



GERMINAÇÃO E BALANÇO HORMONAL *in vitro* DE *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl.

GERMINATION AND HORMONAL BALANCE In vitro OF Astronium urundeuva (M. Allemão) Engl.

GERMINACIÓN Y EQUILIBRIO HORMONAL in vitro DE Astronium urundeuva (M. Allemão) Engl.

Leonardo Máximo Silva ¹, Leandro Silva de Oliveira ², Ariane da Silva Nogueira ³, Nayara dos Santos de Souza ⁴, Nicole Vieira Jorge ⁵, Glenda Araújo de Souza Honorato ⁶, & Leovandes Soares da Silva ⁷

^{1 2 3 4 5 6 7} Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

¹leomaxsylv4@hotmail.com ²leandroengflor@gmail.com ³ariane.silva.nogueira@hotmail.com ⁴souzass.nayara@gmail.com
⁵nicolevieira.engflorestal@gmail.com ⁶glenda_1_ash@hotmail.com ⁷leosoares.ef@gmail.com

ARTIGO INFO.

Recebido: 02.04.2023

Aprovado: 15.05.2023

Disponibilizado: 30.05.2023

PALAVRAS-CHAVES Aroeira do sertão; Micropropagação; regulador de crescimento.

KEYWORDS: Aroeira do sertão; Micropropagation; Plant growth regulator.

PALABRAS CLAVE: Aroeira do sertão; Micropropagacion; Regulador de crecimiento.

*Autor Correspondente: Silva, L. M.

RESUMO

Aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*) apresenta aplicabilidade para fins terapêuticos devido às suas características farmacológicas e para uso madeireiro em razão da sua resistência e com grande durabilidade. Isso acarretou a intensa exploração da espécie, levando-a a ser incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção. Em decorrência desta situação, a micropropagação é tida como ferramenta em potencial para a propagação e conservação *in vitro* da espécie. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e o efeito de diferentes concentrações de ANA associada com TDZ e BAP na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*. Segmentos nodais, obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, foram utilizados como explantes. Os mesmos foram inoculados no meio de cultura MS50%, suplementado com as seguintes concentrações de ANA (0,0; 0,025 e 0,050 mg.L-1) associadas com TDZ (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L-1) e BAP (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L-1). Transcorridos 31 dias, foi avaliado o vigor dos explantes, calejamento e número de brotações. O percentual de germinação *in vitro* das sementes de *A. urundeuva* foi de 61%, demonstrando a viabilidade da técnica para iniciar a micropropagação. O maior vigor dos explantes foi obtido no meio de cultura suplementado somente com BAP, por sua vez, o TDZ induziu distúrbios fisiológicos nos explantes, como intenso calejamento e posterior necrose dos tecidos. Os resultados obtidos indicam a necessidade de maiores estudos em razão do balanço hormonal auxina/citocinas não foi favorável para a multiplicação *in vitro* da espécie.

ABSTRACT

Aroeira-do-sertão (Astronium urundeuva) has applicability for therapeutic purposes due to its pharmacological characteristics and the wood used due to its resistance and excellent durability. Due to the intense exploitation, it is included on the endangered species list. A micro propagation

is a potential tool for in vitro propagation and species conservation. Therefore, this work aims to evaluate the germination and effect of different concentrations of ANA associated with TDZ and BAP on the in vitro multiplication of A. urundeuva. Explants were nodal segments obtained from seedlings germinated in vitro. They were inoculated in MS50% culture medium, supplemented with the concentrations of ANA (0.0; 0.025, and 0.050 mg. L-1), TDZ (0.0; 0.25; 0.50; 0.75, and 1.00 mg. L-1) and BAP (0.0; 0.25; 0.50; 0.75, and 1.00 mg. L-1). After 31 days, we evaluated the vigor of explants, calluses, and the number of sprouts. The in vitro germination of A. urundeuva seeds was 61%, demonstrating that micro propagation is a feasible technique to initiate. The explants supplemented only with BAP showed greater vigor. However, TDZ induced physiological disorders in the explants, such as intense callusities and subsequent tissue necrosis. The auxin/cytokine hormonal balance was not favorable for the in vitro multiplication of the species.

RESUMEN

Aroeira-do-sertão (Astronium urundeuva) tiene aplicabilidad para fines terapéuticos debido a sus características farmacológicas y para uso de madera debido a su resistencia y con gran durabilidad. Esto llevó a la intensa explotación de la especie, lo que la llevó a ser incluida en la lista de especies en peligro de extinción. Como resultado de esta situación, la micropropagación se considera una herramienta potencial para la propagación in vitro y la conservación de la especie. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la germinación e el efecto de diferentes concentraciones de ANA asociadas con TDZ y BAP en la multiplicación in vitro de A. urundeuva. Los segmentos nodales, obtenidos de plántulas germinadas in vitro, se utilizaron como explantes. Se inocularon en el medio de cultivo MS50%, suplementado con las siguientes concentraciones de ANA (0,0, 0,025 y 0,050 mg. L-1) asociado con TDZ (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg. L-1) y BAP (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg. L-1). Después de 31 días, se evaluó el vigor de los explantes, el calloso y el número de brotes. El porcentaje de germinación in vitro de semillas de A. urundeuva fue del 61%, demostrando la viabilidad de la técnica para iniciar la micropropagación. El mayor vigor de los explantes se obtuvo en el medio de cultivo suplementado sólo con BAP, a su vez, el TDZ indujo trastornos fisiológicos en los explantes, tales como calloring intenso y posterior necrosis de los tejidos. Los resultados obtenidos indican la necesidad de estudios adicionales debido a que el equilibrio hormonal auxina/citoquina no es favorable para la multiplicación in vitro de la especie.



1. INTRODUÇÃO

A flora vegetal do Cerrado é uma das maiores do mundo, possuindo mais de 6.000 espécies (Brasil, 2009). Além de possuir um alto grau de endemismo e ocupar mais de 23,3% do território brasileiro e 54% do estado de Minas Gerais (Biomass, 2019). O Cerrado é um domínio que presta uma variedade de Serviços Ecossistêmicos (SE), incluindo serviços culturais, provisórios e regulatórios (Joly et al., 2019). Apesar de sua importância, muitos de seus ecossistemas deram lugar à agricultura e pecuária extensiva, em detrimento de uma diversidade biológica até então desconhecida e não alterada (Brasil, 2015; Martinelli et al., 2014; Strassburg et al., 2017). A pressão sobre a flora do Cerrado fez com que diversos ecossistemas fossem alterados por áreas com pastagens degradadas, e muitas espécies nativas foram se extinguindo devido à exploração desordenada.

