



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

ELISA REGINA DA SILVA

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Melanoxylon brauna*
SCHOTT**

JERÔNIMO MONTEIRO

2019

ELISA REGINA DA SILVA

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Melanoxylon brauna*
SCHOTT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

Coorientadores: Prof. Dr. Marcos Vinícius Winckler Caldeira e José Carlos Lopes

JERÔNIMO MONTEIRO

2019

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Melanoxylon brauna*
SCHOTT**

ELISA REGINA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

Coorientadores: Prof. Dr. Marcos Vinícius Winckler Caldeira e Prof. Dr. José Carlos Lopes

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019.

Prof^a. Dr^a. Virginia Silva Carvalho (Examinadora externa)
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Edilson Romais Schildt (Examinador Interno)
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. José Carlos Lopes (Coorientador)
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo

*À minha mãe, Sebastiana Lucia Affonso (in
memorian), minha heroína e fonte de
inspiração.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por tudo que passei, por tudo que sou e que tenho.

À minha mãe, meu anjo protetor, que mesmo em espírito me acolhe em seus braços nos momentos de esmorecimento.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de ensino.

À Fapes/SEAG Edital Nº 06/2015 pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa de estudo.

Ao orientador Rodrigo Sobreira Alexandre pelo empenho no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Edilson Romais Schmildt, Adésio Ferreira, Jeferson Pereira Martins Silva e José Henrique Soler Guilhen, pela grandiosa colaboração nas análises estatísticas.

Aos queridos coorientadores José Carlos Lopes e Marcos Vinícius Winckler Caldeira que sempre estiveram de prontidão para colaboração com as nossas pesquisas.

À professora Milene Miranda Praça Fontes, pelo acolhimento no Laboratório de Citogenética (CCA-E-UFES) para realização das análises de mutagênese.

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira pelo ensino.

À minha querida amiga Kelly Nery Bigli, por todo apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Cultura e Tecidos Vegetais do departamento de Ciências Florestais da UFES pelo acolhimento.

Ao meu noivo Fernando Gomes Silveira Filho, pelo companheirismo extraordinário.

Às minhas amadas irmãs Adriana, Juliana, Mariana e Pollyana, por todo amor e união.

E por todos aqueles que estimam por mim. Gratidão!

Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos!

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

SILVA, Elisa Regina. **Germinação e morfogênese *in vitro* de *Melanoxylon brauna* Schott.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientadores: Prof. Dr. Marcos Vinícius Wilckler Caldeira e Prof. Dr. José Carlos Lopes.

A braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) uma Fabaceae nativa do Brasil ameaçada de extinção, é comumente propagada via seminífera, entretanto, a baixa produção de sementes viáveis é um problema na produção de mudas. A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa à criação de bancos de germoplasma de braúna. Entretanto, são escassos os estudos voltados para a propagação *in vitro* de braúna. Objetivou-se estudar a germinação de sementes e morfogênese *in vitro* de braúna. Capítulo I. Experimentos I e II- Desinfestação: As sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio (NaClO) e Captan® 2% p.a. com e sem resíduo, por diferentes tempos de imersão, respectivamente. Foram analisadas: contaminação; germinação e plântulas normais e anormais. Experimento III- Bioteste de fitotoxidez do captana em alface: As sementes de alface foram expostas em placa de Petri com 2,5 mL de Captan® a 0,5; 1; 2; 4 e 8% p. a.; glifosato a 0,01% e água destilada. Foram analisados: germinação; comprimento das plântulas; ciclo celular; alterações nucleares e cromossômicas das células do meristema radicular. O uso isolado de NaClO não é eficiente na desinfestação de sementes de braúna. O Captan® por 10 minutos com resíduo, ao ser eficiente na desinfestação, possibilitou as sementes expressarem resultados superiores de germinação e vigor, porém, apresentou toxidez e seu mecanismo de ação no ciclo celular de alface é clastogênico e aneugênico, o que sugere a formação de plântulas anormais em braúna. Capítulo II. Foram realizados três experimentos: I. Proliferação de gemas axilares com os explantes ápice caulinar; segmento nodal com uma gema axilar; segmento nodal com duas gemas axilares e nó cotiledonar em BAP (0; 4,44; 8,88; 17,76 e 26,64 µM). Analisou-se: número e comprimento de brotos; porcentagem de explantes com brotação; porcentagem de calogênese e porcentagem de brotos por organogênese direta e indireta. II. Rizogênese *in vitro* de brotos com AIB, ANA e 2,4-D (0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹); III. Rizogênese *in*

vitro de brotos com imersão temporária em AIB (0; 1000; 2000; 3000 e 4000 mg L⁻¹). Analisou-se: porcentagem de calogênese e rizogênese; número, comprimento e massa seca das raízes. O segmento nodal com duas gemas axilares foi mais responsivo na proliferação de gemas com BAP (8,88 µM). As concentrações auxínicas de AIB, ANA e 2,4-D não foram favoráveis à rizogênese. O AIB nas concentrações de 2544,81 e 2607,52 mg L⁻¹ promoveram resultados superiores na rizogênese.

Palavras chave: braúna, cultura de tecidos vegetais, desinfestação, citocinina, auxinas.

ABSTRACT

SILVA, Elisa Regina. ***In vitro* germination and morphogenesis of Melanoxylon brauna Schott**. 2019. Dissertation (Masters in Forest Sciences) - Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisor: Prof. Dr. Marcos Vinícius Wilckler Caldeira and Prof. Dr. José Carlos Lopes.

Melanoxylon brauna, a Fabaceae native to Brazil threatened with extinction, is commonly propagated sexually, a low seed production is a problem in seedling production. Plant tissue culture is an alternative to the maintenance of *braúna* germplasm banks. However, there are few studies aimed at an *in vitro* propagation of *braúna*. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination and morphogenesis of *Melanoxylon brauna* by means of the organogenesis of juvenile explants. Chapter I. Experiments I and II: Seeds were treated with sodium hypochlorite (NaClO) and Captan® 2% p.a. with and without residue, by different immersion rates, respectively. The following were analyzed: contamination; germination and normal and abnormal seedlings. Experiment III: Biotest of phytotoxicity of captana in lettuce. Lettuce seeds were exposed in Petri dishes with 2.5 mL Captan® at 0.5; 1; 2; 4 and 8% wt. an.; 0.01% glyphosate and distilled water. Germination; length of seedlings; cell cycle; nuclear and chromosomal alterations of the cells of the meristem root. The use of NaClO is not efficient in disinfestation of *braúna* seeds. Captan® for 10 minutes with residue, being efficient in disinfestation, allowed the seeds to express superior results of germination and vigor, however, showed toxicity and its mechanism of action in the lettuce cell cycle is clastogenic and aneugenic, which suggests the formation of abnormal seedlings in *braúna*. Chapter II. Three experiments were carried out: I. Proliferation of axillary buds with explants apex caulinar; nodal segment with axillary bud; nodal segment with two axillary buds and cotyledonary node in BAP (0; 4.44; 8.88; 17.76 and 26.64 µM). It was analyzed: number and length of shoots; percentage of budding explants; percentage of calogenesis and percentage of shoots by direct and indirect organogenesis. II. *In vitro* rhizogenesis of shoots with IBA, ANA and 2,4-D (0; 1; 2 and 3 mg L⁻¹); III. *In vitro* rhizogenesis of shoots with tempor;

immersion in AIB (0; 1000; 2000; 3000 and 4000 mg L⁻¹). The percentage of calogenesis and rhizogenesis was analyzed; number, length and dry mass of the roots. The nodal segment with two axillary buds was more responsive in BAP caulogenesis (8.88 µM). The auxin concentrations of IBA, ANA and 2,4-D were not favorable for rhizogenesis. The IBA at concentrations of 2544.81 and 2607.52 mg L⁻¹ promoted superior results in rhizogenesis.

Keywords: braúna, plant tissue culture, disinfestation, cytokinin, auxins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 A espécie <i>Melanoxylon brauna</i> Schott	15
3.2 Cultura de tecidos vegetais	16
3.2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	18
3.2.2 Morfogênese <i>in vitro</i>	19
4 REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO I: Germinação <i>in vitro</i> e toxicidade de agente desinfestante na produção de plântulas axênicas de <i>Melanoxylon brauna</i> Schott	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4 CONCLUSÕES	44
5 REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO II: Morfogênese <i>in vitro</i> de <i>Melanoxylon brauna</i> Schott: responsividade de explantes à reguladores de crescimento por imersão permanente e temporária	48
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4 CONCLUSÕES	63
5 REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

Melanoxylon brauna Schott pertence à família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, popularmente conhecida como rabo-de-macaco, maria-preta, graúna, braúna-preta ou braúna é uma espécie nativa da Floresta Atlântica, e ocorre no Brasil nos estados do Pará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (LORENZZI, 2014). Sua madeira é muito utilizada na indústria de navegação, na fabricação de mobílias, postes de iluminação e mourões de cerca (CARVALHO; NASCIMENTO; BRAGA et al., 2007). Devido à sua intensa exploração e à falta de replantios, a braúna tem sido raramente registrada nos levantamentos florísticos realizados na Floresta Atlântica e está classificada como vulnerável na Lista Oficial de Flora Ameaçada em Extinção (IBAMA, 2018).

A propagação de braúna é comumente realizada por via seminífera (BORGES et al., 2015), entretanto, suas sementes são muito atrativas aos insetos, e, a baixa produção de sementes viáveis, tem se tornado um entrave para a produção de mudas da espécie (CORTE et al., 2010), o que contribui ainda mais para o desaparecimento da braúna. Diante disso, a produção de mudas de qualidade em larga escala é essencial para que esta espécie saia da zona de perigo de extinção. A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa para a produção de mudas em larga escala, pois permite produzir, num curto espaço de tempo, grande quantidade de mudas provenientes de um único explante, e tem sido empregada na propagação de diversas espécies florestais (XAVIER, 2007). Estudos abordando a produção *in vitro* de braúna representam pontos de partida para o desenvolvimento de novas técnicas e estratégias para a preservação desta espécie.

Na cultura de tecidos vegetais, a propagação das espécies é realizada *in vitro*, na qual as plantas são cultivadas sob condições controladas em meios nutritivos e ambiente asséptico (SILVA et al., 2017). A variedade de explantes que pode ser empregada na cultura de tecidos se deve ao fato de que as células vegetais possuem a capacidade de originar um novo organismo inteiro e idêntico ao material de origem a partir de uma única célula e, essa capacidade é denominada totipotencialidade (CARVALHO; VIDAL, 2003). O primeiro passo na propagação *in vitro* é o estabelecimento de culturas

axênicas, e a contaminação dos explantes é um dos principais inconvenientes que dificultam o avanço da técnica (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Após o estabelecimento dos explantes, a fase subsequente é a morfogênese, pelas vias organogênica, embriogênica e/ou proliferação de gemas axilares. A morfogênese é induzida artificialmente no cultivo *in vitro* com a aplicação exógena de fitorreguladores, tais como citocininas e auxinas (BIELACH et al., 2012). As citocininas induzem a divisão celular, formação de gemas adventícias e estimulam as brotações laterais (TAIZ et al., 2017), e as auxinas promovem o enraizamento, e seu principal efeito está ligado à sua ação na formação dos primórdios radiciais (HARTMANN; KESTER; GENEVE, 2002). Devido à escassez de estudos que abordam a propagação vegetativa, bem como a ausência de relatos do cultivo *in vitro* de braúna, objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente para a morfogênese, a fim de produzir mudas em larga escala, contribuindo para a preservação desta espécie nativa que se encontra em risco de extinção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo eficiente de desinfestação para a germinação e morfogênese *in vitro* de *Melanoxylon brauna*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer e germinar *in vitro* sementes de *Melanoxylon brauna*;
- b) Produzir plântulas normais axênicas que serão fonte de explante de *Melanoxylon brauna*;
- c) Identificar a concentração adequada de BAP na multiplicação *in vitro* de brotos de *Melanoxylon brauna*;
- d) Identificar o tipo e a concentração adequada das auxinas (AIB, ANA e 2,4-D) na rizogênese *in vitro* de brotos de *Melanoxylon brauna*;
- e) Identificar a concentração adequada de AIB na rizogênese *in vitro* por imersão temporária da base de brotos de *Melanoxylon brauna*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie *Melanoxylon brauna* Schott

Melanoxylon brauna é uma espécie nativa da Floresta Atlântica, que ocorre no Brasil nos estados do Pará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Pertence à família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, é conhecida popularmente como rabo-de-macaco, maria-preta, graúna, braúna-preta ou braúna. Sua madeira é muito densa com elevada durabilidade, por isso, é muito utilizada na indústria de navegação, na fabricação de mobílias, postes de iluminação e mourões de cerca (LORENZZI, 2008). Segundo Santos et al. (2004), a braúna é classificada como uma espécie arbórea secundária inicial.

Devido à sua intensa exploração e à falta de replantios, a braúna tem sido raramente registada nos levantamentos florísticos realizados na Floresta Atlântica (GUEDES-BRUNI; SILVA; MANTOVANI, 2009; SAITER et al., 2011) e está classificada como vulnerável na Lista Oficial de Flora Ameaçada em Extinção (IBAMA, 2018).

Em um inventário florestal realizado por Carvalho; Nascimento; Braga (2007) em um remanescente de Floresta Atlântica no município do Rio de Janeiro, os autores confirmaram a raridade desta espécie ao encontrar apenas um indivíduo na área de estudo. Estes autores enfatizaram a importância de conservação *ex situ* desta espécie, uma vez que o avanço da fragmentação florestal contribui para extinção local. Assim, a braúna é uma espécie com prioridade de conservação (CREPALDI; PEIXOTO, 2010).

