrados; (G)- Primeira folha verdadeira desdobrada; (H)- Segunda folha verdadeira desdobrada; (I)- Terceira folha verdadeira desdobrada; rd- radícula; tg- tegumento; rp- raiz principal; hp- hipocótilo; ct- cotilédone; ep- epicótilo; rl- raiz lateral.

Fonte: Sobrinho et al., (2019)

A germinação começa quando a semente absorve água e oxigênio (A). Esta germinação normalmente ocorre entre 5 a 6 dias após a semente. Foi observado que a radícula é pequena, de coloração esbranquiçada e fina (B e C). Pode ser observado que a germinação é do tipo epigea, caracterizada pela elevação dos cotilédones acima da superfície do solo, fanerocotiledonar, com o tegumento aderido aos cotilédones na fase inicial do crescimento das plântulas (D). O hipocótilo é de desenvolvimento monopodial, cercado por cotilédones desenvolvidos de cor verde (E). Os cotilédones normalmente emergem em pares de 10 a 35 dias após de semente. Um par de folhas foi considerado visível quando os cotilédones estão separados entre si (F). Primeira folha verdadeira desdobrada (G). Depois de cotilédones expostos na superfície do solo há o surgimento do epicótilo que é o ponto de crescimento subsequente evidenciando e formação da segunda folha verdadeira desdobrada (H) e terceira folha verdadeira desdobrada (I).

#### 4 | CONCLUSÕES

Diante dos resultados conclui-se que o estudo morfológico das sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentaram valores máximos de largura, comprimento, largura e espessura de 5,29 mm, 4,63 mm e 2,71 mm respectivamente, que contribuem para a germinação e vigor das plântulas. A espécie apresenta um processo germinativo relativamente rápido, mas, faz-se necessário o uso de mecanismos de escarificação para a maior absorção de água por parte da semente para a superação da dormência, seu comportamento em relação a absorção de água é adequado ao padrão trifásico de embebição, sua germinação é epigea com início entre cinco a seis dias após a

semeadura e as plântulas formadas são fanerocotiledonares.

Assim, os aspectos analisados são homogêneos e constantes, isto é, confiáveis, podendo auxiliar o reconhecimento da espécie seja em lotes de sementes ou nos estádios de desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E.U.; BRUNO, R.L.A.; ALVES, A.U.; ALVES, A.U.; CARDOSO, E.A.; GALINDO, E.A., BRAGA JUNIOR, J.M. **Germinação e biometria de frutos e sementes de *Bauhinia divaricata* L. (Leguminosae)**. Sitientibus Série Ciências Biológicas, v. 7, n.3, p.193-198, 2007.
- AMARO, H.T.R; DAVID, A.M.S.S, NETA; I.C.S, ALVES, D.D; SILVA F.G. **Avaliação fisiológica de sementes e crescimento de plântulas de vinagreira**. Com Sci. v.4, p.96-102, 2013.
- BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMAN, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; VAL-DÍAZ, R. D.; ANDRADE-GONZÁLES, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-LEYVA, J.F.; SEGURA-CARRETERO, A. **Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidante and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*)**. Industrial Crops and Products 69, p. 385-394, 2015.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análises de sementes**. Brasília. DF: MAPA/ ACS, 2009.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5ª ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 590, 2012.
- CHRISTENHUSZ, M.; BYNG, J. **The number of known plants species in the world and its annual increase**. Phytotaxa, v.261, p. 201-217, 2016.
- COELHO, C.A; AMORIM, B.S. **Expandindo a distribuição geográfica de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): uma espécie naturalizada e negligenciada para a flora brasileira**. Hoehnea, São Paulo , v. 46, n. 1, 2019.
- DEGU, B. **Influence of Variety and Plant Spacing on Yield and Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. Science, Technology and Arts Research Journal. v.4, p. 25-30, 2015.
- EICHELBERGER, L.; MORAES, D.M. **Preparo de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) para o teste tetrazólio**. Revista Brasileira de Sementes, Londrina, v. 23, n. 1, p. 154-158, 2001.
- FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 321p., 2004.
- GOGOSZ, A.M.; BOEGER, M.R.T.; COSMO, N.L.; NOGUEIRA, A.C. **Morfologia de diásporos e plântulas de espécies arbóreas da floresta com araucária, no sul do Brasil**. Floresta, v.45, n.4, p.819- 832, 2015
- GUIMARÃES, M.A.; DIAS, D.C.F.S.; LOUREIRO, M.E. **Hidratação de sementes**. Revista Tropical – Ciências Agrárias e Biológicas, v.2, n.1, p.31-39, 2008.
- GUIMARÃES, R.M.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, A.R.. **Aspectos fisiológicos de sementes**. Informe Agropecuário, v.27, n.232, p.40-50, 2006..
- KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**; São Paulo: Instituto Plantarum de

Estudos da Flora, 768p, 2014.

MAHADEVAN, N.; SHIVALI; KAMBOJ, P. **Hibiscus sabdariffa** Linn.- **An overview**. Natural Product Radiance, v.8, n.1, p.77-83, 2009.

MOHAMED, B.B.; SULAIMAN, A.A.; DAHAB, A.A. **Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, Cultivation and Their Uses**. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 1: p.48-54, 2012.

MORAIS, L.F; ALMEIDA, J.C.C.; NEPOMUCENO, D.D; MORENZ, M.J.F, DEMINICIS, B.B; CARVALHO, C.A.B; SILVESTRE, M.F. **Efeito da mastigação sobre a sobrevivência de sementes de leguminosas forrageiras tropicais e germinação**. Arch Zootec, v.66, p.131-135, 2017.

OLIVEIRA, A.B.; BOSCO, M.R.O. **Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Martius**. Revista Brasileira de Agroecologia, Cruz Alta, v. 8, n. 1, p. 66-74, 2013.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A.C.; CARVALHO, M.L.M. **Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)**. Revista Árvore, v.27, n.5, p.597-603, 2003.

OMOBUWAJO, T.; SANANI, L.; BALAMI, Y. **Physical properties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) seeds**. Journal of Food Engineering, v.45, n.1, 37-41, 2000.

OSMAN, M.; GOLAM, F., SABERI, S., MAJID, N.A.; NAGOOR, N.H.; ZULQARNAIN M. **Morpho-agronomic analysis of three roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) mutants in tropical Malaysia**. AJCS v.5, n.10, p.1150-1156, 2011.

REGO, S. S.; FERREIRA, M. M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F.; SOUSA, R. K.; BRONDANI, G. E.; ARAÚJO, M. A.; SILVA, A. L. L. **Estresse Hídrico e Salino na Germinação de Sementes de *Anadenanthera colubrina* (Veloso) Brenan**. Journal of Biotechnology and Biodiversity, Gurupi, v. 2, n. 4, p. 37-42, 2011.

SANTIAGO, E.F.; PAOLI, A.A.S. **Respostas morfológicas em *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard e *Genipa americana* L. submetidas ao estresse por deficiência nutricional e alagamento do substrato**. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 131-140, 2007.

SARMENTO, H.G.S.; SOUZA DAVID, A.M.S.; BARBOSA, M.G.; NOBRE, D.A.C.; AMARO, H.T.R. **Determinação do teor de água em sementes de milho, feijão e pinhão-mansão por métodos alternativos**. Energia Na Agricultura, v.30, n.3, p.250- 256, 2015

SCHWEMBER, A.R.; BRADFORD, K. J. **Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions**. Journal of Experimental Botany, p.1-14, 2010.

SILVA, P.E. DE M; SANTIAGO, E.F.; DALOSO, D. DE M.; SILVA, E.M.; SILVA, J.O. **Quebra de dormência em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers**. IDESIA (Chile), v.29, n.2, p. 39-45, 2011.

SOBOTA, J.D.F.; PINHO, M.G.; OLIVEIRA, V.B. **Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto**. Revista Fitos, v. 10, n. 1, p. 33-46, 2016.

SPERBER, K.; STEINBRECHER, T.; GRAEBER, K.; SCHERER, G.; CLAUSING, S.; WIEGAND, N.; HOURSTON, J.E.; KURRE, R.; LEUBNER-METZGER, G.; MUMMENHOFF, K. **Fruit fracture biomechanics and the release of *Lepidium didymum* pericarp-imposed mechanical dormancy by fungi** Nat Commun, v., p. 1868, 2017.

## BIOATIVIDADE DO D-LIMONENO NO CONTROLE DE *Botrytis cinerea* PERS.: FR. ISOLADO DE ROSEIRA

Data de aceite: 20/01/2020

Data de Submissão: 07/11/2019

### Christian Aparecido Demetrio

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-  
ESALQ/USP

Piracicaba- São Paulo

<http://lattes.cnpq.br/3973594000252814>

### Jéssica Fernanda de Oliveira Jacob

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-  
ESALQ/USP

Piracicaba- São Paulo

<http://lattes.cnpq.br/0038617779673873>

### Patricia Fabretti Kreycki

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-  
ESALQ/USP

Piracicaba- São Paulo

<http://lattes.cnpq.br/5450662816716191>

### Paulo Hercílio Viegas Rodrigues

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-  
ESALQ/USP

Piracicaba- São Paulo

<http://lattes.cnpq.br/5675208562828473>

**RESUMO:** A rosa se destaca como a cultura mais tradicional no setor de flores de corte. A principal perda na pós-colheita dessa cultura é a contaminação por fungos. O mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) é a doença que ocasiona prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos

nessa cultura. Seu controle não é simples e o uso de produtos alternativos tem sido estudado. O uso de monoterpenos originados de óleos essenciais pode ser uma alternativa. O objetivo do estudo foi avaliar a bioatividade do D-limoneno no controle de mofo cinzento da roseira. Nas concentrações (ml.L<sup>-1</sup>) de T1 (0,0); T2 (0,30); T3 (0,60); T4 (0,90); T5 (1,20) e T6 (1,5) foi obtido o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM). Os resultados indicam que as doses entre T2 e T5 apresentaram bioatividade no controle do mofo cinzento.

**PALAVRAS-CHAVE:** floricultura, mofo cinzento, terpenos, óleos essenciais.

### D-LIMONENE BIOACTIVITY CONTROL IN *Botrytis cinerea* PERS.: FR. FROM ROSE

**ABSTRACT:** Rose stands out as the most traditional crop in the cutting flower sector. The main loss in the postharvest of this crop is contamination by fungi. Grey mold (*Botrytis cinerea*) is the sick that causes an esthetic, qualitative and quantitative damage in this culture. Its control is not simple, and the use of alternative products have been studied. The use of monoterpenes originating from essential oils may be an alternative. The aim of this study was to evaluate the bioactivity of D-limonene in the control of gray mold. In concentrations (ml. L<sup>-1</sup>) T1 (0.0); T2 (0.30); T3 (0.60); T4 (0.90);

T5 (1.20) and T6 (1.5) the Mycelial Growth Velocity Index (MGVI) was obtained. The results indicate that the doses between T2 and T5 showed bioactivity in the control of gray mold.

**KEYWORDS:** flower culture, gray mold, terpene, essential oil.

## 1 | INTRODUÇÃO

A produção de flores e plantas ornamentais é um setor tecnificado e promissor no agronegócio brasileiro, respondendo por resultados econômicos positivos e com indicadores percentuais de desempenho acima da média obtida por outros setores da produção rural recente. No ano de 2017, o setor movimentou o montante de R \$ 6,9 bilhões, no nível do consumidor final, com crescimento de pouco mais de 6% em relação ao ano anterior, sustentando um desempenho econômico favorável. Até 2018, o valor estimado para essa cadeia produtiva é de R \$ 7,2 bilhões, um aumento de 4% em relação ao ano anterior (JUNQUEIRA & PEETZ, 2018).

A rosa se destaca como a cultura mais tradicional no setor de flores de corte e corresponde a 30% do que é cultivado na floricultura (JUNQUEIRA & PEETZ, 2017). A principal perda pós-colheita em rosas se deve a contaminação por fungos. A espécie *Botrytis cinerea* é o agente causal do mofo cinzento, doença que ocasiona prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos. Nas flores, os sintomas variam desde pequenas manchas descoloridas e úmidas, lesões necróticas até a destruição completa das pétalas e botão. Em caules e hastes, a doença apresenta-se na forma de manchas de coloração marrom em torno dos pecíolos de folhas e pedúnculos afetados (TOFOLI, 2011). A infestação deste fungo pode encurtar o prazo de validade de vários produtos, causando grandes perdas (TRIPATHI et al., 2008). Uma maior incidência de fungos é comum durante o armazenamento e transporte, devido à produção de etileno, predispondo as flores à infecção. (ELAD et al., 2014).

Muitas vezes, o controle de doenças fúngicas é feita de maneira incorreta pelo produtor, já que poucos produtos são registrados para culturas da floricultura, ocasionando problemas de contaminação e de resistência do fungo a certos princípios ativos (GHINI & KIMATI, 2002). O cultivo sustentável e responsável tem atraído vários produtores de flores em busca de alternativas viáveis e rentáveis. Contudo, um número reduzido de informações e resultados de pesquisa não permitem que novas tecnologias sejam aplicadas ao cultivo de rosas. Desse modo, o uso de produtos alternativos no controle de algumas doenças fúngicas, dentre eles o D-limoneno, contribuem para o desenvolvimento de novas práticas culturais na floricultura.

O D-limoneno, monoterpene cíclico, é o maior constituinte do óleo essencial de citrus. As diversas formas do limoneno têm sido utilizadas, como ingrediente ativo ou inerte, em inseticidas (ISMAN, 2006), como solventes, desengraxantes e agentes

de limpeza (KIM et al 2013). De baixa toxicidade para o ser humano, é utilizado ainda na indústria alimentícia como flavorizante e na farmacêutica em tratamentos de redução de colesterol e cálculos biliares (IGIMI et al, 1991).

Estudos da atividade antifúngica de uma série de óleos essenciais, dentre eles o D-limoneno, foram constatados resultados promissores desse óleo contra *Aspergillus niger* e *Penicillium digitatum*, com destaque para a capacidade do D-limoneno em inibir a atividade da enzima celulase nesses fungos (MAREI et al, 2012).

Devido a importância da cultura da rosa e a busca do estabelecimento de novas formas de controle alternativas, objetivou-se avaliar a bioatividade do D-limoneno no controle de mofo cinzento da roseira.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais do Departamento de Produção Vegetal (LPV), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba – SP.

Os isolados patogênicos de *Botrytis cinerea* foram obtidos a partir de isolamento direto de estruturas fúngicas de rosas infectadas, coletadas em área de produção comercial de Holambra, estado de São Paulo. Para o isolamento, estruturas fúngicas presentes nas pétalas coletadas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose e Ágar) com o auxílio de microscópio estereoscópico. Cinco isolados purificados foram mantidos em câmaras de crescimento do tipo BOD, a 23 °C e sob fotoperíodo de 12 horas.

Para o teste de crescimento micelial, foram preparadas placas de Petri, de 9,0cm de diâmetro, com meio BDA fundente (50°C) acrescido dos tratamentos de D-limoneno (Pro-Lyks® - verde) - óleo incolor e solúvel em água (13,8 mg.L<sup>-1</sup> a 25°C), nas concentrações (ml.L<sup>-1</sup>) de T1 (0,0); T2 (0,30); T3 (0,60); T4 (0,90); T5 (1,20) e T6 (1,5). Na avaliação do crescimento micelial, um isolado purificado foi selecionado ao acaso e colocou-se um disco de 7,0mm de diâmetro do micélio da cultura pura do patógeno no centro de cada placa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental composta por uma placa de Petri. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD à 23°C. Realizou-se a medição do diâmetro das colônias, em posição ortogonal a cada 24 horas até que o tratamento atingisse o diâmetro total da placa de Petri. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do IVC, através da equação:

$$\sum \frac{(d - da)}{N}$$

Na qual:

IVCM= Índice de Velocidade de Crescimento Micelial,  $d$ = diâmetro atual da colônia,  $da$ = diâmetro da colônia do dia anterior,  $N$ = número de dias após a inoculação.

Os valores obtidos nos tratamentos foram submetidos a análise de regressão polinomial através do programa computacional R (R CORE TEAM, 2019)

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do crescimento micelial de *B. cinerea* nas diferentes doses de D-limoneno avaliadas demonstram a inibição do crescimento micelial a partir da dose 0,3 ml/l até 1,2 ml/l. A análise de regressão permite observar que o controle do crescimento micelial foi crescente até a dose de 1,2 ml/l (Gráfico - 1) e ocorreu em seis dias. São poucos os produtos à base de D-limoneno existentes no mercado prontos para uso. No caso do produto utilizado, não existe recomendação do fabricante para o uso como fungicida, mas sim como adstringente natural de origem vegetal, podendo ser utilizado na agricultura orgânica para higienização e sanitização nas doses de 1,0 a 5,0 ml/l (Registros no IBD certificações como insumo aprovado e na ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

A atividade antifúngica do D-limoneno foi observada *in vitro* contra *Trichophyton rubrum*. Os resultados demonstraram que o vapor volátil do D-limoneno, na concentração de volume de ar de 1 $\mu$ l/800ml, inibiu o crescimento de *T. rubrum* no interior de Phytatrays® (Sigma). Ao remover a fonte do D-limoneno, o crescimento do fungo ocorreu após 72 horas, comprovando o efeito do vapor desse óleo essencial no controle do desenvolvimento do fungo (CHEE et al, 2009). O mecanismo de ação antifúngica dos monoterpenos não está totalmente compreendida. Mesmo assim, estudos indicam que os agentes lipofílicos dos monoterpenos atuam em diferentes níveis alterando a permeabilidade da membrana celular fúngica (MAREI et al, 2012; COX et al, 2000).

Em T6 (1,5 ml/l) ocorreu estímulo no desenvolvimento do fungo (Figura 1). Nessa dose pode ter ocorrido o efeito Hormese, isto é, estimulação de baixa dose e inibição de alta dose ou vice-versa. Este efeito é um fenômeno comum e amplamente generalizável, e pode representar a plasticidade fenotípica e adaptação de um organismo ao ambiente (CALABRESE e MATTSON, 2011). No caso do presente estudo, o fungo *Botrytis cinerea* apresentou essa capacidade adaptativa que foi manifestada na maior dose avaliada.

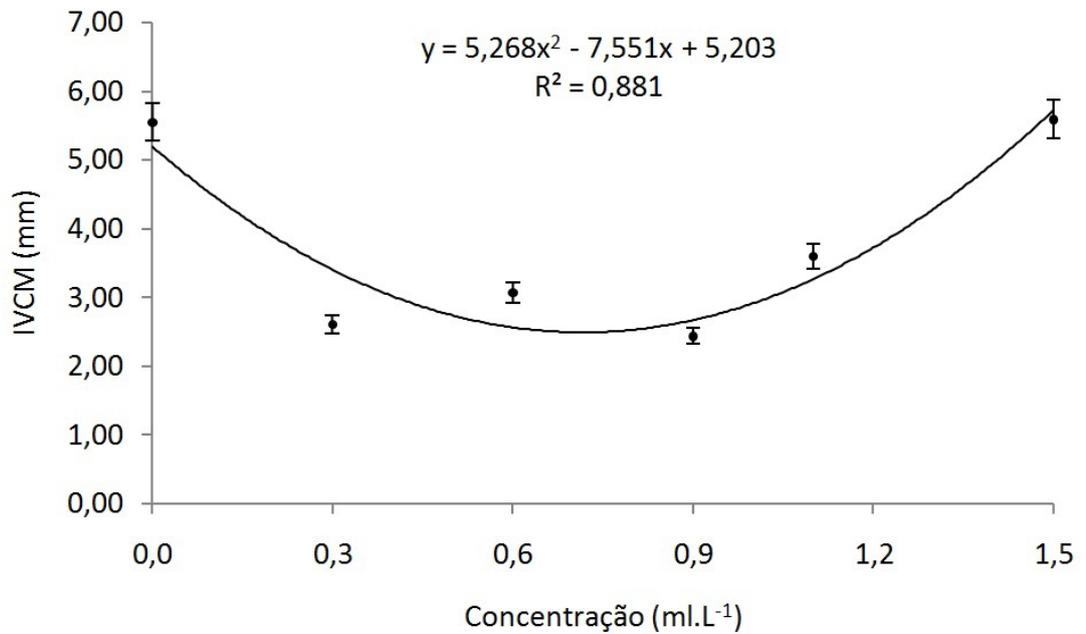


Figura 1 – Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Botrytis cinerea*, nos diferentes tratamentos de D-limoneno (ml.L<sup>-1</sup>).

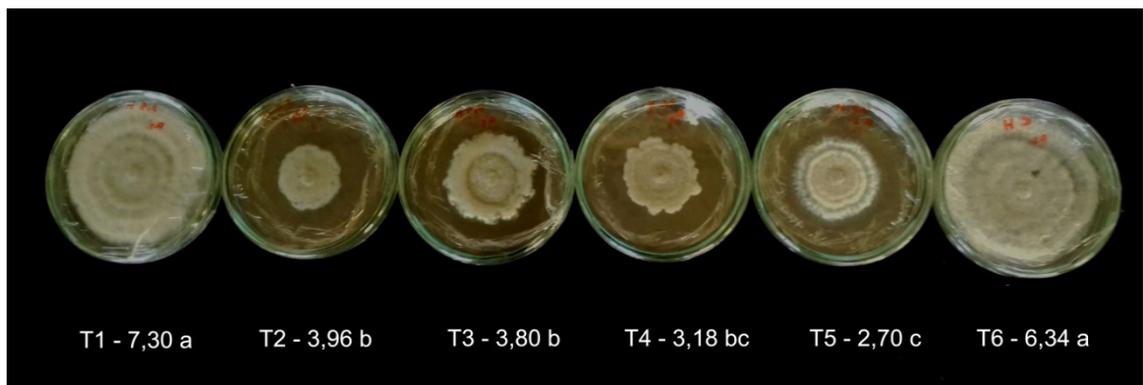


Figura 2- Bioatividade do D-limoneno em *Botrytis cinerea*, expressa pelo Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM).

#### 4 | CONCLUSÕES

O D limoneno apresenta bioatividade em *Botrytis cinerea* nas doses de 0,3 ml/l a 1,2 ml/l.

Foi constatado efeito hormese na dose 1,5ml.

#### REFERÊNCIAS

CALABRESE, E.J.; MATTSON, M.P.J. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 5, p. 25–38, 2011.

CHEE, H.Y.; KIM, H.; LEE, M.H. In vitro Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**.v. 37, p. 243-246, 2009.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**. Oxford, v. 88, p. 170-175, 2000.

ELAD, Y.; EVENSEN, K. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**. v. 85, p. 637-643, 1995.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna:Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

IGIMI, H.; TAMURA, R.; TORAISHI, K.; YAMAMOTO, F.; KATAOKA, A.; IKEJIRI, Y.; HISATSUGU, T.; SHIMURA, H. Medical dissolution of gallstones. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 36, p. 200-208, 1991.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual review of entomology**. v. 51, p. 45-66, 2006.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n. 2, p.155-162,2018. Disponível em: <<https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/1253/793>>.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. S. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. **Ornamental Horticulture**. v. 23, n. 2, p. 178-184, 2017. Disponível em:<<https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/1070/719>>.

KIM, Y.W.; KIM, M.J.; CHUNG, B.Y.; BANG, D.Y.; LIM, S.K.; CHOI, S.M.; LIM, D.S.; CHO, M.C.; YOON, K.; KIM, H.Y.; KIM, B.K.; KIM, Y.S.; KWACK, S.J.; LEE, B.M. Evaluation and Risk Assessment of D-Limonene, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.16:1 p. 17-38, 2013.

MANFREDINI, G. M.; PAIVA, P.D.O.; ALMEIDA, E.F.A.; NASCIMENTO, A.M.P.; SALES, T.S.; SANTOS, L.O. Postharvest quality of essential oil treated roses. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 192-199, 2017. Disponível em: <<https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/993/725>>..

MAREI, G.I.K.; RASOUL, M.A.; ABDELGALEIL, S.A.M.; Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.103, l.1, p. 56-61, 2012.

R C. T.; A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2019. Disponível em < <https://www.R-project.org/>>.

TÖFOLI, J.G.; FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; NOGUEIRA, E.M.C. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Instituto Biológico**. v.73, n.1, p.11-20. 2011.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K.; SHUKLA, A.K. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. **World journal of microbiology & biotechnology**.v.24, l.1, p. 39-46, 2008.

## BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO E ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE DNA EM *Dietes bicolor* (IRIDACEAE), UMA IMPORTANTE ESPÉCIE ORNAMENTAL

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 04/11/2019

### Aryane Campos Reis

Universidade Federal de Juiz de Fora, Dep. de  
Biologia

Juiz de Fora– MG

ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7130316406868595>

### Isabel Teresa Silva Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora, Dep. de  
Biologia

Juiz de Fora– MG

ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0325853578086244>

### Saulo Marçal de Sousa

Universidade Federal de Juiz de Fora, Dep. de  
Biologia

Juiz de Fora– MG

ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1072595667261078>

**RESUMO:** O gênero *Dietes* (Iridaceae), destaca-se por possuir espécies amplamente usadas na ornamentação devido à presença de flores exuberantes de fácil cultivo e boa adaptação a diversos tipos de solos. Embora as espécies sejam bastante utilizadas no paisagismo de casas, praças e jardins, pouco se sabe sobre a constituição cromossômica das espécies. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar citogeneticamente a espécie *Dietes bicolor* por meio de análises de bandeamento com

fluorocromos base-específicos (DAPI/CMA<sub>3</sub>) e estimar a quantidade de DNA nuclear por meio de citometria de fluxo. Para isso, folhas do padrão de referência (*Pisum sativum*) foram maceradas juntamente com folhas jovens de *D. bicolor*, em tampão WPB. A suspensão de núcleos resultante foi filtrada em uma malha de 40 $\mu$ m e então foi adicionado 30 $\mu$ L do corante iodeto de propídeo (1 mg/ml). As amostras foram analisadas em triplicatas no citômetro de fluxo. Para a análise citogenética, meristemas radiculares oriundos de sementes foram pré-tratados com solução bloqueadora 8-hidroxiquinoleína (0,003M) por 10h e fixados em etanol e ácido acético (3:1). A digestão da parede celular foi realizada com solução enzimática Pectinase Celulase (2:20) durante 3h a 37°C, em seguida lâminas foram confeccionadas por meio da técnica de dissociação celular seguida de secagem ao ar. Lâminas previamente analisadas foram submetidas ao bandeamento com os fluorocromos DAPI (específico para regiões ricas em AT) e Cromomicina A<sub>3</sub> (específico para regiões CG), permitindo a identificação de regiões heterocromáticas. A partir dos resultados, obtidos foi possível identificar que a espécie possui 2C = 17,93 pg de DNA. O cariótipo é composto por 2n = 40 cromossomos, apresentando 8 sítios terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, sendo sete marcas localizadas em braços curtos e uma marca localizada no braço

longo. Estas informações são inéditas para a espécie e contribuem para uma melhor caracterização cariotípica de *D. bicolor*, uma importante espécie ornamental.

**PALAVRAS-CHAVE:** citogenética; cromossomo; citometria de fluxo.

**ABSTRACT:** The genus *Dietes* (Iridaceae), is known to present species widely used in ornamentation due to the presence of beautiful flowers of easy cultivation and good adaptation to various types of soil. Although the species are widely used in the landscaping of houses, squares and gardens, little is known about the chromosomal constitution of the species. The aim of present work was to characterize the species *Dietes bicolor* by base-specific fluorochromes (DAPI/CMA<sub>3</sub>) banding analysis and to estimate the amount of nuclear DNA by flow cytometry. For this, reference standard leaves (*Pisum sativum*) were macerated with young leaves of *D. bicolor* in WPB buffer. The nuclei suspension was filtered through a 40µm mesh and then 30µl of the propidium iodide (1mg / ml) was added. Samples were analyzed in triplicate on the flow cytometer. For cytogenetic analysis, root meristems from seeds were pretreated with 8-hydroxyquinoline solution (0.003M) for 10h and fixed in ethanol and acetic acid (3v: 1v). Cell wall was removed with Pectinase and Cellulase (2:20) solution for 3h at 37°C. Slides were prepared by cellular dissociation technique followed by air drying. Previously analyzed slides were stained with DAPI (specific for AT rich regions) and Chromomycin A<sub>3</sub> (specific for CG regions) fluorochromes, in order to detect heterochromatic regions. From the results, it was possible to identify that the species has 2C = 17.93 pg of DNA content. The karyotype is composed of 2n = 40 chromosomes, with 8 CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> terminal sites, seven marks located in short arms and one mark located in the long arm. This is the first description of heterochromatin distribution for the species and contributes to a better karyotypic characterization of *D. bicolor*, an important ornamental species.