Tendo em vista o cenário atual, onde as preocupações com as mudanças climáticas são crescentes, o governo brasileiro assumiu um novo compromisso na Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas 2021 (COP26), que concluiu com o Acordo de Glasgow, no qual o país se comprometeu a restaurar e reflorestar 18 milhões de hectares de floresta até 2030 e restaurar 30 milhões de hectares de pastagens degradadas (Bichara et al., 2022). Com isso, estudo com espécies nativas vem sendo feitas a fim de auxiliar e cumprir essa meta proposta. Dentre as espécies em potenciais para recuperação e restauração do Cerrado, está a aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*).

A. urundeuva é uma espécie pertencente à família *Anacardiaceae* e endêmica de áreas de Cerrado, ocorrendo nas regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste, Sudeste e Sul (Silva-Luz & Pirani, 2016). Em virtude das suas características como a madeira de grande resistência mecânica, foi intensamente explorada e por esse motivo foi incluída na lista oficial de espécies brasileiras ameaçadas de extinção (Brasil, 2008). A espécie também possui grande potencial medicinal, e de acordo com Nobre-Junior et al. (2009) as chalconas, um flavonoide encontrado em *A. urundeuva* juntamente a outras terapias, podem proporcionar benefícios ao tratamento de pacientes com lesões neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Além disso, entre os tipos de méis comercializados no Brasil, o mel de aroeira, produzido na região do norte de Minas Gerais, tem sido bastante estudado e valorizado por suas características marcantes, como sua cor escura e sabor acentuado (Demier, 2018). Apesar dos múltiplos usos da espécie e do interesse econômico sobre a espécie, a exploração ainda ocorre de forma unicamente extrativista, comprometendo a conservação dos recursos genéticos e a sustentabilidade das cadeias produtivas (Vieira et al., 2016).

Nesse contexto, a recuperação e restauração das áreas degradadas, bem como a exploração silvicultural de *A. urundeuva* depende da obtenção de sementes e mudas. Atualmente, a propagação da espécie ocorre exclusivamente de forma seminal e o mercado não tem disponível a quantidade de mudas e nem a diversidade exigida pelas normas ambientais (Durigan et al., 2010). Diante disso, a busca por protocolos de estabelecimentos de sementes *in vitro* podem auxiliar na dificuldade da propagação natural da espécie.



O avanço no aprimoramento da propagação vegetativa pode facilitar a rápida multiplicação de genótipos de interesse, com a obtenção de mudas de qualidade e uniformes em quantidade suficiente para atender a demanda do mercado (Xavier & Silva, 2010). Diante das dificuldades encontradas na propagação sexuada da aroeira-do-sertão, uma alternativa para a obtenção de mudas da espécie encontra-se a micropropagação. As vantagens da micropropagação incluem a capacidade de produzir materiais livres de doenças em larga escala e por períodos de tempo mais curtos (Aitken-Christie et al., 1995; Arrigoni-Blank et al., 2011). Além disso, as técnicas de cultivo *in vitro* desempenham um papel crucial na manutenção e compartilhamento de germoplasma com genes de maior qualidade (Braun et al., 2010). O cultivo *in vitro* frequentemente emprega reguladores de crescimento com o objetivo de promover a proliferação das plantas.

Dentre os vários tipos de reguladores, destacam-se a classe das citocininas, que são utilizadas para promover o crescimento das plantas, estimulando a divisão celular, controlando a síntese de proteínas diretamente relacionadas à formação de fibras mitóticas e inibindo o crescimento dos sistemas aéreo e radicular, exemplos de reguladores dessa classe são o BAP (6-Benzilaminopurina) e o TDZ [thiadizurô (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiurêa)] (Castro et al., 2007). Outra classe importante é a das auxinas que apoiam a divisão, diferenciação e alongamento celular e estão correlacionados à dominância apical, tendo como exemplo o uso de ANA (ácido naftaleno acético), que tem auxiliado a produção *in vitro* de espécies florestais nativas.

O estabelecimento de material vegetativo maduro coletado de árvores matrizes adultas apresenta altos índices de contaminação fúngica e bacteriana, além da oxidação fenólica. Nesse sentido, uma alternativa viável tem sido o cultivo *in vitro* de plântulas obtidas a partir de sementes. O material propagativo de origem juvenil apresentar maior capacidade de resposta *in vitro* em razão do menor grau de diferenciação celular e maior vigor fisiológico (Stuepp et al., 2018). Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar: (1) a germinação *in vitro* de *Astronium urundeuva*, e; (2) a multiplicação de brotações de origem seminal sob diferentes concentrações de ANA em associação com BAP e TDZ a fim de estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação à espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