A braúna é propagada principalmente via seminífera (ATAÍDE et al., 2017), e a germinação das sementes é recomendada em substrato rolo de papel e sobre vermiculita, em temperatura de 25 °C. A primeira e última contagem da germinação é aos 9 e 40 dias após a semeadura, respectivamente (BRASIL, 2013).

Diversos estudos foram realizados sobre a germinação *ex vitro* de braúna (FLORES et al., 2013; FLORES et al., 2014a; FLORES et al., 2014b; LIMA E BORGES et al., 2015; LIMA E BORGES; ATAÍDE; MATOS, 2015; ATAÍDE;

LIMA E BORGES; LEITE FILHO, 2016; ATAÍDE et al., 2017; SANTOS et al., 2017). Entretanto, a baixa produção de sementes viáveis, devido ao ataque de pragas, tem se tornado um entrave para a produção de mudas (CORTE et al., 2010) pelo método convencional. Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais é uma alternativa na produção de mudas de braúna, uma vez que permite produzir em um curto espaço e tempo, mudas de alta qualidade e em grande escala, além de contribuir para a manutenção de bancos de germoplasma. Contudo, estudos voltados para a germinação *in vitro* e para a propagação vegetativa de braúna são escassos na literatura.

3.2 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa aos métodos convencionais de produção de mudas, além de colaborar nos estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais, pois permite aperfeiçoar as interações entre os fatores abióticos como nutrição, luminosidade e temperatura, e bióticos como hormônios e genética, gerando plantas saudáveis e vigorosas, que podem ser multiplicadas de forma massal (SIQUEIRA; FREITAS; PÉRICO, 2014).

Esta técnica consiste no cultivo *in vitro* de plantas ou parte das plantas, como órgãos, tecidos ou células em ambiente controlado e asséptico, e em meio nutritivo. A cultura de tecidos vegetais baseia-se na totipotencialidade celular, na qual células vegetais, vivas, nucleadas, com sistema laminar intacto e diferenciadas possuem a capacidade de gerar novos órgãos e indivíduos inteiros (TERMIGNONI, 2005).

Devido à totipotência celular dos vegetais, o cultivo *in vitro* de plantas pode ser feito a partir de qualquer segmento ou parte (órgão) vegetal, denominado de explante. Os explantes utilizados na cultura de tecidos são variados, podendo ser utilizados sementes, brotos, segmentos caulinares, segmentos radiculares, gemas, segmentos foliares, entre outros, e a escolha dependerá da espécie, idade do material vegetal e responsividade do explante (CARVALHO; VIDAL, 2003).

A escolha do genótipo, a fonte de explante e condições do meio de cultura são determinantes para o sucesso da propagação *in vitro*. A escolha do genótipo depende dos objetivos a que se deseja alcançar, entretanto, ressalta-se que diferentes variedades de uma mesma espécie respondem de formas diferentes na capacidade organogênica (BRAVO et al., 2008).

A fonte, o tipo, idade e tamanho do explante também afetam a capacidade organogênica nos processos de propagação *in vitro*. Segmentos de epicótilo e hipocótilo, segmento nodal e internodal, ápice caulinar, nó cotiledonar, folhas e cotilédones podem ser utilizados como explante. No entanto, o posicionamento dos explantes na planta matriz está fortemente relacionado com a resposta morfogênica desses tecidos, efeito denominado de topófise (MITCHELL; ZWOLINSKI; JONES, 2004; HUNG; TRUEMAN, 2011).

Os propágulos da parte interna e basal da planta matriz podem possuir características mais juvenis, em comparação aos propágulos mais externos e dos ápices (OSTERC et al., 2009; PIJUT et al., 2011). As diferentes respostas morfogênicas dos explantes provenientes de posições diferentes de uma mesma planta estão ligadas aos níveis hormonais endógenos, de forma que explantes mais distantes dos centros de síntese de auxina sofrem menor influência desta, por isso apresentam melhor resposta na formação de brotos (LONG; BARTON, 2000).

Além dos fatores intrínsecos dos explantes, a composição do meio de cultivo é o principal fator extrínseco que influencia a indução na propagação *in vitro* de plantas, em que, as citocininas e auxinas incorporadas ao meio são os reguladores vegetais responsáveis pela sinalização na indução morfogênica (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010; LEE; PIJUT, 2017).

A propagação *in vitro* de plantas, se dá por meio da morfogênese, que se divide em organogênese, embriogênese e/ou proliferação de gemas axilares. A organogênese compreende a formação de parte aérea e de sistema radicular, e na proliferação de gemas axilares, ocorre o crescimento das mesmas resultando na formação de brotos (GEORGE et al., 2008). Todavia, antes de induzir os explantes às vias morfogênicas é necessário o seu estabelecimento *in vitro*.

3.2.1 Estabelecimento *in vitro*

O principal objetivo da fase de estabelecimento dos explantes é a obtenção de culturas axênicas, ou seja, livres de contaminação. Um dos principais inconvenientes encontrados na produção de mudas pela cultura de tecidos é a contaminação do material pela presença de microrganismos, principalmente fungos e bactérias, que ocasionam sérias limitações na obtenção de um número satisfatório de plântulas ou explantes axênicos, impedindo o avanço da multiplicação do material vegetal (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Este problema ocorre devido à ineficiência do processo de desinfestação e/ou pela presença de microrganismos endógenos nos explantes (FORTES; PEREIRA, 2001; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2003; BEVILACQUA et al., 2011) aliado ao ambiente *in vitro* que é, devido a elevada umidade e aos nutrientes presentes no meio de cultura, perfeitamente favorável ao desenvolvimento de microrganismos.

Desse modo, é necessário que se desenvolva protocolos eficientes de desinfestação. Comumente, a desinfestação dos explantes é feita utilizando-se álcool etílico na concentração de 50 a 70%, durante um a três minutos, que age quebrando a tensão superficial, facilitando o contato do próximo produto desinfestante com o explante. Na sequência, utiliza-se o hipoclorito de sódio ou cálcio na concentração de 0,5 a 2,5% (p/v) por 5 a 20 minutos, aproximadamente, seguido de tripla lavagem em água destilada autoclavada (CHAVES et al., 2005).

O cloreto de mercúrio na concentração de 0,05 a 0,2% (p/v), apesar de sua toxidez, também pode ser empregado no processo de desinfestação e ser bastante eficiente (SILVA; PEREIRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2015). Os fungicidas e bactericidas podem ser utilizados na desinfestação e são eficientes no controle da contaminação, todavia, a concentração e o tempo de ação destas substâncias precisam ser melhor investigadas, uma vez que podem afetar a viabilidade dos explantes tratados (BOLOGNESI, 2003).

A desinfestação de microestacas de *Croton cajucara* Benth. (sacaca) em um minuto no álcool 70% + 15 minutos no hipoclorito de sódio 50% (v/v produto comercial), não diferiu do tratamento testemunha (lavagem das microestacas

em água destilada autoclavada), nas quais a contaminação foi elevada, próximo a 100% (SILVA; PEREIRA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2015).

No cultivo de eucalipto *in vitro*, os explantes apesar de imersos em diferentes concentrações de Cercobin® (0,5; 1; 2 e 4 g L⁻¹) obtiveram elevada contaminação fúngica (LEFETÁ et al., 2015). Ishibashi et al. (2017) utilizaram o bactericida Kasumim® (2 mL L⁻¹) incorporado ao meio de cultura, no cultivo de segmentos internodais de *Acacia mearnsii* de Wild (acácia negra), e observaram que a contaminação dos explantes foi de 100%. Os autores concluíram que a alta contaminação pode ser devido à baixa concentração do Kasumim®, ou à termossensibilidade do produto à altas temperaturas, que foi submetido no processo de autoclavagem do meio de cultura.

Após a desinfestação, os explantes são inoculados em meio de cultura e mantidos em sala de crescimento para certificação da eficiência do protocolo empregado. Se o protocolo for ineficiente, o crescimento de microrganismos inicia-se aproximadamente dois dias após o estabelecimento. Se não houver a proliferação de fungos e bactérias, e o explante permanecer viável (vivo e sem oxidação), a etapa de obtenção de culturas axênicas foi estabelecida, portanto, é possível prosseguir para a etapa de indução da morfogênese *in vitro*.

3.2.2 Morfogênese *in vitro*

Após o estabelecimento dos explantes, prossegue-se para a fase de indução à morfogênese, que pode seguir a rota da organogênese ou embriogênese. A escolha da rota morfogênica a seguir dependerá do objetivo que se deseja alcançar. De acordo com os objetivos propostos neste estudo, a organogênese foi a rota escolhida para a propagação de braúna *in vitro*.

O principal mediador do crescimento e da morfogênese *in vitro* é o balanço dos reguladores de crescimento no meio de cultivo, sendo este o fator que mais influencia na multiplicação e desenvolvimento dos explantes (VILLA et al., 2007).

A organogênese é envolvida pela formação de brotos e/ou raízes *in vitro*, a qual pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na organogênese direta, os brotos e raízes formam-se diretamente a partir do explante, e na organogênese

indireta, ocorre a formação de calo, e as brotações e raízes são emitidas através desse calo (LANDA et al., 2000).

Os reguladores de crescimento mais utilizados na indução da organogênese são as citocininas e as auxinas (BIELACH et al., 2012). As citocininas induzem a formação de parte aérea por meio da divisão celular, formação de gemas adventícias e estimulam as brotações laterais por meio da quebra da dominância apical (POZO et al., 2005; SILVA et al., 2017). O tipo e a concentração de citocinina variam de acordo com a espécie e com os níveis hormonais endógenos dos explantes (CORDEIRO et al., 2004).

O BAP (6-benzilaminopurina) é a citocinina mais utilizada na propagação *in vitro*, (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e sua eficiência como indutor de brotações em espécies florestais foi confirmada por Fermino Júnior; Scherwinski-Pereira (2012), quando estudaram seus efeitos em segmentos nodais cotiledonares de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith) utilizando-se 4 mg L⁻¹ de BAP. Cordeiro et al. (2004) observaram maior proliferação de brotos (2,14 brotos/explante) utilizando-se 3 mg L⁻¹ de BAP em segmentos nodais de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke).

A rizogênese é uma das fases mais importantes da propagação *in vitro*, pois é nesta etapa que ocorre a formação de raízes adventícias, que desempenham a função de absorção de água e nutrientes. Esta etapa é regulada por auxinas que promovem o alongamento e divisão celular, e mantém as células viáveis durante o desenvolvimento das raízes. Um sistema radicular bem formado aumenta as chances de sobrevivência das plantas na etapa de aclimação (SAINI et al., 2013).

O ácido indolbutírico (AIB) é a auxina mais utilizada atualmente em trabalhos de rizogênese com sucesso em diferentes espécies, pois promove o aumento do número de raízes e a uniformidade do enraizamento, diminuindo o tempo da fase de produção de mudas, além de não causar o efeito tóxico numa ampla faixa de concentração (PIZZATTO et al., 2011).

O enraizamento *in vitro* e aclimação *ex vitro* de brotações de citros em meios de cultura contendo 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de AIB produziram raízes mais longas, finas e bem ramificadas, e se adaptaram muito bem, com altas taxas de sobrevivência (SOARES; MIRANDA, 2016).

As auxinas são reguladores vegetais que promovem o enraizamento, e seu principal efeito está ligado à sua ação na formação dos primórdios radiciais (HARTMANN; KESTER; GENEVE, 2002). Jualang et al. (2015) estudaram a espécie nativa de bastão (*Etlingera coccinea* (Blume) S. Sakai & Nagam), da ilha de Bornéu, e encontraram maior número e comprimento de raízes quando utilizaram 0,2 mg L⁻¹ de AIB (ácido indol-3-butírico), e relatam que não houve crescimento de raízes no meio sem essa auxina.

4 REFERÊNCIAS

ATAÍDE, G. M. et al. Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (FabaceaeCaesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 372-379, 2017.

ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L.; LEITE FILHO, A. T. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v. 40, n. 1, p. 61- 70, 2016.

BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 367, n. 1595, p. 1469-78, 2012.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research Reviews in Mutat Research**, v. 543, p. 251-272, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes de espécies florestais. MAPA/DAS/ACS, 2013. 97p.

BRAVO, C. D. V. et al. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Revista Árvore**, v. 31, n. 4 p.717-730, 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 42p.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1281-1287, 2005.

CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004.

CORTE, V. B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

CREPALDI, M. O. S.; PEIXOTO, A. L. Use and knowledge of plants by “Quilombolas” as subsidies for conservation efforts in an area of Atlantic Forest in Espírito Santo State, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v.19, n. 1, p. 37-60, 2010.

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.

FLORES, A. V. et al. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* schott sob diferentes temperaturas. **Cerne**, v. 20, n. 3, p. 401- 408, 2014a.

FLORES, A. V. et al. Germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott

em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1147- 1154, 2014b.

FLORES, A. V. et al. Umedecimento do substrato e temperatura na germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 454- 457, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI\Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUEDES-BRUNI, R. R.; SILVA, A.G.; MANTOVANI, W. Rare canopy species in communities within the Atlantic Coastal Forest in Rio de Janeiro State, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 2, p. 387-403, 2009.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. J. F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall. 770 p. 2002.

HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. Topophytic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* × *C. citriodora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, p. 69-77, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE (IBAMA). Lista oficial de flora ameaçada de extinção. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/flora>>. Acesso em: 30 dez. 2018.

ISHIBASHI, V.; KOGUTA, K. V.; FLÔRES JUNIOR, P. C.; HIGA, A. R. Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* de Wild. (Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 13, n. 1, p. 15-20, 2017.

JUALANG, A. G. et al. *In vitro* shoot regeneration from rhizome bud of native ginger in Borneo, *Etlingera coccinea*. **Journal of Tropical Plant Physiology**, v. 7, n. 1, p. 36-46, 2015.