**KEYWORDS:** chromosome; cytogenetics; flow cytometry.

## 1 | INTRODUÇÃO - CITOTAXONOMIA

Freqüentemente a distinção de plantas morfologicamente similares corresponde a uma tarefa difícil, sendo muitas vezes ambígua e/ou contraditória, em função da ausência de caracteres que auxiliem na identificação. Assim, análises citológicas têm sido extensivamente reconhecidas como ferramentas auxiliares para a taxonomia de plantas, visto que o genoma e o número cromossômico não são influenciados por fatores ambientais, constituindo, portanto, bons referenciais para a caracterização de espécies, assim como para o entendimento da evolução das mesmas (STTEBINS, 1971; SHAN, et al., 2003; SADER, et al., 2019).

Dentre os critérios básicos para a classificação e descrição citológica, as análises do nível de ploidia e conteúdo de DNA (*C-value*) por meio da técnica de citometria de fluxo têm sido amplamente usadas no reconhecimento e distinção de espécies, auxiliando em problemas taxonômicos e evolutivos (DOLEZEL, 2007). Segundo

Dolezel et al., (2007), a estimativa da quantidade de DNA tem sido realizada em vários grupos de plantas, principalmente em espécies que apresentam semelhanças ou diferenças morfológicas devido à plasticidade fenotípica. Além disso, esse método tem se mostrado eficiente no estudo de genomas vegetais, principalmente pela reprodutibilidade, precisão e rapidez, além de requerer pequenas quantidades de tecido vegetal para as análises (DOLEZEL e BARTOS, 2005; SOUZA et al. 2019).

Com relação aos estudos citogenéticos, as descrições cariotípicas têm contribuído na caracterização de espécies, ancestralidade e detecção de poliploides e híbridos nos mais variados grupos vegetais. Descrições sobre o número, tamanho, morfologia e presença de constrições secundárias dos cromossomos correspondem a critérios essenciais para a caracterização de um táxon. Além disso, técnicas de bandeamento cromossômico e Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) também são extensivamente utilizadas na taxonomia (SADER, et al. 2019; REIS et al. 2014; BOGUNIC et al. 2011; CHESTER, et al. 2011).

O bandeamento C e a coloração com fluorocromos base-específicos permitem identificar diferentes tipos de heterocromatina através de uma coloração diferencial ao longo dos cromossomos (SUMNER, 2003). O fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub> (CMA) e a quinacrina são específicos para regiões ricas em GC (SCHWEIZER, 1976) enquanto o Hoechst 33258 e o DAPI são específicos para regiões ricas em AT (GUERRA e SOUZA, 2002).

Algumas espécies com problemas taxonômicos e com cariótipo estável podem revelar intensa variação estrutural, quando analisados com bandeamento C ou com fluorocromos. É o caso, por exemplo, do gênero *Cycas*, que apresenta espécies e subespécies com número e morfologia cromossômica bastante estáveis, possuindo, no entanto, quantidade e qualidade variáveis de heterocromatina em diferentes espécies e subespécies (KOKUBUGATA e KONDO, 1996). Em *Citrus*, é possível diferenciar os cromossomos em oito categorias, de acordo com a distribuição de heterocromatina rica em GC ao longo dos cromossomos (CARVALHO et al., 2005; MARQUES et al., 2011). Em *Passiflora*, a técnica de GISH associada ao bandeamento cromossômico DAPI/CMA permitiu a identificação de híbridos e parentais (SILVA et al., 2018). Em espécies de *Jaborosa*, foi possível detectar alterações cromossômicas estruturais ocorridas ao longo da diversificação do grupo por meio de bandeamentos cromossômicos (CHIARINI, 2016). Assim, fica claro o quanto a caracterização citogenética baseada nos perfis de heterocromatina auxilia na descrição de espécies e contribui na taxonomia de diversos grupos vegetais.

## 2 | CITOGENÉTICA DE *DIETES BICOLOR*

A família Iridaceae, destaca-se por possuir espécies com flores exuberantes,

muito usadas na ornamentação. No Brasil, os gêneros mais utilizados no paisagismo são *Iris*, *Neomarica*, *Trimezia*, *Gladiolus*, *Dietes* e *Crocasmia*, sendo os três primeiros nativos do país e os três últimos representados por espécies exóticas (LORENZI e SOUZA, 2001). Além da importância ornamental, algumas espécies também são utilizadas na fitoterapia (apresentando ações antifúngicas e antibacterianas) e na culinária (CARPELLARI JUNIOR, 2000; HOSSEINZADEH et al., 2005).

Dentre as espécies utilizadas na ornamentação, *Dietes bicolor* corresponde a uma espécie amplamente empregada no paisagismo de casas, praças e jardins. Sua resistência às variações ambientais, fácil cultivo, aliada às características atraentes das flores a torna uma espécie interessante para o mercado de plantas ornamentais. No entanto, embora a espécie seja muito utilizada no paisagismo, existem poucos estudos sobre descrições cariotípicas. Os dados se restringem apenas ao número cromossômico ( $2n=40$ ) (GOLDBLATT, 1981).

Assim, tendo em vista o potencial ornamental e a escassez de estudos citogenéticos para o grupo, nós propusemos caracterizar citogeneticamente a distribuição da heterocromatina por meio da coloração diferencial dos fluorocromos DAPI/CMA<sub>3</sub>, além de estimar a quantidade de DNA por meio da técnica de citometria de fluxo em indivíduos de *Dietes bicolor* coletados em Juiz de Fora, MG.

### 3 | MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Sementes de *D. bicolor* coletadas no município de Juiz de Fora (MG) foram escarificadas por abrasão e germinadas em placas de *petri* contendo papel filtro umedecido com 2 mL de água destilada. As plântulas originadas foram transplantadas para vasos contendo terra e substrato (1:1). Meristemas radiculares foram coletados para análises citogenéticas e folhas jovens foram coletadas para as análises de estimativa da quantidade de DNA.

#### 3.2 Estimativa da quantidade de DNA

Para a estimativa do conteúdo de DNA, folhas de plântulas jovens foram maceradas juntamente ao tecido foliar do padrão interno de referência *Pisum sativum* (9,09 pg de DNA) (DOLEZEL et al., 2007), em 700 µL do tampão WPB (LOUREIRO et al., 2007). A suspensão de núcleos resultante foi filtrada em uma malha de 50 µm e o produto do filtrado coletado em um tubo de poliestireno. A coloração dos núcleos foi realizada com a adição de 25 µL de iodeto de propídio (1mg/mL). Além disso, 5 µL de RNase (1mg/mL) foram acrescentados à mistura com a finalidade de diminuir possíveis interferências ocasionados por moléculas de RNA durante a leitura das

amostras.

As análises foram realizadas em triplicatas a partir de 10 indivíduos. Aproximadamente 5.000 núcleos foram analisados por amostra, em citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Os histogramas gerados foram analisados utilizando-se o programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA obtido segundo a fórmula proposta por DOLEZEL e BARTOS (2005):

$$\text{Amostra (2C)} = \frac{\text{Valor observado no canal do pico da espécie}}{\text{Valor observado no canal do pico do padrão}} \times \text{Quantidade de DNA do padrão interno}$$

### 3.3 Confeção de Lâminas

Para a análise citogenética, meristemas radiculares foram pré-tratados com o bloqueador mitótico 8-hidroxiqiloneína (HQ) 0,003M por 10 horas a 4°C. Decorrido o bloqueio, os meristemas foram lavados em água purificada, e devidamente fixados em etanol e ácido acético (3:1) por no mínimo 24 horas a 4 °C. A remoção da parede celular ocorreu a partir da solução enzimática Pectinase (Sigma) e Celulase (Serva-Onozuka R-10) nas concentrações de 20% e 2%, respectivamente, por cerca de 4 horas a 37 °C. As lâminas foram confeccionadas a partir da técnica de dissociação celular com secagem ao ar (CARVALHO, 1993; 1997) e coradas com 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, EUA).

### 3.4 Bandeamento cromossômico DAPI/CMA<sub>3</sub>

Para a caracterização da heterocromatina rica em GC, lâminas envelhecidas, previamente selecionadas foram submetidas ao protocolo de bandeamento de acordo com SCHWEIZER (1976). Aproximadamente 30 µL de CMA<sub>3</sub> (0,1mg/mL) foram adicionados às lâminas, e estas foram incubadas em câmara escura por uma hora. Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada e em seguida foi adicionado 30 µL de distamicina (DA) por 30 minutos. Sequencialmente, as lâminas foram coradas com DAPI (1µg/mL), incubadas durante 30 minutos e montadas em meio Antifade. As análises foram realizadas em microscopia de epifluorescência Olympus BX51 com um conjunto de filtros apropriado.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível confirmar o número cromossômico de *D. bicolor* de 2n=40, como previamente descrito por Goldblatt e Takei (1997). O conteúdo de DNA estimado foi de 2C = 17,93 pg (Fig. 1), um valor elevado, quando se compara o *C-value* de outras espécies vegetais (GREILHUBER e LEITCH, 2013). De acordo com as análises, *D. bicolor* apresenta o cariótipo simétrico com cromossomos

metacêntricos e submetacêntricos (Fórmula Cariotípica = 11m + 9sm) (Fig 2). Esta simetria cariotípica também pode ser observada em outras espécies de *Dietes* e em outros gêneros de Iridaceae, como em *Belamcanda*, por exemplo (ALVES, 2008). Considerando o número básico do gênero como  $x=10$ , provavelmente, *D. bicolor* corresponde a uma espécie tetraploide.

Com relação ao bandeamento cromossômico, nós encontramos oito sítios terminais CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, sendo sete sítios localizados no braço curto e um sítio no braço longo. Adicionalmente, foi possível observar heteromorfismos entre alguns pares cromossômicos. Os cromossomos VII e XIX apresentaram variação quanto à presença de marcas CMA<sup>+</sup>. Relatos de heteromorfismos já foram observados em outros gêneros de Iridaceae e são considerados frequentes na família, especialmente na tribo Tigrideae (ALVES, 2008; SENGUPTA e SEM, 1988). Rearranjos cromossômicos como inversões e translocações são sugeridos para explicar as diferenças entre homólogos, e segundo os autores, tais variações teriam um importante valor adaptativo para as espécies, as quais se mostram bastante adaptadas ao ambiente em que vivem (GOLDBLATT, 1982; BELTRÃO e GUERRA, 1990).

Embora todas as marcas CMA<sup>+</sup> tenham sido observadas nas porções terminais dos cromossomos, grandes diferenças quanto à dimensão das marcas e brilho dos sinais foram detectados. Isso pode ser explicado por mecanismos capazes de alterar sequências repetitivas. Frequentemente, regiões de heterocromatina constitutiva são formadas por repetições de nucleotídeos *in tandem*, que são susceptíveis a várias alterações estruturais, como: duplicação de segmentos, deleção de sequências, transposição, entre outras. Todos estes rearranjos auxiliam na diferenciação de cariótipos e contribuem para a diversificação das espécies ao longo do tempo (HLOUŠKOVÁ et al. 2019; CHESTER et al. 2011).

Estas informações são inéditas para a espécie e contribuem para uma melhor caracterização cariotípica, que poderá ser utilizada para estudos futuros de pré-melhoramento genético. Além disso, os resultados somam informações relevantes para a evolução cariotípica no gênero e levantam discussões sobre a estrutura dos cromossomos e composição cariotípica de *D. bicolor*, uma importante espécie ornamental.

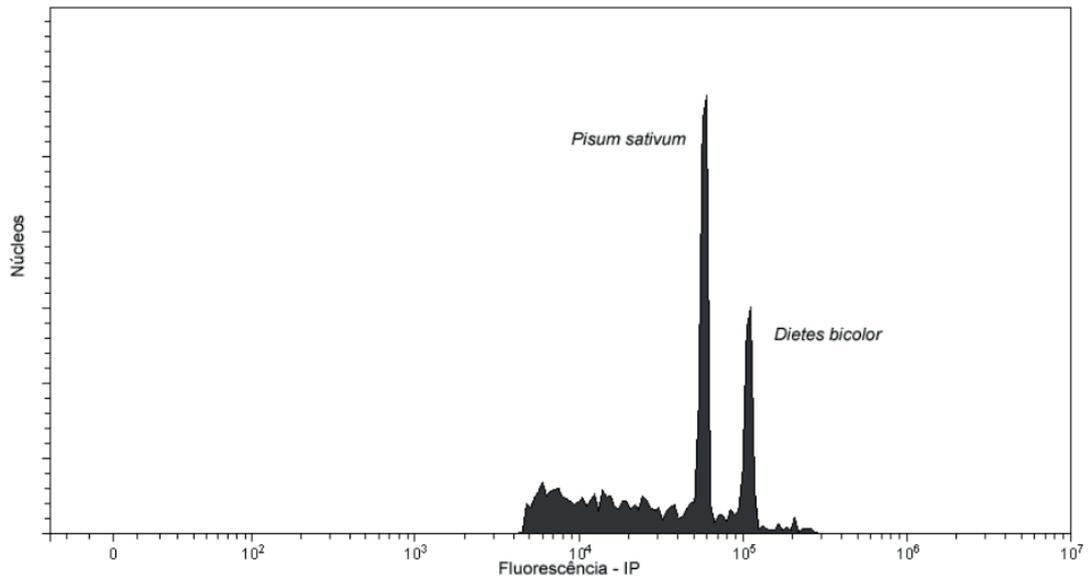


Fig 1: Histograma representativo da quantidade de DNA de *Dietes bicolor* ( $2C = 17,93$  pg). O padrão interno de referência utilizado foi *Pisum sativum* ( $2C = 9,09$  pg).

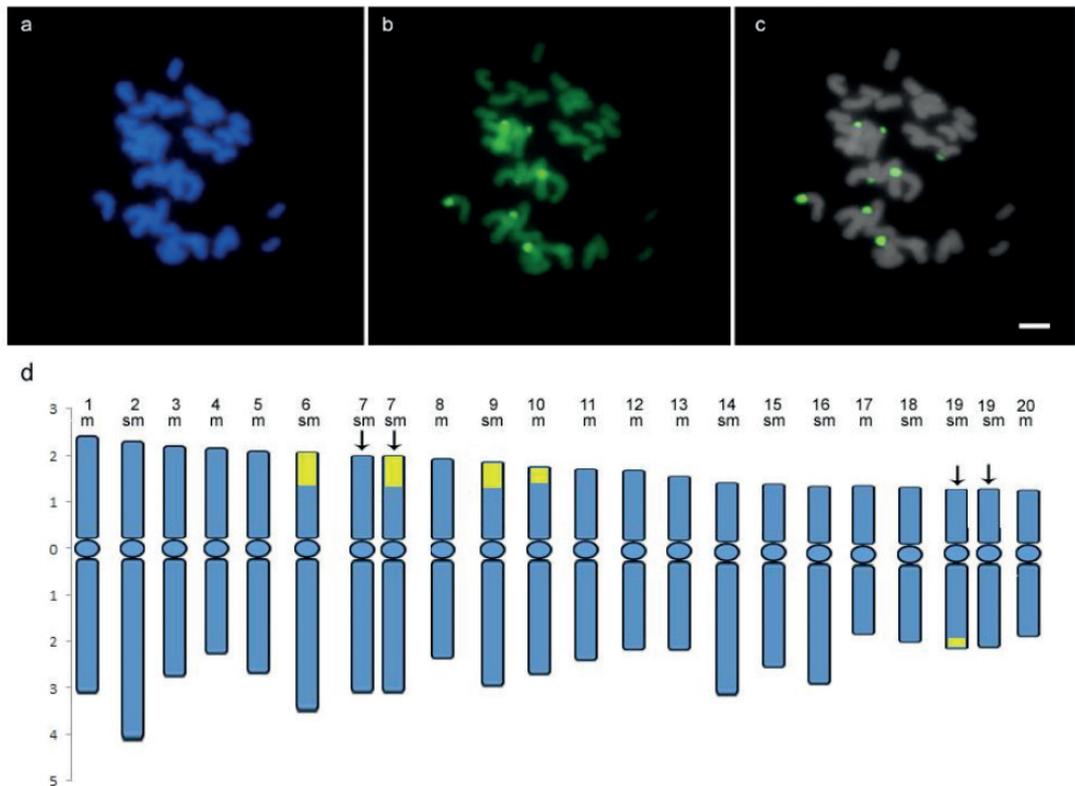


Fig 2. Metáfases de *Dietes bicolor* ( $2n=40$ ) coradas os fluorocromos: a) DAPI e b)  $CMA_3$ . C) sobreposição das colorações DAPI/ $CMA_3$ . d) Idiograma representativo dos cromossomos de *Dietes bicolor*. As setas indicam heteromorfismo de pares cromossômicos; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico. Barra =  $5\mu m$ .

## REFERÊNCIAS

ALVES, L I F. **Citogenética de espécies de Iridaceae ocorrentes no nordeste do Brasil**. Tese 2008, p.109

BELTRÃO G. T. A., GUERRA M. **Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco - III**. Ciência e Cultura. São Paulo. (1990), p. 839-845.

- BOGUNIC, F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; MURATOVIC, E.; BALLIAN, D. **Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics.** Plant Biology, (2011) n13, p.194–200.
- CARPELLARI JUNIOR L. **Revisão taxonomica do gênero *Neomarica* Sprague (Tribo Mariceae, Subfamília Iridoideae, Iridaceae).** Campinas, São Paulo. (2000).
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. **A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes.** Heredity, (1993)v. 70, n. 4, p. 515-519.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. **High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes.** Journal of Plant Research (1997) v. 110, n. 5, p. 417-420.
- CARVALHO R, SOARES FILHO WS, BRASILEIRO-VIDAL AC, GUERRA M. **The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison.** Cytogenet Genome Res, (2005) n.109, p. 276- 282.
- CHESTER M A, GALLAGHERA J P; SYMONDSB V V; SILVA A V C,, MAVRODIEVD E V; LEITCH E A R; SOLTIS P S; SOLTIS E D. **Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae).** PNAS (2011) p.1-6
- CHIARINI F, MORENO N., MORE M.; BARBOZA G. **Chromosomal changes and recent diversification in the Andean genus *Jaborosa* (Solanaceae).** Botanical Journal of the Linnean Society, (2016) n.183, p.57–74.
- DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. **Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size.** Annals of Botany,(2005) v.95, n.1, p.99–110.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes.** Weinheim, Czech Republic: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, (2007) p. 454.
- GREILHUBER, J.; LEITCH, I. J. **Genome size and the phenotype.** In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes. Vienna: Springer, 2013. cap. 20, p. 323-344.
- GOLDBLATT P. **Systematics, phylogeny and evolution of *Dietes* (Iridaceae).** Ann. Missouri Bot. Gard. (1981) v.68, p.132–153
- GOLDBLATT, P. **Chromosome Cytology in Relation to Suprageneric Systematics of Neotropical Iridaceae.** Systematic Botaniy. Missouri Botanical Garden: St. Louis, Missouri, 1982.
- GOLDBLATT, P.; TAKEI, M. **Chromosome Cytology of Iridaceae: Patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change.** Ann. Missouri Bot. Gard. (1997) v 84, p.285-304.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.
- HOSSEINZADEH, H.; SADEGHNIA, H. R.; DANAEE, ZIAEE, T.; DANAEE, A. **Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats.** J Pharm Pharmaceut Sci, (2005) v. 8, p.387-393.
- KOKUBUGATA, G.; KONDO, K. **Differential fluorescent-banding patterns in chromosome of four species *Cycas* (Cycadaceae).** Botanical Journal of the Linnean Society (1996) v. 120, n. 1, p. 51-55.

LORENZI H., SOUZA H. M. **Plantas Ornamentais do Brasil: Arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** In: Lorenzi H., Souza H. M (eds.) **Família Iridaceae.** Instituto Plantarum, São Paulo (2001), pp. 576-597.

LOUREIRO, J. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal.** Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal. 2007.

MARQUES A., FUCHS J., MA L., HECKMANN S., GUERRA M., HOUBEN A. **Characterization of Eu- and Heterochromatin of *Citrus* with a Focus on the Condensation Behavior of 45S rDNA Chromatin.** Cytogenet Genome Res (2011), v.134, p.72–82

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M. O.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VIEIRA, R. F.; VICCINI, L. F. ***Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyloid complex?** American Journal of Botany (2014) v. 101, n. 6, p. 1002-1012.

SADER MA; AMORIM, B. S.; COSTA L; SOUZA, GUSTAVO; PEDROSA-HARAND, A. **The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae).** Systematics and Biodiversity (2019) v. 1, p. 1-15.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER J. A. **Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae).** Botanical Journal of the Linnean Society (2003) v. 142, n. 2, p. 309-320.

SCHWEIZER, D. **Reverse fluorescent chromosome chromosome banding with chromomycin and DAPI.** Chromosoma (1976) v. 58, n. 2, p. 307-324,

SILVA G.S, SOUZA M.M., MELO C.A.F, URDAMPILLETA J.D., FORNI-MARTINS E.R. **Identification and characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using FISH and GISH.** BMC Genetics (2018) v.19, 1-11

SOUZA, GUSTAVO; COSTA, LUCAS ; GUIGNARD, MAÏTÉ S. ; VAN-LUME, BRENA ; PELLICER, JAUME ; GAGNON, EDELINE ; LEITCH, ILIA J. ; Lewis, Gwilym P. **Do tropical plants have smaller genomes? Correlation between genome size and climatic variables in the *Caesalpinia* Group (Caesalpinioideae, Leguminosae).** Perspectives in plant ecology evolution and systematics (2019) v. 1, p. 1

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function.** New York, Blacwell Science, 2003. 287 p.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants.** Bristol: J. W. Arrowsmith, (1971)

VOSA, C. G. **Heterochromatin recognition with fluorochromes.** Chromosoma, v.

## INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Leucaena leucocephala* (FABACEAE) E AVALIAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 05/11/2019

### Danielle Carvalho Pinto

Universidade Federal de São João del-Rei  
Divinópolis-MG  
<http://lattes.cnpq.br/0830770786508733>

### Mairon César Coimbra

Universidade Federal de São João del-Rei  
Divinópolis-MG  
<http://lattes.cnpq.br/9064803050046162>

### Ana Hortência Fonsêca Castro

Universidade Federal de São João del-Rei  
Divinópolis-MG  
<http://lattes.cnpq.br/8427649163529950>

**RESUMO:** A cultura de calos é uma técnica de cultivo que possibilita a obtenção de compostos bioativos *in vitro*. Este estudo teve como objetivos induzir calos em segmentos nodais de *Leucaena leucocephala*, estabelecer a curva de crescimento de calos e avaliar os teores de fenóis e flavonoides totais. Explantes nodais foram colocados em meio WPM 50%, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. O material foi incubado na presença e ausência de luz e após 30 dias foram avaliados a cor e consistência dos calos, matéria fresca e seca e teores de fenóis e flavonoides totais. A curva de crescimento de calos foi estabelecida pela

inoculação de novos segmentos nodais em meio WPM 50% acrescido de 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, na ausência de luz. Observou-se entre 95% a 100% de indução de calos independente do tipo e concentração dos reguladores de crescimento utilizados, na presença ou ausência de luz. Os calos apresentaram coloração branca, verde e marrom e foram predominantemente friáveis. Em geral, calos induzidos com 2,4-D e luz apresentaram maior acúmulo de biomassa. Calos induzidos na presença de 9,04 e 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D na presença de luz e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP, na ausência de luz apresentaram os maiores teores de fenóis totais e aqueles induzidos na presença de 17,75  $\mu\text{M}$  de BAP, na ausência de luz apresentaram os maiores teores de flavonoides totais. A curva de crescimento de calos apresentou um padrão sigmoidal com quatro fases distintas: fase lag (0-28 dias), fase exponencial (29-63 dias), linear (64-84 dias) e estacionária (85-133 dias). Não foi detectada a fase de declínio. Maiores teores de fenóis e flavonoides totais foram observados no explante inicial e durante a fase lag. Estes resultados demonstram o potencial biotecnológico dos calos de *L. leucocephala* e indicam a possibilidade da conservação da espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cerrado, planta medicinal, cultivo *in vitro*, calos, compostos fenólicos.

## CALLUS INDUCTION IN NODAL SEGMENTS OF *Leucaena leucocephala* (FABACEAE) AND ASSESSMENT OF TOTAL PHENOL AND FLAVONOIDS CONTENTS

**ABSTRACT:** Callus culture is an culture technique that enables the *in vitro* production of bioactive compounds. The aim of this study was to induce callus in nodal segments of *Leucaena leucocephala*, to establish the callus growth curve and to evaluate total phenol and flavonoids contents. Nodal explants were placed on 50% WPM médium added with different concentrations of 2,4-D and BAP. The explants were incubated in the presence and absence of light and after 30 days, the callus color and consistency, fresh and dry matter and phenol and total flavonoid contents were evaluated. The callus growth curve was established from new nodal segments placed on 50% WPM médium added with 18.10  $\mu\text{M}$  2,4-D, in the absence of light. Between 95% and 100% callus induction was observed, regardless of the type and concentration of growth regulators used, in the presence or absence of light. The calli showed white, green and brown color and it was predominantly friable. In general, callus induced with 2,4-D and light showed higher fresh and dry matter. Callus induced in the presence of 9.04 and 18.10  $\mu\text{M}$  2,4-D in the presence of light and 8.88  $\mu\text{M}$  BAP in the absence of light had the highest total phenol contents and those induced in the presence of 17.75  $\mu\text{M}$  BAP, in the absence of light showed the highest total flavonoids content. The callus growth curve presented a sigmoidal pattern with four distinct phases: lag (0-28 days), exponential (29-63 days), linear (64-84 days) and stationary (85-133 days). No decline phase detected. Higher total phenols and flavonoids contents were observed in the initial explant and during the lag phase. These results demonstrate the biotechnological potential of *L. leucocephala* callus and indicate the possibility of the species conservation.

**KEYWORDS:** Brazilian Cerrado, medicinal plant, *in vitro* culture, callus, phenolic compounds.

### 1 | INTRODUÇÃO

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae) foi introduzida inicialmente no Brasil para arborização urbana e recuperação de áreas degradadas, devido à sua relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, melhorando a fertilidade dos solos (OLIVEIRA, 2008; COSTA; DURIGAN, 2010). Na medicina tradicional é utilizada para doenças estomacais, como anticoagulante e para tratamento alternativo e complementar da Diabetes (CHOWTIVANNAKUL et al., 2016; OLIVA et al., 2000). Segundo Almeida et al. (2006), suas atividades medicinais estão associadas à presença de galactomananas, polissacarídeos sulfatados e compostos de natureza fenólica. Fatores como plasticidade e tolerância a ambientes extremos, além de dormência tegumentar apresentada pelas sementes tornam *L. leucocephala* propícia para o cultivo *in vitro* (FONSECA; JACOBI, 2011). A cultura de células e tecidos

de plantas é uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada para promover a preservação e propagação de espécies vegetais de difícil cultivo e minimizar o extrativismo predatório (PINHAL et al., 2011).

A cultura de tecidos é uma técnica de crescimento de células, tecidos e órgãos em um meio nutritivo artificial, isolado da planta mãe. O cultivo *in vitro* pode minimizar os efeitos da variação de fatores ambientais bióticos e abióticos, assim como se pode conseguir um maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes. Como resultado, a produção de compostos de valor econômico torna-se mais viável. A propagação de plantas por meio de cultura de tecidos, baseia-se no princípio da totipotência, o qual considera que cada célula vegetal tem o potencial para regenerar uma planta inteira. Assim, este princípio pode ser aplicado na regeneração de plantas, a partir de culturas celulares e de tecidos (GEORGE, 2008).

Segundo Fumagali et al. (2008), dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a cultura de calos pode resolver alguns problemas relacionados à utilização de plantas para obtenção de metabólitos bioativos (princípios ativos). Calos são tecidos que podem apresentar diferenciação parcial, constituídos por uma massa de células irregulares, que se multiplicam desordenadamente, em resposta a injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciarem em tecidos e órgãos (SMITH, 2012). Para a obtenção dos calos é necessário determinar o meio de cultura adequado para a inoculação e manutenção destes tecidos. A otimização do meio de cultivo é realizada modificando-se a composição mineral e orgânica com atenção especial para o balanço de reguladores de crescimento (auxina/citocinina) que governam os mecanismos de diferenciação e dediferenciação celular (GEORGE, 2008). A adição de reguladores de crescimento tem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Durante a calogênese é importante se estabelecer a curva de crescimento de calos, o que propicia a identificação das fases distintas de crescimento da espécie. A partir deste estudo, pode-se determinar o momento exato de repicagem dos calos para um meio fresco ou a possibilidade de sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos bioativos (SMITH, 2012).

Até o presente momento, não foram encontrados relatos na literatura sobre a indução de calos em segmentos nodais e avaliação de compostos fenólicos em *L. leucocephala*, fato este que estimulou a escolha da espécie para o presente estudo.

## 2 | OBJETIVOS

Desenvolver um protocolo eficiente para indução de calos em *L. leucocephala* empregando-se segmentos nodais e avaliar os teores de fenóis e flavonoides totais,

visando futura obtenção de suspensões celulares.