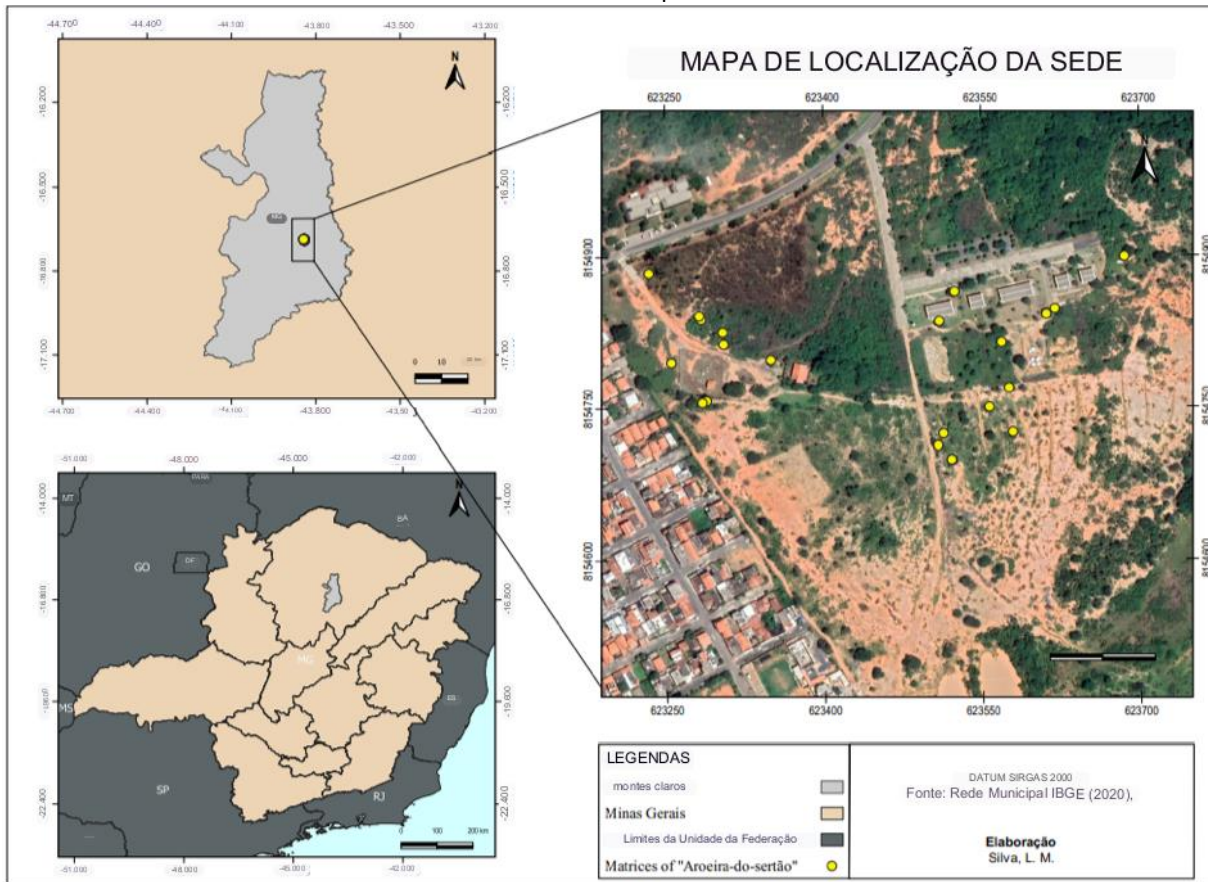
2.1. MATERIAL VEGETAL

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Melhoramento Florestal situado no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA) no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), localizado no município de Montes Claros, Minas Gerais. A coleta dos diásporos de *A. urundeuva* foi realizada no mês de setembro, a partir de 21 matrizes localizadas num fragmento de Cerrado localizado no município de Montes Claros/MG (latitude 16°40'59,7''S, longitude 43°50'21,9''W e altitude 680 m) (Figura 1). De acordo com a classificação climática Köppen (Alvares et al., 2013), a região é caracterizada por apresentar um clima seco tropical, com precipitação anual entre 1000 a 1300 mm, inverno seco e temperatura média de 23,1°C.



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal in vitro de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

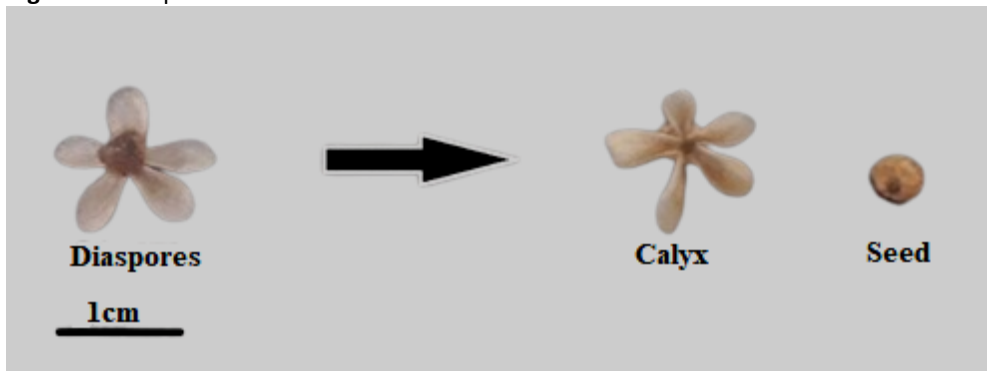
Figura 1 - Mapa de localização das matrizes de *A. urundeuva*, utilizadas neste estudo para a coleta dos diásporos.



Fonte: Autores (2022).

Os diásporos coletados foram encaminhados ao laboratório, para beneficiamento manual, que consistiu na remoção dos cálices dos diásporos e a seleção daqueles que não apresentavam visualmente fruto-semente vazios (ausência dos tecidos), danos físicos e/ou causados por insetos (Figura 2).

Figura 2 - Diásporos de *A. urundeuva* coletadas na cidade de Montes Claros - Minas Gerais.



Fonte: Autores (2022).

2.2. GERMINAÇÃO IN VITRO

Os diásporos selecionados foram colocados em água corrente por 10 minutos e, em seguida, foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0 - 2,5% (v/v) de cloro ativo por 15 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados com água deionizada e



autoclavada por três vezes e inoculados verticalmente em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 ml do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de sais, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8h (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2°C.

Na germinação de *A. urundeuva* foram realizadas 9 avaliações em um período de 31 dias após a inoculação. Durante as avaliações determinou-se o número protrusão radicular, número de plântulas e sementes não germinadas. A protrusão radicular foi definida como a emissão da radícula igual ou superior a 1 mm. As plântulas foram classificadas como aquelas que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e apresentaram todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas, completas, proporcionais e saudáveis. Já as sementes não germinadas corresponderam àquelas que apresentaram ausência do embrião ou algum tipo de dano.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, contendo 390 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 1 semente. Os dados mensurados foram analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade (P>0,05), respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão polinomial (P<0,05). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote ExpDes.pt do *softwares* estatístico RStudio®, versão 3.5.3.

2.3. MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*, as brotações foram obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro*. Para tanto, as sementes foram colocadas em água corrente por 10 minutos e, em seguida, foram imersas em uma solução de álcool (70%) por 30 segundos e em sequência em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,0 - 2,5% (v/v) de cloro ativo por 15 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguadas com água deionizada e autoclavada por três vezes e inoculadas em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 ml do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de sais, suplementado com sacarose (30 g/L), PVP (1,5 g/L) e ágar (6 g/L). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC biocide® (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8h (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2°C.