LAFETÁ, B. O. et al. Assepsia de explantes caulinares de eucalipto com fungicida sistêmico. **Revista Científica Vozes dos Vales**, v. 8, p. 2-14, 2015.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 56-63, 2000.

BORGES, E. E. L. et al. Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna* Schott. **Cerne**, v. 21, n. 1, p. 75-81, 2015.

BORGES, E. E. L.; ATAÍDE, G. M.; MATOS, A. C. B. Micropilar and embryonic events during hydration of *Melanoxylon brauna* Schott seeds. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 3, p. 192-201, 2015.

LONG, J.; BARTON, M. K. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. **Developmental Biology**, v. 218, p. 341-353, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 6ª ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384 p. 2014.

MAGYAR-TÁBORI, K. et al. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 101, p. 251-267, 2010.

MITCHELL, R. G.; ZWOLINSKI, J.; JONES, N. B. A review on the effects of donor maturation on rooting and field performance of conifer cuttings. **South African Journal of Science**, v. 201, n. 1, p. 53-63, 2004.

OSTERC, G.; STEFANCIC, M.; STAMPAR, F. Juvenile stockplant material enhances root development through higher endogenous auxin level. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 899–903, 2009.

PIJUT, P. M.; WOWSTE, K. E.; MICHLER, C. H. Promotion of adventitious root

formation of difficult-to-root hardwood tree species. **Horticultural Reviews**, v. 38, p. 213–251, 2011.

PIZZATTO, M. et al. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. **Revista Ceres**, v. 58, p. 487-492, 2011.

POZO, J. C. D. et al. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, v. 123, p. 173-183, 2005.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root developed. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 741-757, 2013.

SAITER, F. Z. et al. Tree changes in a mature rainforest with high diversity and endemism on the Brazilian coast. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 9, p. 1921-1949, 2011.

SANTOS M. M. et al. Germination of seeds of *Melanoxylon brauna* Schott. under heat stress: production of reactive oxygen species and antioxidant activity. **Forests**, v. 8, n. 11, p. 1-13, 2017.

SILVA, J. P. G. S. et al. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Rosa* sp. **Agroecossistemas**, v. 9, n. 2, p. 370-380, 2017.

SIQUEIRA, J.; FREITAS, E. M.; PÉRICO, E. Influência de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L. G. Lohmann a partir de estacas caulinares. **Iheringia Série Botânica**, v. 69, n. 2, p. 341-346, 2014.

SOARES, B. O.; MIRANDA, V. S. Enraizamento *in vitro* e aclimatização *ex vitro* de cultivares de citros. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 59, n. 2, p. 144-151, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.

XAVIER, A. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Ed. UFV. 2007, p. 55-74.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. S. **Silvicultura clonal: Princípios e Técnicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2013, 279p.

CAPÍTULO I: Germinação *in vitro* e toxicidade de agente desinfestante na produção de plântulas axênicas de *Melanoxylon brauna* Schott

RESUMO

A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa à manutenção dos bancos de germoplasma de braúna, espécie ameaçada de extinção. Entretanto, explantes livres de contaminação é determinante para o sucesso dessa técnica, onde os agentes desinfestantes podem ser tóxicos. Objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente de produção de plântulas axênicas *in vitro* de braúna. Experimentos I e II: As sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio (NaClO) e Captan® 2% p.a. com e sem resíduo, por diferentes tempos de imersão, respectivamente. Foram analisadas: contaminação; germinação e plântulas normais e anormais. Experimento III: sementes de alface foram expostas em placa de Petri com 2,5 mL de Captan® a 0,5; 1; 2; 4 e 8% p. a.; glifosato a 0,01% e água destilada. Foram analisadas: germinação; comprimento das plântulas; ciclo celular; alterações nucleares e cromossômicas das células do meristema radicular. O uso isolado de NaClO não é eficiente na desinfestação de sementes de braúna. O Captan® por 10 minutos com resíduo, ao ser eficiente na desinfestação, possibilitou as sementes expressarem resultados superiores de germinação e vigor, porém, apresentou toxidez e seu mecanismo de ação no ciclo celular de alface é clastogênico e aneugênico, o que sugere a formação de plântulas anormais em braúna.

Palavras-chave: Braúna, sementes, cultura de tecidos vegetais, desinfestação, plântulas anormais.

ABSTRACT

Plant tissue culture is an alternative to the establishment and maintenance of germplasm collections and massive propagation for several plant species. The development of tissue cultured-based protocols applied to brauna, an endangered species, would be though highly desirable. However, contamination-free explants are determinant for the success of this technique, which might be vulnerable to the toxicity of disinfectants. Here, we aimed at establishing an efficient protocol for *in vitro* production of axenic seedlings of brauna. Experiments I and II: Seeds were treated with sodium hypochlorite (NaClO) and fungicide captan, with and without residue, by different immersion times, respectively. The following were analyzed: contamination; germination and normal and abnormal seedlings. Experiment III: Lettuce seeds placed in Petri dishes were exposed to 2.5 mL captan at 0.5; 1; 2; 4 and 8%; 0.01% glyphosate and distilled water. The germination, length of seedlings, cell cycle, nuclear and chromosomal alterations of the cells of the root meristem were assessed. The isolated use of NaClO was not efficient in the disinfestation of brauna seeds. However, the immersion of the seeds in captan, for 10 minutes with its residue, led to higher germination and vigor indexes; however, this compound demonstrated toxicity and its mechanism of action in the lettuce cell cycle was clastogenic and aneugenic, which resulted in the formation of abnormal seedlings in the target species.

Key words: Braúna, seeds, plant tissue culture, disinfestation, abnormal seedlings.

1 INTRODUÇÃO

Melanoxylon brauna Schott, conhecida popularmente como braúna, é uma árvore nativa da Floresta Atlântica, pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, que possui grande valor ecológico e econômico (LORENZI, 2014). Sua madeira é utilizada na indústria de navegação, na fabricação de móveis, postes de iluminação e mourões de cerca (CARVALHO et al., 2007), porém, devido à sua intensa exploração e à falta de replantios, raramente tem sido registrada nos levantamentos florísticos, e está classificada como vulnerável na Lista Oficial de Flora Ameaçada em Extinção (IBAMA, 2018).

A propagação da espécie *M. brauna* é feita *ex vitro* por sementes, e a cultura de tecidos vegetais é uma técnica alternativa na produção de mudas de alta qualidade genético-sanitária e a sua manutenção em bancos de germoplasma. Entretanto, algumas limitações específicas dificultam o uso da cultura de tecidos vegetais, a exemplo da presença de microrganismos nos explantes, que precisam ser eliminados com substâncias desinfestantes (CHAVES et al., 2005).

O etanol e o hipoclorito de sódio e cálcio são as substâncias comumente mais utilizadas para a desinfestação na propagação *in vitro*, suas concentrações e tempo de exposição variam de acordo com a espécie e o tipo de explante, e, portanto, é necessária a adequação de protocolos para que a desinfestação seja eficiente (CHAVES et al., 2005).

Os fungicidas são substâncias eficientes no controle da contaminação fúngica e a sua fungitoxicidade é inerente à sua composição química (mecanismo de ação), concentração e tempo de exposição (EDGINGTON et al., 1971). A ação dos fungicidas, no metabolismo dos microrganismos, destaca-se principalmente na síntese de proteínas, na qual as substâncias químicas inibem a conversão de aminoácidos livres em proteínas, e na síntese e polimerização de ácidos nucleicos (SISLER, 1969).

Ainda que sejam eficientes, os agentes utilizados na desinfestação podem ser tóxicos tanto aos microrganismos quanto aos explantes. O captana, princípio ativo de alguns fungicidas, a exemplo do Captan[®] utilizados no tratamento de

sementes, pode, a depender da concentração e tempo de exposição, acarretar em danos ao DNA e afetar a normalidade das plântulas (BOLOGNESI, 2003). No entanto, análises macro e microscópicas são excelentes formas de estudar os efeitos fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos de substâncias sobre espécies bioindicadoras (KUMARI et al., 2011).

Objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo eficiente de produção de plântulas axênicas *in vitro* de *Melanoxylon brauna* utilizando-se o hipoclorito de sódio e o captana como agentes desinfestantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, e no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo. As sementes de braúna foram provenientes de matrizes do município de Leopoldina-MG, localizadas sob as coordenadas 21°59'75"S e 42°49'42"W.

Experimento I: GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BRAÚNA (*Melanoxylon brauna* Schott) APÓS DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaClO).

As sementes de braúna foram previamente lavadas em água corrente e detergente neutro, posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram submersas em álcool 70% por um minuto, e em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% de cloro ativo, em diferentes tempos de imersão (0; 5; 10; 15; 20 e 25 minutos). O resíduo de NaClO das sementes foi removido por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada durante 30 minutos, à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm.

Posteriormente, as sementes foram introduzidas individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 25x150 mm, contendo 10 mL de meio WPM (Woody Plant Medium) Sigma® (2,41 g L⁻¹) (LLOYD; McCOW, 1980), sacarose Dinâmica® (30 g L⁻¹), mio-inositol Sigma® (0,1 mg L⁻¹), ágar Kasvi® (7 g L⁻¹), cujo pH foi ajustado para 5,7±0,1 e em seguida autoclavado por 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm. As sementes *in vitro* foram

mantidas em sala de crescimento por 30 dias, sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A irradiância na sala de crescimento foi promovida por lâmpadas de LED tubular 20W, e a maior parte dos comprimentos de ondas emitidos por elas estão dentro do espectro do visível (450 a 700 nm), energia que os vegetais utilizam para realizar fotossíntese (Figura 1). A irradiância e espectro foram medidos com o equipamento: Spectrapen LM500-VIS, Photon Systems Instruments®.

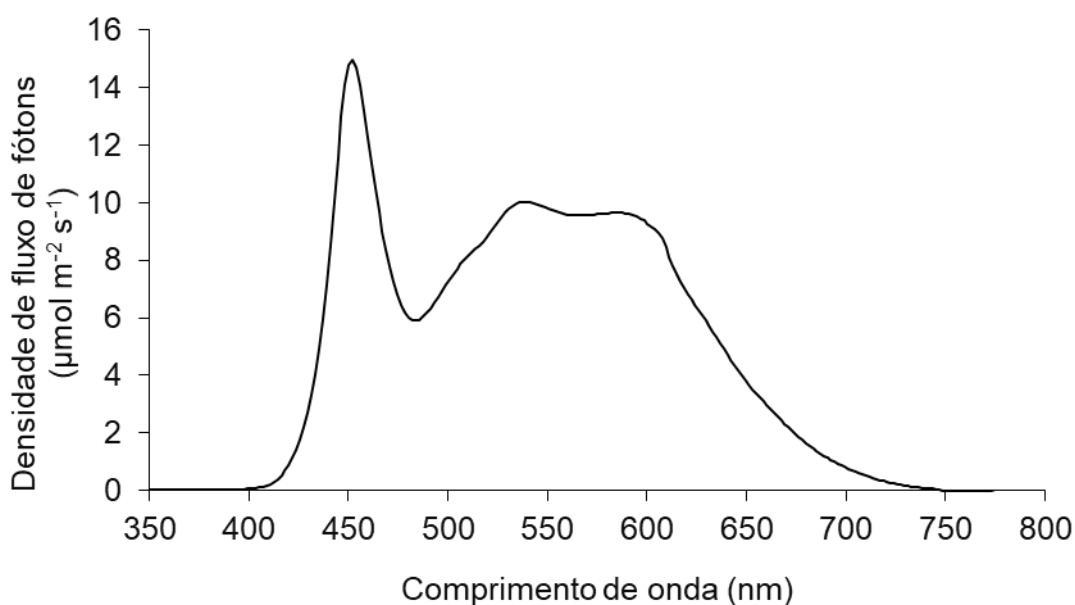


Figura 1 - Espectro da radiação das lâmpadas utilizadas na sala de crescimento.

As análises foram: contaminação (%); germinação (%); índice de velocidade de germinação (IVG); plântulas normais (%); plântulas anormais (%) e dormência (%).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e quatro repetições com 25 sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão ($p < 0,01$). Para o cálculo do tempo de máxima eficiência técnica (TMET) foram obtidos os pontos de máximo e mínimo por meio da derivação das equações das regressões que apresentaram modelo quadrático. Considerando os resultados obtidos neste experimento, foi realizado um segundo experimento de desinfestação a fim de complementar os resultados.

Experimento II: GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BRAÚNA (*Melanoxylon brauna* Schott) APÓS DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO E MANUTENÇÃO OU NÃO DO RESÍDUO DE CAPTANA

As sementes de braúna foram previamente lavadas em água corrente e detergente neutro, e, em câmara de fluxo laminar, foram submersas em álcool 70% por um minuto, e em NaClO a 2,5% de cloro ativo durante 15 minutos. Posteriormente, o resíduo foi removido por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram submersas em Captan® a 2% p.a., em diferentes tempos de exposição (0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 minutos).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 13 tratamentos (sete tempos de exposição ao Captan® e, ausência ou presença do resíduo do fungicida), com quatro repetições de 25 sementes, colocadas individualmente nos tubos de ensaio de dimensões de 25 x 150 mm. Nas parcelas sem o resíduo do Captan®, as sementes foram lavadas uma vez com água destilada e autoclavada, e nas parcelas com a manutenção do resíduo, as sementes foram inseridas nos tubos de ensaio imediatamente após a imersão no fungicida. As sementes foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL WPM (Woody Plant Medium) Sigma® (2,41 g L⁻¹) (LLOYD; McCOW, 1980), sacarose Dinâmica® (30 g L⁻¹), mio-inositol Sigma® (0,1 mg L⁻¹), ágar Kasvi® (7 g L⁻¹), cujo pH foi ajustado para 5,7±0,1 e em seguida autoclavado por 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm.