## 3 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Material vegetal

Amostras do material vegetal foram coletadas e herborizadas. As exsicatas foram identificadas pela Dra. Andréia Fonseca Silva e depositadas no Herbário PAMG/EPAMIG sob o número de registro PAMG 58034.

As sementes foram coletadas em julho de 2016, em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Divinópolis, situado na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, a 712m de altitude, 20°10'45,9"S de latitude e longitude 44°55'07,2"W GRW. A coleta foi registrada junto ao SISBIO sob no 24542-7 e o trabalho foi cadastrado na Plataforma SISGEN (Cadastro nº A88527D).

### 3.2 Germinação *in vitro*

Os segmentos nodais utilizados como fonte de explante para indução dos calos foram obtidos a partir de plântulas de *L. leucocephala* com 30 dias de idade, provenientes de sementes germinadas *in vitro*, em meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981), com 50% da concentração de sais. Antes da inoculação, as sementes foram desinfestadas com NaOCl 25% por 20 minutos e lavadas em água autoclavada por cinco vezes. A seguir, as sementes foram excisadas e inoculadas em tubos contendo 15 mL de meio WPM 50%, suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. As sementes foram transferidas para sala de crescimento a 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e monitoradas semanalmente para verificação de oxidação, contaminação do meio e dos explantes e percentagem de sementes germinadas.

### 3.3 Indução de calos

Segmentos nodais foram inoculados em meio WPM com 50% de sais, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e acrescidos dos reguladores de crescimento 2,4-D (0; 4,52; 9,05; 18,10 μM) e BAP (0; 4,44; 8,88; 17,75μM). Os meios foram solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Os explantes foram transferidos para sala de crescimento, nas mesmas condições descritas anteriormente. Diariamente foram monitoradas a taxa de oxidação e contaminação dos explantes e aos 54 dias foram avaliadas a porcentagem de indução de calos, cor, consistência, a matéria seca e fresca dos calos e teores de fenóis e flavonoides

totais.

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, constituído por diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, ausência e presença de luz e 20 repetições, em um total de 280 parcelas.

### 3.4 Preparo de extrato hidroetanólico

Aproximadamente 200 mg de calos secos foram submetidos por três vezes à extração com 10 mL de etanol 70%, sob maceração e agitação constante em aparelho ultrassom, durante 30 minutos, segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira IV (BRASIL, 1988). Após, os extratos foram filtrados, reunidos e secos em estufa à 40°C. Para os doseamentos, os extratos secos foram ressuspensos em etanol 70%.

### 3.5 Teores fenólicos totais

Os teores de fenóis totais foram determinados por meio do método de Folin-Ciocalteu, segundo Pastrana-Bonilla et al. (2003), a partir da construção de uma curva de calibração, empregando-se como padrão, uma solução de ácido gálico 100 mg L<sup>-1</sup>. As determinações foram feitas em triplicata e o resultado expresso em microgramas de equivalentes de ácido gálico, por miligrama de extrato seco ( $\mu\text{g}$  EqAG mg<sup>-1</sup> EB).

### 3.6 Teores de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados pelo método do cloreto de alumínio, segundo metodologia proposta por Stahl e Schild (1981), modificada por Woisky e Salatino (1998). Os teores de flavonoides totais foram calculados com base na construção da curva de calibração, empregando-se como padrão uma solução de rutina 100  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup>. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em microgramas de equivalentes de rutina, por miligrama de extrato seco ( $\mu\text{g}$  EqR mg<sup>-1</sup> EB).

### 3.7 Curva de crescimento dos calos

O estabelecimento da curva de crescimento de calos foi realizado a partir da inoculação de novos segmentos nodais em meio WPM 50%, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e acrescido de 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Os meios foram solidificados com ágar, na proporção de 7 g L<sup>-1</sup> e o pH ajustado para 5,7  $\pm$  0,1. Os explantes foram transferidos para sala de crescimento e incubados na ausência de luz, à temperatura de 25  $\pm$  1°C. A cada 7 (sete) dias, amostras constituídas por 15 calos foram coletadas e monitoradas, por meio da determinação da matéria fresca e seca. A seleção das

amostras foi realizada de forma aleatória, através do sorteio dos tubos a cada dia de avaliação. Os teores de fenóis e flavonoides totais também foram avaliados. O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado.

### 3.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e analisados estatisticamente utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados empregando-se o software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011). Utilizou-se o Teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade, para comparação dos contrastes entre médias dos tratamentos.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Indução de calos e avaliação dos fenóis e flavonoides totais

A indução de calos ocorreu na presença de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, na ausência e presença de luz. Em meios contendo BAP a indução iniciou-se a partir do 9º dia após inoculação e em 2,4-D, a partir do 14º dia. Em ambos os tratamentos se observou uma porcentagem de indução de 95 %.

Os calos apresentaram colorações que variaram entre verde, marrom e branco, sendo aqueles induzidos em ausência de luz, principalmente em meios com BAP, com baixos valores de matéria fresca e seca (Figura 1, Tabela 1).

Na presença de luz, predominaram calos friáveis marrons e verdes e na ausência de luz obteve-se calos friáveis, com coloração branca e regiões marrons (Figura 1). A coloração esverdeada, na presença de luz, pode ser explicada pela presença de clorofila, cuja síntese é influenciada pela luz (FUKUDA et al., 2008). A influência da luz na indução de calos também foi relatada para *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae), onde calos friáveis foram obtidos na ausência de luz (COIMBRA et al., 2017). Segundo Mustafa et al. (2011) e Souza et al. (2011), os calos friáveis são caracterizados por células isodiamétricas, com alta frequência de divisões celulares e são ideais para o estabelecimento de suspensões celulares.

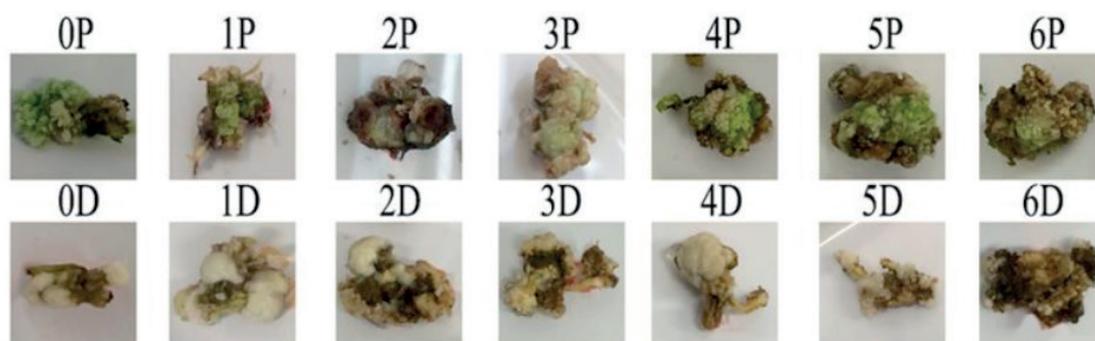


Figura 1. Aspecto geral dos calos produzidos nos diferentes tratamentos. P = presença de luz; D = ausência de luz (0= ausência de regulador de crescimento; 1= 4,52; 2= 9,05; 3= 18,10  $\mu\text{M}$ )

de 2,4-D e 4= 4,44; 5= 8,88; 6= 17,75  $\mu\text{M}$  de BAP).

Tratamento	Regulador de Crescimento	Presença de luz			
		MF* (g)	MS* (g)	Consistência	Coloração
1	4,52 $\mu\text{M}$ 2,4-D	0,49 $\pm$ 0,17	0,07 $\pm$ 0,16	F	VERDE
2	9,05 $\mu\text{M}$ 2,4-D	0,57 $\pm$ 0,12	0,08 $\pm$ 0,02	F	VERDE
3	18,10 $\mu\text{M}$ 2,4-D	0,68 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,02	F	VERDE/MARROM
4	4,44 $\mu\text{M}$ BAP	0,60 $\pm$ 0,29	0,08 $\pm$ $\pm 0,04$	F	VERDE/MARROM
5	8,88 $\mu\text{M}$ BAP	0,81 $\pm$ 0,26	0,10 $\pm$ 0,03	F	VERDE/MARROM
6	17,75 $\mu\text{M}$ BAP	0,88 $\pm$ 0,19	0,10 $\pm$ 0,02	F	MARROM

Tratamento	Regulador de Crescimento	Ausência de luz			
		MF* (g)	MS* (g)	Consistência	Coloração
1	4,52 $\mu\text{M}$ 2,4-D	0,31 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,01	C	BRANCO
2	9,05 $\mu\text{M}$ 2,4-D	0,47 $\pm$ 0,10	0,06 $\pm$ 0,01	C/F	BRANCO/ MARROM
3	18,10 $\mu\text{M}$ 2,4-D	0,46 $\pm$ 0,13	0,05 $\pm$ 0,02	F	BRANCO/ MARROM
4	4,44 $\mu\text{M}$ BAP	0,12 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,01	C/F	BRANCO/ MARROM
5	8,88 $\mu\text{M}$ BAP	0,16 $\pm$ 0,09	0,02 $\pm$ 0,01	C/F	BRANCO
6	17,75 $\mu\text{M}$ BAP	0,28 $\pm$ 0,09	0,04 $\pm$ 0,01	F	BRANCO/ MARROM

Tabela 1. Matéria fresca (MF) e matéria seca (MS), consistência e coloração dos calos induzidos a partir de explantes nodais de *L. leucocephala*. F= frível; C= compacto. \*Média  $\pm$  desvio padrão.

Na ausência de luz, calos induzidos na presença de 2,4-D apresentaram maiores teores de fenóis totais (Figura 2A).

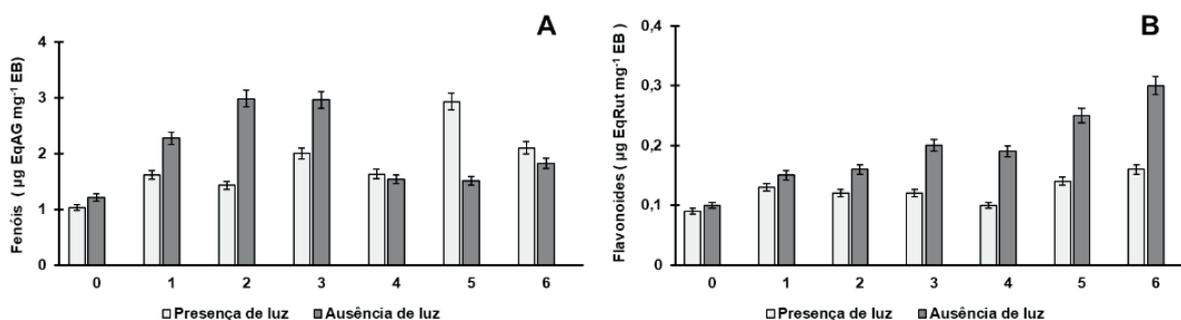


Figura 2. Teores de fenóis (A) e flavonoides (B) totais em calos de *Leucaena leucocephala*. 0= sem regulador de crescimento; 1= 4,52; 2= 9,05; 3= 18,10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4= 4,44; 5= 8,88; 6= 17,75  $\mu\text{M}$  de BAP.

Elevados valores de metabolitos secundários, foram relatados por Nunes et al. (2016), em seu estudo sobre a *Leucaena leucocephala*. Esses autores demonstraram uma correlação direta entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Calos induzidos na ausência de luz, em diferentes concentrações de 2,4-D e BAP apresentaram rendimentos significativamente superiores de flavonoides totais, aos encontrados na presença de luz, com destaque o tratamento com 17,75 $\mu$ M de BAP (Figura 2B). O explante inicial, na ausência e presença de luz, apresentou os menores teores de flavonoides como demonstrado na Figura 2B.

Em *Heliotropium indicum*, Kumar et al. (2014) observaram calos induzidos com 2,4-D com menor quantidade de fenóis e flavonoides em relação àqueles induzidos em meios suplementados com BAP e ANA. Duangporn e Siripong (2009) observaram um acúmulo de metabolitos secundários em calos de *Phyllanthus acidus*, quando o meio foi suplementado com BAP, na presença de luz. Segundo Jamwal et al. (2017), o conteúdo de flavonoides aumenta com a introdução de reguladores de crescimento em vários tipos de culturas.

Levando em consideração o conjunto de resultados avaliados, o tratamento que proporcionou altas quantidades de compostos fenólicos, elevados valores de biomassa e presença de calos friáveis foi o tratamento contendo 18,10  $\mu$ M de 2,4-D, na ausência de luz.

#### **4.2 Curva de crescimento de calos e avaliação dos teores de fenóis e flavonóides totais**

A curva de crescimento de calos de *L. leucocephala* apresentou um padrão sigmoidal, com quatro fases distintas: fase lag (0-28 dias), fase exponencial (29-63 dia), fase linear (64-84 dias) e fase estacionária (85-133 dias). Não foi detectada fase de declínio (Figura 3).

A fase lag foi observada até o 28<sup>o</sup> dia, corresponde ao estágio responsável por fornecer energia às células. A fase exponencial observada a partir do 29<sup>o</sup> dia, pela máxima divisão celular é considerada por Smith (2012), como a fase de intensa biossíntese do metabolismo secundário, visto o deslocamento da síntese de esqueletos de carbono da rota primária para a secundária. O crescimento dos calos chegou a fase linear entre o 64<sup>o</sup> ao 84<sup>o</sup> dia. A partir do 85<sup>o</sup> dia, os calos entraram na fase estacionária, onde o ganho de biomassa foi mínimo, em decorrência da redução de nutrientes para a divisão celular. Segundo Smith (2012), é o momento ideal para o repique dos calos, para evitar o acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura e baixa proliferação celular.

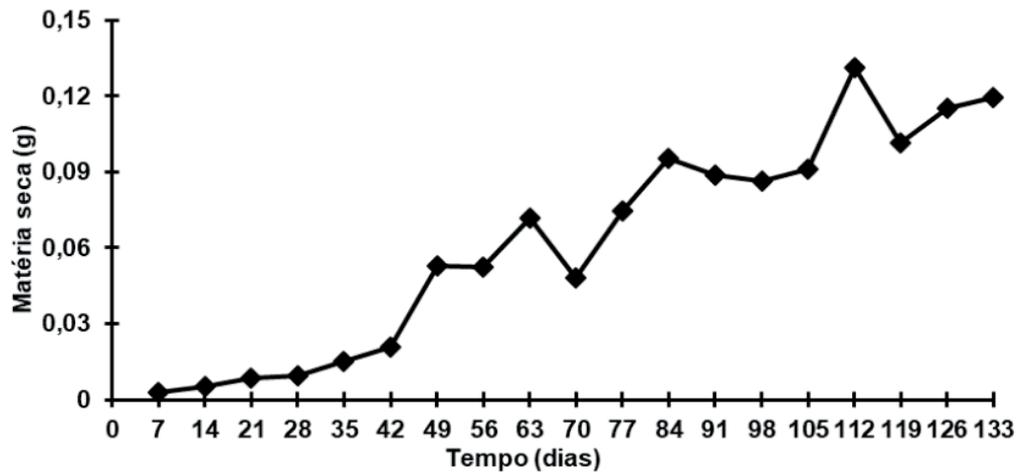
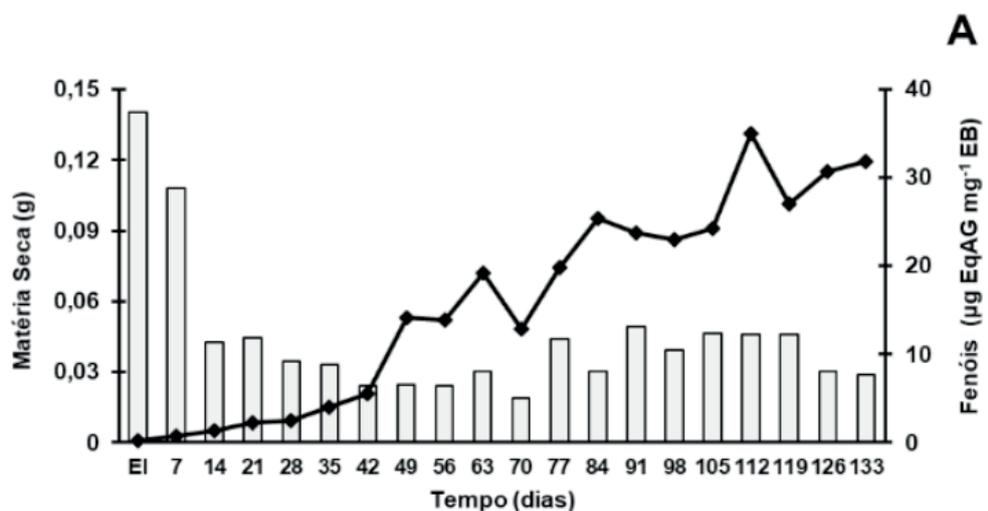


Figura 3. Curva de crescimento de calos induzidos a partir de segmentos nodais de *Leucaena leucocephala*, em meio WPM com 18,10  $\mu$ M de 2,4-D, na ausência de luz.

A curva de crescimento é essencial para o estabelecimento da fase de repicagem dos calos para um novo meio de cultura e viabiliza o estabelecimento de subcultivos de suspensões celulares para obtenção de compostos fenólicos (NOGUEIRA et al., 2008). A curva de crescimento para calos de *Leucaena leucocephala* apresentou um padrão semelhante ao de outras espécies medicinais de Cerrado como *Stryphnodendron adstringens* (CASTRO et al., 2008) e *Byrsonima intermedia* (NOGUEIRA et al., 2008).

Os teores de fenóis e flavonoides totais foram mais elevados no explante inicial e em calos com 7 dias de idade, reduzindo significativamente na fase exponencial, e a partir da fase linear permaneceram praticamente constantes (Figura 4). Observou-se uma relação inversamente proporcional entre o crescimento celular e o acúmulo de compostos fenólicos, corroborando com os estudos de Castro et al. (2008), para *Stryphnodendron adstringens*.



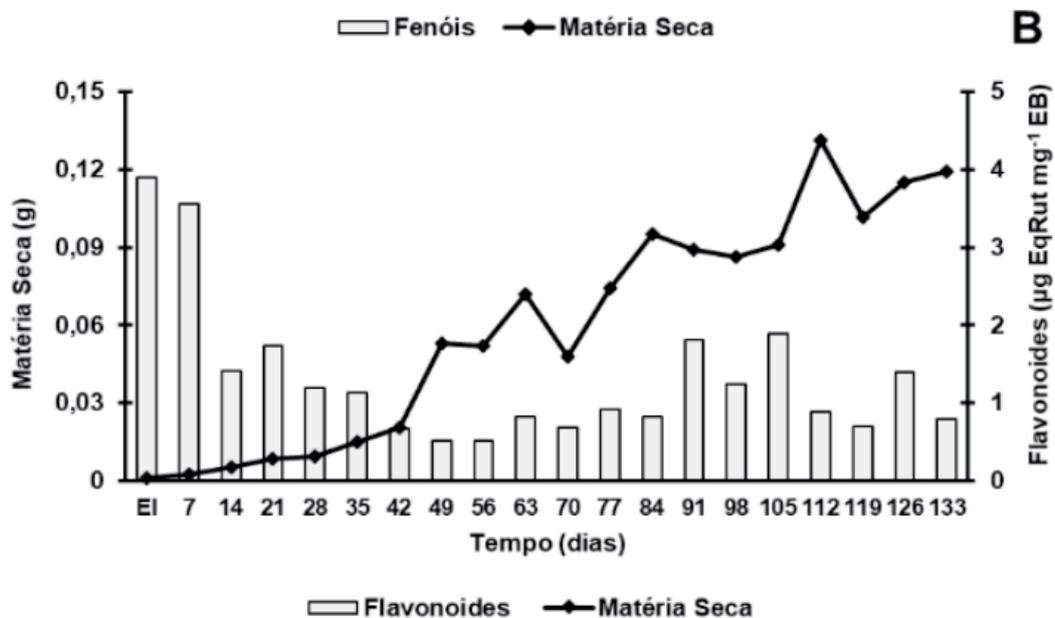


Figura 4. Teores de fenóis (A) e flavonoides (B) totais e matéria seca em calos induzidos em segmentos nodais de *Leucaena leucocephala*, inoculados em meio WPM suplementado com 18,10 µM de 2,4-D.

A partir da fase exponencial, observa-se a predominância da biomassa sobre a produção dos compostos fenólicos, considerada por Nicioli *et al.* (2010), como uma relação inversamente proporcional, devido a menor viabilidade de precursores para o metabolismo secundário. O decréscimo de fenóis e flavonoides totais ao longo da curva pode estar associado ao consumo de sacarose, durante o crescimento celular, sendo necessários subcultivos subsequentes para renovação da fonte de esqueletos de carbono e energia para a formação de metabólitos secundário (Naik *et al.*, 2010).

## 5 | CONCLUSÃO

Os resultados indicaram a possibilidade de obtenção de compostos fenólicos *in vitro* em calos de *L. leucocephala*, principalmente flavonoides e a necessidade da conservação da espécie, devido ao seu potencial biotecnológico para produção de compostos de natureza fenólica.

## AGRADECIMENTOS

À UFSJ, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. À FAPEMIG pela concessão da bolsa de Iniciação Científica PIBIC/FAPEMIG/UFSJ.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P. M. G. *et al.* **Avaliação do efeito tóxico de *Leucaena leucocephala* (Leg. Mimosoideae) em ovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 26, n. 3, p. 190-194, set. 2006.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 4.ed., v. 1, 1988.

CASTRO, A. H. F. et al. **Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-ase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae)**. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.

CHOWTIVANNAKU, P. et al. **Antidiabetic and antioxidant activities of seed extract from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit**. *Agriculture And Natural Resources*, v. 50, n. 5, p. 357-361, 2016.

COIMBRA M. C. et al. **Influence of plant growth regulators and light on callus induction and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae)**. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 55, p. 584-590, 2017

COSTA, J. N. M. N.; DURIGAN, G. ***Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): Invasora ou ruderal?** *Revista Árvore*, v. 34, n. 5, p. 825-833, 2010.

DUANGPORN, P.; SIRIPONG, P. **Effect of auxin and cytokinin on phyllanthosol production by callus cultures of *Phyllanthus acidus* Skeels**. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, v. 5, n. 2, p. 258-263, 2009.

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

FONSECA, N. G. da; JACOBI, C. M. **Desempenho germinativo da invasora *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. e comparação com *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. e *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. (Fabaceae)**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 25, n. 1, p. 191-197, 2011.

FUKUDA, N. et al. **Directional blue light irradiation triggers epidermal cell elongation of abaxial side resulting in inhibition of leaf epinasty in geranium under red light condition**. *Scientia Horticulturae*, v. 115, n. 2, p. 176-182, 2008.

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

GEORGE, E. F.; MICHAEL, A. H.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture - the Background**. 3 ed. Basingstoke: Springer. v.1, 2008. 501 p.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. **Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants**. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 9, p. 26-38, 2018.

LLOYD, G.; McCOWN, B. **Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture**. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*, v. 30, p. 421-327, 1981.

MUSTAFA, N. R. et al. **Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures**. *Nature Protocols*, v. 6, n. 6, p. 715-742, 2011.

NAIK, P.M. et al. **Effects of sucrose and pH levels on *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 100, n. 2, p. 235-239, 2010.

NICIOLI, P. M. et al. **Induction and phytochemical analyses in *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Calli**. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 5, n. 2, p. 159-162, 2010.

- NOGUEIRA, R. C. et al. **Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.
- NUNES, F. R. S.; DIAS, H. M. C.; CAVALCANTE, G. M. **Investigação das atividades antioxidante e antimicrobiana de duas espécies arbóreas ocorrentes no bioma caatinga**. Estação Científica (UNIFAP), v. 6, n. 1, p. 81-90, 2016.
- OLIVA, M. L. V. et al. ***Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1477, n. 1-2, p.64-74, 2000.
- OLIVEIRA, A. B. de. **Germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.)**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 8, n. 2, p.166-172, 2008.
- PASTRANA-BONILLA, E. et al. **Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 51, n. 18, p. 5497-5503, 2003.
- PINHAL, H. F. et al. **Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado**. Ciência Rural, v. 41, n. 7, p.1136-1142, 2011.
- PIRES, L. L.; BRAGANTINI, C.; COSTA J. L. S. **Armazenamento de sementes de feijão revestidas com polímeros e tratadas com fungicidas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 7, p. 709-715, 2004.
- SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 2012.
- SOUZA, J. M. M. et al. **Callus sieving is effective in improving synchronization and frequency of somatic embryogenesis in *Citrus sinensis***. Biologia Plantarum, v. 55, p. 703-707, 2011.
- STAHL, E.; SCHILD, W. **Drogenanalyse, II Inhaltsstoffe und Isolierungen**. Pharmazeutische Biologie Bd. 4, Gustav Fischer Verlag, pp 69-73. 1981.
- VASCONCELOS, J. N. C. et al. **Indução, caracterização bioquímica e ultraestrutura de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.)**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.
- WOISKY, R. G; SALATINO, A. **Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control**. Journal of Apicultural Research, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

## ACESSIBILIDADE – RISCOS E ACIDENTES ESTUDO DE CASO – PARQUE 13 DE MAIO (RECIFE-PE)

*Data de aceite: 20/01/2020*

*Data de submissão: 11/11/2019*

### **Anne Katherine de Araújo Barros**

Faculdade de Ciências Humanas Esuda  
Recife-PE

### **Jaqueline Coelho**

Faculdade de Ciências Humanas Esuda  
Recife-PE

### **Renata Britto**

Faculdade de Ciências Humanas Esuda  
Recife-PE

### **João Victor Martins Bamberg**

Universidade Federal do Vale do São Francisco -  
Univasf  
Petrolina-PE

### **Vitória Jéssica Galvão**

Universidade Federal do Vale do São Francisco -  
Univasf  
Petrolina-PE

**RESUMO:** As pessoas com deficiência apresentam limitações físicas, sensoriais ou mentais que podem acarretar dificuldades e impossibilidades na execução de tarefas simples, dificultando o deslocamento de um lugar para o outro. A acessibilidade consiste em um dos fundamentos principais para a qualidade de vida e o pleno exercício da cidadania pelas pessoas portadoras de

deficiências. As responsabilidades de inclusão e de acessibilidade são de todos e de cada um individualmente. Devemos ter presente que além de um dever legal, a inclusão é um dever ético, propiciando uma cultura respeitadora dos direitos de todos os cidadãos, incluindo-se nessa cultura também as pessoas com deficiência. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os riscos e acidentes que podem ocorrer no Parque 13 de maio, em Recife-PE, baseados nas condições ergonômicas de acessibilidade dos portadores de deficiências físicas ou com mobilidade reduzida.

**PALAVRAS-CHAVE:** Acessibilidade, Paisagismo, NBR9050

### ACCESSIBILITY – RISKS AND ACCIDENTS CASE STUDY – MAY 13 PARK (RECIFE-PE)

**ABSTRACT:** People with disabilities have physical, sensory or mental limitations that can cause difficulties and impossibilities in performing simple tasks, making it difficult to move from one place to another. Accessibility is one of the main foundations for the quality of life and the full exercise of citizenship by persons with disabilities. The responsibilities for inclusion and accessibility belong to each and everyone individually. We must bear in mind that in addition to a legal duty, inclusion is an ethical duty, providing a culture that respects the rights

of all citizens, including people with disabilities. Thus, the objective of this study was to evaluate the risks and accidents that may occur in Parque 13 de Maio, in Recife-PE, based on the ergonomic accessibility conditions of people with physical disabilities or reduced mobility.

**KEYWORDS:** accecibility; landscape; NBR9050;

## 1 | CONCEITOS

As pessoas com deficiência apresentam limitações físicas, sensoriais ou mentais que muitas vezes acarretam em dificuldades e impossibilidades na execução de tarefas simples às outras pessoas, dificultando o deslocamento de um lugar para o outro (BRASIL, 2012).

Segundo a Norma Brasileira (NBR) 9050, os portadores de deficiência ou que possuem mobilidade reduzida precisam estar em constante interação com o meio sociocultural para gozarem de uma vida plena e autônoma (ABNT, 2004).

A Constituição Federal assegura aos portadores de deficiência o exercício efetivo da cidadania e da convivência social, garantindo o direito ao trabalho, educação, saúde e lazer. A Lei nº 10.098, p. 1, de 19 de Dezembro de 2000, estabelece normas, critérios e exigências para a promoção da saúde e a acessibilidade das Pessoas com Necessidades Especiais (PNE) em qualquer lugar, que possuem mobilidade reduzida, seja ela adquirida ou nata, devem ser eliminadas a supressão de barreiras e de obstáculos nas vias e espaços públicos, no mobiliário urbano, na construção e reforma de edifícios e nos meios de transporte e comunicação (BRASIL, 2000).