Transcorridos 25 dias, as plântulas germinadas *in vitro* foram excisadas para a retirada da raiz e a parte aérea sem o meristema apical foi utilizada como explante. As brotações foram inoculadas em meio de cultura em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 5,0 ml do meio de cultura MS com metade da concentração de sais, suplementado com diferentes



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal *in vitro* de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

concentrações de ANA associadas com BAP e TDZ (Tabela 1), sacarose (30 g L⁻¹), PVP (1,5 g L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização do mesmo foi feita quimicamente com o biocida Polybac 7DC biocide® (2 ml L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sobre controle de fotoperíodo 16/8h (claro e escuro) e de temperatura de 27 ± 2°C.

Tabela 1 - Descrição das concentrações dos reguladores de crescimento, ácido naftaleno acético (ANA), benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) utilizadas na multiplicação *in vitro* de brotações de *A. urundeuva*.

Tratamentos	ANA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)
T1	-	0.00	-
T2	-	0.25	-
T3	-	0.50	-
T4	-	0.75	-
T5	-	1.00	-
T6	0.025	0.00	-
T7	0.025	0.25	-
T8	0.025	0.50	-
T9	0.025	0.75	-
T10	0.025	1.00	-
T11	0.050	0.00	-
T12	0.050	0.25	-
T13	0.050	0.50	-
T14	0.050	0.75	-
T15	0.050	1.00	-
T16	-	-	0.00
T17	-	-	0.25
T18	-	-	0.50
T19	-	-	0.75
T20	-	-	1.00
T21	0.025	-	0.00
T22	0.025	-	0.25
T23	0.025	-	0.50
T24	0.025	-	0.75
T25	0.025	-	1.00
T26	0.050	-	0.00
T27	0.050	-	0.25
T28	0.050	-	0.50
T29	0.050	-	0.75
T30	0.050	-	1.00

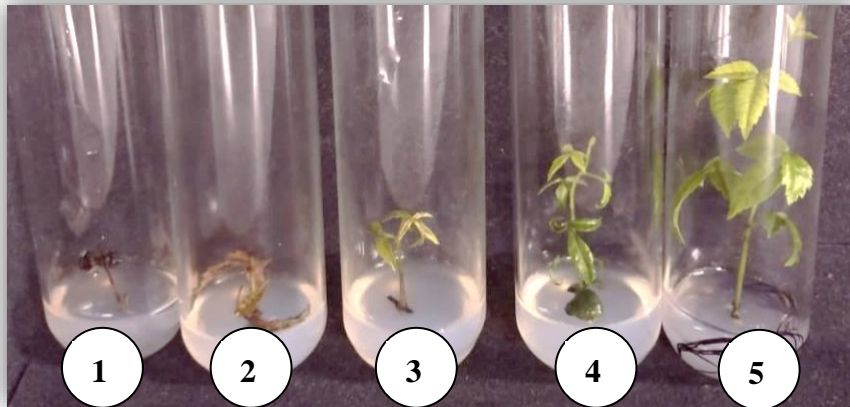
Fonte: Autores (2022).



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal in vitro de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

Transcorridos 30 dias após o início do experimento, procedeu-se a avaliação das brotações quanto ao seu vigor vegetativo, grau de calejamento e o número de brotações emitidas. O vigor vegetativo das brotações e o seu grau de calejamento foram avaliados com base em uma escala de notas (Figura 3 e 4).

Figura 3 - Escala de notas de classificação do vigor vegetativo das brotações de *A. urundeuva* multiplicadas *in vitro* em meio de cultura MS50% suplementado com diferentes concentrações de ANA associadas com concentrações de BAP e TDZ. 1- explante morto; 2- explante em processo de necrose; 3- explante pouco vigoroso; 4- explantes desenvolvidos, porém com distúrbios fisiológicos; 5- explantes vigorosos.



Fonte: Autores (2022).

Figure 4 - Escala de notas de classificação do grau de calejamento das brotações de *A. urundeuva* multiplicadas *in vitro* em meio de cultura MS50% suplementado com diferentes concentrações de ANA associadas com concentrações de BAP e TDZ. 1- explante morto; 2- explante com grande área de calos; 3- explante com pouca presença de calos; 4- explantes desenvolvidos, porém com distúrbios fisiológicos; 5- explantes vigorosos.



Fonte: Autores (2022).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 30 tratamentos, cada qual composto por 10 repetições, com 1 brotação por unidade amostral. Os dados mensurados foram analisados quanto à sua normalidade e homogeneidade ($P > 0,05$), respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão polinomial ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote ExpDes.pt do software estatístico RStudio®, versão 3.5.3.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

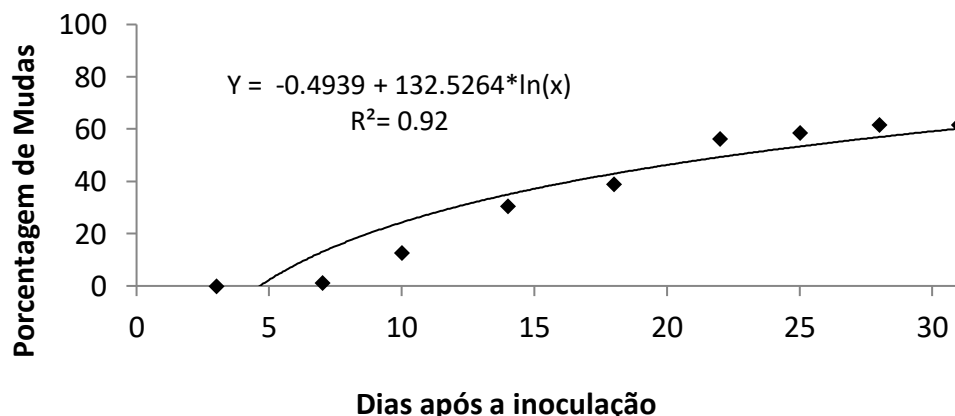
3.1. GERMINAÇÃO *IN VITRO*

As espécies florestais nativas, tais como a *A. urundeuva* que ainda estão em um estágio de pré-melhoramento, apresentam dificuldades quanto à sua propagação quer seja seminal ou clonal. Na maioria das nativas, a baixa taxa de germinação é um fator que prejudica sua perpetuação. Com isso, os resultados obtidos de germinação *in vitro* no presente estudo foram satisfatórios quando comparados ao método de propagação por sementes (Nascimento et al., 2022). No final dos 31 dias de cultivo *in vitro* foi observada uma porcentagem de 61,53% de plântulas; 34,10% de sementes não germinadas e 4,37% de sementes com protusão radicular.