As sementes *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento por 30 dias, sob temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 12 horas, com irradiância de 90 µmol m⁻² s⁻¹ promovida por lâmpadas de LED tubular 20 W, que emitem os comprimentos de ondas no espectro do visível (Figura 1).

As análises foram: contaminação (%); germinação (%); índice de velocidade de germinação (IVG); plântulas normais (%); plântulas anormais (%) e dormência (%). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de médias de Skott-Knott (p<0,01). Para verificar se o captana promove efeito fitotóxico às plântulas, foi realizado o experimento a seguir.

Experimento III: TOXICIDADE DO CAPTANA EM SEMENTES DE *Lactuca sativa* L.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado utilizando cinco concentrações do Captan® (0,5; 1; 2; 4 e 8% p. a), solução de glifosato 0,01% (controle positivo) e água destilada (controle negativo), com cinco repetições de 25 sementes cada. Foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) do cultivar Manteiga (Feltrin Sementes®), dispostas em placas de Petri forradas com papel tipo Germitest®, umedecido com 2,5 mL de solução de cada tratamento, que posteriormente foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 24 ± 2 °C. A análise de germinação foi feita de oito em oito horas durante 48 horas.

Decorridas 48 horas foi aferido o comprimento de raiz com paquímetro digital (0,01 mm) e foram selecionadas aleatoriamente dez plântulas de cada tratamento para a fixação em solução de metanol e ácido acético (3:1), e acondicionadas em freezer. Após 120 horas foi aferido o comprimento de parte aérea das plântulas que permaneceram nas placas, com paquímetro digital.

As raízes fixadas foram submetidas à técnica de esmagamento (adaptado de GUERRA; SOUZA, 2002), em que, em temperatura ambiente, realizou-se a tríplice lavagem com água destilada (10 minutos cada lavagem) e imersão em solução de HCl 5 N por 18 minutos e novamente em água destilada por 10 minutos.

Após a lavagem, o meristema apical de cada raiz foi retirado e transferido para uma lâmina de microscopia, em seguida adicionou-se uma gota do coranteorceína acética a 2%. Decorridos dois minutos, o meristema corado foi esmagado entre lamínula e lâmina. As lâminas foram observadas em microscópio com lente objetiva (Nikon® BE Plan 40x /0,65). Foram contabilizadas 1000 células em cada repetição por tratamento.

O índice mitótico (IM) foi obtido dividindo-se o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento. As frequências das alterações cromossômicas e nucleares foram obtidas dividindo-se o número de alteração cromossômica e nuclear,

respectivamente, pelo número total de células avaliadas. Já, a frequência de alterações, que representa a ocorrência de cada alteração individualmente, foi avaliada a partir da razão entre a quantidade de alterações individualmente (c-metáfase, ponte, pegajoso, poliploidização, quebrado e perdido) e o número de células por divisão. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$), sendo duas testemunhas, o controle positivo (glifosato) e negativo (água).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BRAÚNA (*Melanoxylon brauna* SCHOTT) APÓS DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaClO).

A menor contaminação nas sementes de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) foi de 39,11%, no tempo de máxima eficiência técnica, que corresponde ao ponto de mínimo obtido no modelo quadrático da regressão, com imersão em NaClO por 20,73 minutos. No tratamento controle (ausência de NaClO) houve 87,36% de contaminação das sementes (Figura 2a).

A porcentagem e a velocidade de germinação das sementes apresentaram regressão linear crescente (Figura 2b e c, respectivamente) com o aumento do tempo de imersão em NaClO, até atingir a máxima germinação (51,88%), com 25 minutos de imersão (Figura 2b). Entretanto, à medida que aumentou o tempo de imersão das sementes em NaClO, aumentou a porcentagem de plântulas anormais, chegando a 29,24% no tempo de exposição de 25 minutos (Figura 2d).

A máxima porcentagem de plântulas normais (24,57%) foi obtida em sementes imersas por 15 minutos (Figura 2e). O cloro, princípio ativo do hipoclorito de sódio, quando diluído em água ocorre a formação do ácido hipocloroso (HClO) e cloro gasoso (Cl₂). O ácido hipocloroso consegue penetrar facilmente na célula bacteriana através da membrana citoplasmática, e atua sobre proteínas e ácidos nucleicos dos microrganismos, por meio da oxidação dos grupos sulfidrilas e dos grupos amino, indol e hidroxifenol da tirosina (INGRAM et al., 2003). Esse efeito prejudicial do cloro aos microrganismos ficou evidenciado na figura 2a, em que, a inserção do hipoclorito de sódio no processo de

desinfestação das sementes promoveu uma brusca redução da contaminação no tempo de cinco minutos de imersão (30%), entretanto, mesmo no tempo de máxima eficiência técnica (TMET) (20,73 min.), a contaminação das sementes manteve-se elevada.

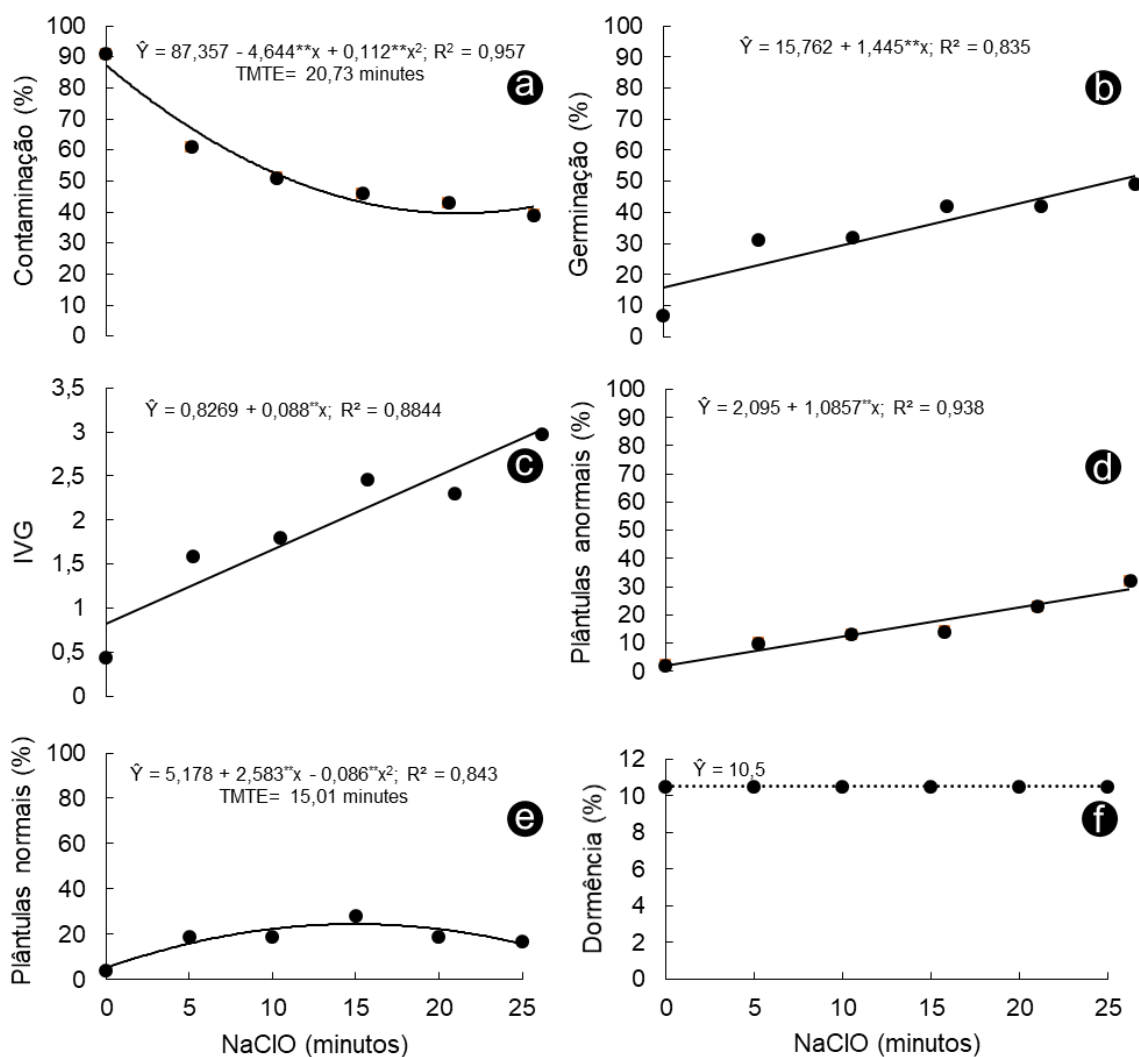


Figura 2 - Contaminação (%), a), germinação (%), b), índice de velocidade de germinação (IVG, c), plântulas normais (%), d), plântulas anormais (%), e) e dormência (%), g) *in vitro* de sementes de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) após tempos de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO). $^{**}(p<0,01)$; TMET. Tempo de máxima eficiência técnica.

A reduzida eficiência do NaClO no controle da contaminação pode ser atribuída à sua maior efetividade contra bactérias, principalmente no presente estudo, em que a contaminação persistente, após a desinfestação, foi em grande parte, fúngica (Figura 3ab), e a presença de bactérias após este processo foi reduzida

ou ausente. Essa contaminação em sementes de espécies florestais nativas está associada à presença do agente contaminante na superfície do tegumento e quando em condições favoráveis, a contaminação avança e coloniza toda superfície da semente, impedindo a absorção de água que é primordial para o avanço do processo germinativo (BOTELHO et al., 2008). Em explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã) desinfestadas com NaClO, a contaminação bacteriana foi inferior a 30%, entretanto, o tratamento não foi eficiente no controle da contaminação fúngica (CARNEIRO et al., 2000).

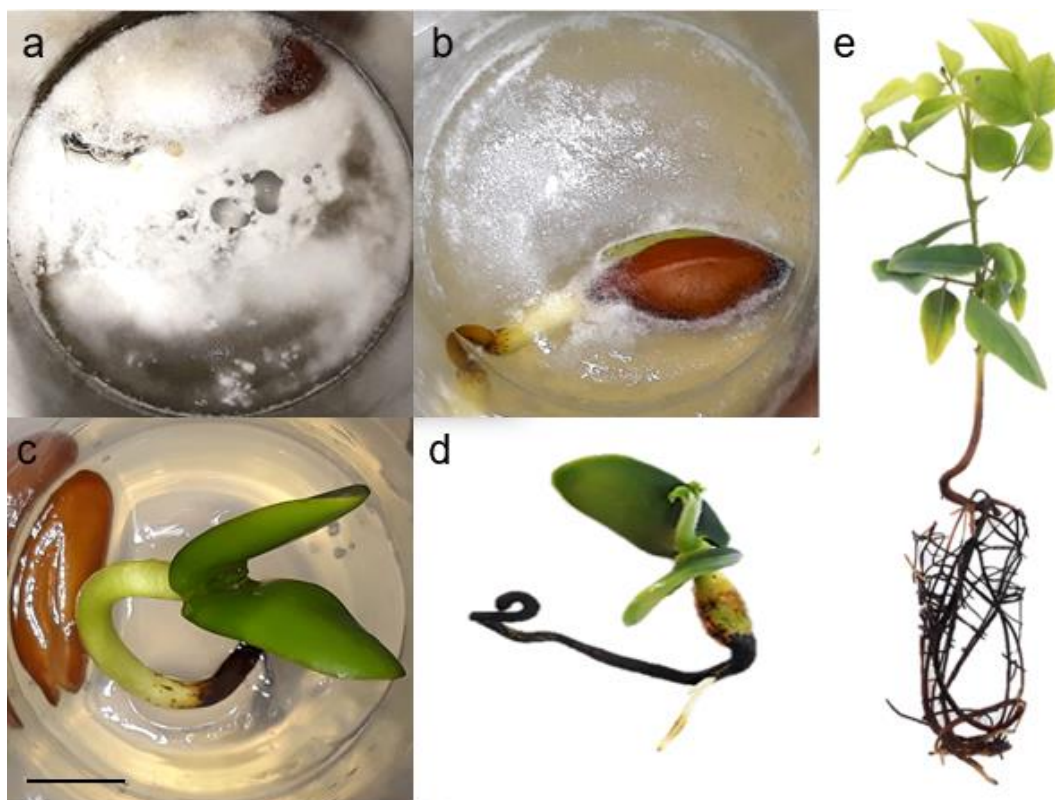


Figura 3. **a, b.** Sementes de *Melanoxylon brauna* contaminadas *in vitro*; **c.** Plântula axênica seis dias após a germinação *in vitro*; Plântula anormal (**d**) e normal (**e**) 30 dias após a germinação *in vitro*. Barra: 1 cm.

As bactérias são organismos procariontes, e se caracterizam por serem unicelulares, de tamanho reduzido, ausência de organelas como a mitocôndria, complexo de Golgi e fuso mitótico e o material genético mantém-se disperso no citoplasma (MURAT et al., 2010). Com a ausência do envoltório nuclear, acredita-se que as proteínas e ácidos nucleicos ficam mais vulneráveis à ação do NaClO, uma vez que este agente desinfestante atua sobre essas moléculas. Bevilacqua et al. (2011) ratificam a eficiência da ação antibacteriana do NaClO

em sementes de *Calendula officinalis*, que tratadas a 2,5% por 30 minutos, 93,9% das sementes apresentaram-se livres deste microrganismo.

Experimento II: GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE BRAÚNA (*Melanoxylon brauna* SCHOTT) APÓS DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO E MANUTENÇÃO OU NÃO DO RESÍDUO DO CAPTANA.