A acessibilidade consiste em um dos fundamentos principais para a qualidade de vida e o pleno exercício da cidadania pelas pessoas portadoras de deficiências. No entanto, por mais que se tenha consciência do regulamento que determina a eliminação de barreiras arquitetônicas e urbanas, nota-se que a acessibilidade nos espaços em geral é muito restrita no país. Sendo assim, muitos portadores de deficiência encontram dificuldades de locomoção nas vias públicas e de acesso aos transportes públicos. Esses indivíduos são vítimas de inúmeros constrangimentos, que inviabilizam o exercício pelos direitos à educação, à saúde, ao trabalho e ao lazer (AVELAR & CARVALHO, 2010).

## 2 | ESTUDO DE CASO

O Parque 13 de Maio é o primeiro parque urbano histórico do Recife. Medindo 6,9 hectares, situando-se em uma área bastante central da cidade. Burle Marx, um dos mais célebres paisagistas do País, elaborou o projeto dos primeiros jardins

públicos do Parque.

Neste trabalho analisamos as áreas de riscos de acidentes, levando em consideração a NBR 9050, que rege a acessibilidade.

Segundo análise, foi desenvolvido um mapa de risco (anexo 01), visando localizar as áreas de alto, médio e baixo risco.

Abaixo poderemos analisar estes riscos detectados.



Figura 1 – Área do monumento sem proteção (guarda-corpo)



Figura 2 –Área do monumento com rampa lateral, sem identificação



Figura 3 – Área do monumento – escadaria sem corrimão



Figura 4 – Área do monumento – escadaria sem plataforma de apoio e sem corrimão



Figura 5 – Piso desnivelado, com muitos buracos



Figura 6 – Local sem piso acessível interligando setores e muito desnível



Figura 7 – Canteiros sem piso de sinalização



Figura 8 – Drenos e lagoa sem proteção



Figura 9 – Zoológico com desnível no piso e sem piso sinalizador para os locais das jaulas



Figura 10 - Desnívelamento de piso



Figura 11 – Barreira física



Figura 12 - Parque com areia, sem acessibilidade



Figura 13 – Desnível acentuado no piso



Figura 14 – Caixas de energia sem nenhuma proteção ou indicação

## CONCLUSÕES

Sabe-se que os direitos à acessibilidade dos indivíduos com deficiência ou com mobilidade reduzida são garantidos pela legislação brasileira. Para assegurar a execução dessa legislação é preciso planejar os espaços, principalmente de via pública, a fim de torná-los acessíveis.

Ao longo dos anos observa-se um aumento da população com deficiência ou alguma incapacidade física. Este fato deve refletir no que diz respeito à inclusão social, promovendo a eliminação de barreiras arquitetônicas e permitindo o deslocamento dessa população com proteção e bem-estar.

Constatou-se por meio da avaliação das condições arquitetônicas do Parque 13 de maio que o mesmo não atende todos os preceitos da NBR 9050. Visto que há ausência de piso sinalizador em alguns locais, corrimões na escadaria e guarda corpo na área mais elevada. Também registrou-se muito desnível no piso, bem como falta de acesso adequado aos bancos e parques infantis. Desta forma os usuários com deficiência física ou mobilidade reduzida, podem ter um maior desgaste físico para realização das atividades e o risco de quedas e acidentes.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9050**: Acessibilidade a edificações, mobiliário, espaços e equipamentos urbanos. Rio de Janeiro, 2004.

AVELAR, S. A.; CARVALHO, A. M. Barreiras Arquitetônicas: Acessibilidade aos Usuários. **Revista Enfermagem Integrada**, v. 3, num. 1, Minas Gerais, jul./ago. 2010. Disponível em <<http://www.unilestemg.br/enfermagemint>

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**: promulgada em 5 de Outubro de 1988. 35. ed, Brasília, 2012.

BRASIL. **Decreto n. 10098, p.1, de 19 de Dezembro de 2000**. Estabelece normas gerais e critério básicos para a promoção da acessibilidade das pessoas portadoras de deficiência ou com mobilidade reduzida, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2000.

## REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Pyrostegia venusta* A PARTIR DE CULTURAS DE MERISTEMA APICAL

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 07/11/2019

### **Caroline Rocha Neves Crema**

Universidade Federal de São João del-Rei  
Divinópolis-MG

<http://lattes.cnpq.br/8520627903387547>

### **Mairon César Coimbra**

Universidade Federal de São João del-Rei  
Divinópolis-MG

<http://lattes.cnpq.br/9064803050046162>

### **Ana Hortência Fonsêca Castro**

Universidade Federal de São João del-Rei  
Divinópolis-MG

<http://lattes.cnpq.br/8427649163529950>

**RESUMO:** Meristemas apicais de *Pyrostegia venusta* foram cultivados *in vitro* para otimizar as melhores condições para a proliferação de brotações, indução de raízes e subsequente regeneração de plântulas. Os efeitos da citocinina BAP (6-benzilaminopurina) e das auxinas ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), AIA (ácido indolilacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) no estabelecimento *in vitro* e na produção de compostos fenólicos nas brotações e raízes foram avaliados. Após 30 dias de incubação, 100% de parte aérea foi regenerada a partir dos meristemas apicais na presença e ausência de BAP. A utilização de

meio MS suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA promoveu a formação de raízes em 70% dos explantes utilizados. A produção de substâncias de natureza fenólica nas plântulas regeneradas *in vitro* foi acentuadamente maior, quando comparada ao explante inicial. Este trabalho mostrou que a regeneração de plântulas de *P. venusta* a partir de meristemas apicais é possível por meio da suplementação do meio MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP por 30 dias, seguida da transferência das brotações para meio MS contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

**PALAVRAS-CHAVE:** micropropagação, auxina, citocinina, planta medicinal, Bignoniaceae.

### *IN VITRO* REGENERATION OF *Pyrostegia venusta* FROM APICAL MERISTEM CULTURE

**ABSTRACT:** Apical meristems of *Pyrostegia venusta* were cultivated *in vitro* to optimize the best conditions for shoot proliferation, root induction and subsequent seedling regeneration. The effects of cytokinin BAP (6-benzylaminopurine) and auxins NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid), IAA (indolylacetic acid) and 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in the establishment and production of phenolic compounds of cultures were analyzed. After 30 days of incubation, 100% of shoots from the apical meristems in the presence and

absence of BAP were regenerated. The use of MS medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> NAA promoted root formation in 70% of the explants. The production of phenolic compounds in *in vitro* regenerated seedlings was markedly higher when compared with the initial explant. This work showed that the regeneration of *P. venusta* seedlings from apical meristem is possible by supplementation of the MS medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP for 30 days, followed by transfer of shoots to MS medium added of 1 mg L<sup>-1</sup> NAA.

**KEYWORDS:** micropropagation, auxin, cytokinin, medicinal plant, Bignoniaceae.

## 1 | INTRODUÇÃO

*Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers é uma trepadeira lenhosa, de ramagem densa, nativa e com ocorrência em todos os biomas brasileiros (LOHMANN, 2015), podendo ser encontrada dispersa em campos, revestindo barrancos, margens de estradas e cercas de pastagens (MILANI et al., 2015). *P. venusta* é uma trepadeira lenhosa vigorosa, de crescimento rápido, que floresce no inverno e na primavera com vistosas flores alaranjadas, que inclusive a fizeram ser incluída, como *Pyrostegia ignea*, em uma lista das trepadeiras com as mais belas florações do mundo e classificada como a mais popular de todas nos trópicos (MENNINGER, 1970; NISHA et al., 2012). *P. venusta* (Bignoniaceae) é popularmente conhecida como “flor-de-São-João” ou “cipó-de-São-João” e na medicina popular é usada no tratamento de tosse, bronquite, resfriados, diarreia e vitiligo (LORENZI, 2008; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Existem atividades biológicas atribuídas a *P. venusta* em estudos na literatura não só como melanogênica, antitumoral, anti-helmíntica, antinociceptiva e antioxidante, mas também como antimicrobiana e agente imunomodulador (ROY et al., 2011; ROY et al., 2012; SILVA et al., 2012; NISHA et al., 2012; VELOSO et al., 2010, 2012, 2014; MOREIRA et al., 2012, 2015).

A cultura de meristemas apicais é uma técnica importante para a produção de plântulas livres de doenças e para a rápida multiplicação clonal (KAUSHAL et al., 2015). O desenvolvimento direto de brotações e raízes a partir de meristemas apicais evita a formação de calos, garantindo que a instabilidade genética e variações somaclonais sejam minimizadas (CHOWDHURY et al., 2004). O processo de regeneração *in vitro* da parte aérea e indução de raízes envolve o cultivo de meristemas apicais presentes no ápice do caule ou gemas axilares (SATISH et al., 2015). Para a indução e regeneração de raízes e brotações, o meio de cultivo deve ser otimizado quanto ao tipo, concentração e combinação de reguladores de crescimento vegetal. A otimização do meio de cultivo pode ser realizada modificando-se a composição mineral e orgânica com atenção especial para o balanço de reguladores de crescimento (auxina/citocinina) que governam os mecanismos de diferenciação e desdiferenciação celular (GEORGE, 2008). A adição de reguladores de crescimento

tem como objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz (WERNER et al., 2009).

Este é o primeiro relato sobre a regeneração direta de meristemas apicais de *P. venusta* e estes podem ser efetivamente utilizados para estudos relacionados à obtenção de produtos de origem biotecnológica. Plantas medicinais, como qualquer outro medicamento, devem comprovar sua segurança e eficácia para uso, exigindo que um elaborado plano de controle de qualidade seja estabelecido em toda a sua cadeia produtiva, desde o seu plantio até a droga vegetal ou fitoterápico pronto para dispensação (SOUZA-MOREIRA, 2010). Neste contexto, o cultivo *in vitro* de plantas medicinais pode ser uma interessante alternativa, capaz de suprir a qualidade sanitária requerida para a obtenção de insumos farmacêuticos de origem vegetal.

## 2 | OBJETIVOS

Estudar os efeitos da citocinina BAP (6-benzilaminopurina) e das auxinas ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), AIA (ácido indolilacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) na regeneração de ápices caulinares de *P. venusta* cultivados *in vitro* e avaliar os teores de fenóis e flavonoides totais, visando a conservação da espécie e a futura obtenção de plântulas sadias úteis para estudos farmacognósticos e biotecnológicos.

## 3 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Material vegetal

Sementes *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae) foram coletadas em área urbana do município de Divinópolis, situado na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, a 712 m (20°10'45,9"S e 44°55'07,2"W) . A coleta foi registrada previamente no SISBIO sob nº 24542-6. Após a coleta das sementes, estas foram processadas e armazenadas em câmara fria (geladeira) a 4°C, até sua utilização. Exsiccatas foram preparadas e identificadas pela Dra. Andréia Fonseca Silva, curadora do Herbário PAMG e receberam o registro PAMG 56307. Este trabalho foi cadastrado na Plataforma SISGEN (Cadastro nº A12A940).

### 3.2 Germinação *in vitro*

As sementes foram desinfestadas em etanol 70%, por 1 minuto e hipoclorito de sódio 4% (2% de cloro ativo), por 5 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. A inoculação se deu em tubos contendo 15 mL de meio

MS basal (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de agar com o pH ajustado para 5,8±0,1. Os tubos foram transferidos para sala de crescimento a 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (BRAGA et al., 2015).

### 3.3 Regeneração da parte aérea

Os explantes (ápices caulinares) foram obtidos a partir de plântulas de *P. venusta* oriundas da germinação *in vitro*. Em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares com comprimento de aproximadamente 1 cm foram excisados e isolados com o auxílio de pinça e bisturi. Em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS basal (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e acrescidos de 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0; 0,5; 1; 2 μM. O pH foi ajustado para 5,8±0,1. Os tubos contendo os ápices foram transferidos para sala de crescimento a 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por um período de 30 dias. Realizou-se avaliações a cada 3 dias para determinar taxa de brotação, contaminação e oxidação.

### 3.4 Indução de raízes

Brotações obtidas de acordo com o item 3.3 foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com ágar, na proporção de 7 g L<sup>-1</sup>, acrescidos de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ANA (ácido α-naftaleno acético) e AIA (ácido indolilacético), nas concentrações de 0; 0,5; 1 mg L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8±0,1. Os tubos inoculados foram transferidos para sala de crescimento a 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por um período de 30 dias. Foram realizadas avaliações a cada 3 dias para determinar taxa de enraizamento, contaminação e oxidação.

### 3.5 Preparo de extrato hidroetanólico

Amostras secas das plântulas foram pulverizadas e em seguida submetidas, por três vezes de 25 min, à extração com etanol 70%, sob aquecimento (35°C) e agitação constante em aparelho de ultrassom. O extrato foi concentrado até a evaporação total do solvente a 40°C. O extrato bruto seco foi ressuscitado em etanol 70% para os ensaios fitoquímicos.

### 3.6 Teores fenóis totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Slinkard e Singleton (1977), utilizando ácido gálico como padrão. A absorbância foi medida a 750 nm. As determinações foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso em microgramas de equivalentes de ácido gálico, por miligrama de extrato bruto ( $\mu\text{g EqAG mg}^{-1}$  EB).

### 3.7 Teores de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método do cloreto de alumínio (BRASIL, 2010) com algumas modificações. Utilizou-se rutina como substância de referência. A absorbância foi medida a 425 nm. As determinações foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso em microgramas de equivalentes de rutina, por miligrama de extrato bruto ( $\mu\text{g EqRut mg}^{-1}$  EB).

### 3.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e analisados estatisticamente utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados empregando-se o software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011). Utilizou-se o Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação dos contrastes entre as médias.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Germinação *in vitro*

A germinação iniciou a partir do 15º dia após a inoculação, com o desenvolvimento do primeiro par de folíolos a partir do 21º dia. Padrão similar para a germinação *in vitro* de *P. venusta* foi descrito por Braga et al. (2015). Estes autores sugerem que plântulas de *P. venusta* não são exigentes quanto às necessidades nutricionais para seu desenvolvimento inicial, bastando a suplementação oferecida pelo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

### 4.2 Regeneração da parte aérea

Meristemas apicais de *P. venusta* foram cultivados *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações de BAP. A resposta morfogênica, referente a indução de brotações ocorreu em 100% dos explantes em todos os tratamentos avaliados, inclusive na ausência de BAP (Tabela 1). Na ausência de BAP (T0) observou-se, em 20% dos explantes, a formação de

raízes. Assim como para a variável regeneração de parte aérea, não se observou diferença significativa para o comprimento da parte aérea regenerada (Tabela 1).

Tratamento	Concentração de BAP (mg L <sup>-1</sup> )	RPA (%)	RR (%)	CPA (cm)	CR (cm)
T0	-	100	20	1,34 a	0,23
T1	0,5	100	-	1,56 a	-
T2	1	100	-	1,14 a	-
T3	2	100	-	1,17 a	-

Tabela 1. Porcentagem de regeneração de parte aérea (RPA); porcentagem de regeneração de raiz (RR); comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de plântulas de *P. venusta*.

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O acúmulo de biomassa fresca e seca é significativamente superior nos tratamentos onde se utilizou o BAP (Tabela 2). Pode-se observar, neste estudo, uma relação inversamente proporcional entre a concentração de BAP e o número de folíolos obtidos a partir de meristemas apicais de *P. venusta* cultivados *in vitro*. Na presença de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, o número de folíolos foi 2,7 vezes maior, quando comparado a ápices caulinares cultivados na presença de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Tabela 2).

Aplicações exógenas de citocininas modificam a dominância apical e promovem o crescimento das gemas laterais e podem, também, promover o desenvolvimento de cloroplastos e expansão de folhas (TAIZ; ZEIGER, 2012). Entretanto, o comportamento observado para a espécie estudada sugere que não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a regeneração de parte aérea em meristemas apicais de *P. venusta*, provavelmente devido à existência de concentrações endógenas de citocinina suficientes para a indução de brotações (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

Tratamento	Concentração de BAP (mg L <sup>-1</sup> )	MFPA (mg)	MFR (mg)	MSPA (mg)	MSR (mg)	Número de Folíolos
T0	-	15,93 b	0,55	4,55 b	0,09	4,60 a
T1	0,5	42,14 a	-	8,11 ab	-	7,60 a
T2	1	26,90 ab	-	9,06 a	-	2,80 a
T3	2	45,31 a	-	5,47 ab	-	2,60 a

Tabela 2. Acúmulo de biomassa, matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca da raiz (MFR); matéria seca da parte aérea (MSPA); matéria seca da raiz (MSR) e números de folíolos de plântulas de *P. venusta*.

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

### 4.3 Indução de raízes

Após os 30 dias de incubação dos ápices caulinares na presença de auxinas (2,4-D; AIA; ANA), realizou-se uma avaliação morfológica das culturas *in vitro*, sendo considerado relevante os aspectos relacionados ao enraizamento, que abrangem porcentagem da formação, comprimento e biomassa fresca e seca de raiz. Nos tratamentos onde se utilizou ANA e AIA, a formação de raízes foi superior a 40%, destacando-se a utilização de 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA que apresentou taxas de indução de raízes de 70% (Tabela 3). Nos meios suplementados com 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D não houve a formação de raízes, havendo apenas o crescimento de calos friáveis. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o 2,4-D é utilizado para a indução de calos e embriogênese somática o que consolida os resultados obtidos neste teste (Tabela 3).

Quanto ao acúmulo de biomassa fresca e seca, de parte aérea e raiz, não se observou diferenças significativas entre os tratamentos estudados na presença de auxinas. Contudo, pode-se destacar o valor médio de massa fresca de raízes induzidas na presença de 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e de massa seca de raízes obtidas a partir de meristemas apicais cultivados sob a ação de 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA (Tabela 4).

Tratamento	Regulador de Crescimento			RPA (%)	RR (%)	CPA (cm)	CR (cm)
	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	2,4-D	AIA				
T0	-			80	20	1,45 a	0,45 a
T1	0,5	+		-	-	-	-
T2	1	+		-	-	-	-
T3	0,5		+	70	40	1,35 a	0,37 a
T4	1		+	50	60	1,20 a	0,58 a
T5	0,5			40	50	1,36 a	0,71 a
T6	1			40	70	1,42 a	1,04 a

Tabela 3. Porcentagem de regeneração de parte aérea (RAP); porcentagem de regeneração de raiz (RR); comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de plântulas de *P. venusta*.

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tratamento	Regulador de Crescimento			MFPA (mg)	MFR (mg)	MSPA (mg)	MSR (mg)	Número Foliolos
	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	2,4-D	AIA					
T0	-			16,33 a	0,35 a	4,63 a	0,6 a	2,7 a
T1	0,5	+		-	-	-	-	-
T2	1	+		-	-	-	-	-

<b>T3</b>	0,5	+	22,06 a	2,12 a	4,26 a	1,26 a	3,7 a
<b>T4</b>	1	+	18,42 a	3,74 a	4,25 a	3,28 a	1,3 a
<b>T5</b>	0,5	+	18,50 a	2,83 a	4,61 a	1,93 a	0,9 a
<b>T6</b>	1	+	16,53 a	4,89 a	4,02 a	3,16 a	1,6 a

Tabela 4. Acúmulo de biomassa, matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca da raiz (MFR); matéria seca da parte aérea (MSPA); matéria seca da raiz (MSR) e números de folíolos de plântulas de *P. venusta*.

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para promover a indução de raízes e melhorar o sistema radicular formado, geralmente aos meios de cultura são acrescidos de auxina (SAINI et al., 2013). As auxinas têm se mostrado eficientes para a otimização na formação de raízes adventícias, sendo seu efeito relacionado à promoção do desenvolvimento das mesmas, através do crescimento das células recém-formadas nos meristemas (HARTMANN et al., 2002). Entre as auxinas o AIA e o AIB, são geralmente utilizados para plantas herbáceas que são de fácil enraizamento, como o bastão-do-imperador (SANTOS et al., 2017), enquanto o regulador de crescimento ANA tem sido empregado especialmente em espécies lenhosas, que são mais recalcitrantes à formação de raízes (SHARMA, 2006). Esta observação, pôde ser corroborada por nossos dados, uma vez que as maiores taxas de formação de raízes em *P. venusta*, uma trepadeira lenhosa, foram obtidas na presença de 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

#### 4.4 Teores fenóis e flavonoides totais

Análises fitoquímicas foram realizadas nas partes aéreas e raízes de plântulas regeneradas a partir de meristemas apicais de *P. venusta* cultivados *in vitro* (Figura 1). A utilização de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu a maior produção de compostos fenólicos nas partes aéreas regeneradas, encontrando-se valores da ordem de 13,30 µg EqAG mg<sup>-1</sup> EB (Figura 1A). Nas raízes formadas, os maiores teores de compostos fenólicos foram detectados no tratamento onde se empregou 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, sendo a concentração destes metabólitos de 14,30 µg EqAG mg<sup>-1</sup> EB (Figura 1C). Quando comparados aos seus respectivos explantes iniciais, a produção de compostos fenólicos totais foi maior em todos os tratamentos avaliados, sugerindo que a regeneração de plântulas de *P. venusta* a partir de meristemas apicais é uma importante ferramenta biotecnológica para a produção de compostos de natureza fenólica.

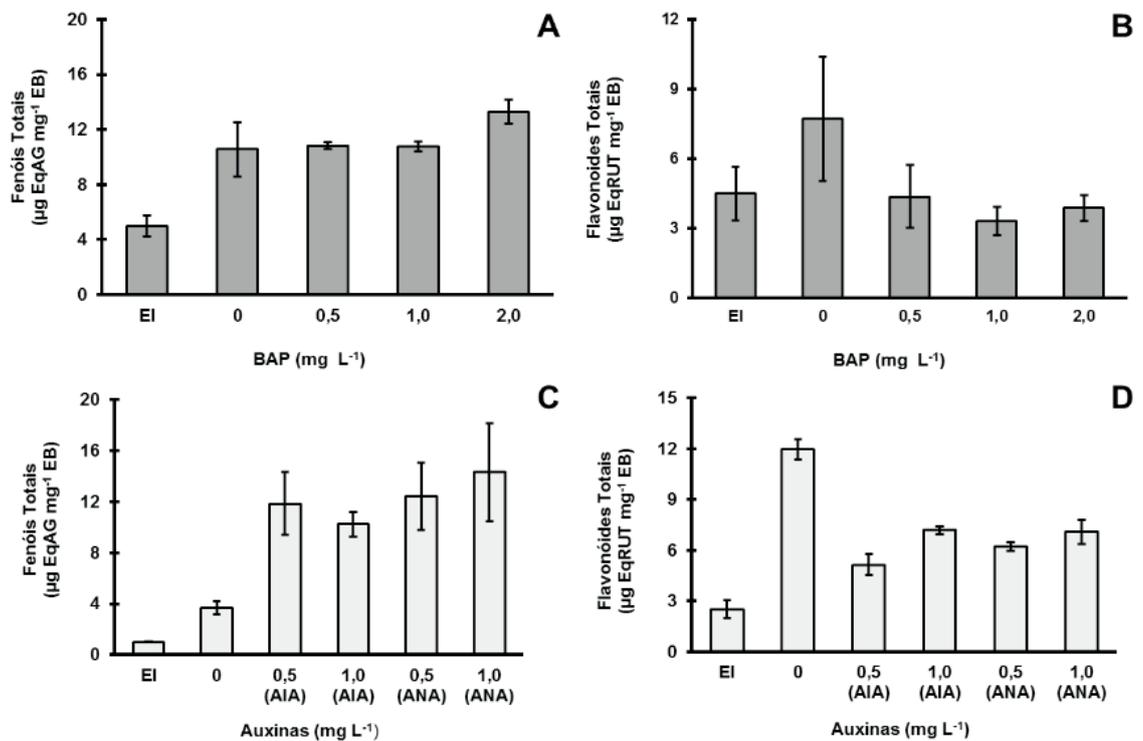


Figura 1. Teores de fenóis e flavonoides totais em plântulas de *P. venusta* regeneradas a partir de meristemas apicais na presença de citocinina (A e B) e auxinas (C e D).

Assim como para a regeneração de parte aérea, a produção de flavonoides totais foi afetada pela presença de BAP no meio de cultivo, podendo-se estabelecer, de maneira semelhante, uma relação inversamente proporcional entre a concentração de BAP e a produção de flavonoides nas partes aéreas regeneradas a partir de meristemas apicais de *P. venusta* (Figura 1B). Os maiores teores de flavonoides totais no experimento de formação de raízes foram observados na ausência de auxinas (Figuras 1B e 1D). Este dado sugere que o procedimento de excisão do meristema apical, seguido de inoculação em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e transferência para sala de crescimento, na presença de fotoperíodo é suficiente para a produção de flavonoides, sem a necessidade de adição de um regulador de crescimento exógeno.

Reguladores de crescimento vegetal, especialmente auxinas e citocininas são importantes para o acúmulo de biomassa e produção de metabólitos secundários na cultura *in vitro* de células e tecidos vegetais. Alterações nos tipos e concentrações de auxinas e citocininas, associadas à sua interação, desempenham papéis importantes no crescimento e formação dos metabólitos nas plantas (JI et al., 2015). Em culturas celulares (calos) *in vitro* de *P. venusta*, Coimbra et al. (2017) observaram que a auxina (2,4-D) e a citocinina (BAP), bem como a presença ou ausência de luz, influenciam fortemente a produção de compostos fenólicos, assim como a indução e crescimento dessas culturas.

## 5 | CONCLUSÃO

A regeneração de plântulas de *Pyrostegia venusta* a partir de meristemas apicais é possível, por meio da inoculação em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e incubação por 30 dias, seguida da transferência das brotações para um novo meio acrescido de 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA para enraizamento.

## AGRADECIMENTOS

À UFSJ, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UFSJ.

## REFERÊNCIAS

- BRAGA, K.Q.; COIMBRA, M.C.; CASTRO, A.H.F. **In vitro germination, callus induction and phenolic compounds contents from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers.** Acta Scientiarum: Biological Sciences, v.37, p.151-158, 2015.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Farmacopeia Brasileira, 5nd ed., n, 1, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5 ed, n.1, 2010.
- CHOWDHURY, P. et al. **Influence of the physiological age and position of the nodal explants on micropropagation of field-grown *Dendrocalamus strictus*.** Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, v. 5, n.1-2, p. 45-50, 2004.
- COIMBRA, M.C et al. **Influence of plant growth regulators and light on callus induction and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae).** Indian Journal of Experimental Biology, v.55, p.584-590, 2017.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith - Fabaceae).** Ciência Florestal, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system.** Ciência e Agrotecnologia, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GEORGE, E. F.; MICHAEL, A. H.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture - the Background.** 3 ed. Basingstoke: Springer. v.1, p. 501, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, MA Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, v 1, p. 183-260, 1998.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant Propagation: Principles and Practices.** 7. ed. New York: Englewood Cliffs, 2002. 880p.
- JI, X. H. et al. **Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.120, n. 1, p. 325-337, 2015.
- KAUSHAL, S.; SIDANA, A.; DEV, K. **In vitro plant production through apical meristem culture of *Gentiana kurroo* Royle.** Journal of Medicinal Plants Studies, v. 3, n. 1, p. 4-9, 2015.

- LOHMANN, L. G. 2015. ***Bignoniaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB113866>>. Acesso em: 07 de maio de 2019.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. 4<sup>a</sup> ed., Nova Odessa: Plantarum, 2008.
- MENNINGER, E. A. **Flowering Vines of the World**. New York: Hearthside Press Inc., 1970.
- MILANI, M. et al. **Influência do número de folíolos e nós no enraizamento de estacas semilenhosas de cipó-de-são-joão**. *Ornamental Horticulture*, v. 21, n.3, p. 339-344, 2015.
- MOREIRA, C. G. et al. **Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, p. 1005-1011, 2012.
- MOREIRA, C. G. et al. **Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 168, p. 315-325, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NISHA, P. V. et al. **Anthelmintic activity of *Pyrostegia venusta* using *Pheretima posthuma***. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 4, n. 3, p. 205-208, 2012.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais**. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.
- ROY, P. et al. ***In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 140, p. 186-192, 2012.
- ROY, P. et al. **Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers**. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 11, p. 69-77, 2011.
- SAINI, S. et al. **Auxin: a master regulator in plant root development**. *The Plant Cell*, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.
- SANTOS, E. O.; RODRIGUES, A. A. J.; CARVALHO, A. C. P. P. **Concentrações do meio MS e auxinas no enraizamento *in vitro* de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*)**. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2017.
- SATISH, L. et al. **Direct plant regeneration from *in vitro*-derived shoot apical meristems of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.)**. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 51, n. 2, p. 192–200, 2015.
- SHARMA, R. **Biomass and cell culturing techniques**. New Delhi: Biotech. Books, 2006, 287p.
- SILVA, P. B. et al. **Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae)**. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 4, p. 447-455, 2011.
- SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. **Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.
- SOUZA-MOREIRA, T. M., SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. **O Brasil no contexto de**

**controle de qualidade de plantas medicinais.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, p. 435-440, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 954p.