O início do processo germinativo foi observado a partir do terceiro dia de cultivo *in vitro*, onde houve um total de 14,35% de sementes com presença de radícula. A rápida germinação *in vitro* das sementes de *A. urundeuva* é decorrente da sua adaptabilidade às condições ambientais dos locais de ocorrência natural da espécie. Para tanto, há rápida absorção de água e fisiologicamente um acentuado aumento na intensidade respiratória, que é responsável pela produção de energia que vai ser utilizada nas reações bioquímicas. Dentre as reações bioquímicas, temos a degradação das substâncias de reserva, que vão nutrir o eixo embrionário até o desenvolvimento do sistema radicular (Alonso, 2018).

No processo germinativo das sementes de *A. urundeuva* para as plântulas ditas normais houve um pico após 7 dias de cultivo *in vitro* que se estendeu até ao 23º dia, no qual observou uma estabilização de germinação, totalizando 240 de plântulas (Figura 5). Tal comportamento pode ser explicado devido aos diásporos de aroeira possuírem um índice médio de emergência de plântulas após 5 dias de semeadura (Paula et al., 2022). No decorrer do tempo, os diásporos que não são viáveis, mesmo que proporcionada todas as condições ideais, não há formação de plântulas.

Figure 5 - Porcentagem de plântulas (%) de *A. urundeuva* germinadas *in vitro* em meio de cultura MS50%, após 31 dias de inoculação.



Fonte: Autores (2022).

A germinação *in vitro* de *A. urundeuva* está atrelada a alguns fatores, dentre os quais a variabilidade genética das sementes. A literatura reporta que os diásporos germinados de *A.*



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal *in vitro* de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

urundeuva variam de 20% a 80% (Dorneles et al., 2005). No presente estudo, 34,10% dos diásporos foram classificados como inviáveis e esse fator genético dificulta determinar as possíveis causas dessa inviabilidade, pois cada semente responderá de uma forma independente. Além disso, outro fator decisivo que pode afetar diretamente as condições dos diásporos é a sanidade da planta matriz na época de frutificação. As condições edafoclimáticas do local das plantas matrizes podem alterar o transporte de nutrientes para toda a planta e conseqüentemente impactar na formação de sementes de qualidade.

Tabela 2 - Percentuais de protrusões radiculares e de diásporos não germinados de *A. urundeuva* germinadas *in vitro* em meio de cultura MS50%, após 31 dias de inoculação.

Dias de avaliação	Protuberância da raiz (%)	Diásporos não germinados (%)
3	14.35	85.64
7	41.28	57.43
10	34.35	53.07
14	31.,28	38.20
18	23.07	37.94
22	8.71	35.12
25	6.41	35.12
28	4.35	34.10
31	4.35	34.10

Fonte: Autores (2022).

A protrusão radicular é uma variável de suma importância uma vez que é indicativo de que as sementes ao emitirem raízes apresentam alta probabilidade de desenvolverem plântulas completas. Geralmente, baixas porcentagens para esse índice estão atreladas à dormência ou incapacitação das raízes romperem os tegumentos, o que rotineiramente ocorre em espécies nativas. Porém, Dorneles et al., (2005) testando diferentes métodos de superações de dormência em *A. urundeuva*, observou que os principais métodos que auxiliam nesse processo, reduziram a viabilidade da semente e conseqüentemente a redução de sua taxa germinativa, não sendo recomendado para essa espécie o uso de quaisquer métodos de quebra de dormência, conforme constatou-se no presente estudo. Nesse contexto, mesmo aqueles diásporos (4,35%) que emitiram radícula após 28 dias de cultivo *in vitro* desenvolveram a parte aérea em sequência (Tabela 2).

Os resultados obtidos para a germinação *in vitro* de *A. urundeuva* demonstrou que a sua propagação *in vitro* é factível, com um percentual de obtenção de plântulas normais satisfatório (61%). Isso demonstra que a micropropagação da espécie a partir de material juvenil é uma ferramenta em potencial para maiores estudos, quer seja para a multiplicação de genótipos ou para a conservação de germoplasma.

3.2. MULTIPLICAÇÃO IN VITRO

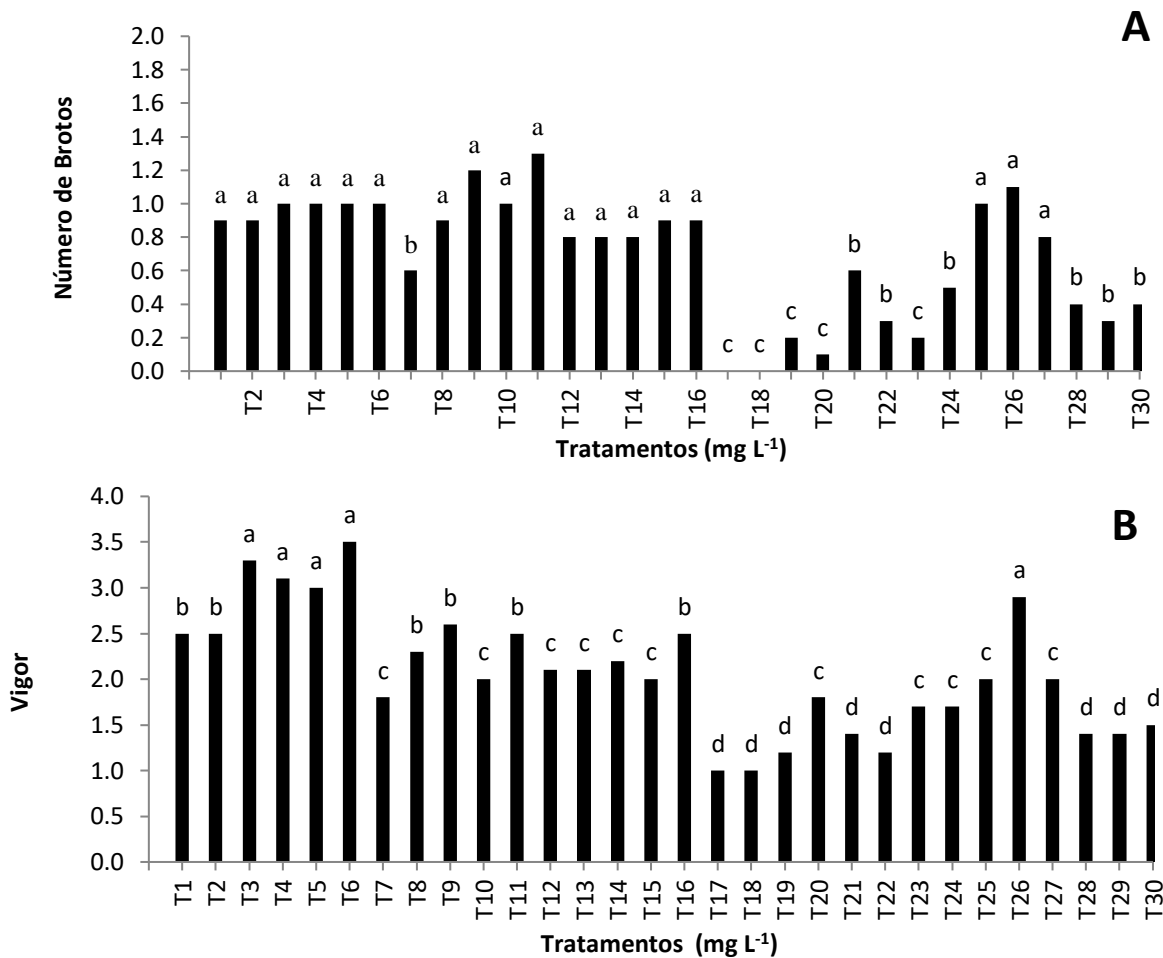
A multiplicação *in vitro* almeja a proliferação do material vegetal em uma acentuada taxa de crescimento, com a emissão do maior número de brotações em cada subcultivo. Entretanto, diversas espécies lenhosas, especialmente as florestais nativas, têm apresentado problemas nessa etapa (Choudhary et al., 2020). Diversos fatores podem estar ligados à reduzida taxa