A menor contaminação, a maior germinação e o maior IVG ocorreram com a manutenção do resíduo do captana nas sementes, independentemente do tempo de imersão no fungicida (Tabela 1). A manutenção do resíduo do captana nas sementes após 10; 20; 25 e 30 minutos de imersão resultou nas maiores porcentagens de plântulas normais (Figura 3e) (68; 65; 61 e 59%, respectivamente). Entretanto, verificou-se que a manutenção do resíduo do captana, na maioria dos tempos de imersão, promoveu maior anormalidade (Figura 3d) das plântulas (Tabela 1). A diferença da contaminação no tratamento controle (álcool 70%, um minuto + NaClO 2,5% de cloro ativo, 15 minutos) em comparação à adição do captana é significativa, sugerindo que somente o NaClO não é suficiente para a desinfestação de sementes de braúna.

A inserção do captana no processo de desinfestação das sementes de braúna promoveu um ganho satisfatório de sementes não contaminadas (40%), e quando o seu resíduo foi mantido nas sementes esse ganho elevou-se para 53%. A fungitoxicidade do captana é proveniente da sua ação multisítios, que bloqueia irreversivelmente as moléculas que contém o grupo tiol, resultando na redução da atividade de várias enzimas essenciais para a sobrevivência dos fungos (ARCE et al., 2010).

TABELA 1- Contaminação (CONT, %), germinação (GER, %), índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN, %), plântulas anormais (PA, %) e dormência (DOR, %) *in vitro* de sementes de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) após diferentes tempos de imersão e manutenção ou não do resíduo do captana

Captan®	Tempo (min)	CONT (%)	GER (%)	IVG	PN (%)	PA (%)	DOR(%)
Sem resíduo	0	64a ⁽¹⁾	33c	1,13c	25d	8b	3a
	5	33c	56b	2,74b	50b	6b	7a
	10	45b	52b	2,47b	44c	8b	3a
	15	43b	50b	2,13b	45c	5b	7a
	20	34c	58b	1,88b	53b	5b	8a
	25	36c	56b	2,22b	42c	15a	7a
	30	29c	61b	2,10b	51b	11b	9a
Com resíduo	5	14d	77a	3,60a	56b	21a	9a
	10	11d	73a	3,34a	68a	12b	8a
	15	18d	65a	3,29a	53b	16a	13a
	20	6d	77a	3,60a	65a	14a	14a
	25	13d	72a	3,70a	61a	18a	8a
	30	4d	75a	3,48a	59a	19a	17a

⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott ($p>0,05$).

A eficiência do captana na desinfestação é atribuída ao seu amplo espectro de ação, que faz com que várias classes de fungos sejam afetadas pelo seu efeito tóxico (SCARIOT et al., 2017). Diferentemente do hipoclorito de sódio, o captana é um composto químico insolúvel em água, e devido a essa característica de apolaridade consegue penetrar mais facilmente ao núcleo das células fúngicas e iniciar o processo toxicológico. Em estudo realizado com *Saccharomyces cerevisiae* tratados com captana revelou que 81,7% destes fungos apresentaram morte celular, devido às suas células perderem a integridade das membranas (SCARIOT et al., 2017).

A manutenção do resíduo do captana reduziu a contaminação, devido ao maior tempo de contato com as sementes, uma vez que, este fungicida possui ação protetora, inibe o crescimento e desenvolvimento de possíveis microrganismos que persistem nas sementes, mesmo após os processos de desinfestação. O

curto tempo de exposição aliado às características de baixa permeabilidade do tegumento, devido à cerosidade das sementes de braúna, reduziram a eficiência do tratamento do captana sem resíduo. Portanto, a utilização de um coadjuvante seria uma alternativa para aumentar o poder de ação do fungicida. A eficiência de fungicidas protetores está estreitamente relacionada com a sua atuação de contato e, para que a desinfestação tenha êxito, é importante que o captana cubra toda a superfície da semente (WAGNER et al., 2003; KOLLER et al., 2005). A retirada do resíduo, após o tratamento com captana reduziu seu efeito fungitóxico, pois os fungicidas de contato não conseguem persistir na superfície dos vegetais após serem lavados com água 24 horas após o tratamento, deixando-os desprotegidos (ABBOTT; BECKERMAN, 2018). Apesar da eficiência na desinfestação do captana com a manutenção do seu resíduo, o mesmo ocasionou anormalidades nas plântulas de braúna, em média 17%. Esta porcentagem de plântulas anormais neste tratamento sugere que o Captan[®] promoveu algum efeito citotóxico às plântulas de braúna.

Experimento III: TOXICIDADE DO CAPTANA EM SEMENTES DE *Lactuca sativa* L.

A germinação, o IVG e o comprimento radicular das sementes tratadas com captana foram diferentes e inferiores dos controles positivo e negativo, e à medida que aumentou a concentração do fungicida diminuiu a germinação das sementes, até a concentração mais alta (8%), na qual não houve germinação (Tabela 2).

Os efeitos do captana em todas as concentrações testadas e em todas as características analisadas, à exceção do comprimento de parte aérea, foram mais drásticos se comparado aos causados pelo glifosato. O índice mitótico nas concentrações 1; 2; 4 e 8% de captana foi semelhante estatisticamente ao índice mitótico do controle positivo (glifosato), e o índice mitótico das células meristemáticas radiculares tratadas com captana a 0,5% foi reduzido em 39,43%, em relação ao controle negativo (água) (Tabela 2).

O número de células em intérfase nas concentrações 1; 2 e 4% foram semelhantes ao controle positivo. Já, o número de células em prófase na concentração de 0,5% foi semelhante ao controle negativo, e nas demais

concentrações foram semelhantes ao controle positivo. O número de células em metáfase e anáfase nas concentrações 1; 2; 4 e 8% se assemelharam ao controle positivo. Na telófase, as células em todas as concentrações de captana foram semelhantes ao controle positivo (Tabela 2).

Alterações no ciclo celular e consequentemente fisiológicas e morfológicas nas sementes de alface causadas pelo captana variaram de acordo com as concentrações utilizadas. Houve alterações no ciclo celular (C-metáfase, cromossomos pegajosos, anáfase multipolar, ponte anafásica e micronúcleos) nas concentrações de 0,5 e 1% de captana e na germinação das sementes, sendo que apenas 41% germinaram na menor concentração, e na maior concentração não houve germinação (Tabela 2).

As alterações cromossômicas foram mais frequentes na concentração de 0,5%, e nas demais concentrações foram semelhantes estatisticamente aos controles positivo e negativo. O efeito inibidor da germinação das sementes na maior concentração impossibilitou as análises de divisão celular, devido à ausência de raízes (Tabela 2).

O captana reduziu a germinação e comprimento radicular, diminuiu o índice mitótico e aumentou a frequência de alterações cromossômicas das células de *Lactuca sativa*, sugerindo respectivamente, o poder fitotóxico, citotóxico e genotóxico deste fungicida.

As análises macroscópicas (germinação, IVG, comprimento de raiz e comprimento da parte aérea) estão intimamente relacionadas com as microscópicas (divisões celulares e alterações cromossômicas), pois a germinação e o crescimento de raiz e parte aérea dependem do aumento do número e alongamento celular (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010), que dependem de sucessivos ciclos mitóticos. Neste sentido, se não houver bloqueio na transição das fases da mitose, a divisão celular ocorre normalmente, bem como o crescimento radicular e aéreo.

Tabela 2 - Germinação de sementes, crescimento de plântulas, divisão celular, índice mitótico e alterações cromossômicas de células meristemáticas de alface (*Lactuca sativa* L.) após imersão em diferentes concentrações de captana

Tratamento	[]s	Germinação (%)	IVG	Comprimento de raiz (cm)	Comprimento de parte aérea (cm)
Captan® (%)	0,5	41 ⁽¹⁾	0,3254	3,54	1,74
	1	28,8	0,2230	2,86	2,50
	2	17,2	0,1586	2	0 b
	4	10	0,1042	0,62	0 b
	8	0	0	0	0 b
Água	-	99,2 a	1,3918 a	11,32 a	5,16 a
Glifosato	0,01	97,6 b	1,3168 b	4,20 b	0 b
Tratamento	[]s	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase
Captan® (%)	0,5	941	42,4 a	11	5
	1	994,6 b	4 b	1,2 b	0,2 b
	2	1000 b	0 b	0 b	0 b
	4	1000 b	0 b	0 b	0 b
	8	0	0 b	0 b	0 b
Água	-	902,6 a	40,0 a	31,2 a	22,8 a
Glifosato	0,01	995,8 b	2,6 b	0,8 b	0,8 b
Tratamento	[]s	Telófase	Células em Divisão	Índice Mitótico (%)	Alterações Cromossômica (%)
Captan® (%)	0,5	0,6 b	59	5,9	0,2
	1	0 b	5,4 b	0,54 b	0,08 ab
	2	0 b	0 b	0 b	0 ab
	4	0 b	0 b	0 b	0 ab
	8	0 b	0 b	0 b	0 ab
Água	-	3,4 a	97,4 a	9,74 a	0,06 a
Glifosato	0,01	0 b	4,2 b	0,42 b	0,06 b

⁽¹⁾Médias seguidas pela letra a indicam semelhança significativa ao controle negativo (água) e médias seguidas pela letra b indicam semelhança significativa ao controle positivo (glifosato), segundo o teste de Dunnett ($p>0,05$). []s. Concentrações; IVG. Índice de velocidade de germinação.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos com os fungicidas difeconazol e tebuconazol em sementes de *Allium cepa*, que determinaram diminuição no crescimento de raízes, redução do índice mitótico e aumento de alterações cromossômicas e nucleares (BERNARDES et al., 2015).

Com a redução do índice mitótico, o crescimento radicular e a germinação das sementes são afetados, porque um dos principais fatores que os influenciam é a atividade de divisão celular do meristema radicular, juntamente com o

alongamento das células desse tecido (SHISHKOVA et al., 2008). O índice mitótico pode fornecer informações sobre a citotoxicidade de determinada substância, em que, sua redução está relacionada com a paralisação do ciclo celular evidenciando a atividade citotóxica, e, seu aumento pode indicar processos de tumorização (SOUZA et al., 2010), ambos prejudiciais ao desenvolvimento normal do organismo.

A semelhança do índice mitótico nas concentrações 1; 2; 4 e 8% de captana com o controle positivo (glifosato, inibidor da ação da enzima 5-enolpiruvato-shiquimato-3 fosfato sintase (EPSPs), interferindo na síntese do corismato, precursor imediato dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina) (FUNKE et al., 2006), sugere que nestas concentrações o fungicida e o glifosato paralisaram a divisão celular do meristema radicular de alface. Observa-se na tabela 2 que todas as células visualizadas nas concentrações 2 e 4% estão em intérfase (Figura 4F), e o efeito citotóxico do captana a 8% foi tão severo, a ponto de inibir completamente a germinação das sementes, por isso não foi possível analisar o ciclo celular do meristema desse tratamento.

A ausência ou reduzida frequência de alterações cromossômicas, nas concentrações acima de 0,5% de captana, pode ser consequência do elevado número de células em intérfase (Figura 4f), principalmente porque o efeito citotóxico de determinadas substâncias pode mascarar o efeito genotóxico, uma vez que promovem a apoptose ao invés de formar alterações cromossômicas (BRUNETTI et al., 1988). Deste modo, a fim de evitar possíveis resultados falsos negativos para a ação genotóxica do captana, recomenda-se a utilização do método indireto de análise citogenética.

Entretanto, como na concentração de 0,5% o efeito citotóxico do captana foi menor, algumas células conseguiram avançar na divisão, sendo possível identificar maiores alterações cromossômicas nas fases do ciclo celular. Nessa concentração a frequência de alterações cromossômicas foi três vezes superior ao controle negativo, sugerindo o potencial genotóxico de captana.

Na figura 4 observa-se as diferentes alterações cromossômicas causadas pelo fungicida, sendo possível inferir o seu mecanismo de ação sobre a alface. Alterações que abrangem a estrutura do cromossomo tais como pontes (Figura 4e) e quebra indicam ação clastogênica, e quando as alterações são numéricas e abrangem o conjunto de cromossomos, tais como cromossomo

perdido, aderente (Figura 4b), atrasos, multipolaridade (Figura 4c) e C-metáfase (Figura 4a) sugerem ação aneugênica (VIDAKOVIC-CIFREK et al., 2002; LEME et al., 2009).

Neste entanto, como foi possível observar alterações cromossômicas que abrangem a estrutura quanto as que interferiram no conjunto cromossômico pode-se afirmar que o mecanismo de ação do captana sobre a alface é clastogênico e aneugênico, com predominância do último.

A ocorrência de cromossomos pegajosos (Figura 4b) nas células foi devido a alterações na estrutura cromossômica, e promoveu a perda das características normais de condensação formando aglomerados, enquanto a c-metáfase é decorrente da má formação do fuso mitótico ou divisão anormal da célula (FENECH, 2000).