VELOSO, C. C. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* in mice.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 22, n. 1, p. 162-168, 2012.

VELOSO, C. C. et al. **Hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet.** Journal of Ethnopharmacology, v. 151, p. 722–728, 2014.

VELOSO, C. C. et al. ***Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice.** Journal of Ethnopharmacology, v. 132, p. 355-358, 2010.

WERNER, E. T. et al. **Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*.** Revista Árvore, v. 33, n. 6, 2009.

## SEMENTES DE CÁRTAMO TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO

Data de aceite: 20/01/2020

### **Janine Farias Menegaes**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Departamento de Fitotecnia  
Santa Maria – Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/6320581820328718>

### **Ubirajara Russi Nunes**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Departamento de Fitotecnia  
Santa Maria – Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/8937125213120268>

### **Geovana Barbieri Facco**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Departamento de Fitotecnia  
Santa Maria – Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/1417931132426105>

### **Tiéle Stuker Fernandes**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Departamento de Fitotecnia  
Santa Maria – Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/4523994079425960>

### **Felipe de Lima Franzen**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),  
Departamento de Alimentos e Nutrição  
Campinas – São Paulo  
<http://lattes.cnpq.br/8255038544132776>

### **Rogério Antônio Bellé**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Departamento de Fitotecnia

Santa Maria – Rio Grande do Sul

<http://lattes.cnpq.br/3423988900328678>

### **Fernanda Alice Antonello Londero Backes**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Departamento de Fitotecnia  
Santa Maria – Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/1501573193830736>

**RESUMO:** Entres as espécies de flores de corte propagadas por sementes, o cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) destacam-se por sua beleza, rusticidade e versatilidade, sendo utilizado como flor fresca ou seca. Contudo, o uso de tratamentos de sementes é necessário para obter uma maior expressão do percentual de plântulas de cártamo germinadas no campo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tratamento de semente com diferentes concentrações de ácido salicílico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cártamo. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5 (duas variedades de sementes: ornamental (var. Lasting Orange) e oleífera (var. Yellow Saffron) e, cinco soluções concentradas com ácido salicílico: 0 (testemunha); 250; 500; 750; e 1.000  $\mu$ M), com oito repetições de 50 sementes. Avaliou-se a qualidade fisiológica das sementes através dos testes de germinação, comprimento e massa de plântulas, índice de velocidade e tempo médio de germinação, e

teste de sanidade. Constatou-se que as soluções concentradas de ácido salicílico entre 250 a 500  $\mu\text{M}$  foram benéficas para a qualidade fisiológica das sementes de cártamo de ambas as variedades, proporcionando melhoria na expressão da porcentagem de plântulas normais na primeira contagem e na germinação, além da redução no tempo médio de germinação e do aumento na massa seca de plântulas. Também, verificou-se que estas soluções concentradas de ácido salicílico como tratamento de sementes para a cultura do cártamo foram benéficas para o controle da infestação de fitopatógenos sobre as sementes.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Carthamus tinctorius* L., tratamento de sementes, floricultura.

### SALICYLIC ACID TREATED SAFFLOWER SEEDS

**ABSTRACT:** Among the species of cut flowers propagated by seeds, the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) stand out for its beauty, rusticity and versatility, being used as a fresh or dried flower. However, the use of seed treatments is necessary to obtain a higher expression of the percentage of field germinated safflower seedlings. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of seedS treatment with different salicylic acid concentrations on the physiological and health quality of safflower seeds. The design was completely randomized in a 2x5 factorial scheme (two seed varieties: ornamental (var. Lasting Orange) and oleifera (var. Yellow Saffton) and five concentrated solutions with salicylic acid: 0 (control); 250; 500; 750 and 1,000  $\mu\text{M}$ ), with eight repetitions of 50 seeds. The physiological quality of seeds was evaluated by germination tests, seedling length and mass, speed index and average germination time, and sanity test. Concentrated salicylic acid solutions between 250 and 500  $\mu\text{M}$  were found to be beneficial to the physiological quality of safflower seeds of both varieties, providing better expression of the percentage of normal seedlings in the first count and in germination, as well as a reduction in seedling. average time of germination and increase in seedling dry mass. Also, it was found that these concentrated salicylic acid solutions as seed treatment for safflower cultivation were beneficial for the control of plant pathogen infestation on seeds.

**KEYWORDS:** *Carthamus tinctorius* L., seed treatment, floriculture.

## 1 | INTRODUÇÃO

O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), pertencente à família Asteraceae e originário da Ásia, é uma planta anual, oleaginosa, rústica e possui múltiplos propósitos de uso, como culinário, ornamental, farmacêutico, forrageiro, além de apresentar potencialidades como matéria prima na produção de biodiesel. As hastes florais de cártamo apresentam caráter ornamental devido a sua beleza e versatilidade, em que são utilizadas como flor cortada fresca ou seca. Além disso, suas sementes possuem teor de óleo de 20 a 40%, rico em vitamina C, E e betacaroteno, amplamente utilizado

na indústria alimentícia e farmacêutica (MOURA et al., 2015; EMONGOR; OAGILE, 2017).

A produção mundial de sementes de cártamo, em 2014, foi de 868 mil toneladas com área cultivada de aproximadamente um milhão de hectares, todavia, a produção de sementes pode chegar até 3 t ha<sup>-1</sup> (FAOWATER, 2015). Um dos fatores da baixa produtividade de hastes florais e de sementes de cártamo é a alta suscetibilidade ao ataque de fitopatógenos, sobretudo, em ambientes de alta pluviosidade, depreciando o caráter ornamental das hastes e provocando o chochamento das sementes, o que inviabiliza a sua germinação (GARCIA, 1999).

A semente é um insumo agrícola de grande importância agroeconômica, pois contém o potencial genético da planta e, somadas as suas qualidades físicas, fisiológicas e sanitárias, determinam a capacidade da mesma em originar plantas de alta produtividade. Assim, o uso de tratamento de sementes possibilita a expressão do máximo potencial fisiológico deste insumo, permitindo a sua germinação e, propiciando o controle e proteção das sementes aos fitopatógenos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Os reguladores de crescimento são compostos sintéticos que produzem efeitos semelhantes aos hormônios vegetais e sua utilização no tratamento de sementes pode favorecer o desempenho das plântulas em vigor e germinação (ARAGÃO et al., 2006; VIEIRA et al., 2010). Entre os reguladores de crescimento, destaca-se o ácido salicílico, o qual se caracteriza por ser um composto fenólico envolvido em vários processos fisiológicos e bioquímicos da planta, sendo sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina (VIEIRA et al., 2010; KHAN et al., 2015;).

O ácido salicílico em aplicação exógena se configura como uma alternativa para o setor sementeiro por se tratar de um importante indutor de resistência nas plantas a doenças e pragas (TAVARES et al., 2014). Além disso, pode atuar no processo germinativo, na regulação do crescimento de plantas e da atividade enzimática de desintoxicação celular, bem como indutor da síntese de proteínas de tolerância aos diferentes estresses e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), com expressão das quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (CARVALHO et al., 2007; CAMPOS, 2009). Estas últimas prejudicam o desenvolvimento dos fungos e impedem seu crescimento como resultado da destruição dos polissacarídeos estruturais da parede celular destes microrganismos ou das alterações na sua arquitetura (ZAREIE et al., 2002).

Embora, a cultura do cártamo apresente alto potencial produtivo e capacidade de adaptação a diversos ambientes, ainda se tem baixa expressão econômica no Brasil, principalmente, pelo alto índice de acometimento de doenças, carecendo de estudos neste âmbito. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do

tratamento de semente com diferentes concentrações de ácido salicílico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *cártamo*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de outubro a dezembro de 2017, no Laboratório Didático e de Pesquisas em Sementes, ambos do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizado em Santa Maria, RS (29° 43' S; 53° 43' W e altitude de 95m). Em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5 (duas variedades de sementes de *cártamo* e cinco soluções concentradas com ácido salicílico), com oito repetições de 50 sementes.

As variedades de *cártamo* utilizadas foram ornamental (var. Lasting Orange) e oleífera (var. Yellow Saffron), as sementes de ambas variedades foram cultivadas na área experimental do Setor de Floricultura do Departamento de Fitotecnia da UFSM, em Santa Maria, na safra 2016/2017, e armazenados em câmara fria (15° C e 40% UR) em sacos de papel kraft (tipo pardo de 1,0 kg), com grau de umidade médio de 10% até a execução deste experimento (Tabela 1).

Variedade	MMS (g)	GRU (%)	EE, MS (%)
Ornamental	41,8	10,1	20,5
Oleífera	36,1	9,8	41,8

Tabela 1. Caracterização das variedades de sementes de *cártamo* (*Carthamus tinctorius* L.) quanto à massa de mil sementes (MMS), grau de umidade (GRU), extrato etéreo na matéria seca MS (EE).

As soluções de ácido salicílico 0 (testemunha); 250; 500; 750; e 1.000  $\mu$ M por um quilo de sementes. Para a aplicação dos tratamentos, as sementes foram colocadas em frascos de vidro de 500 mL e adicionadas às soluções concentradas de ácido salicílico (5% da massa total das sementes) correspondendo aos tratamentos supracitados, com posterior agitação manual pelo período de cinco minutos. Para o tratamento testemunha, o mesmo procedimento foi adotado, porém apenas com utilização de água destilada.

Na sequência avaliaram-se as qualidades das sementes pelos seguintes testes:

**Teste padrão de germinação (TPG) e primeira contagem da germinação (PCG):** realizado com oito repetições de 50 sementes, em rolo de papel de germinação, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador tipo BOD (box organism development), com fotoperíodo de 24 h e temperatura de 25 $\pm$ 2° C. As avaliações de germinação foram realizadas aos quatro e 14 dias após a sementeira (DAS), e os resultados expressos

em porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009a);

**Índice de velocidade de germinação (IVG) e o tempo médio de germinação (TMG):** realizaram-se avaliações diárias conforme a metodologia descrita por Maguire (1962) e Furbeck et al. (1993), respectivamente;

**Comprimento e massa de plântula:** foram realizados com oito repetições de 20 sementes, semeadas em duas linhas desencontradas no terço superior do papel de germinação, na mesma condição do TPG. Aos quatro DAS, mediu-se o comprimento da parte aérea e da raiz primária de dez plântulas normais de cada repetição. Na sequência, verificou-se a massa fresca das plântulas em balança de precisão de 0,001 g, e a determinação da massa seca ocorreu por secagem desse material em estufa de ventilação forçada a  $65\pm 5^\circ$  C por 48 h (Nakagawa, 1999);

**Teste de sanidade em papel-filtro** - foi realizado através da incubação em substrato de papel (Blotter Test), com oito repetições de 50 sementes. A semeadura ocorreu em caixas plásticas transparentes para germinação (gerbox), preparadas com três folhas de papel de germinação umedecido com água destilada correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco. A germinação foi inibida pelo método de congelamento por 24 h. Posteriormente, as sementes permaneceram em BOD por cinco dias com fotoperíodo de 12 h de luz e temperatura de  $20\pm 2^\circ$  C. Foram avaliadas em lupa (microscópio estereoscópio) as porcentagens de sementes infestadas e a identificação dos fitopatógenos em nível de gênero (Brasil, 2009b).

Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno  $\sqrt{x}/100$ . A análise de variância e de regressão, ambos em nível de 5% de erro, realizados com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a utilização de ácido salicílico em concentração de 250 a 500  $\mu$ M proporcionou melhor expressão do vigor (primeira contagem) e da germinação das sementes de cártamo, em relação à testemunha (sem ácido salicílico) e as demais concentrações utilizadas (Figura 1). Na solução de 500  $\mu$ M de ácido salicílico, obteve-se a máxima germinação para a variedade ornamental e oleífera, sendo esta 74 e 66%, respectivamente (Figura 1b). A máxima expressão do vigor também foi verificada nesta mesma concentração de ácido salicílico com valores de 55 e 42% para a variedade ornamental e oleífera, respectivamente (Figura 1a).

Todavia, soluções com ácido salicílico acima de 500  $\mu$ M resultaram em menor porcentagem de germinação, sendo que na concentração mais alta (1.000  $\mu$ M) verificou-se 64 e 60% de germinação para a variedade ornamental e oleífera, respectivamente.

Além disso, observou-se que a partir da concentração de 750  $\mu$ M de ácido

salicílico, os valores de vigor mantiveram-se estáveis, sugerindo-se que a aplicação exógena em concentrações muito elevadas de ácido salicílico não promove aumento de vigor das sementes de cártamo.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho, foram observados por Fernandes et al. (2019) em que as soluções com ácido salicílico acima de 500  $\mu\text{M}$  resultaram em menor porcentagem de germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

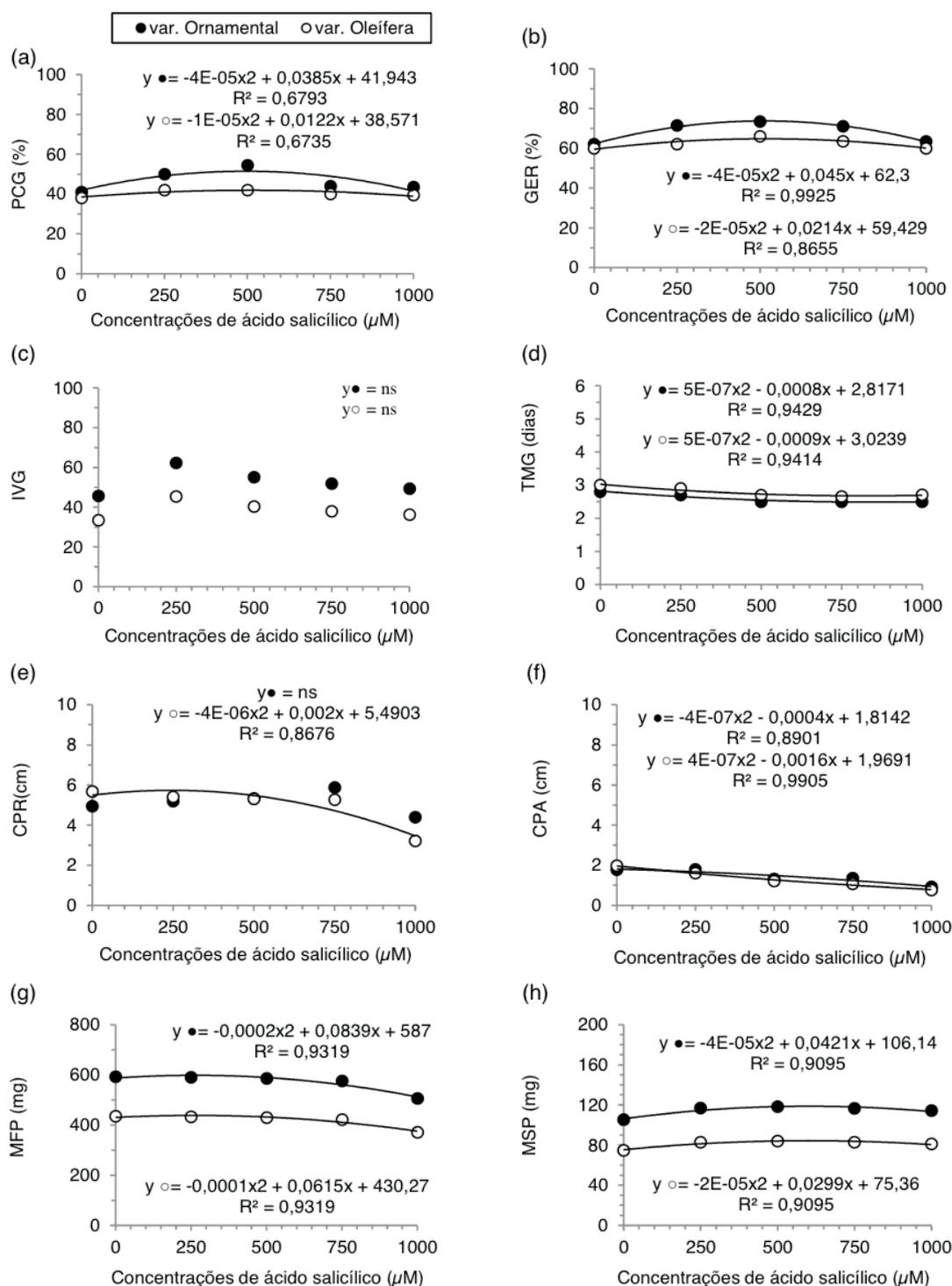


Figura 1. Primeira contagem de germinação (PCG; a), germinação de plântulas normais (GER; b), índice de velocidade de germinação (IVG; c), tempo médio de germinação (TMG; d), comprimento radicular (CPR; e), comprimento de parte aérea (CPA; f), massa fresca de plântula (MFP; g) e massa seca de plântula (MSP; h) de sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) em função das diferentes soluções com concentrações de ácido salicílico. ns: não significativo.

Miura e Tada (2014) observaram que altas concentrações de ácido salicílico afetaram negativamente a germinação de sementes, promovendo estresse oxidativo com a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), causando a degradação de lipídeos de membrana e morte celular.

O índice de velocidade de germinação (IVG) não apresentou significância, mantendo a velocidade de germinação similar em todas as concentrações de ácido salicílico, exceto a 250  $\mu M$ , em que se observou uma aceleração no processo germinativo em comparação ao tratamento testemunha (Figura 1c).

Khan et al. (2015) e Miura e Tada (2014) verificaram que, em geral, baixas concentrações de ácido salicílico beneficiam as plantas por aumentarem a sua capacidade antioxidante, porém, quando em altas concentrações deste sal, provoca efeitos negativos, aumentando a suscetibilidade aos estresses abióticos e promovendo a morte celular. Resultados semelhantes aos deste trabalho foram observados por Carvalho et al. (2007) e Lisboa et al. (2017) para as sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) e sorgo-sacarino (*Sorghum bicolor* L.) cv. BRS 506, respectivamente.

Para tempo médio de germinação das sementes (TMG), verificou-se redução conforme o aumento das concentrações do ácido salicílico, passando a valor constante a partir 500  $\mu M$  (Figura 1d). Nesta concentração, obtiveram-se valores de 2,5 e 2,7 dias para as variedades ornamental e oleífera, respectivamente. Namdeo (2007) salienta que as respostas das plantas a um determinado agente elicitor podem variar entre as espécies e há a necessidade de se determinar as concentrações adequadas para que se alcance a produção dos metabólitos de interesse.

O comprimento de parte aérea de plântulas demonstrou um comportamento decrescente com o aumento da concentração de ácido salicílico, sendo 1,8 (0  $\mu M$ ) e 0,9 cm (1.000  $\mu M$ ) para a variedade ornamental, e 2,0 (0  $\mu M$ ) e 0,8 cm (1.000  $\mu M$ ) para a variedade oleífera (Figura 1e). Brandão et al. (2016) verificaram um decréscimo de 81% no comprimento da parte aérea de perpétua-do-campo (*Alternanthera tenella* Colla) na concentração 400 mM de ácido salicílico.

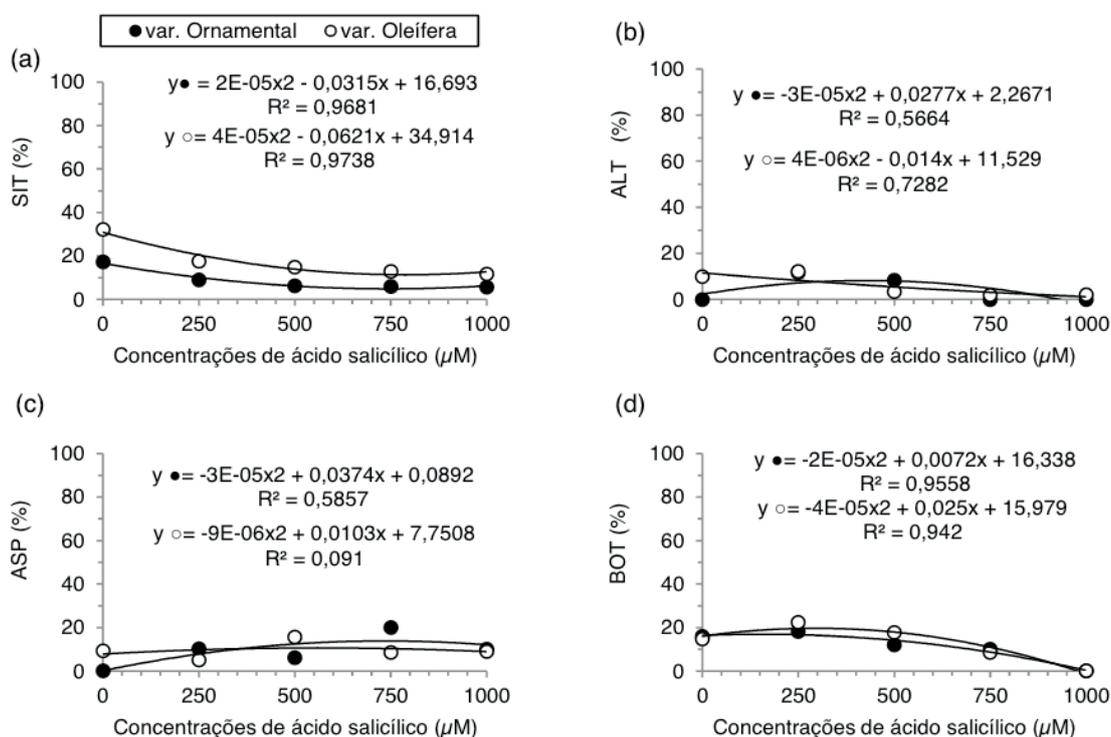
Gallego-Giraldo et al. (2011) relatam que o ácido salicílico tem a capacidade de dificultar o crescimento das plantas de agrião-de-parede (*Arabidopsis thaliana* L.) e alfafa (*Medicago sativa* L.) pela regulação da biossíntese de lignina, resultando em rigidez na parede celular secundária e, dessa forma, impedindo a alongação celular. Miura e Tada (2014), também, relatam que altas concentrações e a aplicação contínua de ácido salicílico causam danos severos ao crescimento das plantas de agrião-de-parede.

O comprimento radicular para a variedade oleífera apresentou-se mais sensível às concentrações acima de 500  $\mu M$  de ácido salicílico quando comparada a variedade ornamental (Figura 1f). Verificou-se um incremento no comprimento radicular de

plântulas nas concentrações de 0 a 750  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico para a variedade ornamental, enquanto que para a variedade oleífera se obteve valores menores no comprimento de raiz conforme o aumentado das concentrações de ácido salicílico. Brunet et al. (2015) estudando o efeito do tratamento de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) com ácido salicílico nas concentrações de 0; 250; 500; 750 e 1.000  $\mu\text{M}$  por quilo de semente, verificaram redução linear no comprimento de raiz das plântulas para um dos lotes estudados conforme aumentadas as concentrações do ácido.

Em relação à massa fresca de plântulas, esta foi reduzida nas concentrações mais elevadas de ácido salicílico para ambas as variedades de cártamo. Todavia, verificaram-se valores crescentes para massa seca de plântula até concentração de 500  $\mu\text{M}$ , sendo que a partir desta concentração reduziu-se a massa nas duas variedades. Maia et al. (2000) avaliando o efeito do ácido salicílico na germinação e vigor de sementes de soja (*Glycine max* L.), constataram que este ácido promove a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, aumenta os comprimentos da parte aérea e raiz, bem como matéria fresca de plântulas.

Na avaliação sanitária das sementes de cártamo (Figura 2), foram identificados os fitopatógenos dos gêneros *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Sclerotinia* spp., nas duas variedades de cártamo analisadas.



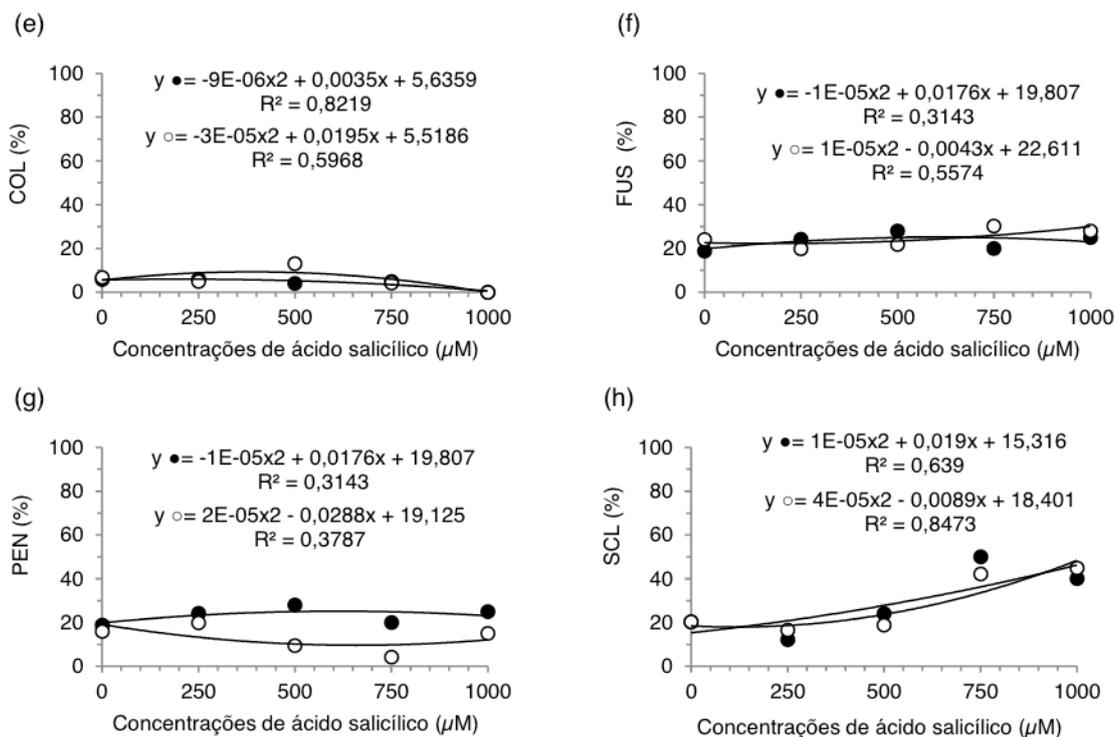


Figura 2. Sementes infestadas no teste de sanidade (SIT; a), *Alternaria* spp. (ALT; b), *Aspergillus* spp. (ASP; c), *Botrytis* spp. (BOT; d), *Colletotrichum* spp. (COL; e), *Fusarium* spp. (FUS; f), *Penicillium* spp. (PEN; g) e *Sclerotinia* spp. (SCL; h) de sementes de cârtamo (*Carthamus tinctorius* L.) em função das diferentes soluções com concentrações de ácido salicílico.

No tratamento sem utilização de solução concentrada de ácido salicílico (testemunha), a incidência de fitopatógenos foi de 17 e 35% sobre as sementes de cârtamo para as variedades ornamental e oleífera, respectivamente (Figura 2a), sugerindo que a variedade oleífera é mais suscetível ao ataque de fitopatógenos.

Entre os fitopatógenos incidentes, os de maior expressão porcentual foram os do gênero *Fusarium* spp. (24 e 25%), *Penicillium* spp. (19 e 13%) e *Sclerotinia* spp. (29 e 29%) para as variedades ornamental e oleífera, respectivamente, em todas as soluções concentradas de ácido salicílico. Girardi et al. (2013) trabalhando com a qualidade de sementes de cârtamo colhidas em diferentes períodos de maturação, também verificaram alta incidência de fitopatógenos nestas sementes, sendo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. os mais relevantes, com porcentagens de incidência de 62, 42 e 56%, respectivamente.

Verificou-se que a qualidade sanitária das sementes de cârtamo foi beneficiada pela utilização de ácido salicílico, sendo que, em geral, a variedade oleífera obteve redução mais expressiva na porcentagem de sementes infectadas quando comparada à variedade ornamental (Figura 2a). Houve redução na infestação por *Alternaria* spp. nas variedades ornamental e oleífera quando submetidas a crescentes concentrações de ácido salicílico em comparação à testemunha (Figura 2b).

Na variedade ornamental, observou-se controle total de *Alternaria* spp. nas

concentrações de 500, 750 e 1.000  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico. Ainda, verificou-se que solução concentrada com 1.000  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico proporcionou controle completo de *Botrytis* spp. (Figura 2d) e *Colletotrichum* spp. (Figura 2e) incidentes sobre as sementes de ambas as variedades de cártamo. Todavia, observou-se efeito antagônico no controle de *Fusarium* spp. (Figura 2f), *Penicillium* spp. (Figura 2g) e *Sclerotinia* spp. (Figura 2h) nesta mesma concentração, havendo aumento na infecção dos fitopatógenos mencionados.