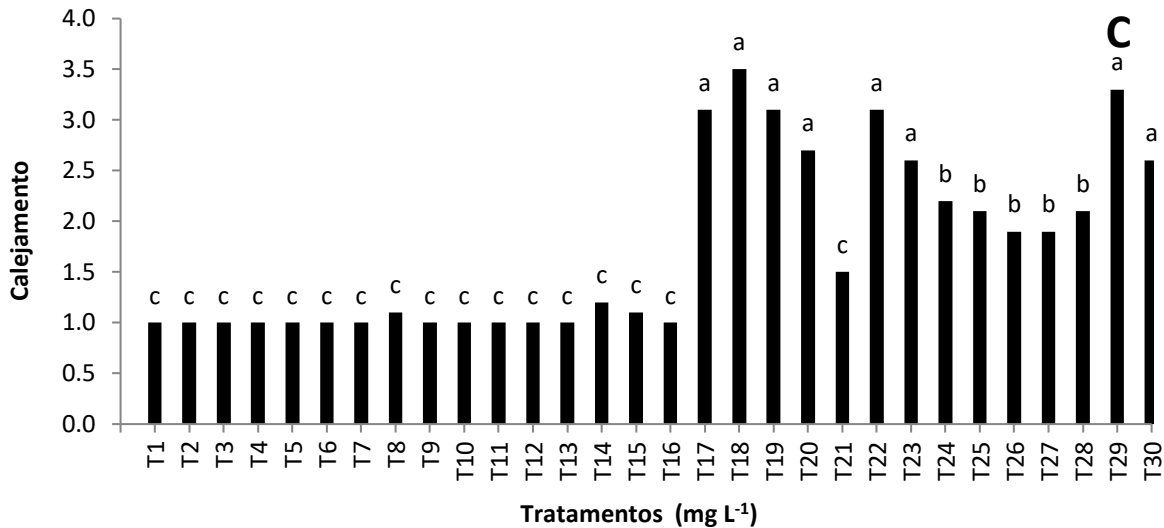


multiplicativa das brotações, tais como o genótipo, o meio de cultura, as condições de cultivo *in vitro* (Ferrari et al., 2004). No presente estudo, o acompanhamento do experimento através de observações periódicas abriu um indício que *A. urundeuva* apresenta uma dominância apical proeminente. Portanto, a alteração do balanço hormonal auxinas/citocininas dos explantes pela suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento pode ser decisivo para a quebra dessa dominância e induzir a multiplicação de novas brotações.

Em relação ao número de brotações, os melhores resultados foram obtidos naqueles tratamentos com a presença de ANA (Figura 6A). O efeito positivo do ANA para a multiplicação das brotações de *A. urundeuva* provavelmente está ligado à sua contribuição para a manutenção de um balanço endógeno nos explantes que favoreceu à quebra da dominância apical e à indução da multiplicação das brotações axilares (Nascimento et al., 2022). A associação de ANA e BAP promoveu a multiplicação das brotações apenas nos tratamentos T11 e T9. No âmbito geral, a associação de BAP e ANA não foi eficaz na proliferação de brotações de *A. urundeuva*.

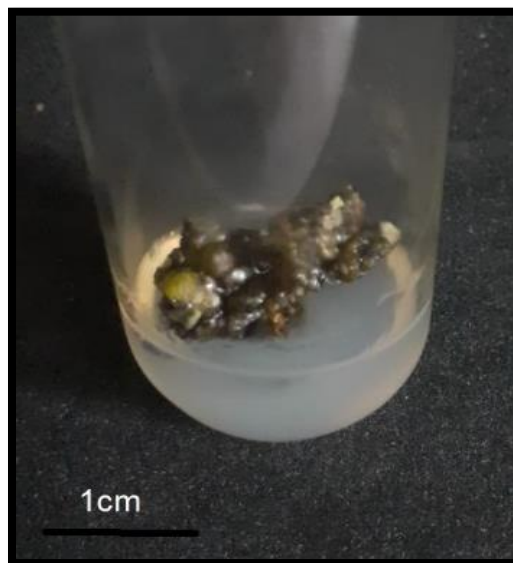
Figura 6 - Valores médios do número de brotos (A), vigor (B) e calejamento (C) de *A. urundeuva* na fase de multiplicação *in vitro*. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.