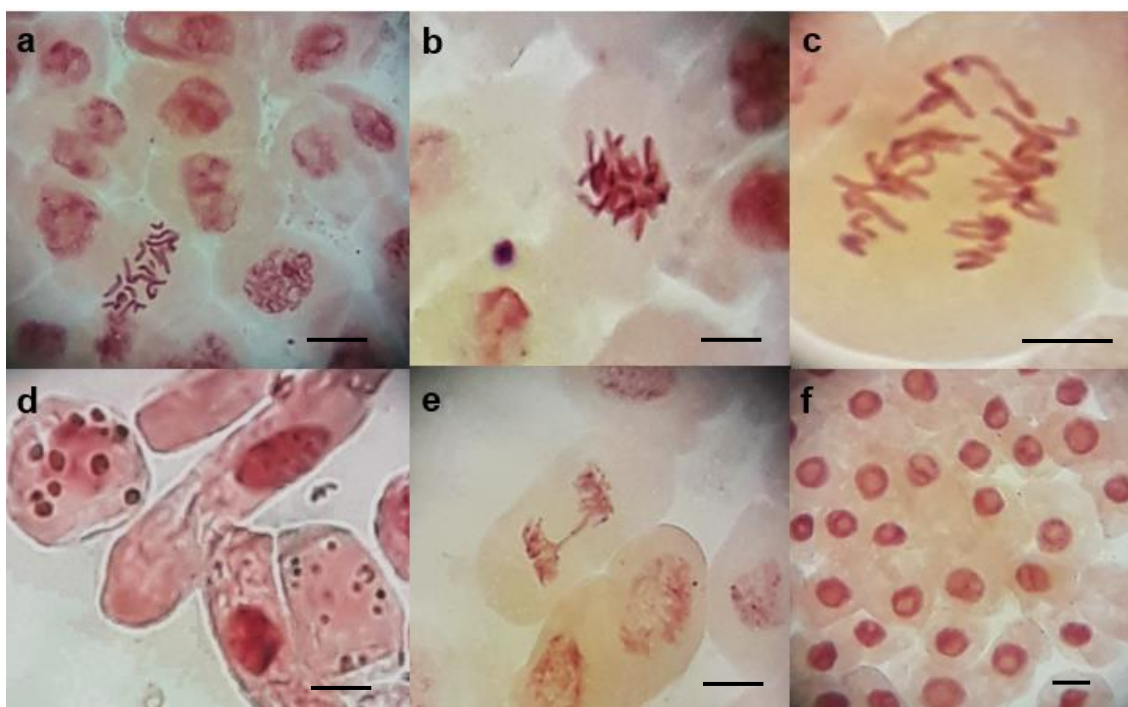


Figura 4 - Danos genotóxicos em células meristemáticas de *Lacuta sativa* L. expostas a diferentes concentrações do fungicida Captan®. **a.** C-metáfase; **b.** Cromossomos pegajosos; **c.** Anáfase multipolar; **d.** Micronúcleos; **e.** Ponte anafásica; **f.** Intérfase. Barras: 5 µm.

As pontes cromossômicas são decorrentes da aderência e uma subsequente falha na separação dos cromossomos na anáfase, e uma vez aderidas as cromátides, estas continuam unidas na anáfase, e quando separadas se rompem podendo levar a formação de micronúcleos (MARCANO et al., 2004).

Essas e outras alterações cromossômicas e nucleares são prejudiciais às células e podem fazer com que as mesmas entrem em processo de morte celular (PALMIERI et al., 2014).

4 CONCLUSÕES

O uso isolado de NaClO não é eficiente na desinfestação de sementes de braúna. O fungicida Captan® a 2% p. a. por 10 minutos, com a manutenção do seu resíduo, promove resultados superiores de germinação e vigor, resultando na maior e menor formação de plântulas normais e anormais, respectivamente. O captana apresenta alto poder fitotóxico, citotóxico e genotóxico e seu mecanismo de ação no ciclo celular de *Lactuca sativa* é clastogênico e aneugênico, o que sugere a formação de plântulas anormais em *M. brauna*.

5 REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. P.; BECKERMAN, J. L. Incorporating adjuvants with Captan to manage common apple diseases. **Plant disease**, v. 102, n. 1, p. 231-236, 2018.

ARCE, G. T. et al. Genetic toxicology of folpet and Captan. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 6, p. 546-574, 2010.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 226, n. 1, p. 1-11, 2015.

BEVILACQUA, C. B. et al. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 761-766, 2011.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research Reviews in Mutat Research**, v. 543, p. 251-272, 2003.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia*

impetiginosa): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BRUNETTI, R. et al. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology Progress Series**, v. 44, n. 1, p. 65-68, 1988.

CARNEIRO, M. F. et al. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n. 1, p. 29-35, 2000.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Revista Árvore**, v. 31, p. 717-730, 2007.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1281-1287. 2005.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FUNKE, T. et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p.13010-13015, 2006.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Funpec. São Paulo, 131 p. 2002.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.13, n.1, p. 66-74, 2010.

INGRAM, P. R. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects *in vitro*, in mammalian and in microbial cells. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 410, n. 1, p. 121-133, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE (IBAMA). 2018. Lista oficial de flora ameaçada de extinção. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/flora>>. Acesso em: 04 mai. 2018.

KOLLER, W. A two-phase resistance response to *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 537-544, 2005.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1, p. 613-621, 2011.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LLOYD, G. McCOW, B. Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society**, v. 30, n. 1, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 6nd ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014, 384 p.

MARCANO, L. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221-226, 2004.

MURAT, D.; BYRNE, M.; KOMEILI, A. Cell biology of prokaryotic organelles. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. 1-18, 2010.

PALMIERI, M. J. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, n. 1, p. 30-35, 2014.

SCARIOT, F. J. et al. Necrotic and apoptotic cell death induced by captan on *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 159, 2017.

SHISHKOVA, S.; ROST, T. L.; DUBROVSKY, J. G. Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. **Annals Botany**, v. 101, n. 3, p. 319-340, 2008.

SISLER, H. D. Effect of fungicides on protein and nucleic acid synthesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 7, n. 1, p. 311-330, 1969.

SOUZA, L. F. B. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal Environment Studies**, v. 67, n. 6, p. 871-877, 2010.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z. et al. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 284-291, 2002.

WAGNER, P. et al. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. **Journal Experimental Botany**, v. 54, n. 385, p. 1295-1303, 2003.

CAPÍTULO II: Morfogênese *in vitro* de *Melanoxylon brauna* Schott: responsividade de explantes à reguladores de crescimento por imersão permanente e temporária

Resumo

Melanoxylon brauna é propagada via sexuada, entretanto, a baixa produção de sementes viáveis é um problema na produção de mudas. A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa à produção de mudas em larga escala, entretanto são escassos os estudos com esta espécie. Objetivou-se estudar a morfogênese *in vitro* de explantes juvenis de braúna após indução à fitorreguladores. Três experimentos foram realizados: I. Proliferação de gemas axilares com os explantes ápice caulinar; segmento nodal com uma gema axilar; segmento nodal com duas gemas axilares e nó cotiledonar em BAP (0; 4,44; 8,88; 17,76 e 26,64 μM). Analisou-se: número e comprimento de brotos; porcentagem de explantes com brotação; porcentagem de calogênese e porcentagem de brotos por organogênese direta e indireta. II. Rizogênese *in vitro* de brotos com AIB, ANA e 2,4-D (0; 1; 2 e 3 mg L^{-1}); III. Rizogênese *in vitro* de brotos com imersão temporária em AIB (0; 1000; 2000; 3000 e 4000 mg L^{-1}). Analisou-se: porcentagem de calogênese e rizogênese; número, comprimento e massa seca das raízes. O segmento nodal com duas gemas axilares foi mais responsivo na formação de brotações com BAP (8.88 μM). As concentrações auxínicas de AIB, ANA e 2,4-D não foram favoráveis à rizogênese. O AIB nas concentrações de 2544,81 e 2607,52 mg L^{-1} promoveram resultados superiores na rizogênese e emissão de brotos, respectivamente.

Palavras chave: braúna, cultura de tecidos, polaridade, citocinina, auxinas

ABSTRACT

Melanoxylon brauna is propagated sexually, however, the low production of viable seeds is a problem in the production of seedlings. Plant tissue culture is an alternative to large scale seedlings production, however, there are few studies with this species. The objective of this work was to study the *in vitro* morphogenesis of juvenile explants of braúna after induction to the phyto regulators. Three experiments were carried out: I. Proliferation of axillary buds with explants apex caulinar; nodal segment with axillary bud; nodal segment with two axillary buds and cotyledonary node in BAP (0; 4.44; 8.88; 17.76 and 26.64 μM). It was analyzed: number and length of shoots; percentage of budding explants; percentage of calogenesis and percentage of shoots by direct and indirect organogenesis. II. *In vitro* rhizogenesis of shoots with IBA, ANA and 2,4-D (0; 1; 2 and 3 mg L^{-1}); III. *In vitro* rhizogenesis of shoots with temporary immersion in IBA (0; 1000; 2000; 3000 and 4000 mg L^{-1}). The percentage of calogenesis and rhizogenesis was analyzed; number, length and dry mass of the roots. The nodal segment with two axillary buds was more responsive in BAP sprout formation (8.88 μM). The auxin concentrations of IBA, ANA and 2,4-D were not favorable for rhizogenesis. The IBA at concentrations of 2544.81 and 2607.52 mg L^{-1} promoted superior results in rhizogenesis and shoot emission, respectively.

Key words: braúna, tissue culture, polarity, cytokinin, auxins.

1 INTRODUÇÃO

A braúna (*Melanoxylon brauna* Schott), uma Fabaceae arbórea nativa brasileira, é comumente propagada via sexuada, entretanto, suas sementes são muito atrativas à insetos, e a baixa produção de sementes viáveis tem se tornado um entrave para a produção de mudas (CORTE et al., 2010). A propagação *in vitro* de braúna é uma alternativa à produção de mudas em larga escala e de alta qualidade nutricional, fisiológica e sanitária, além da manutenção de bancos de germoplasma, o que contribui para que a espécie saia do atual cenário de risco de extinção.

A cultura de tecidos vegetais permite produzir, num curto espaço de tempo, grande quantidade de mudas provenientes de um único explante, e tem sido empregada na propagação de diversas espécies florestais (XAVIER, 2007). O princípio básico da propagação *in vitro* é a totipotência celular, a qual, as células vegetais possuem a capacidade morfogênica de formar um novo organismo completo (STEWART, 1983). A morfogênese se divide na formação de parte aérea e sistema radicular (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Vários fatores influenciam o sucesso das vias morfogênicas *in vitro*, principalmente os fatores intrínsecos, a exemplo do genótipo, do tipo de explante (segmento de epicótilo ou hipocótilo, segmento internodal, ápice caulinar, nó cotiledonar, cotilédones e folhas), idade e tamanho do explante. Os reguladores vegetais, tanto qualitativa quanto quantitativamente, são os principais fatores extrínsecos que determinam o sucesso da indução morfogênica, com destaque para as citocininas e auxinas (MOREIRA-DIAS et al., 2001; MAGYAR-TÁBORI et al., 2010; LEE; PIJUT, 2017).

A resposta morfogênica está fortemente relacionada com a posição do explante na planta, e se diferencia quanto a polaridade, uma vez quanto mais próximos ao nó cotiledonar, melhor é a capacidade na emissão de brotos do explante (GARCIA-LUIZ, 1999; MOREIRA-DIAS et al., 2001). As diferentes responsabilidades dos explantes em relação à posição na planta, estão ligadas aos níveis hormonais endógenos, de forma que explantes mais distantes dos centros de síntese de auxina sofrem menor influência desta, por isso apresentam melhor resposta na formação de brotos (LONG; BARTON, 2000).

A citocinina mais utilizada na propagação *in vitro* é a 6-benzilaminopurina (BAP), que apresenta as vantagens de baixo custo e eficiência na multiplicação

de parte aérea e indução de brotações adventícias, e sua concentração é o fator principal na emissão de brotos (BRUM et al., 2002; KOECH et al., 2005). A organogênese ocorre de forma direta ou indireta, onde a proliferação de brotações originam diretamente do explante ou a partir de tecidos não diferenciados, respectivamente.

As substâncias responsáveis pela rizogênese são as auxinas, e um grande avanço na história da propagação vegetativa foi a descoberta do ácido indolacético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) e do ácido naftalenoacético (ANA), que proporcionam maior porcentagem, qualidade, velocidade e uniformidade da rizogênese (HARTMANN; KESTER; GENEVE, 2002).

São escassos os estudos voltados para a propagação *in vitro* de *M. brauna*, nessa perspectiva, objetivou-se estudar a morfogênese de explantes juvenis de braúna após indução à reguladores de crescimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I: PROLIFERAÇÃO DE GEMAS AXILARES *IN VITRO* DE EXPLANTES JUVENIS DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

A fonte de explantes para a proliferação de gemas foram plântulas axênicas normais de *M. brauna* cultivadas *in vitro* por 30 dias após a germinação das sementes. Para a produção das plântulas, as sementes de braúna foram previamente lavadas em água corrente e detergente neutro, e, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas em álcool 70% por um minuto, e em NaClO a 2.5% de cloro ativo durante 15 minutos.

Posteriormente, os resíduos destes produtos foram removidos por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram submersas em Captan® a 2 % p.a. durante 10 minutos. Após a imersão no Captan®, as sementes foram colocadas diretamente nos tubos de ensaio, sem a retirada do resíduo. Os tubos de ensaio continham 10 mL WPM (Woody Plant Medium) Sigma® (2,41 g L⁻¹) (LLOYD; McCOW, 1980), sacarose Dinâmica® (30 g L⁻¹), mio-inositol Sigma® (0,1 mg L⁻¹), ágar Kasvi® (7 g L⁻¹), cujo pH foi ajustado para 5.7±0.1 e em seguida autoclavado por 20 minutos à

temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm. As sementes *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento por 30 dias, sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, com irradiância de $90\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ promovido por lâmpadas de LED tubular 20W que emitem os comprimentos de onda no espectro do visível (Figura 1).