Observou-se aumento na porcentagem de *Botrytis* spp. quando as sementes da variedade ornamental e oleífera foram submetidas à concentração de 250  $\mu\text{M}$ , em comparação à testemunha, mas em concentrações superiores houve aumento do controle deste fungo. Garcia (1999) relata que os principais causadores de danos à cultura do cártamo são os patógenos do gênero *Botrytis* spp., uma vez que estes patógenos, na fase de floração do cártamo, atacam as lígulas e se hospedam dentro do capítulo, depreciando o valor ornamental das hastes florais e inviabilizam a germinação das sementes. Já em relação ao *Colletotrichum* spp., não houve diferença no controle na concentração de 250  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico para a variedade ornamental, todavia a variedade oleífera apresentou redução na infestação deste fungo.

Em relação ao controle de *Fusarium* spp., a variedade ornamental não foi beneficiada com as concentrações de ácido salicílico, sendo que se observou porcentagens maiores de infecção por desse fungo em todas as concentrações utilizadas em comparação à testemunha. Já para a variedade oleífera, as concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  proporcionaram redução na porcentagem de sementes infectadas por *Fusarium* spp. em relação à testemunha.

Observou-se menor infestação por *Penicillium* spp. quando as sementes foram submetidas a concentrações de 500 e 750  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico. Yu e Zheng (2006) trabalhando com ácido salicílico e leveduras contra *Penicillium expansum* demonstraram que o ácido salicílico possui efeito fungicida *in vitro* sobre este fungo quando aplicadas concentrações maiores que 0,6 mM.

Não se verificou benefício na aplicação de ácido salicílico para as variedades de cártamo estudadas em relação ao controle de *Sclerotinia* spp., sendo que a incidência de *Sclerotinia* spp. foi menor apenas quando as sementes foram expostas à concentração de 250  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico quando comparada à testemunha. Vechiato e Parisi (2013) relatam a importância da qualidade sanitária das sementes para a formação do estande de plantas, pois a infestação de fungos patogênicos associados às sementes no campo ocasionam podridões, manchas foliares e danos ainda em estágio plantular.

## 4 | CONCLUSÃO

O ácido salicílico em concentrações de 250 a 500  $\mu\text{M}$  como tratamento de sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) foi benéfico para o controle da infestação de fitopatógenos sobre as mesmas, afetando positivamente a qualidade fisiológica das variedades de cártamo (ornamental e oleífera), proporcionando melhor expressão do vigor e da germinação.

## REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, C. A.; DEON, M.D.; QUEIRÓZ, M.A.; DANTAS, B.F. Germinação e vigor de sementes de melancia com diferentes ploidias submetidas a tratamentos pré-germinativos. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, p. 82-86, 2006. DOI: 10.1590/S0101-31222006000300012
- BRANDÃO, I. R.; KLEINOWSKI, A. M.; RIBEIRO, M. V.; LUCHO, S. M.; MILECH, C.; BRAGA, E. J. B. Capacidade elicitora do ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Alternanthera tenella*. **Revista Congrega Urcamp**, Bagé, v.1, n.1, p.1-11, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009b. 200p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009a. 395p.
- BRUNES, A. P.; DIAS, L. W.; LEITZKE, I. D.; SILVA, A. S.; SOARES, V. N. Tratamento de sementes de girassol com ácido salicílico. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 11 n. 21; p. 1847-54, 2015.
- CAMPOS A D. 2009. **Considerações sobre indução de resistência a patógenos em plantas**. Brasília: Embrapa. 28p.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 588p.
- CARVALHO, P. R.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Uso de ácido salicílico em calêndula. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 114-124, 2007. DOI: <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n1/16.pdf>
- EMONGOR, V.; OAGILE, O. **Safflower production**. Botswana: The Regional Universities Forum for Capacity Building in Agriculture - RUFORUM. 2017. 67p.
- FAOWATER. Food and Agriculture Organization - Land and water discussion. **Crop Water Information: Safflower**. 2015. Disponível em: <[http://www.fao.org/nr/water/cropinfo\\_safflower.html](http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_safflower.html)>. Acesso em: 02 mar. 2017.
- FERNANDES, T. S.; NINES, U. R.; ROSO, R.; LUDWIG, E. J.; ZINI, P. B.; MENEGAES, J. F.; BARBIERI, G. F.; SANTOS, C. V. Physiological quality of common bean seeds subjected to different concentrations of salicylic acid. **Journal of Agricultural Science**, v.11, n.1, p.448-458, 2019. DOI:10.5539/jas.v11n1p448
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI: 10.1590/S1413-70542014000200001
- FURBECK, S. M.; BOURLAND, F. M.; WATSON, C. E. J. Relationship of seed and germination measurements with resistance to seed weathering cotton. **Seed Science and Technology**, v. 21, n. 3, p. 505-12, 1993.

- GALLEGO-GIRALDO, L.; ESCAMILLATREVINO, L.; JACKSON, L. A.; DIXON, R. A. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down regulated plants. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 108, n. 51, p. 20814-20819, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117873108>
- GARCIA, A. G. **Cultivos herbáceos extensivos**. 6 ed. Barcelona: Ed. Mundi-Prensa. 1999, 779p.
- GIRARDI, L. B.; BELLÉ, R. A.; LAZAROTTO, M.; MICHELOM, S.; GIRARDI, B. A.; MUNIZ, M. F. B. Qualidade de sementes de cártamo colhidas em diferentes períodos de maturação. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambiental**, Curitiba, v. 11, p. S67-S73, 2013. DOI:
- KHAN, M. I. R.; FATMA, M.; PER, T. S.; ANJUM, N. A.; KHAN, N. A. Salicylic acid-induced a biotic stress tolerance and underlying mechanism plants. **Front Plant Science**, v. 6, n. 462, p. 1-35, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00462
- LISBOA, L. A. M.; LAPAZ, A. de M.; VIANA, R. da S.; LEONEZI, R. S.; DE FIGUEIREDO, P. A. M. Influência do ácido salicílico no processo germinativo de sementes de cultivares de sorgo sacarino. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 2, p. 37-49, 2017.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962. DOI: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x
- MAIA, F. C.; MORAES, D. M.; MORAES, R. C. P. Ácido Salicílico: efeito na qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 264-70, 2000. DOI: 10.17801/0101-3122/rbs.v22n1p264-270
- MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 1-12, 2014. DOI: 10.3389/fpls.2014.00004
- MOURA, P. C. S.; BORTOLHEIRO, F. P. de A. P.; GUIMARÃES, T. M.; LEAL, D. P. V.; SILVA, M. de A. Características gerais e ecofisiologia do cártamo (*Carthamus tinctorius*). **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 4, n. especial, p. 136-150, 2015.
- NAKAGAWA, J. **Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas**. In: KRZYZANOSWIKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES. 1999. 218p.
- NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 69-79, 2007.
- TAVARES, L. C.; CASSYO, C. A.; BRUNES, A. P.; OLIVEIRA, S.; VILLELA, F. A. Treatment of rice seeds with salicylic acid: seed physiological quality and yield. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 3, p. 352-356, 2014. DOI: 10.1590/2317-1545v36n3636
- VECHIATO, M. H.; PARISI, J. J. D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.27-32, 2013.
- VIEIRA, E. L.; SOUZA, G. S.; SANTOS, A. R.; SILVA, J. S. **Manual de fisiologia vegetal**. São Luis: Edufma, 2010. 230p
- YU, T.; ZHENG, X. D. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of the antagonist *Cryptococcus laurentii* in Apple fruit. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 25, n. 2, p. 166-174, 2006. DOI: 10.1007/s00344-005-0077-z
- ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 1031-1039, 2002. DOI: 10.1094/MPMI.2002.15.10.1031

## ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* KING EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Data de aceite: 20/01/2020

Data de submissão: 04/10/2019

### Wirton Pires Pereira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte,  
Centro de Ciências Biológicas, Departamento de  
Botânica, Ecologia e Zoologia, LABCEN  
Natal, Rio Grande do Norte  
<http://lattes.cnpq.br/0490994751879130>

**RESUMO:** O mogno (*Swietenia macrophylla* King) é uma espécie arbórea nativa do ambiente amazônico, a qual vem sofrendo intensa pressão extrativista em função das propriedades da sua madeira, estando classificada como vulnerável pela IUCN (2019). A micropropagação é a técnica de cultura de tecidos vegetais que oferece uma maneira de propagar em grande escala indivíduos vegetais para repô-los no ambiente ou conservá-los *in vitro*. O estabelecimento *in vitro*, que é a primeira etapa de um protocolo de micropropagação tem como obstáculos a contaminação microbiana endofítica e a oxidação fenólica, ambos podendo causar a inviabilidade dos explantes. Objetivou testar qual o melhor tratamento para reduzir tanto a contaminação endógena quanto a oxidação fenólica em segmentos raquidianos da folha do mogno através da combinação de substâncias antimicrobianas e antioxidantes

em quatro tratamentos: o tratamento controle onde os explantes foram inoculados ao meio de cultura básico; o tratamento 1 em que os explantes foram banhados previamente em soluções antimicrobianas e antioxidantes antes de serem adicionados ao meio de cultura básico; o tratamento 2 em que os explantes foram inoculados ao meio de cultura acrescido destes constituintes e o tratamento 3 em que os explantes foram tanto banhados nestas soluções quanto foram inoculados no meio de cultura acrescido delas. Aos vinte dias de estabelecimento dos explantes *in vitro* os contaminantes foram reduzidos de 60% no tratamento controle para 20% no tratamento 3 com médias de 42,5% para contaminação 57,5 % para explantes sadios enquanto que a oxidação fenólica teve médias gerais de 95% para oxidações e 5% para não oxidações nos explantes, Conclui-se que o tratamento 3 foi o mais eficaz para diminuir as contaminações enquanto que os tratamentos para diminuir as oxidações não se mostraram eficazes, podendo em outros experimentos utilizar-se outro antioxidante para banhar os explantes ou usar-se tecidos menos lignificados.

**PALAVRAS-CHAVE:** mogno, micropropagação de espécies arbóreas, contaminação *in vitro*, oxidação fenólica.

## IN VITRO ESTABLISHMENT OF *Swietenia macrophylla* KING IN VEGETABLE TISSUE CULTURE

**ABSTRACT:** Mahogany (*Swietenia macrophylla* King) is a native tree species from the Amazonian environment, which has been under intense extractive pressure due to its wood properties, being classified as vulnerable by IUCN (2019). Micropropagation is the plant tissue culture technique that offers a way of large-scale propagation of plant individuals to restore them to the environment or conserve them in vitro. The in vitro establishment, which is the first stage of a micropropagation protocol, has obstacles to endophytic microbial contamination and phenolic oxidation, both of which can cause explants to be unviable. It aimed to test the best treatment to reduce both endogenous contamination and phenolic oxidation in mahogany leaf spinal segments by combining antimicrobial and antioxidant substances in four treatments: the control treatment where the explants were inoculated into the basic culture medium; treatment 1 wherein the explants were previously bathed in antimicrobial and antioxidant solutions before being added to the basic culture medium; treatment 2 wherein the explants were inoculated into the culture medium plus these constituents and treatment 3 wherein the explants were both bathed in these solutions and inoculated into the culture medium plus them. Twenty days after in vitro explant establishment the contaminants were reduced from 60% in the control treatment to 20% in the treatment 3 with means of 42.5% for contamination 57.5% for healthy explants while phenolic oxidation had overall averages of 50%. 95% for oxidation and 5% for non-oxidation in explants. It is concluded that treatment 3 was the most effective to reduce contamination while treatments to reduce oxidation were not effective, and in other experiments another antioxidant may be used. to bathe the explants or to use less lignified tissues.

**KEYWORDS:** mahogany, micropropagation of tree species, in vitro contamination, phenolic oxidation.

### 1 | INTRODUÇÃO

O mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla* King 1886) é uma árvore da família das Meliáceas. Segundo Lorenzi (2008) ela é uma árvore de altura média variando entre 25-30 m com tronco de 50-80 cm de diâmetro revestido com casca pardacenta com ritidoma escamoso. Ela ocorre naturalmente no ambiente amazônico desde as latitudes de 20°N no México (Yucatán) até 14° S em Mato Grosso, no Brasil segundo Carvalho (2007).

Devido às qualidades que reúne a madeira do mogno foi muito procurada pelos madeireiros. Segundo Prieto (2013, p.695) “A madeira de *Swietenia macrophylla* King (mogno) está entre as mais comercializadas e valorizadas do mundo, sendo explorada há mais de 200 anos, muitas vezes de maneira ilegal”. Estando classificada como espécie vulnerável, categoria A1cd+2cd segundo a International Union for Conservation of Nature - IUCN (2019). O que gera a necessidade preeminente da

sua conservação e reintrodução dela no seu habitat.

Uma das formas de repor os indivíduos desta espécie no seu ambiente natural é a regeneração destes a partir das técnicas de cultura de tecidos vegetais.

“A cultura de tecidos vegetais é um termo que exprime o conceito de que uma ampla gama de tipos de tecidos da planta pode ser cultivada sob condições assépticas e *in vitro*, visando micropropagação, melhoramento, armazenamento ou limpeza clonal. A micropropagação é um termo usado exclusivamente para referir-se à propagação *in vitro* a partir de alguma parte específica da planta – chamada explante – baseada na capacidade morfogenética e totipotencial das células” (VASIL & HILDEBRANDT, 1965 apud CID & TEIXEIRA, 2014, p.19).

Para se iniciar e estabelecer uma cultura *in vitro* dois fatores fundamentais precisam ser superados: a necrose dos explantes, causada por oxidações de compostos fenólicos precursores da lignina existente nas paredes celulares secundárias e terciárias das células do explante e os microrganismos existentes sobre ou no interior do explante, por vezes fitopatogênicos que mesmo após a desinfestação superficial do explante permanecem endogenamente nos explantes causando a morte dele. Plantas lenhosas como é o caso do mogno são mais propensas a terem compostos fenólicos por causa dos tecidos de sustentação e microrganismos endógenos, os quais desempenham várias funções ou podem ser fitopatogênicos, o que dificulta sobremaneira o seu estabelecimento *in vitro*, levando ao descarte dos explantes oxidados e contaminados, gerando perda de tempo, esforço e recursos materiais.

Diante do exposto o experimentador tem a escolha de lançar mão do uso de antioxidantes e antibióticos para estabelecer a cultura *in vitro* a mais viável e saudável possível, respectivamente, uma vez que explantes com tecido oxidado (necrosado) podem inviabilizar o influxo de nutrientes e hormônios existentes no meio de cultura e assim a formação de parte aérea e posteriormente o enraizamento, bem como microrganismos resistentes ao processo de desinfestação e/ou pré-existentes endogenamente no explante podem causar diretamente a sua morte ou indiretamente ao competir pelos nutrientes presentes no meio de cultura segundo SCHERWINSKI-PEREIRA (2010). Assim objetivou-se estabelecer *in vitro* segmentos peciolares (raquidianos) da folha do mogno avaliando-se a taxa de contaminações e oxidações fenólicas com o uso de antimicrobianos e antioxidantes, respectivamente.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

De duas populações biológicas de *Swietenia macrophylla*, uma com indivíduos de 27 meses de idade, oriunda de Tietê, São Paulo e outra com indivíduos de 33 meses, proveniente do Parque das Dunas, Natal, Rio Grande do Norte, localizadas

na casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia de Conservação de Espécies Nativas – LABCEN, Centro de Biociências da UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, foram coletadas as raques de suas folhas com média de trinta centímetros, lavando-se as folhas em água corrente, retirando-se os seus folíolos, deixando os seus peciólulos e cortando-as em quatro segmentos em uma bandeja contendo água de torneira. Posteriormente, elas foram levadas à capela de fluxo onde passaram pelo processo de desinfestação. A desinfestação consistiu em imergi-los em álcool etílico a 70% por 30 segundos, depois em hipoclorito de sódio concentrado entre 0,25% com três gotas de detergente líquido comercial durante cinco minutos e lavá-los três águas destiladas previamente esterilizadas com duração de cinco minutos cada, em recipientes previamente esterilizados.

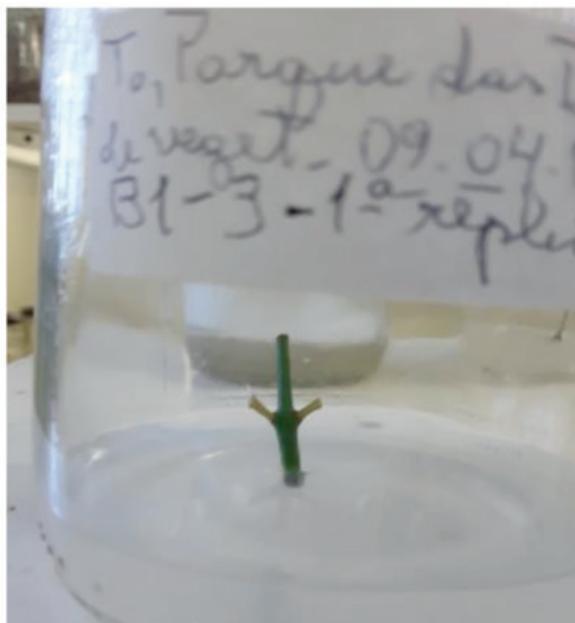


Figura 1. Segmento peciolar (raquidiano) da folha de *Swietenia macrophylla* King estabelecido *in vitro*, UFRN, Natal, RN, 2019.

Após a desinfestação, eles foram cortados em pedaços de cerca de dois centímetros em papel-filtro no interior de placa de Petri previamente esterilizados, inoculados em frascos de cultura de 300 ml contendo 30 ml de meio de cultura Wood Plant Medium (WPM- Lloyd & McCown, 1980) e vedados com filme de PVC, sofrendo quatro tratamentos, a saber: **Tratamento Controle (T0)**: meio de cultura WPM básico dissolvido em água destilada, com o pH ajustado para 5,8 +/- 0,05, 7g/L de ágar, 20g/L de sacarose e autoclavado a 120°C durante vinte minutos. **Tratamento 1 (T1)**: os explantes foram banhados previamente em soluções do fungicida Cercobin® (princípio ativo: tiofanato metílico) a 0,7g/L durante 30 minutos, dos antibióticos Cefalexina (50mg/L) + Amoxicilina (50mg/L) dissolvidas em solução-tampão de fosfato de potássio a 0,1 M com pH 6,0 durante 30 minutos, e do antioxidante polivinilpirrolidina (PVP, peso molecular 40.000) a 6 g/L também

durante 30 minutos nesta ordem e logo depois inoculados em frascos contendo o meio de cultura WPM dissolvido em água destilada, com pH ajustado para 5,8, 7g/L de ágar, 20g/L de sacarose e autoclavado a 120°C durante vinte minutos, adicionado de 2g/L de carvão ativado vedados com filme de PVC. **Tratamento 2 (T2):** os explantes foram inoculados em frascos contendo meio WPM dissolvido em água destilada, com pH a 5,8, 7g/L de ágar, 20g/L de sacarose, suplementado com soluções de antibióticos Cefalexina (50mg/L) + Amoxicilina (50mg/L) dissolvidas em solução-tampão de fosfato de potássio a 0,1M com pH 6,0, do fungicida Cercobin® (princípio ativo: tiofanato metílico) a 0,7g/L dissolvidos em água destilada e carvão ativado a 2g/L autoclavado a 120°C durante quinze minutos, sem banhos prévios em soluções bactericidas, fungicida e antioxidante. **Tratamento 3 (T3):** os explantes foram banhados previamente em soluções do fungicida Cercobin® (princípio ativo: tiofanato metílico) a 0,7g/L durante 30 minutos, dos antibióticos Amoxicilina (50mg/L) + Cefalexina (50mg/L) dissolvidas em solução-tampão de fosfato de potássio a 0,1 M com pH 6,0, do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) a 6 g/L durante 30 minutos dissolvidos em água destilada e esterilizada e inoculados em meio WPM dissolvido em água destilada, com pH a 5,8, 7g/L de ágar, 20g/L de sacarose e autoclavado a 120°C durante quinze minutos, suplementado com soluções de antibióticos Amoxicilina (50mg/L) + Cefalexina (50mg/L) dissolvidas em solução-tampão de fosfato de potássio a 0,1 M com pH 6,0, do fungicida Cercobin® (princípio ativo: tiofanato metílico) a 0,7g/L e carvão ativado a 2g/L.

Após passarem pelos tratamentos os explantes foram postos em sala de incubação à temperatura de 25° C, com o fotoperíodo de 12 horas de iluminação/12 horas de escuridão, deixados na penumbra durante cinco dias e após este prazo eles foram postos em iluminação sob luz fluorescente convencional. A cada cinco dias eles foram observados quanto a oxidações e contaminações microbianas. Foram considerados oxidados os explantes que apresentaram manchas nitidamente marrons ou escurecidas em alguma de suas partes ou no interior deles, como nos tecidos internos das suas extremidades – extremidade superior, extremidade inferior e peciólulos. E foram considerados contaminados por fungos os explantes que apresentaram sobre ele ou na sua base que se insere no meio de cultura micélios filamentosos, assim como foram considerados contaminados por bactérias os explantes que apresentaram na base deles ou sobre eles alguma colônia de superfície lisa característica das bactérias.

O delineamento experimental foi feito em blocos completamente randomizados considerando a idade de cada grupo de plantas bem como cada ambiente em que elas estavam como sendo um bloco. Assim, definiu-se a idade das plantas de 33 meses que estavam na casa de vegetação como sendo o bloco I, as plantas de 27 meses que estavam na casa de vegetação como bloco II e as plantas de 33 meses

que estavam no viveiro como sendo o bloco III. Os indivíduos de cada bloco foram devidamente numerados.

Para garantir a casualização se sorteou plantas que contivessem folhas com comprimento de cerca de trinta centímetros no dia do sorteio, sempre que possível sem sintomas de fitopatogenicidade ou deficiência nutricional para serem inoculadas no dia. Após a desinfestação os quatro segmentos foram postos nos quatro tratamentos diferentes, de modo que as diferenças intrínsecas de cada bloco ficassem distribuídas em cada tratamento até completar-se o total de dez réplicas por tratamento. A unidade experimental constituiu-se de um explante por frasco com meio de cultura. Aos vinte dias de avaliação determinou-se a proporção (taxa percentual) de explantes contaminados e/ou oxidados por tratamento.

### 3 | RESULTADOS

Em relação à contaminação microbiana o tratamento controle (T0) apresentou 40% dos explantes sem contaminação. O tratamento 1 (T1) 50% sem contaminação. O tratamento 2 (T2) obteve 60% sem contaminação. O tratamento 3 foi o mais eficiente para evitar a contaminação com 80% das réplicas sem contaminação. Com médias de 57,5 para as réplicas não contaminadas e 42,5 para as réplicas contaminadas.

TRATAMENTO	NÃO CONTAMINAÇÃO (%)	CONTAMINAÇÃO (%)
T0	40	60
T1	50	50
T2	60	40
T3	80	20
Média	57,5	42,5

Tabela 1 – Porcentagem de réplicas contaminadas e não contaminadas por tratamento decorridos vinte dias de inoculação. UFRN, Natal, RN, 2019.

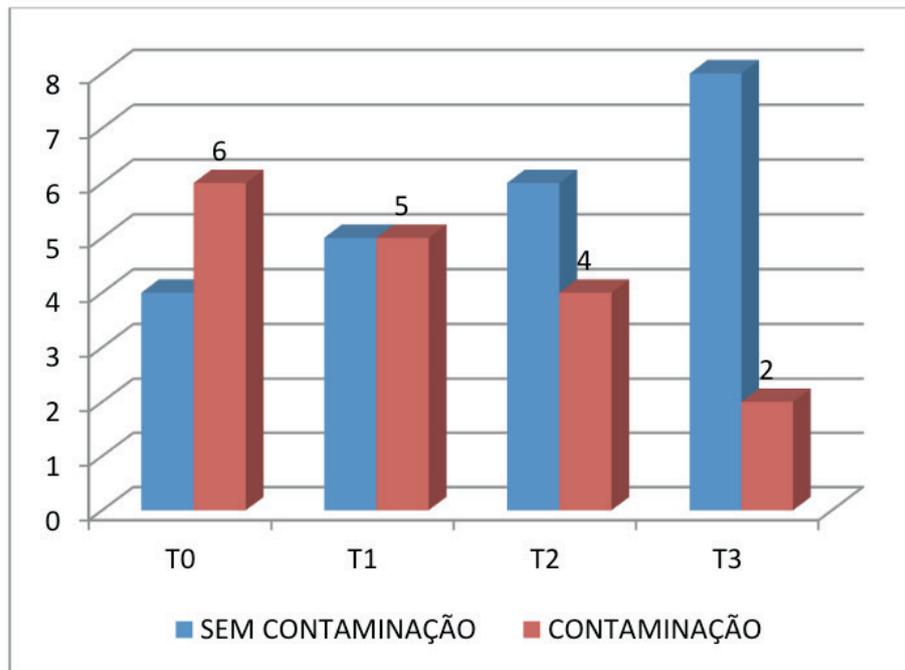


Figura 2. Gráfico mostrando a contaminação microbiana e a não contaminação microbiana entre os tratamentos com dez réplicas cada aos vinte dias de inoculação. UFRN, Natal, RN, 2019.

TRATA- MENTO	CONTAMINAÇÃO FÚNGICA(%)	CONTAMINAÇÃO BACTE- RIANA(%)
T0-Controle	60	10
T1	20	30
T2	10	30
T3	80	20
Média	22,5	22,5

Tabela 2. Tipos de microrganismos presentes em explantes de *Swietenia macrophylla* de acordo com os tratamentos empregados para combatê-los. UFRN, Natal, RN, 2019.

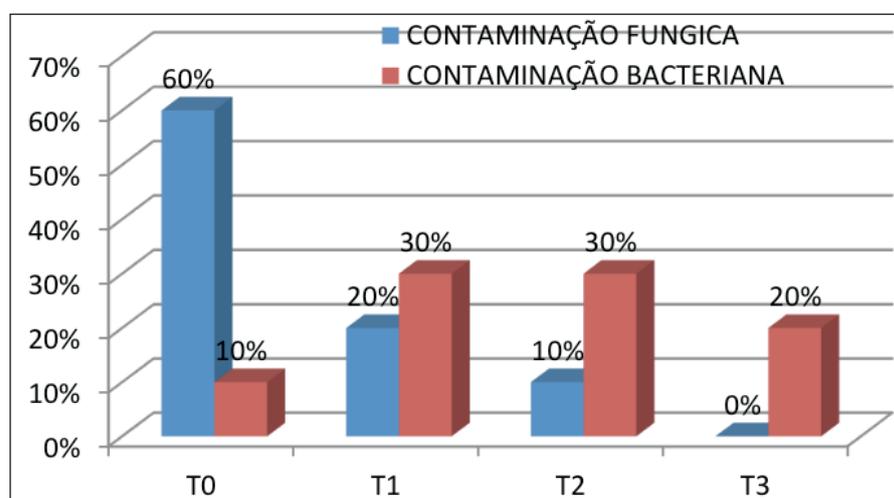


Figura 3. Gráfico mostrando os tipos de microrganismos presentes nos tratamentos para controlá-los aos vinte dias de inoculação. UFRN, Natal, RN, 2019.

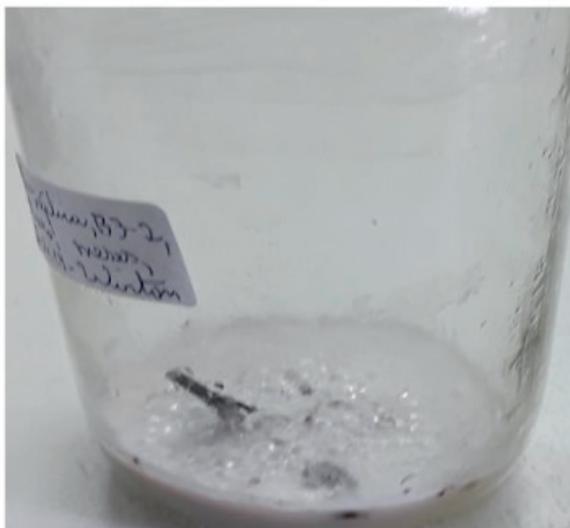


Figura 4. Explante de *Swietenia macrophylla* King *in vitro* envolto por micélio fúngico sobre o meio de cultura. , UFRN, Natal, RN, 2019.