Os resultados referentes à multiplicação das brotações no meio de cultura suplementado com ANA associado com TDZ foram insatisfatórios, visto que na maioria dos tratamentos houve intenso calejamento dos explantes (Figura 7). A maioria dos explantes apresentaram morte ou inibição do desenvolvimento do meristema apical. Essa resposta provavelmente deve-se ao efeito hormonal do TDZ que induz uma intensa desdiferenciação celular, o que contribuiu para a inibição do desenvolvimento do ápice dos explantes, promovendo a quebra da dominância apical (Máximo et al., 2020). Por outro lado, o intenso calejamento promovido pela ação do TDZ no meio de cultura proporcionou a formação de estruturas bem características de tecidos meristemáticos, havendo a formação de uma brotação, muito provavelmente adventícia. Assim, esse resultado abre perspectivas para a utilização do TDZ como indutor de organogênese e/ou embriogênese somática em *A. urundeuva*. O potencial morfogênico do TDZ já foi comprovado para diferentes espécies florestais (Dhiman et al., 2018).

Figura 7 - Aspecto visual do calejamento induzido em segmento nodal no tratamento com ANA associado com TDZ, em meio de cultura MS50%, após 31 dias de inoculação de *A. urundeuva*.



Fonte: Autores (2022).



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal *in vitro* de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

Ressalta-se que os tratamentos nos quais o ANA foi associado com BAP, não houve calejamento das brotações (Figura 6C). Portanto, na multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*, o tipo de citocinina utilizada como regulador de crescimento tem efeito diferenciado sobre a morfogênese dos explantes. O BAP é a principal citocinina utilizada nos meios de cultivo *in vitro* de espécies florestais (Sant'ana et al., 2018). O vigor vegetativo das brotações foi obtido para aqueles tratamentos nos quais apenas o BAP foi suplementado ao meio de cultura (Figura 6B). Por sua vez, os tratamentos com TDZ todos apresentaram na sua maioria a morte das brotações, em razão do intenso calejamento observado.

As brotações que se desenvolveram, apresentaram leves sintomas de deficiência nutricional, com o amarelecimento do limbo das folhas de algumas brotações. Tais resultados revelam a necessidade de maiores estudos relacionados à nutrição *in vitro*, como avaliação de meios de cultura e concentrações dos componentes dos mesmos. Como alternativa ao meio MS, a utilização do meio de cultura WPM pode mostrar bons resultados em espécies nativas brasileiras como: *Hancornia speciosa* e *Dalbergia nigra* (Pires et al., 2019; Pessanha et al., 2022).

De modo geral, com base nos resultados obtidos no presente estudo, recomenda-se maiores investigações na micropropagação de *A. urundeuva*, especialmente com modificações do meio de cultura, conforme encontrado para *Rubus sp* e *Eucalyptus Globulus Labill.* (Villa et al., 2010; Cordeiro et al., 2014). Novos estudos a fim de determinar a concentração ideal de reguladores de crescimento para a multiplicação *in vitro* de brotações de *A. urundeuva* com a associação de ANA x BAP corresponde à melhor alternativa para otimizar a produção de propágulos *in vitro*. Ademais, em razão dos resultados obtido com intenso calejamento dos explantes nos tratamentos com TDZ, o mesmo poderá ser utilizado em novas pesquisas com organogênese e/ou embriogênese da espécie a fim de determinar possíveis alterações em sua taxa de germinação e multiplicação *in vitro*.

4. CONCLUSÃO

A germinação *in vitro* de *A. urundeuva* é uma alternativa aos métodos convencionais de propagação, obtendo-se 61% de plântulas viáveis para etapas subsequentes de micropropagação. O balanço hormonal estabelecimento entre ANA x BAP e ANA x TDZ em nenhum dos tratamentos testados foi efetivo para induzir a multiplicação *in vitro* de *A. urundeuva*.

REFERÊNCIAS

Aitken-Christie, J., Kozai, T., & Takayama, S. (1995). Automation in plant tissue culture—general introduction and overview—. *Automation and environmental control in plant tissue culture*, 1-18. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_1

Alonso, C. R. (2018). *Germinação múltipla e sequencial de sementes como estratégia de propagação em espécies de Eugenia (Myrtaceae)* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado. São Paulo, Instituto de Botânica).

Recuperado de <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/pgibt/dissertacoestes/camila-rivero-alonso-ms/>

Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. D. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische zeitschrift*, 22(6), 711-728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

Arrigoni-Blank, M. D. F., Costa, A. S., Fonseca, V. O., Alves, P. B., & Blank, A. F. (2011). Micropropagação,



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal in vitro de Astronium urundeuva (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

- aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. *Revista Ciência Agrônômica*, 42, 175-184. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902011000100022>
- Bichara, J. P., & de Aro Bezerra, R. (2022). A participação das cidades no combate à mudança climática: a omissão do município de natal. *Revista FIDES*, 13(1), 60-79. Recuperado de : <http://www.revistafides.ufrn.br/index.php/br/article/view/622>
- Biomás, I. B. G. E. (2019). Sistema Costeiro-Marinho do Brasil: compatível com a escala 1: 250.000. Rio de Janeiro: IBGE. Recuperado em : <https://www.ibge.gov.br/apps/biomás/>
- Braun, H., Lopes, J. C., de Souza, L. T., Schmidt, E. R., Cavatte, R. P. Q., & Cavatte, P. C. (2010). Germinação in vitro de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 539-545. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p539>
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. *Instrução Normativa n.º 006 de 23 de setembro de 2008* Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/MM_A_IN_N_6.pdf. Acesso em 20 Set. 2022.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. (2009). *Regras para análise de sementes*. Recuperado de https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuários/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf
- Brondani, G. E., Molinari, L. V., Faria, J. C. T., Souza, D. M. S. C., Teixeira, G. C., & Gonçalves, D. S. (2022). Emission of epicormic shoots and in vitro establishment of Cordia trichotoma selected adult trees. *Revista Bosque*, 43(2), 169-177. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002022000200169>
- Castro, P. R., Pitelli, A. M. D. C. M., Peres, L. E. P., & Aramaki, P. H. (2007). Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. *Publicatio UFPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, 13(3), 25-29. Recuperado de <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/viewFile/892/774>
- Cordeiro, G. M., Brondani, G. E., Oliveira, L. S. D., & Almeida, M. D. (2014). Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação in vitro de clones de Eucalyptus globulus Labill. *Scientia Forestalis*, 2(103 p. 337-344). Recuperado de <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura.asp?Article=03&Number=103&p=s>
- Choudhary, M., Arya, I. D., & Arya, S. (2020). Problems Encountered during In vitro Culture Establishment in Terminalia arjuna. *Annual Research & Review in Biology*, 154-160. https://doi.org/10.9734/ARRB%2F2020%2FV35I123_0320
- Demier, A. D. M. (2018). Doces matas do Norte de Minas: atores, Instituições e a obtenção do registro de indicação geográfica do mel de aroeira. <http://hdl.handle.net/1843/NCAP-B58EYN>
- Dhiman, N., Gautam, N., Sareen, B., Kumari, P., Rajouria, S., & Bhattacharya, A. (2018). In vitro morphogenesis of some Himalayan Flora using TDZ: a potential plant growth regulator. Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator, 247-271. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_12
- Dorneles, M. C., Ranal, M. A., & Santana, D. G. (2005). Germination of newly collected diaspores of Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae) occurring in the cerrado of Central Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 28, 399-408. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200018>
- Durigan, G., Engel, V. L., Torezan, J. M., Melo, A. C. G. D., Marques, M. C. M., Martins, S. V., ... & Scarano, F. R. (2010). Normas jurídicas para a restauração ecológica: uma barreira a mais a dificultar o êxito das iniciativas?. *Revista Árvore*, 34, 471-485. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000300011>
- Ferrari, M. P., Grossi, F., & Wendling, I. (2004). *Propagação vegetativa de espécies florestais* (Vol. 94, pp. 1-19). Colombo: Embrapa Florestas. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215024/1/doc94.pdf>
- Joly, C. A., Padgurschi, M. C. G., Pires, A. P. F., Agostinho, A. A., Marques, A. C., Amaral, A. G., ... & Loyola, R. D. (2019). *Apresentando o diagnóstico brasileiro de biodiversidade e serviços ecossistêmicos*. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/112419>
- Lorenzi, H. (1992). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, v. 1. Plantarum.
- Máximo, W. P. F., Santos, B. R., Martins, J. P. R., Beijo, L. A., & Barbosa, S. (2020). Multiplication and in vitro rooting of Handroanthus impetiginosus (Mart. Ex DC.) Mattos. *Ciência Florestal*, 30, 658-668. <https://doi.org/10.5902/1980509827012>
- Martinelli, G., Messina, T., & Santos Filho, L. (2014). Livro vermelho da flora do Brasil: plantas raras do Cerrado. In *Livro vermelho da flora do Brasil: plantas raras do cerrado* (pp. 319-319).