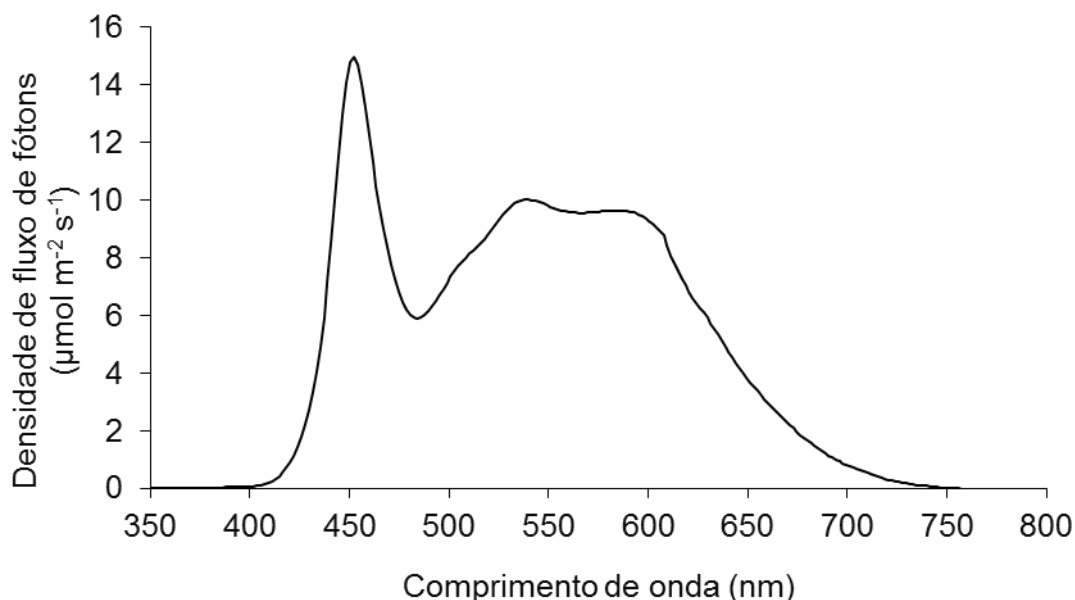


Figura 1. Espectro da radiação das lâmpadas utilizadas na sala de crescimento.

As plântulas axênicas normais foram seccionadas, com o auxílio de lâminas de bisturi estéril, em diferentes posições do epicótilo. Os explantes excisados foram: ápice caulinar; segmento nodal com uma gema axilar; segmento nodal com duas gemas axilares e nó cotiledonar (Figura 3d).

Após o seccionamento, os explantes foram inseridos em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura autoclavado durante 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm, constituído de $2,41\ \text{g L}^{-1}$ WPM (Woody Plant Medium) (Sigma®) suplementado com $30\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose (Dinâmica®), $0,1\ \text{g L}^{-1}$ de mio-inositol (Sigma®), $7\ \text{g L}^{-1}$ de ágar (Kasvi®) e 6-benzilaminopurina (BAP) (Sigma®) nas concentrações de 0; 4,44; 8,88; 17,76 e $26,64\ \mu\text{M}$ e o pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7\pm0,1$. Os explantes foram mantidos durante 60 dias em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, com o fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $90\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (Figura 1).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x5, com quatro tipos de explantes e cinco concentrações de BAP. As características analisadas foram o número de brotos, comprimento de brotos (cm), explantes com brotação (%), calogênese (%) e número de brotos por organogênese direta e indireta. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p \leq 0,5$) para o fator explante e análise de regressão para o fator BAP utilizando o software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

Experimento II: RIZOGÊNESE *IN VITRO* DE BROTOS DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT COM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES AUXÍNICAS

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, com três tipos de auxinas (AIB - Ácido indol-3-butírico; ANA - Ácido naftalenoacético e 2,4-D - Ácido diclorofenoxiacético) nas concentrações de 0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹, com seis repetições de quatro brotos cada. O meio de cultura utilizado foi constituído de 2,41 g L⁻¹ WPM (Woody Plant Medium) (Sigma®) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma®), 7 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®), pH ajustado para 5,7±0,1 e autoclavado durante 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm.

As auxinas foram filtradas e adicionadas ao meio de cultura, já autoclavado, em erlenmeyer individualizados para cada auxina e concentração. Após a adição das auxinas, 30 mL do meio de cultura foi vertido para frascos de vidro de capacidade de 350 mL, que foram vedados com papel alumínio e filme de PVC. Os frascos foram mantidos na sala de crescimento no escuro durante cinco dias para evitar a fotodegradação auxínica e permitir a absorção pelos explantes, bem como para confirmar se não houve contaminação dos mesmos. Os brotos de *M. brauna* de aproximadamente um centímetro de comprimento provenientes da proliferação de gemas foram inseridos nos frascos com o meio de cultura. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 27±2 °C, durante 10 dias na ausência de luz e após esse tempo os frascos foram mantidos por mais 60 dias sob fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 90 µmol m⁻² s⁻¹ (Figura 1).

As características analisadas foram: calogênese (%) e rizogênese (%). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p \leq 0,5$) para o fator auxina e análise de regressão para o fator concentração utilizando o software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

Experimento III: RIZOGÊNESE *IN VITRO* DE BROTO DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT SOB IMERSÃO TEMPORÁRIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco concentrações de AIB (0; 1000; 2000; 3000 e 4000 mg L⁻¹) e quatro repetições de seis brotos cada.

A base dos brotos provenientes da proliferação de gemas foi imersa durante 10 segundos em cada concentração de AIB, e em seguida foram inseridos em tubos de ensaio contendo 1/3 do volume do tubo de vermiculita autoclavada (durante 30 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm) e hidratada.

Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias sob temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 90 µmol m⁻² s⁻¹ (Figura 1).

As características analisadas foram: enraizamento (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm) e massa seca das raízes (mg). Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão ($p \leq 0,1$) utilizando o software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: PROLIFERAÇÃO DE GEMAS AXILARES *IN VITRO* DE EXPLANTES JUVENIS DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

Para as variáveis número de brotos, explantes com brotação (%) e brotos por organogênese direta (%), não houve interação entre os fatores tipos de explantes e concentrações de BAP (Tabelas 1).

Houve interação significativa entre os fatores explantes e concentrações de BAP, para as características calogênese (%), número de brotos por explante e comprimento de brotos (mm) (Tabela 4). Nas variáveis com interação significativa, a análise de regressão para o fator concentração de BAP dentro de cada tipo de explante foi impossibilitada não havendo ajuste de modelos. Portanto, optou-se pela comparação das médias do fator concentração de BAP também pelo teste de Tukey.

No segmento axilar com duas gemas o comprimento dos brotos nas concentrações 4,44 e 8,88 μ M foi superior e não diferenciou estatisticamente entre si, apresentando em média 12,3 e 8,7 mm de altura, respectivamente.

Tabela 1. Análise de variância dos fatores tipos de explantes e concentração de BAP na organogênese de parte aérea de *M. brauna*

GL	Explante	BAP	Explante*BAP	Resíduo	CV (%)
	3	4	P	60	
Número de brotos	11,77**	4,32**	0,27 ^{ns}	0,21	27,35
Brotos (mm)	0,21**	0,27**	0,12*	0,05	34,26
Explantes com brotação (%)	3762,70**	1765,60**	305,00 ^{ns}	339,1	23,2
Calogênese (%)	2809,00**	7574,70**	1139,50*	496,50	40,06
Brotação organogênese direta ⁻¹ (%)	2973,08**	3116,93**	835,99 ^{ns}	500,98	29,2
Brotação organogênese indireta ⁻¹ (%)	2354,70**	4096,60**	834,30*	376,00	87,76

Abreviações: BAP. 6-benzilaminopurina; CV. Coeficiente de variação; GL. Grau de liberdade. *, **Signifiativo a 5 e 1%, respectivamente. ^{ns}Não significativo a 5% pelo teste F.

O segmento nodal com duas gemas axilares foi o explante que apresentou a maior atividade morfogenética, observado na variável número de brotos (2,7) (Tabela 2). Neste explante, 92%, ou seja, 2,48 dos brotos foram emitidos por organogênese direta (Figura 3e).

As diferentes respostas na emissão de brotos estão relacionadas ao posicionamento dos explantes, uma vez que, quanto mais distante do nó cotiledonar menor é a capacidade organogênica do explante (MOREIRA-DIAS et al., 2001) que pode estar relacionada ao nível endógeno de citocinina na plântula (SCHINOR et al., 2006). Entretanto, os resultados obtidos neste

estudo, mostraram que a responsividade dos explante foram, em ordem decrescente, segmento axilar com duas gemas, nó cotiledonar, segmento axilar com uma gema e ápice caulinar.

Tabela 2. Brotações em explantes juvenis de *M. brauna*, independente das concentrações de BAP utilizadas

Explantes	Número de brotos	Explantes com brotação (%)	Brotação organogênese direta ¹ (%)
Ápice caulinar	0,9c ⁽¹⁾	63c	66b
Segmento axilar com uma gema	1,3c	76bc	81ab
Segmento axilar com duas gemas	2,7a	95a	92a
Nó cotiledonar	1,9b	84ab	68b

⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,5).

Observa-se que independente do tipo de explante, a média do número dos brotos e a porcentagem de explantes com brotação foi superior nas concentrações de 4,44 e 8,88 μ M de BAP. Entretanto, a porcentagem de brotos emitidos por organogênese direta foi superior na ausência de BAP (Tabela 3). Mesmo na ausência do BAP os explantes expressaram capacidade organogênica direta, com média de 0,79 brotos por explante. Esse resultado sugere que os explantes juvenis possuem níveis endógenos de citocinina suficientes para induzir a brotação. Na presença do BAP, houve aumento do número de brotos por organogênese direta em consequência provavelmente do somatório dos níveis endógenos e exógenos desta citocinina.

Tabela 3. Brotações em explantes juvenis de *M. brauna*, induzidas em diferentes concentrações de BAP independente dos explantes utilizados

BAP (μ M)	Número de brotos	Explantes com brotação (%)	Brotação organogênese direta ¹ (%)
0	0,79b	64b	94a
4,44	2,05a	92a	71ab
8,88	2,05a	84a	56b
17,76	1,79a	81ab	84a
26,64	1,70a	76ab	78ab

⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,5).

Os fitorreguladores adicionados ao meio de cultura são prontamente transportados para a extremidade apical do explante, independente do seu tipo e da posição que é colocado no meio de cultura (GARCIA-LUIS et al., 1999).

As axilas das folhas possuem centros ativos, com o mesmo potencial na formação de brotações que o meristema apical, entretanto, a retomada da atividade destes centros ocorre em ordem acrópeta, ou seja, da região mais próxima do nó cotiledonar para a região mais distante (LONG; BARTON, 2000). Acredita-se que a formação acropetal das brotações, se deve à movimentação da auxina que é produzida no meristema apical e é transportada para as raízes.

Tabela 4. Indução e crescimento de brotos de *M. brauna* por meio da organogênese de diferentes explantes e concentrações de BAP

Explantes	BAP (μ M)				
	0	4,44	8,88	17,76	26,64
Calogênese (%)					
Ápice caulinar	16,67bB ⁽¹⁾	79,17aA	79,17abAB	25aB	20,83bB
Segmento axilar com 1 gema	37,5abBC	87,5aA	79,17abAB	50aABC	29,17bC
Segmento axilar com 2 gemas	62,5aAB	95,83aA	100aA	50aB	50abB
Nó cotiledonar	25abB	58,33aAB	54,17bAB	33,33aB	79,17aA
Médias	35,42	80,21	78,13	39,58	44,79
Brotos organogênese indireta ¹ (%)					
Ápice caulinar	0aB	55,81aA	52,5abA	26,67aAB	12,5bB
Segmento axilar com 1 gema	0aB	27,92abAB	47,1abA	14,58aAB	6,25bB
Segmento axilar com 2 gemas	0aA	9,05bA	17,22bA	2,78aA	11,09bA
Nó cotiledonar	0aB	21,09abAB	57,55aA	21,28aAB	58,5aA
Médias	0	28,46	43,59	16,32	22,08
Brotos (mm)					
Ápice caulinar	1,7bB	6,1bAB	6,7aA	7,8aA	4,1aAB
Segmento axilar com 1 gema	5,8abA	7,8bA	7,6aA	5,8aA	5,6aA
Segmento axilar com 2 gemas	5,8abB	12,3aA	8,7aAB	5,8aB	6,4aB
Nó cotiledonar	6,1aA	5,3bA	6,8aA	7,7aA	5,6aA
Médias	4,8	7,8	7,4	6,7	5,4

⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical entre os diferentes tipos de explante e maiúscula na horizontal entre as diferentes concentrações de BAP não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,5$).

O mecanismo de ação da auxina sobre o bloqueio do desenvolvimento das gemas axilares não é totalmente elucidado, mas sabe-se que a inibição se dá

indiretamente (BOOKER et al., 2003). Diferentemente das auxinas, as citocininas estão ligadas diretamente no desenvolvimento das gemas axilares por meio de estímulos à divisão, expansão e diferenciação celular (DELLO-IOIO et al., 2008).

A formação de calo na organogênese é um processo muito importante para a formação indireta de plantas. O calo surge com o crescimento desordenado das células, e possuem centros ativos de divisão celular, esses centros, em alguns casos são capacitados ou, em condições adequadas, se capacitam para a produção de órgãos, e as células competentes, que são capazes de responder a determinados estímulos, se diferenciam e formam brotos ou raízes (GEORGE, 2008). Por outro lado, a obtenção de brotos por organogênese direta, não passa pela formação de calo e o broto surge diretamente do explante (Figura 3f) reduzindo o tempo para a formação das brotações.