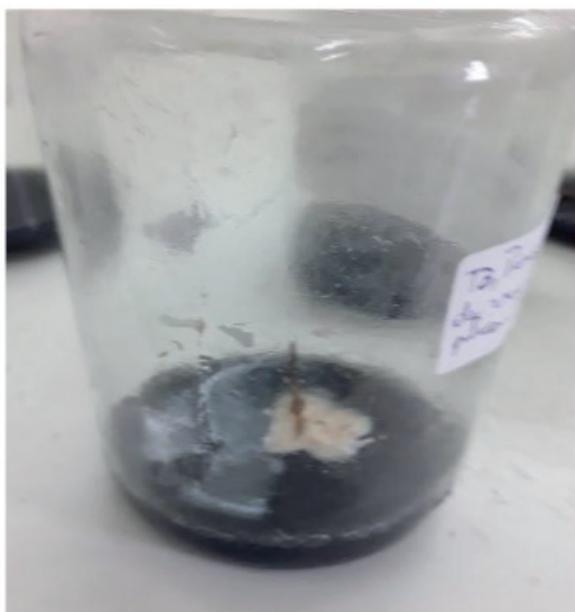


Figura 5. . Explante de *Swietenia macrophylla* King *in vitro* envolto por colônia bacteriana sobre o meio de cultura. UFRN, Natal, RN, 2019.

As oxidações foram mais severas do que as contaminações. O tratamento 0 (controle) obteve apenas 10% de réplicas sem oxidações (1ª réplica) contra 90% de réplicas oxidadas. Os tratamentos 1 e 2 tiveram 100% de oxidação em pelo menos algum ponto dos explantes. Enquanto o tratamento 3 também obteve apenas 10% (2ª réplica) de não oxidação das réplicas contra 90% de oxidações das réplicas. Algumas réplicas dos tratamentos não sofreram oxidações aos cinco dias ou mais de mantidas na penumbra, enquanto outras já apresentavam sinais de oxidação já aos cinco dias de incubação na penumbra. Alguns explantes mostraram sinais de oxidação já no processo de desinfestação ou/e após os banhos nas soluções de fungicida, de antibióticos e de PVP. As oxidações iniciaram-se pelas extremidades superiores, inferiores e peciolulares; ficando majoritariamente limitadas a elas, enquanto que

em outros explantes elas se espalharam para o restante do explante, oxidando-os quase que completamente. Mesmo as extremidades basais dos explantes inseridas no meio de cultura com carvão ativado não permaneceram totalmente livres de sinais de oxidação.

TRATAMENTO	NÃO OXIDAÇÃO(%)	OXIDAÇÃO(%)
T0	10	90
T1	0	100
T2	0	100
T3	10	90
Média	5	95

Tabela 3. Oxidações fenólicas em segmentos de raque de *Swietenia macrophylla* King aos vinte dias de incubação. UFRN, Natal, RN, 2019



Figura 5. Gráfico representando a oxidação fenólica em segmentos de raque de *Swietenia macrophylla* dispostas nos tratamento com dez réplicas cada aos vinte dias de incubação *in vitro*. UFRN, Natal, RN, 2019.

#### 4 | DISCUSSÃO

Os percentuais de contaminações foram decrescentes à medida que se foi incorporando os banhos com as soluções antimicrobianas e/ou incorporando-as ao meio de cultura nos tratamentos, sugerindo a eficácia dos tratamentos 1, 2 e 3 em diminuí-las progressivamente; sendo o tratamento 3 em que se combinou os banhos dos explantes com as soluções antimicrobianas com elas sendo incorporadas aos meios de cultura o mais eficaz. A média de 57,5 de não contaminações contra 42,5 para as contaminações nos tratamentos sugerem este fato.

Lopes, Lameira & Fortes (2003) testando vários tratamentos para descontaminar

explantes de mogno ao combinarem imersão dos explantes em álcool a 70% por 30 segundos, imersão em NaClO a 2% com pH ajustado para 6 por 15 minutos e em ampicilina concentrada a 0,1mg/ml por 30 minutos, antibiótico penicilínico semelhante à amoxicilina, obtiveram 80% de contaminação bacteriana em segmentos apicais e 90% em segmentos nodais em plantas de 5 meses de idade germinadas e crescidas em casa de vegetação, porém eles obtiveram 0% e 23% de contaminação fúngica, respectivamente. Mesmo no tratamento utilizando o álcool a 70% por 30 segundos, imersão em NaClO a 2% por 15 minutos e estreptomicina a 0,1mg/ml por 30 minutos, um antibiótico de maior espectro bacteriano, a porcentagem de contaminação bacteriana foram de 87% e 36% para os segmentos apicais e nodais, respectivamente e 12% e 50% de contaminação fúngica, respectivamente. De modo geral este experimento sugere que os antibióticos associados ao álcool a 70% e ao NaClO a 2% foram ineficientes para a descontaminação de bactérias, assim como a onipresença destes microrganismos em plantas de mogno. O que está de acordo com o nosso experimento que apresentou médias de 22,5 tanto para bactérias quanto para fungos. Sendo difícil dizer se eles exercem uma função mutualística ou parasítica nessas plantas.

O grande percentual de oxidações fenólicas em todos os tratamentos reflete o alto grau de compostos fenólicos existentes no mogno como se pode ver na secção transversal do pecíolo do mogno quase totalmente escuro devido à ligação do cloreto férrico aos compostos fenólicos ali presentes.

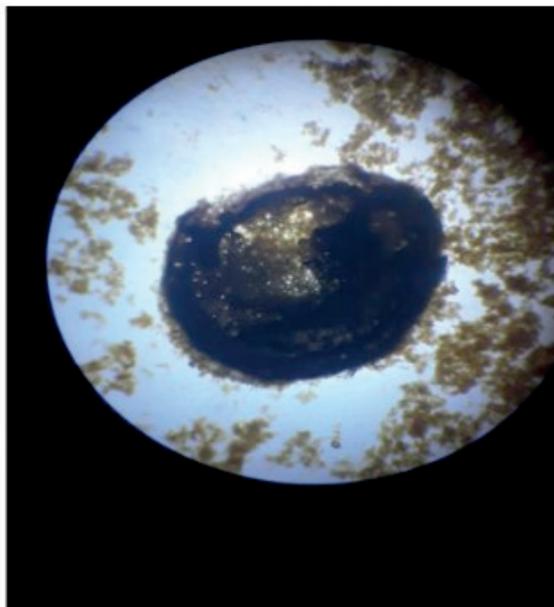


Figura 6. Secção transversal do pecíolo (raque) de *Swietenia macrophylla* King oxidada por compostos fenólicos corada com cloreto férrico a 3% vista ao microscópio óptico, UFRN, Natal, 2019.

Plantas lenhosas como o mogno possuem grande quantidade de compostos fenólicos que dentre as várias funções que desempenham como nas plantas

herbáceas são constituintes das paredes secundárias e terciárias formando a lignina das células dos tecidos de sustentação, característico destas plantas.

As extremidades excisadas foram os locais que apresentaram maior oxidação, devido justamente ao contato dessas partes com o oxigênio do ar no interior dos frascos. Os antioxidantes utilizados – PVP e carvão ativado nas concentrações utilizadas não se mostraram eficientes para diminuir as oxidações nos explantes. Uma vez que se instala o escurecimento do tecido do explante dificilmente ele é reduzido ou revertido. O carvão ativado só preservou cinco bases da fotooxidação no T2 e duas bases no T3. O pré-tratamento para se deixá-los cinco dias na penumbra antes de colocá-los sob iluminação, foi efetivo para alguns explantes enquanto que para outros, não; sendo que mesmo para os que ele foi efetivo eles se oxidaram posteriormente, só restando dois explantes ao final dos vinte dias de avaliação totalmente sem manchas escuras. Poderia ter-se feito uma escala gradual das áreas oxidadas para classificar os explantes nelas. Porém seria muito subjetivo identificar visualmente quais tiveram oxidações intensas das não intensas, por isso preferiu-se considerar como oxidado o explante que apresentasse qualquer sinal de escurecimento; o que, dependendo do grau de oxidação do explante, não o inviabiliza necessariamente. Não houve extravasamento de exsudação fenólica dos explantes para os meios de cultura.

Sendo que os dois únicos explantes que sobreviveram pode ter sido pelo fato dos compostos fenólicos existentes nas células deles não terem entrado em contato com o oxigênio aos vinte dias de inoculação.

Talvez se tivesse utilizado a solução de PVP logo após as soluções de álcool e hipoclorito de sódio e antes das soluções de antimicrobianos ou outro antioxidante haveria um resultado com menos oxidações posteriores nos explantes *in vitro*.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento T3 foi o mais eficaz na redução dos contaminantes microbianos com apenas 20% dos explantes contaminados contra 80% não contaminados. Nenhum dos tratamentos contra a oxidação fenólica se mostrou eficaz para evitá-la com médias de 5% para os tratamentos sem oxidações contra 95% para os tratamentos com oxidações nos explantes.

Plantas adultas dessa espécie são difíceis de estabelecer *in vitro* devido ao alto percentual de oxidações devido aos compostos fenólicos presentes.

Experimentos utilizando-se tecidos menos lignificados de plântulas dessa espécie com outros antioxidantes como o ácido ascórbico ou o ácido cítrico provavelmente serão mais eficazes para sobrepor a oxidação fenólica.

## REFERÊNCIAS

CARVALHO, P. E. R. **Circular Técnica 140**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 12p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/42435/1/Circular140.pdf>. Acesso em 01 mai 2019.

CID, L. P. B. & TEIXEIRA, J. B. Explante, Meio de Cultura, Luz e Temperaturas. *In*: CID, L. P. B. (ed.) **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, D.F.:Embrapa, 2014. 325 p. p. 19.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A. & FORTES, G. R. L. Comparação de procedimentos para descontaminação de explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista de Ciências Agrárias**. Belém, v. 40, p. 63-71, jul /dez, 2003. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/405679/comparacao-de-procedimentos-para-descontaminacao-de-explantes-de-mogno-swietenia-macrophylla-king>. Acesso em: 20 nov 2017.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, v.1, 384 p.

PRIETO, P.V. *Swietenia macrophylla*. *In*: MARTINELLI, G. & MORAES, N. A. (orgs.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Tradução: Flávia Anderson & Chris Hieatt. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p. p. 695.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446 p.

World Conservation Monitoring Centre 1998. *Swietenia macrophylla*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32293A9688025.en>. Acesso em: 23 mar 2019.

## MORFOANATOMIA DOS ORGÃOS VEGETATIVOS DE ESPÉCIES DE PORTA-ENXERTO DE *Rosa* SP. CULTIVADAS NO MUNICÍPIO DE BARBACENA, MG

Data de aceite: 20/01/2020

Data de Submissão: 11/11/2019

### **Patricia Azevedo Rodrigues Guedes**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

Barbacena – Minas Gerais

<http://lattes.cnpq.br/9702062705643726>

### **André Pociano de Almeida**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

Barbacena – Minas Gerais

<http://lattes.cnpq.br/4711674264852193>

### **Marília Maia de Souza**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

Barbacena – Minas Gerais

<http://lattes.cnpq.br/5054854939552132>

### **Glauco Santos França**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

Barbacena – Minas Gerais

<http://lattes.cnpq.br/4554721023581829>

**RESUMO:** O gênero *Rosa* sp. Linnaeus, 1753, pertence à família Rosaceae. As roseiras de corte do município de Barbacena são produzidas através do método da enxertia. A identificação dos porta-enxertos torna-se difícil pois suas características morfológicas

podem ser influenciadas pelas condições ambientais. Por isso o objetivo deste trabalho foi identificar espécies de porta-enxertos utilizadas comercialmente em Barbacena com base nas características morfoanatômicas de órgãos vegetativos. O experimento foi conduzido no Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais *Campus* Barbacena, localizado nas coordenadas 21° 14' 27" S e 43° 45' 47" W. O clima é do tipo Cwb. Foram coletados órgãos vegetativos de quatro espécies de porta-enxertos de *Rosa* sp. em mesmos estágios fenológicos. Foram preparadas lâminas microscópicas permanentes utilizando as etapas de fixação em FAA, desidratação em série crescente de concentração de etanol, diafanização com o xilol, inclusão em parafina e coloração com azul de metileno e safranina. Os resultados foram obtidos com base em análises anatômicas no microscópio óptico e conforme as características morfológicas. O porta-enxerto *R. multiflora* “paulista” apresentou o xilema helicoidal e o escalariforme, o porta-enxerto *R. canina* “Natal Brier” apresentou o xilema reticulado. Os porta-enxerto *R. multiflora* “Paulista”, *R. multiflora* “Kopman’s” e *R. multiflora* “Iowa” apresentaram os estômatos paracíticos e *R. canina* “Natal Brier” apresentou estômatos diacítico. O estudo permitiu diferenciar quanto à morfologia externa e interna das espécies de porta-enxerto de *Rosa* sp. utilizadas no município.

## MORPHANATOMY OF VEGETATIVE ORGANS OF *Rosa* SP. ROOTSTOCK SPECIES GROWN IN THE MUNICIPALITY OF BARBACENA, MG

**ABSTRACT:** The genus *Rosa* sp. (Linnaeus, 1753) belongs to Rosaceae family. The rose bushes from Barbacena are produced through grafting method. Their rootstocks identification is difficult because of their morphological characteristics that may be influenced by environmental conditions. Therefore, the aim of this paper was to identify commercially used rootstock species in Barbacena based on anatomical and morphological vegetative organs features. The experiment was conducted at “Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Barbacena, located at the coordinates 21 ° 14 '27 ”S and 43 ° 45'47” W, under a Cwb climate (Köppen). Vegetative organs at the same phenological stage were collected from four rootstock species of *Rosa* sp.. Permanent slides were prepared by fixing the material in FAA solution, subsequently it was dehydrated in an increasingly ethanol concentration. Then, it was performed Xylol diaphanization, paraffin penetration, and methylene blue and safranin staining. Results were obtained based on morphological and anatomic analysis on microscope. Rootstock “*R. multiflora* “paulista”” presented the helical and the scalariform Xylem; Rootstock “*R. canina* “Natal Brier”” presented the reticulated xylem and diacitic stomata; “*R. multiflora* Pulista””, “*R. multiflora* “Kopman's””, and “*R. multiflora* “Iowa”” rootstocks presented the paracitic stomata. This study allowed the differentiation between the external and internal *Rosa* sp. morphology grown in the County.

**KEYWORDS:** Morfoanatomy; Rootstock; *Rosa sp.*; Rosaceae; Flower shop

### 1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Rosa* (Linnaeus, 1753) pertence à classe das Angiospermas, subclasse das Dicotiledônea, ordem Rosales e família Rosaceae URCULO (1953, apud. FERREIRA et al., 2011). As roseiras são arbustos perenes, de desenvolvimento ereto com o caule lenhoso e normalmente espinhoso, suas folhas são pinadas, decíduas e compostas, variam entre cinco a nove folíolos ovalados. As flores se desenvolvem na extremidade das hastes contendo, normalmente, cinco sépalas com lóbulos laterais e fruto do tipo carnosos BAÑON ARIAS (1993, apud. FERREIRA et al., 2011). A temperatura ótima para o crescimento das mudas de roseira está em torno de 17 °C à 26 °C e umidade relativa de 80%, o pH do solo ou do substrato deve ser em torno de 5,5 a 6,5 (BARBOSA, 2003).

Barbacena situa-se em uma região com altitude média de 1200m e clima ameno, onde as temperaturas médias variam entre 16,9 °C à 19,9°C (ARAUJO, 2009). Devido a tais características a região apresentou-se muito favorável ao cultivo das rosas. No início da década de 60, graças ao trabalho de imigrantes da Alemanha

e da Itália que se estabeleceram na cidade, a produção de rosas e de outras flores tornou-se a principal atividade econômica do município. A partir de 1999, com a criação da Associação Barbacenense dos Produtores de Rosas e Flores (Abaflores) e incentivo do Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Minas Gerais (Sebrae-MG), houve expansão do setor na região, e desde então tem se mantido como o terceiro maior polo de produção do país, de acordo com o Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR, 2018).

No Brasil as roseiras de corte são produzidas através da propagação vegetativa, principalmente pelo método da enxertia, onde se realiza o enxerto de variedades híbridas em porta-enxertos primitivos (LOCARNO, 2011). As roseiras silvestres apresentam facilidade e uniformidade no enraizamento, enquanto as variedades híbridas cultivadas apresentam muitas variações na capacidade de enraizamento (PIVETA, 2004).

A obtenção comercial do porta-enxerto em campo de produção é realizada por propagação vegetativa através de estacas. Para a multiplicação das espécies híbridas florais o método mais aplicado é o de borbulhia em T invertido (MACDONALD, 2014). As inovações tecnológicas para a produção de mudas têm como meta a redução do tempo de produção e o maior controle das condições fitossanitárias. Assim, torna-se possível o aumento do número de ciclos de produção durante a vida útil da estrutura física (SOUZA et al., 2011).

A identificação das espécies de porta-enxerto torna-se difícil quando se considera somente as características morfológicas, que são influenciadas pelas diferentes condições ambientais e pelo conhecimento técnico do profissional responsável pela análise. De acordo com Pivetta et al. (2004) são necessários muitos estudos para melhorar a identificação das diferenças entre os porta-enxertos utilizados no país.

A morfoanatomia vegetal descreve as relações espaciais dos elementos estruturais. As técnicas histológicas são empregadas para analisar estruturas anatômicas, tecidos, e conteúdos celulares. O material a ser observado ao microscópio deve ser fino e transparente, de modo a permitir a passagem de luz. As análises das estruturas morfoanatômicas das espécies vegetais são realizadas com a montagem de lâminas histológicas. As lâminas permanentes são importantes, pois servem de referência para a caracterização anatômica de raízes, caules e folhas.

## 2 | OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal identificar as espécies de porta-enxerto de *Rosa* sp. Cultivadas no município de Barbacena. Os objetivos específicos foram: Caracterizar a estrutura morfoanatômica de raízes, caules e folhas das espécies; Preparar lâminas permanentes das estruturas anatômica dos órgãos vegetativos,

que posteriormente serão utilizadas como material didático nas aulas de Histologia e Anatomia Vegetal e subsidiar estudos de taxonomia na identificação correta e diferenciação das espécies.

### 3 | MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais *Campus* Barbacena que está localizado na região do Campo das Vertentes (IFSUDESTE-MG), Serra da Mantiqueira no município de Barbacena, Minas Gerais, nas coordenadas 21° 14' 27" S e 43° 45' 47" W. O relevo da região é montanhoso com altitude média de 1.200 m s.n.m. O clima da região é do tipo Cwb, de Köppen, com temperaturas médias variando de 16,9 °C a 19,9 °C (primavera/verão) e 14,4 °C e 17,5 °C (outono/inverno). As precipitações médias são de 1.143,6 mm (primavera/verão) e 206,5 mm (outono/inverno) (EMBRAPA, 2006).

Para o preparo das lâminas permanentes foram feitas adaptações do procedimento básico para pré-microscopia em tecido animal utilizando a parafina como matriz de Ribeiro et.al. (2012), pois o procedimento de microscopia vegetal de Bouzon & Shimidt (2012) demanda de aparelhos e reagentes específicos e de alto custo.

Foram coletados no IFSUDESTE-MG órgãos vegetativos (raiz, caule e folhas) de quatro espécies de porta-enxertos do gênero *Rosa*, em estágios fenológicos equivalentes (Floração). Elas foram identificadas como espécie 1, espécie 2, espécie 3 e espécies 4. A identificação das espécies foram realizadas comparando as características morfológicas das folhas, conforme o estudo realizado por Cintra et. al, 2005. Após esta etapa, eles foram cortados em tamanhos de aproximadamente 1cm e armazenadas separadamente em frasco opaco contendo solução de etanol 70%.

Na fixação do material utilizou-se procedimentos químicos para imobilizar as substâncias constituintes das células e dos tecidos. Nesse procedimento foi empregado o FAA que é composto por 85 ml de etanol 70%, 10 ml formaldeído comercial e 5 ml de ácido acético glacial. O FAA foi escolhido por ser de rápida penetração e preservar relativamente bem a morfologia, os ácidos nucléicos e os carboidratos. O tempo de fixação foi de 48 horas. A lavagem para retirada de excesso de fixador foi realizada com água destilada. Após a fixação o material foi mantido em etanol 70% por 72 horas.

A seguinte etapa foi a desidratação dos tecidos, pois as substâncias previamente utilizadas para inclusão em parafina não se combinam homogeneamente com a água. A substância utilizada foi o álcool etílico (etanol). Essa etapa iniciou-se com banhos em séries crescentes de etanol: 80%, 90% e

95%, todos por uma hora, e 100% por três vezes, durante uma hora cada.

A diafanização foi uma etapa que consistiu na remoção do etanol, pois a parafina não se mistura com o etanol. Para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina utilizou-se, nessa etapa, soluções de 75% de etanol e 25% xilol (álcool-xilol), 50% etanol e 50% xilol (xilol I), 25% etanol e 75% xilol (xilol II) e dois banhos em xilol 100% (xilol III). Cada um dos banhos foi realizado por 30 minutos. Conforme o xilol penetra no tecido, em substituição ao álcool, o material se tornava mais claro e transparente.

A infiltração consistiu na impregnação do tecido em parafina. Nessa etapa a parafina foi derretida em estufa a 60 °C. O primeiro banho em parafina foi realizado dentro da capela onde preparou-se uma solução de parafina e xilol na proporção de 1:1, essa solução foi vertida em uma placa de Petri juntamente com o tecido. Utilizou-se uma chapa aquecedora, a 60 °C, para manter a solução em estado líquido. O tecido permaneceu nessa solução por 30 minutos, nessa etapa do processo é importante a utilização de máscara de gás. Em seguida foram realizados três banhos em parafina, com uma hora cada, dentro da estufa.

A inclusão consistiu-se em colocar, com o auxílio de uma pinça pré-aquecida, os tecidos que foram infiltrados em parafina no interior de um molde (caixinha de papel) devidamente identificado, em seguida verteu-se a parafina no molde cobrindo-o totalmente de forma que o tecido infiltrado ficasse no fundo e bem centralizado. Neste momento a parafina precisou estar aquecida, para evitar a formação de bolhas de ar em torno dos tecidos. Após o resfriamento os blocos de parafina, com o material incluído, foram levados à geladeira por 24 horas.

Foi importante que todos os processos fossem feitos sem interrupções e com tempo exato. Pausas no processo poderiam tornar o tecido quebradiço e retraído ao ser seccionado, inviabilizando a análise no microscópico.

Para seccionar o material no micrótomo foi preciso unir o molde de parafina com o tecido incluído a um bloco de madeira pequeno, que serviu como apoio. Esta união foi feita com a parafina derretida. As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para o banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A temperatura da água variou entre 55 °C a 57 °C.

Nesta etapa, os cortes ficaram mais uniformes devido à minimização das dobras e formação de bolhas. Os cortes foram separados em grupos, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente neutro e etanol 70% e secas em estufa a 60°C. Antes da utilização das lâminas, foi necessário revestir suas superfícies com uma fina camada de albumina para facilitar a adesão do corte. Os cortes obtidos foram transferidos para uma chapa aquecedora a 60 °C por 10 minutos.

A coloração consistiu em uma etapa importante para a visualização das estruturas anatômicas. Utilizou-se corantes hidrossolúveis, foi necessário a

remoção da parafina da peça preparada nas etapas descritas anteriormente e que permaneceram na lâmina de vidro. Na desparafinização realizou-se banhos em séries decrescentes de Xilol III, Xilol II, Xilol I e Etanol – Xilol. Cada lâmina permaneceu mergulhada por 5 minutos em cada banho. Em seguida as lâminas passaram por três banhos consecutivos em etanol 100%, também por 5 minutos cada e sucessivamente por banhos em etanol 95%, 90%, 80% e 70%, por 5 minutos cada.

Após essa etapa as lâminas foram coradas com dois tipos de corantes, contendo azul de metileno e safranina. Solução I: 1 grama de azul de metileno diluída em 100 ml de etanol 95%. Solução II: 1 grama de safranina em 100ml de etanol 95%. Ambas diluídas em água destilada na proporção de 1:1, no momento do uso.

Foram feitos três tipos de coloração utilizando como base as duas soluções preparadas. Na primeira, a lâmina foi mergulhada em um béquer que continha a solução I por 30 segundos. Na segunda, a lâmina foi mergulhada em um béquer contendo a solução II por 30 segundos. Na terceira, a lâmina foi mergulhada no béquer contendo a solução I por 30 segundos, depois ela foi lavada com água destilada e após utilizou-se a solução II por 30 segundos.

Posteriormente as lâminas foram desidratadas novamente seguindo séries crescentes de banhos em etanol 80%, 90%, 95%, por 5 minutos cada e três banhos em etanol 100% por 5 minutos cada. Banhos no Xilol I, Xilol II e Xilol III, por 5 minutos cada.

Durante a montagem colocou-se bálsamo-do-canadá para cobrir os cortes e a lamínula foi sobreposta à lâmina e esperou-se secar. Após este procedimento selou-se as bordas com esmalte transparente. Com a finalização do processo a lâmina permanente pode durar muitos anos.

Os resultados foram obtidos a partir da identificação morfológica proposta por Cintra et. al. (2005). Após a identificação procede-se a construção de tabelas com os caracteres morfológicos e anatômicos que foram observados em microscópio óptico.

#### **4 | RESULTADOS**

As folhas de *Rosa* sp. Coletadas apresentam caracteres morfológicos coincidentes aos descritos por Cintra et al. (2005), sendo possível demonstrar que a espécie 1 corresponde morfológicamente com a *Rosa multiflora* “Paulista”, a espécie 2 com a *Rosa multiflora* “Kopman’s”, a espécie a 3 com a *Rosa multiflora* “Iowa” e a espécies 4 com a *Rosa canina* “Natal Brier.

As folhas das quatro espécies de porta-enxertos de roseiras deste estudo foram do tipo compostas, pinadas, com o limbo foliar elíptico e simétrico com o ápice agudo. O ângulo formado pelo ápice dos folíolos não se diferenciou entre os porta-enxertos

como mostra a Tabela 1. As bases dos folíolos foram do tipo agudo com exceção da *Rosa canina* “Natal Brier” que possui um ângulo de 90° e, portanto, é obtuso. As margens dos folíolos são serreadas com base acuminada, com exceção da *R. canina* “Natal Brier” que é convexa. A margem do ápice em todos os porta-enxertos é côncava. Quanto ao número de folíolos a *R. multiflora* “Paulista” apresentou nove folíolos, os demais porta-enxertos apresentaram sete folíolos. O porta-enxerto *R. canina* “Natal Brier” possui maior densidade de acúleos que o *R. multiflora* “Iowa”. Os porta-enxertos *R. multiflora* “Paulista” e *R. multiflora* “Kopman’s” não apresentam acúleos.

Espécies	Base dos folíolos	Margem do ápice do folíolo	Margem da base do folíolo	Tricomas	Espinho raquis	Número de folíolos	Acúleos
<i>R. multiflora</i> “Paulista”	Agudo	Côncava	Acuminada	Presente	Ausente	9	Ausente
<i>R. multiflora</i> “kopman's”	Agudo	Côncava	Acuminada	Presente	Ausente	7	Ausentes
<i>R. multiflora</i> “Iowa”	Agudo	Côncava	Acuminada	Ausente	Presente	7	Presente
<i>R. canina</i> “Natal Brier”	Obtuso	Côncava	Convexa	Presente	Presente	7	Presente

Tabela 1 - Principais características morfológicas de quatro porta-enxertos de roseira (*Rosa* sp.)

No caule foram observados presença de tricomas do tipo tectores nos porta-enxertos *R. multiflora* “Paulista”, *R. multiflora* “Kopman’s” e *R. canina* “Natal Brier”. Quanto aos vasos condutores observou-se que todos os porta-enxertos possuem xilema helicoidal. O porta-enxerto *R. multiflora* “Paulista” além do xilema helicoidal apresentou também o xilema escalariforme e o porta-enxerto *R. canina* “Natal Brier” apresentou o xilema reticulado. Os porta-enxertos *R. multiflora* “Paulista” e *R. canina* “Natal Brier” apresentaram a presença de oxalato de cálcio. Todos os porta-enxertos apresentaram a presença de cutícula, colênquima do tipo lamelar, floema radial e axial. A Figura 1 mostra as principais estruturas anatômicas do caule das quatro espécies de porta-enxertos de roseiras.