Citação: (APA): Silva, L. M., Oliveira L. S., de., Nogueira, A. da S., Souza, N. dos S., de., Jorge, N. V., Honorato, G. A. de S., & Silva, L. S., da. (2023). Germinação e balanço hormonal in vitro de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. *Brazilian Journal of Production Engineering*, 9(2), 113-126.

<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-772818>

Murashige, T. C., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nascimento, A. V. D. S., Mendonça, A. M. D. C., Campos, J. A., Santana, M. C. D., & Santos, P. A. A. (2022). Seed germination of *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. and *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan in different substrates. In *Colloq. Agrar* (pp. 64-73). <http://dx.doi.org/10.5747/ca.2022.v18.n1.a48>

Nascimento, A. V. D. S., Mendonça, A. M. D. C., Campos, J. A., Santana, M. C. D., & Santos, P. A. A. (2022). *In vitro* germination and micropropagation of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae). *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 16, 16-e156. <http://dx.doi.org/10.46526/pccm.2020.v16.156>

Nobre-Júnior, H. V., Oliveira, R. A., Maia, F. D., Nogueira, M. A., de Moraes, M. O., Bandeira, M. A. M., ... & Viana, G. S. (2009). Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochemical Research*, 34, 1066-1075. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-008-9876-5>

Paula, J. C. B. D., Guariz, H. R., Ribeiro Júnior, W. A., Shimizu, G. D., Faria, R. T. D., & Oliveira, H. C. D. (2022). Criopreservação de sementes da espécie nativa do Brasil aroeira-do-sertão (*astronium urundeuva* m. Allemão engl.). *Revista caatinga*, 35(4), 915-924. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252022v35n419rc>

Pessanha, L. S., Aragão, V. P. M., de Sousa, K. R., Silveira, V., & Santa-Catarina, C. (2022). Benzyladenine Effects On Polyamine Contents And Proteomic Profiles During *In vitro* Shoot Development And On Ex Vitro Rooting In *Dalbergia Nigra* (Vell.) Allemão Ex Benth.(Fabaceae). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1419531/v1>

Pires, D. C. M., de Matos Trento, S., de Paula, M. S. P., Asmar, S. A., Luz, J. M. Q., & de Souza, A. V. V. (2019). *In vitro* conservation of mangaba native to Brazilian Cerrado. *Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909*, 15(2), 33-39. <https://doi.org/10.46526/pccm.2019.v15i2.141>

Sant'Ana, C. R. D. O., Paiva, R., Reis, M. V. D., Silva, D. P. C. D., & Silva, L. C. (2018). *In vitro* propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. *Ciência e Agrotecnologia*, 42, 372-380. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018424011018>

Silva-Luz, C. L., & Pirani, J. R. (2010). Anacardiaceae in lista de espécies da flora do Brasil. *Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <http://floradobrasil.ibri.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4394>. Acesso em: 18 set. 2022.

Strassburg, B. B., Brooks, T., Feltran-Barbieri, R., Iribarrem, A., Crouzeilles, R., Loyola, R., ... & Balmford, A. (2017). Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecology & Evolution*, 1(4), 0099. <https://www.nature.com/articles/s41559-017-0099>

Stuepp, C. A., Wendling, I., Xavier, A., & Zuffellato-Ribas, K. C. (2018). Propagação vegetativa e aplicação da silvicultura clonal em espécies arbóreas nativas do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53(9), 985-1002. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000900002>

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora. Recuperado em <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=PpO4DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=T AIZ,+L.%3B+ZEIGER,+E.+Fisiologia+e+Desenvolvimen to+Vegetal.+6.+ed.+Porto+Alegre:+Artmed,+2017,+8 88p&ots=7RIgtVGvUf&sig=JzuXS0VZBsVHX6j8V5qpk gcUoKQ#v=onepage&q&f=false>

Vieira, R. F., Camillo, J., Coradin, L., & Vieira, R. F. (2018). *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste*. Brasília, DF: MMA, 2018. Recuperado de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1073295>

Villa, F. V., Pasqual, M., das Graças Souza, A., & Vilela, X. M. D. S. (2010). Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. *Scientia agraria*, 11(2), 109-117. Recuperado em <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8275235>

Xavier, A., & da Silva, R. L. (2010). Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. *Agronomia Costarricense*, 34(1), 93-98. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242010000100009