A partir de uma plântula de braúna *in vitro* de 30 dias de idade é possível extrair um segmento nodal com duas gemas axilares, em média três segmentos nodais com uma gema axilar, um nó cotiledonar e um ápice caulinar (Figura 3d). Portanto, a taxa de multiplicação a partir de uma plântula, para os explantes: Ápice caulinar é de 0,9 brotos plântula⁻¹ (0,9 brotos x 1 ápice caulinar); Segmento axilar com uma gema é de 3,9 brotos plântula⁻¹ (1,3 brotos x 3 segmentos); Segmento axilar com duas gemas é de 2,7 brotos plântula⁻¹ (2,7 brotos x 1 segmento); e Nó cotiledonar é de 1,9 brotos plântula⁻¹ (1,9 brotos x 1 nó cotiledonar). A capacidade organogênica de uma plântula de braúna é de 9.4 brotos, que darão origem a novas mudas desta espécie.

Apesar de ocorrer calogênese na ausência do BAP, os brotos emitidos foram por organogênese direta. Entretanto, em média, apenas 27,11% dos brotos foram oriundos do calo, ou seja, a maioria dos brotos lançados foram por organogênese direta.

Experimento II: RIZOGÊNESE *IN VITRO* DE BROTOS DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT COM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES AUXÍNICAS

A interação entre as auxinas e as concentrações não foram significativas na análise de variância ($p > 0,05$). As auxinas e as concentrações testadas no presente estudo foram favoráveis somente à calogênese e não promoveram a rizogênese dos brotos de braúna (Tabela 5).

Tabela 5. Calogênese e rizogênese de brotos de *Melanoxylon brauna* em diferentes tipos e concentrações auxínicas

[] (mg L ⁻¹)	AIB		ANA		2,4-D	
	Calogênese (%)	Rizogênese (%)	Calogênese (%)	Rizogênese (%)	Calogênese (%)	Rizogênese (%)
0	100	0	100	0	100	0
1	100	0	35	5	60	10
2	100	0	40	0	75	6,25
3	100	0	81,25	0	75	10



Abreviações: []. Concentrações; AIB. Ácido indol-3-butírico; ANA. Ácido naftalenoacético; 2,4-D. Ácido diclorofenoxiacético. Barra: 1 cm.

As raízes adventícias se formam em respostas à vários estímulos, como ferimentos, estresse ou reguladores de crescimento, e podem se desenvolver a partir de vários tecidos e células, e normalmente emergem de órgãos como folhas e caules (DRUEGE et al., 2016). A indução da rizogênese caracteriza-se pela reprogramação das células-alvo para células meristemáticas, os meristemóides de raiz, que sofrem sucessivas divisões celulares até a formação dos meristemas radiculares internos. Após a fase de indução, ocorre a iniciação, na qual os primórdios radiculares são formados e se desenvolvem até a emergência radicular (COSTA et al., 2013; GUAN et al., 2015).

Marcadores bioquímicos da rizogênese adventícia, na espécie *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. identificaram que a atividade da peroxidase (POX) durante a fase de indução é muito maior em meio suplementado com AIB (1 µM)

(GOEL et al., 2018). Esta enzima interage com fenóis na indução rizogênica (LEE et al., 1982). Goel et al. (2018) observaram menores atividades das enzimas polifenoloxidase (PPO), ascorbato peroxidase (APx) e ácido indol-acético oxidase (AIAO) nas fases de indução. A explicação para as enzimas PPO e a APx é que exigem maior quantidade de compostos monofenólicos, que interagem com auxinas na indução rizogênica. Segundo Hartmann; Kester; Geneve (2002) os níveis mais altos de AIAO são verificados durante as fases posteriores da rizogênese já que estão provavelmente envolvidos com a oxidação e inativação auxínica.

As auxinas AIB, ANA e 2,4-D nas concentrações de 1; 2 e 3 mg L⁻¹ foram muito baixas, a ponto de não conseguirem induzir a reprogramação das células do caule. Além da ineficiência das auxinas nestas concentrações, o não enraizamento e a alta calogênese dos brotos de *M. brauna* também pode estar associado ao baixo nível endógeno de AIA e ao possível desbalanço hormonal promovido pelo BAP absorvido no processo que antecedeu a rizogênese. Acredita-se que as concentrações residuais de citocinina nos tecidos vegetais provenientes do processo organogênico em meio suplementado com BAP interagiram com as auxinas e as células não conseguiram atingir a competência necessária, ou seja, o desbalanço entre auxina e citocinina (SKOOG; MILLER, 1957) inibiram as células de seguirem a rota da rizogênese. A reduzida eficiência das auxinas ANA e AIB nas concentrações 0; 1; 2; 3 e 4 mg L⁻¹ foi relatada por Soares et al. (2007) ao submeterem brotações obtidas *in vitro* a partir de explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Os autores sugeriram que a resposta negativa obtida na rizogênese foi devido provavelmente à baixa eficiência das auxinas nas concentrações testadas aliada à reduzidos níveis endógenos da auxina AIA, que é o hormônio natural responsável pela rizogênese.

Experimento III: RIZOGÊNESE *IN VITRO* DE BROTOS DE *Melanoxylon brauna* SCHOTT SOB IMERSÃO TEMPORÁRIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB

Todas as variáveis analisadas apresentaram comportamento quadrático (Figura 3). Na ausência de AIB o enraizamento é muito baixo (5,71%) (Figura

3h). A máxima eficiência técnica (MET) foi obtida nas concentrações de 2544,81; 2607,52; 2283,33 e 2300,47 mg L⁻¹ que proporcionaram, respectivamente, o maior enraizamento (92,42%); o maior número de raízes (1,52); o maior comprimento de raízes (17,29 mm) e a maior massa seca de raízes (9,162 mg).

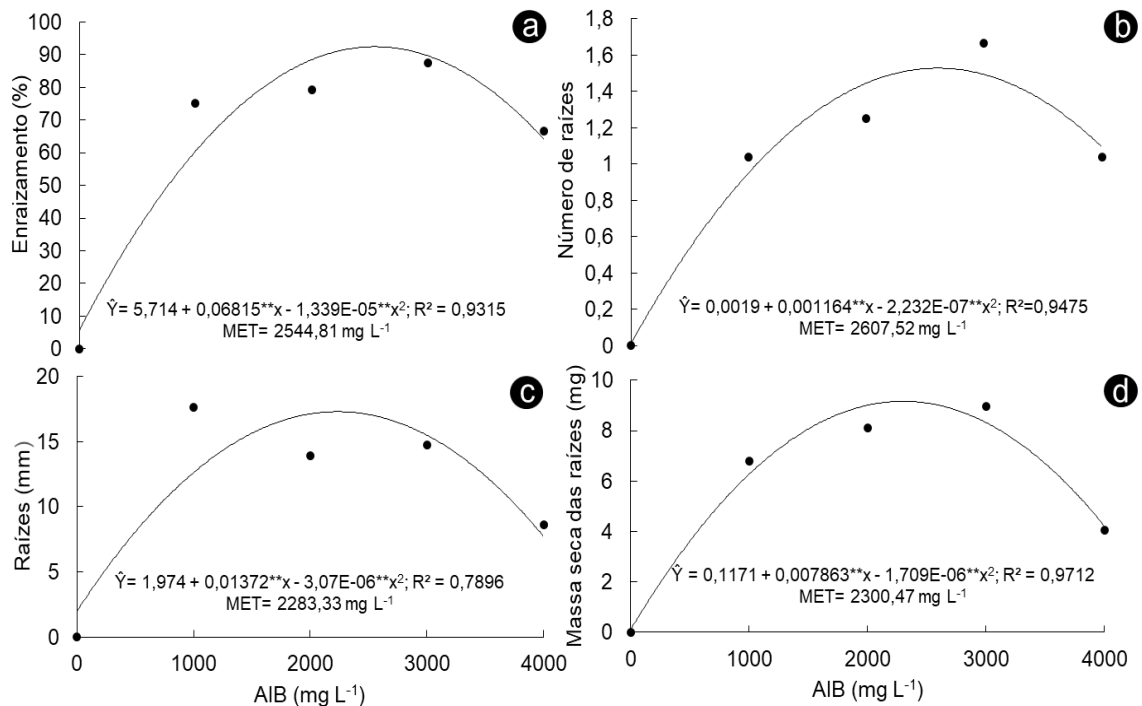


Figura 2. Rizogênese *in vitro* de brotos de *M. brauna* em diferentes concentrações de AIB. **a.** Enraizamento (%); **b.** Número de raízes; **c.** Comprimento radicular (mm); **d.** Massa seca das raízes (mg). Abreviações: AIB. Ácido indol-3-butírico; MET. Máxima eficiência técnica.

A auxina é o principal hormônio vegetal responsável pela rizogênese adventícia, requerido em altas concentrações na fase de indução, ou seja, na formação dos meristemóides da raiz, e após essa fase, o requerimento de auxina decresce e passa a atuar no alongamento celular, permitindo que a raiz cresça em espessura e comprimento. Na fase de indução, a auxina atua como estimulador da rizogênese adventícia, necessitando de altas concentrações deste regulador de crescimento, entretanto, nas fases subsequentes, altas concentrações de auxina podem inibir o crescimento e as raízes não se desenvolvem (VERSTRAETEN et al., 2014).

A exposição dos brotos à altas concentrações de AIB (1000; 2000; 3000 e 4000 mg L⁻¹) por um curto tempo, contribuiu para que as células do caule fossem reprogramadas para formar os meristemóides de raiz, e consequentemente iniciar o processo de rizogênese. E na fase de alongamento, acredita-se que os brotos já absorveram toda auxina necessária e o meio de cultivo, neste caso, a vermiculita, encontra-se em condições físicas adequadas (densidade e porosidade) para o crescimento radicular.



Figura 3. *M. brauna*. **a.** Árvore adulta. **b.** Frutos. **c.** Sementes maduras. **d.** Plântula cultivada *in vitro* com 30 dias após a germinação: **I.** Ápice caulinar; **II.** Segmento nodal com uma gema axilar; **III.** Segmento nodal com duas gemas axilares. **IV.** Nó cotiledonar. Setas: 1. segmento nodal com uma gema axilar; 2. segmento nodal com duas gemas axilares; 3. nó cotiledonar; 4. ápice caulinar. **e.** Proliferação de gemas por organogênese direta. **f.** Proliferação de gemas por organogênese indireta. **g.** Broto em vermiculita para enraizamento.

Rizogênese com imersão temporária de brotos na concentração de 0 **(h)**; 1000 **(i)**; 2000 **(j)**; 3000 **(k)** e 4000 **(l)** mg L⁻¹ de AIB. Barras: **a.** 1 m; **b.** 2 cm; **c.** 5 cm; **d-l.** 1 cm.

O número de raízes emitidas na concentração de 3000 mg L⁻¹ (AIB) foi superior (Figura 2b), entretanto, nessa concentração, o comprimento das raízes foi inferior à concentração de 2000 mg L⁻¹ (AIB) (Figura 2c). Ou seja, na concentração de 3000 mg L⁻¹ (AIB), houve maior formação de raízes, porém, as mesmas apresentaram menor comprimento. Estes resultados podem ser visualizados nas figuras 3j e 3k.

4 CONCLUSÕES

O segmento nodal com duas gemas axilares foi o explante mais responsivo com a concentração de 8,88 µM de BAP na proliferação de gemas. As concentrações testadas das auxinas AIB, ANA e 2,4-D não foram suficientes à rizogênese. O AIB nas concentrações de 2544,81 e 2607,52 mg L⁻¹ promoveram resultados superiores na rizogênese e emissão de brotos, respectivamente.

5 REFERÊNCIAS

BOOKER, J.; CHATFIELD, S.; LEYSER, O. Auxin acts in xylem- associated or medullary cells to mediate apical dominance. **The Plant Cell**, v. 15, n. 1, p. 495-507, 2003.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na proliferação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 2002, p. 1403-1409, 2002.

CORTE, V. B. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

COSTA, C. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 133, 2013.

DELLO-IOIO, R. et al. Cytokinins determine Arabidopsis root meristem size by controlling cell differentiation. **Current Biology**, v.17, n. 8, p. 678-682, 2007.

DRUEGE, U.; FRANKEN, P.; HAJIREZAEI, M. R. Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 381, 2016.

GARCIA-LUIS, A. et al. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals Botany**, v. 84, n. 6, p. 715-723, 1999.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. P. **Plant propagation by tissue culture**. Part I. England: Exegetics. 386 p. 1984.

GOEL, A.; KAUR, A.; KUMAR, A. Biochemical and histological changes during *in vitro* rooting of microcuttings of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 64, p. 1-12, 2018.

GUAN, L. et al. Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. **Criticals Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 5, p. 506-521, 2015.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. J. F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall. 770 p. 2002.

KOECH, A. A.; ISUTSA, D. K.; WU, Q. Explants, hormones and sucrose influence *in vitro* shoot regeneration and rooting of calla lily (*Zantedeschia albomaculata* L. Spreng.) 'Black Magic'. **Journal of Agriculture, Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 53-66, 2005.

LEE, T. T.; STARRAT, A. N.; JEVNIKAR, J. J. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: structure-activity relationship. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 517-523, 1982.

LEE, J. M.; PIJUT, P. M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of *Fraxinus nigra*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 130, p. 335-343, 2017.

LONG, J.; BARTON, M. K. Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. **Developmental Biology**, v. 218, p. 341-353, 2000.

MAGYAR-TÁBORI, K. et al. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 101, p. 251-267, 2010.

MOREIRA-DIAS, J. M. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Science Horticulturae**, v. 87, n. 4, p. 275-290, 2001.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing, version 3.2.4. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

SCHINOR, E. H. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 463-466, 2006.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. In: Biological Action of Growth Substances. **Symposium of Society Experimental Biology**, v. 11, n. 1, p. 118-131, 1957.

SOARES, F. P. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1048-1053, 2007.

VERSTRAETEN, I.; SCHOTTE, S.; GEELEN, D. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 1, p. 495, 2014.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: UFV. 279 p. 2013.