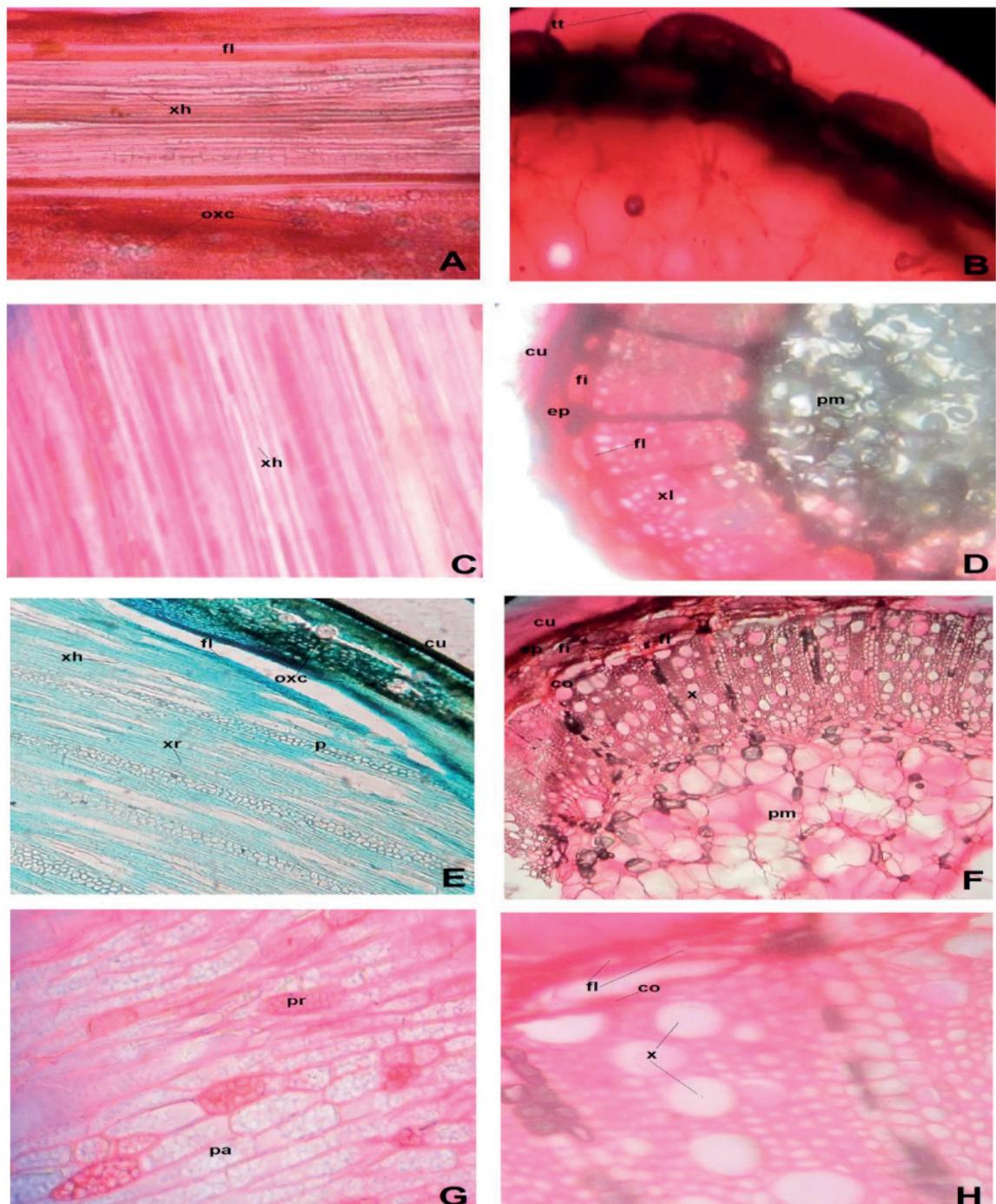


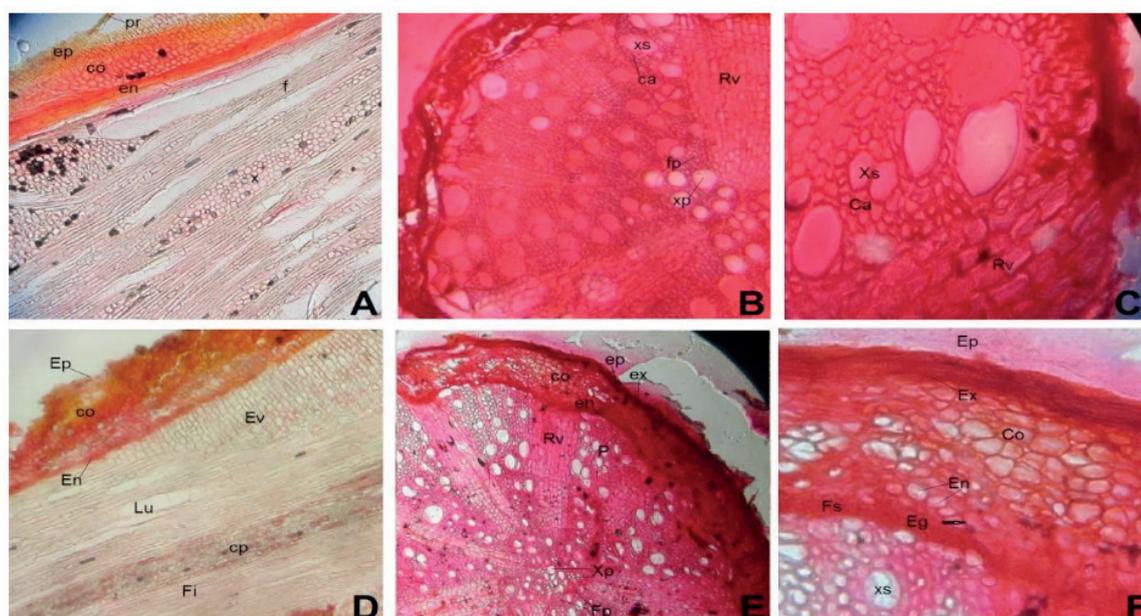
Figura 1- Anatomia de caule de quatro espécies de porta-enxerto de *Rosa spp.* (A) corte longitudinal *R. multiflora* "Paulista" (B) corte transversal *R. multiflora* "Paulista", (C) corte longitudinal *R. multiflora* "Kopman's" (D) corte transversal *R. multiflora* "Kopman's", (E) corte longitudinal *R. canina* "Natal Brier" (F) corte transversal *R. canina* "Natal Brier", (G) corte longitudinal *R. multiflora* "Iowa" (H) corte transversal *R. multiflora* "Iowa". Abreviaturas: (fl) floema, (x) xilema, (xh) xilema helicoidal, (xr) xilema reticulado, (xe) xilema escalariforme, (pa) parênquima axial, (pr) parênquima radial, (pm) parênquima medular, (p) parênquima, (oxc) oxalato de cálcio, (co) cambio, (cu) cutícula, (ep) epiderme, (fi) fibras, (tt) tricomas tectores.

A tabela 2 relaciona as características anatômicas do caule de cada porta-enxerto estudado.

Espécies	Cutícula	Oxalato de cálcio	Parênquima	Colênquima	Xilema	Floema	Tricomas
<i>R. multiflora</i> "Paulista"	Presente	Presente	Cortical/medular	Lamelar	Helicoidal/escalariforme	Radial/axial	Presente
<i>R. multiflora</i> "kopman's"	Presente	Ausente	Cortical/medular	Lamelar	Helicoidal	Radial/axial	Presente
<i>R. multiflora</i> "Iowa"	Presente	Ausente	Cortical/medular	Lamelar	Helicoidal	Radial/axial	Ausente
<i>R. canina</i> "Natal Brier"	Presente	Presente	Cortical/medular	Lamelar	Helicoidal/reticulado	Radial/axial	Presente

Tabela 2 - Principais características anatômicas do caule de quatro porta-enxertos de roseira (*Rosa* spp.)

Na raiz foram observadas a presença de oxalato de cálcio nos porta-enxertos *R. multiflora* "Kopman's" e *R. canina* "Natal Brier". O pelo radicular está presente em todos os porta-enxertos, bem como o parênquima cortical e as estrias de Kaspary nas células da endoderme. O câmbio adicional foi observado nos porta-enxertos *R. multiflora* "Paulista", *R. multiflora* "Kopman's" e *R. canina* "Natal Brier" e ausente no porta-enxerto *R. multiflora* "Iowa". O número de fileiras de células dos raios vasculares foi obtido pela média aritmética. Os porta-enxertos *R. multiflora* "Paulista" e *R. multiflora* "Iowa" apresentaram uma média de 8 fileiras de células vasculares. As espessuras das células da epiderme foram estimadas pela análise visual conforme mostra a Figura 3. Os porta-enxertos *R. multiflora* "Paulista", *R. multiflora* "Kopman's" e *R. multiflora* "Iowa" apresentaram a epiderme mais espessa que a *R. canina* "Natal Brier".



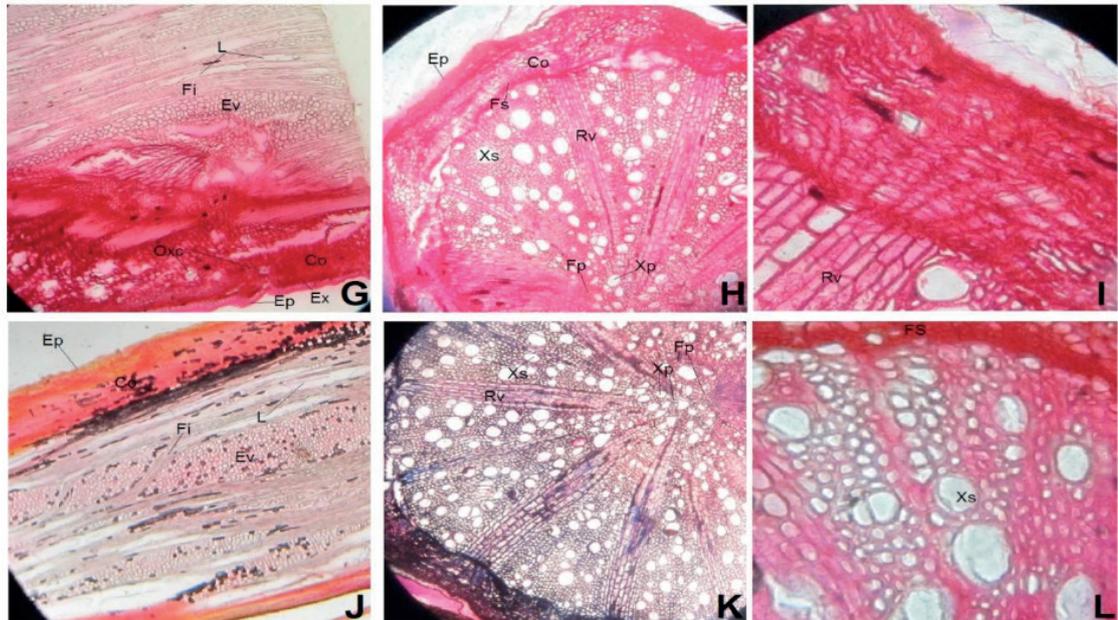


Figura 2- Anatomia da raiz de quatro espécies de porta-enxerto de *Rosa* spp. (A) corte longitudinal *R. multiflora* “paulista” (B e C) corte transversal *R. multiflora* “paulista”, (D) corte longitudinal *R. multiflora* “Kopman’s” (E e F) corte transversal *R. multiflora* “Kopman’s”, (G) corte longitudinal *R. canina* “Natal Brier” (H e I) corte transversal *R. canina* “Natal Brier”, (J) corte longitudinal *R. multiflora* “Iowa” (K e L) corte transversal *R. multiflora* “Iowa”. Abreviaturas: (ep) epiderme, (pr) pelo radicular, (co) córtex, (pc) parênquima cortical, (eg) estrias de gaspary, (fp) floema primário, (fs) floema secundário, (xs) xilema secundario, (xp) xilema primário, (ev) elementos de vasos, (cp) células parenquimáticas, (fi) fibras, (lu) lúmen, (rv) raios vasculares, (em) endoderme, (ca) cambio adicional.

Na tabela 3 estão relacionadas as características anatômicas da raiz do quatro porta enxerto estudados.

Espécies	Pelo radicular	Oxalato de cálcio	Parênquima	Epiderme	Média de raios vasculares	Estrias de Kaspary	Câmbio adicional
<i>R. multiflora</i> "Paulista"	Presente	Ausente	Cortical	Espessa	8 Fileiras	Presente	Presente
<i>R. multiflora</i> "kopman's"	Presente	Presente	Cortical	Espessa	7 Fileiras	Presente	Presente
<i>R. multiflora</i> "Iowa"	Presente	Ausente	Cortical	Espessa	8 Fileiras	Presente	Ausente
<i>R. canina</i> "Natal Brier"	Presente	Presente	Cortical	Fina	7 Fileiras	Presente	Presente

Tabela 3 - Principais características anatômicas da raiz de quatro porta-enxertos de roseira (*Rosa* spp.)

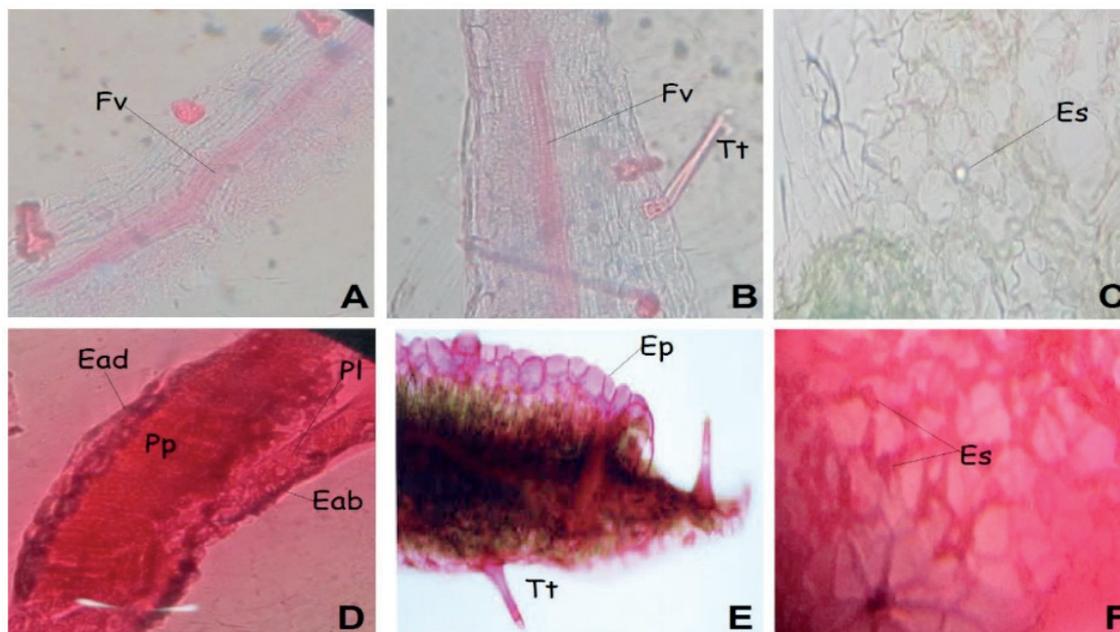
Os estômatos estão presentes na face inferior dos folíolos de todos os porta-enxertos, de forma aleatória, com células-guarda reniformes (Figura 3). Os porta-enxerto *R. multiflora* “Paulista”, *R. multiflora* “Kopman’s” e *R. multiflora* “Iowa”

apresentaram os estômatos paracíticos, classificados de acordo com o formato e arranjo das células subsidiárias, e *R. canina* “Natal Brier” apresentou estômatos diacíticos. Verificou-se a presença de uma camada de cera epicuticular (Figura 3) presente no porta-enxerto *R. multiflora* “Iowa”. O resumo destas características encontra-se na Tabela 4.

Espécies	Estômatos	Tricomas	Cutícula
<i>R. multiflora</i> "Paulista"	Paracítico	Tectores	Ausente
<i>R. multiflora</i> "kopman's"	Paracítico	Tectores	Ausente
<i>R. multiflora</i> "Iowa"	Paracítico	Tectores/ glandulares	Presente
<i>R. canina</i> "Natal Brier"	Diacítico	Tectores/ glandulares	Ausente

Tabela 4 - Principais características anatômicas da folha de quatro porta-enxertos de roseira (*Rosa spp.*)

Na superfície abaxial e adaxial da epiderme observou-se a presença de tricomas tectores nos quatro porta-enxertos (Figura 3), e tricomas glandulares nos porta-enxertos *R. multiflora* “Iowa” e *R. canina* “Natal Brier”. A forma dos tricomas é semelhante para todos os porta-enxertos (Figura 3). Esta característica não distingue as variedades de *R. multiflora* entre si, com exceção de *R. multiflora* “Iowa”.



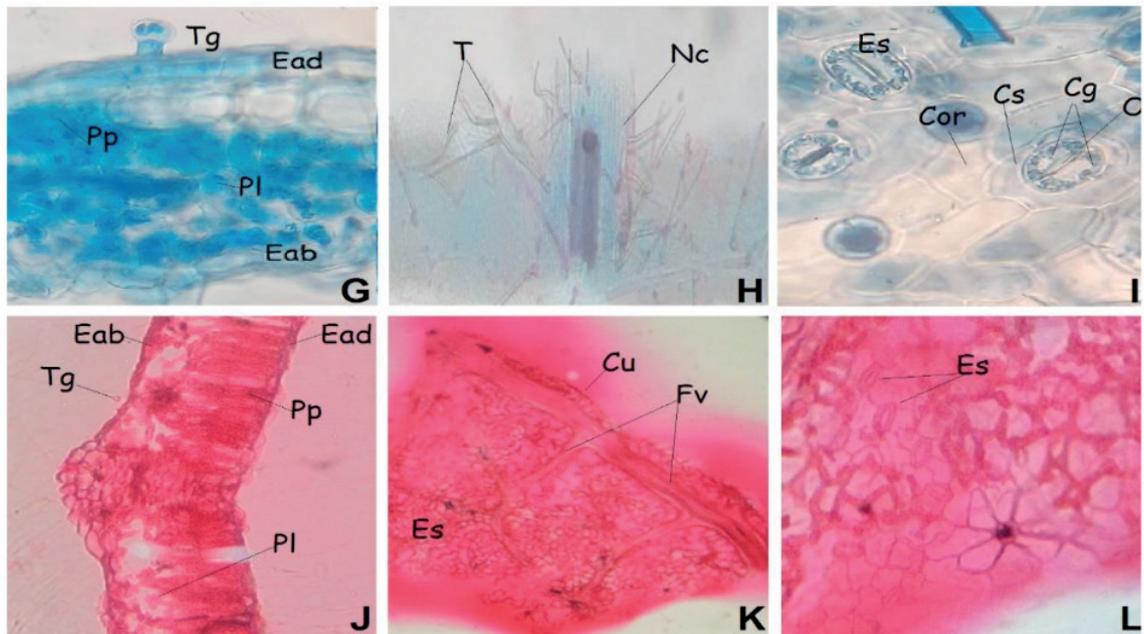


Figura 3 - Anatomia da folha de quatro espécies de porta-enxerto de *Rosa* spp. (A e B) corte transversal *R. multiflora* "paulista", (C) corte paradérmico *R. multiflora* "paulista", (D e E) corte transversal *R. multiflora* "Kopman's", (F) corte paradérmico *R. multiflora* "Kopman's", (G e H) corte transversal *R. canina* "Natal Brier", (I) corte paradérmico *R. canina* "Natal Brier", (J) corte transversal *R. multiflora* "Iowa", (K e L) corte paradérmico *R. multiflora* "Iowa". Abreviaturas: (ep) epiderme, (ead) epiderme adaxial, (eab) epiderme abaxial, ((es) estômatos, (pl) parênquima lacunoso, (pp) parênquima paliçádico, (t) tricomas, (tt) tricomas tectores, (tg) tricomas glandulares, (nc) nervura central do limbo foliar, (O) ostíolo, (cg) células guarda, (cor) células ordinárias, (cs) células subsidiárias.

## 5 | CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a diferenciação quanto à morfologia externa e interna das quatro espécies de porta-enxertos de roseiras utilizadas no município de Barbacena. Quanto às características morfológicas a *R. canina* "Natal Brier" foi a que mais se diferenciou das demais espécies. A presença ou a falta de acúleos é uma característica importante na escolha do porta-enxerto a ser implantado na lavoura. As espécies *R. multiflora* "Paulista" e *R. multiflora* "Kopman's" são vantajosas nesse aspecto pois não possuem acúleos e nem espinhos na raquis.

Em relação à anatomia dos órgãos vegetativos, o porta-enxerto que mais se diferenciou foi o *R. canina* "Natal Brier". Entre os porta-enxertos da espécie *R. multiflora* a variedade que mais se diferenciou foi a *R. multiflora* "Iowa" pois não apresentou tricomas no caule, suas raízes não apresentaram oxalato de cálcio e cambio adicional e nas folhas foram observadas presença de tricomas glandulares.

A partir da realização do presente estudo foi possível desenvolver uma metodologia alternativa para o preparo de lâminas permanentes. O acervo criado gerou informações que poderão subsidiar estudos futuros de taxonomia vegetal envolvendo as espécies estudadas.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, P. O. L. C.; **Metodologia Para Adequação das Escolas Agrotécnicas à Legislação Ambiental**, tese UFLA. Lavras, 2009. p. 54-65
- BARBOSA, J. G. **Produção comercial de rosas**. Ed. Viçosa, 2003. p. 200
- BARBOSA, J. G.; MUNIZ, M. A.; GROSSI, J. A. S.; FINGER, F. L. Produção de mudas de roseira com qualidade. **Revista Campo & Negócios**, ano 5, n. 48, 2009.
- BOUZON, Z. L.; SCHMIDT, E. C.; **Microscopia Vegetal**. Cap. 15. Ed. Santos. São Paulo, 2012. p. 340-367.
- CINTRA, G. S.; PIVETTA, K. F. L.; MÔRO, F. V.; Caracterização morfológica e grupamento de porta-enxertos de roseira (*Rosa spp.*). **Revista Científica**, Jaboticabal, v.33, n.1. 2005. p. 91-102
- FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, K. R. S.; BORGES, P. L. F.; MAINARDI, V. F.; SILVA, N. C. B. **Anatomia foliar e caulinar de Rosa SPP. (L.) Rosaceae**. Universidade federal do Espírito Santo, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. (Abraflor) **Floricultura no Brasil: apontamentos mais relevantes sobre o papel sócio-econômico recente da atividade**. Campinas, 2018. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br>>. Acesso em: 04 de nov. 2019, 16:42:00
- LOCARNO, M. **Propagação de roseiras em sistema hidropônico**. Tese de doutorado. Lavras, 2011.
- NOVARO, N. **Breeders rights and Brazilian roses**: FloraCulture International, Heiloo, v.15, n.4. 2005. p. 32.
- PIVETTA, K. F. L.; PIZETTA, P. U. C.; PEDRINHO, D. R. Morphologic characterization and evaluation of the productivity of nine rootstocks of rose bush (*Rosa spp.*). **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 630, 2004. p.213-217
- RIBEIRO, C. A. O; REIS FILHO, H. S.; GRÖTZNER, S. R.; **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia**. Ed. Santos. São Paulo, 2012. p. 422.
- SOUZA, A. G.; CHALFUN, N. N. F.; FAQUIN, V.; SOUZA, A. A. Produção de mudas de pêssego enxertadas em sistema hidropônico. **Rev. Ciência agrotécnica**. Lavras, vol.35, n.2. 2011. p 322-326

## **SOBRE OS ORGANIZADORAS**

**Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos:** Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de Pernambuco – UPE (2009), Mestre em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas pela Universidade Federal do Piauí – UFPI (2012), com bolsa do CNPq. Doutora em Agronomia pela Universidade Federal da Paraíba -UFP (2016), com bolsa da CAPES. Atualmente é professora adjunta do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Fitotecnia, fisiologia das plantas cultivadas, propagação vegetal, manejo de culturas, nutrição mineral de plantas, adubação, atuando principalmente com fruticultura e floricultura. E-mail para contato:raissasalustriano@yahoo.com.br; raissa.matos@ufma.br Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0720581765268326>

**Analya Roberta Fernandes Oliveira:** Graduada em Agronomia pela Universidade Federal do Maranhão – UFMA (2018). Atualmente é mestranda em Agronomia/Fitotecnia - Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal do Ceará – UFC (2020), com bolsa do CNPq. Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em fisiologia vegetal, irrigação e drenagem, produção vegetal, atuando principalmente com grandes culturas, frutíferas e floricultura. E-mail para contato: [analyaroberta\\_fernandes@hotmail.com](mailto:analyaroberta_fernandes@hotmail.com) Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9601701413016553>

**Francisca Gislene Albano-Machado:** Graduada em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal do Piauí – UFPI (2012), Mestre em Agronomia – Fitotecnia/Produção Vegetal pela Universidade Federal do Piauí (2015). Doutora em Agronomia Fitotecnia pela Universidade Federal do Ceará (2019). Tem experiência na área de Agronomia com ênfase em fitotecnia, atuando nas áreas de produção, fisiologia e qualidade de frutos e substratos alternativos para espécies frutíferas, como maracujá, mamão, ateira e pitaiá. E-mail para contato: [gislene.fga@gmail.com](mailto:gislene.fga@gmail.com); Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3728012118132276>.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Acessibilidade 83, 84, 85, 90, 91, 92  
Ácido salicílico 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116  
*Aechmea blanchetiana* 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41  
Alcaloides 14  
Amaryllidaceae 12, 13, 14, 23  
Ápices caulinares 24, 26, 27, 29, 95, 96, 98, 99  
Aspectos botânicos 44  
Auxina 73, 93, 94, 100, 101

### B

Bandeamento cromossômico 62, 64, 66, 67  
Bioatividade 56, 58, 60  
biotecnologia vegetal 12, 15  
Bromeliaceae 11, 31, 32, 33, 40, 42

### C

Calos 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 94, 99, 101  
Cana-de-açúcar 24, 25, 26, 28, 29, 30  
Cápsulas de orquídea 1  
Cerrado 71, 72, 74, 79, 82, 103  
Citocinina 73, 93, 94, 95, 98, 101  
Citogenética 62, 63, 64, 66, 68, 69  
Citometria de fluxo 62, 63, 65, 70  
Compostos fenólicos 15, 28, 71, 73, 78, 79, 80, 93, 97, 100, 101, 119, 126, 127  
Contaminação 24, 25, 26, 27, 28, 29, 35, 37, 56, 57, 74, 96, 117, 122, 123, 126  
Contaminação *in vitro* 117  
Conteúdo de DNA 62  
*Crinum americanum* 12, 14  
Cromossomo 63  
Cultivo *in vitro* 12, 14, 15, 21, 24, 34, 71, 72, 73, 95, 115, 128

### D

Desenvolvimento 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 28, 31, 33, 35, 37, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 57, 59, 94, 97, 98, 100, 107, 130  
Diets bicolor 62, 63, 64, 65, 68  
D-limoneno 56, 57, 58, 59, 60

### E

Embebição 44, 47, 49, 50, 51, 52, 53  
Espécie ornamental 62, 63, 67

Espécies arbóreas 54, 82, 117

## F

Fabaceae 29, 71, 72, 81, 102

Fenóis 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 95, 97, 100, 101

Flavonóides 71, 78

Formação de plântulas 22

## G

Germinação 12, 15, 16, 20, 21, 31, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 74, 82, 95, 96, 97, 102, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115

Germinação in vitro 12, 20, 37, 39, 74, 95, 96, 97

## H

Hibiscus 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55

## I

Índices biométricos 44

*In vitro* 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 59, 60, 71, 72, 73, 74, 80, 81, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 124, 125, 127, 128

## L

*Leucaena leucocephala* 71, 72, 77, 78, 79, 80, 81, 82

## M

Meristema apical 93, 101

Metabólitos secundários 12, 15, 81, 101

Métodos de desinfestação 24

Micropropagação 4, 21, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 41, 93, 102, 117, 119

Mofo cinzento 56, 57, 58

Mogno 117, 118, 119, 126, 128

Morfoanatomia 129, 130, 131

Morfológicos 44, 46, 47, 134

## N

NBR9050 83, 84

## O

Óleos essenciais 56, 58

Orchidaceae 1, 2

Órgãos vegetativos 129, 131, 132, 140

Ornamental 1, 2, 13, 14, 23, 32, 43, 61, 62, 63, 65, 67, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112,

113, 114, 115

Orquídeas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11

Oxidação fenólica 117, 125, 127

## P

Paisagismo 13, 14, 62, 65, 83

*Phalaenopsis amabilis* 1, 2, 3, 7, 10

Planta medicinal 71, 93

Planta ornamental 32

Plântulas 12, 15, 16, 17, 20, 22, 35, 36, 39, 40, 41, 44, 46, 47, 50, 52, 53, 54, 55, 65, 74, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 116, 127

Porta-enxerto 129, 130, 131, 135, 136, 137, 138, 139, 140

Produção de calos 12, 17

*Pyrostegia venusta* 76, 81, 93, 94, 95, 102, 103, 104

## R

Reprodução 1

Rosaceae 129, 130, 141

*Rosa sp.* 136, 137, 138, 139, 140, 141

Roseira 56, 58, 130, 135, 137, 138, 139, 141

## S

Segmentos nodais 71, 73, 74, 75, 79, 80, 126

Sementes 4, 7, 12, 14, 15, 16, 20, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 62, 65, 72, 74, 82, 95, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116

Substratos 31

## T

Tecidos vegetais 26, 27, 31, 34, 82, 101, 117, 119

Terpenos 56

Tratamento de sementes 106, 107, 112, 115

 **Atena**  
Editora

**2 0 2 0**