



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



BRENDA TAYNÁ SOUSA DA SILVA

**FENOLOGIA E CULTURA DE TECIDOS DO ACAPU
(*Vouacapoua americana* Aubl., Leguminosae), ÁRVORE DA
AMAZÔNIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Feira de Santana – BA

2024

BRENDA TAYNÁ SOUSA DA SILVA

**FENOLOGIA E CULTURA DE TECIDOS DO ACAPU
(*Vouacapoua americana* Aubl., Leguminosae), ÁRVORE DA
AMAZÔNIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

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

Orientadora: Prof. Dra. Claudinéia Regina Pelacani Cruz

Coorientadora: Prof. Dra. Magali Gonçalves Garcia

Coorientadora: Prof. Dra. Raírys Cravo Herrera

Feira de Santana – BA

2024

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

S578 Silva, Brenda Tayná Sousa da
Fenologia e cultura de tecidos do acapu (*Vouacapoua americana* Aubl.,
Leguminosae), árvore da amazônia ameaçada de extinção / Brenda Tayná
Sousa da Silva. – 2024.
94 f.: il.

Orientadora: Claudinéia Regina Pelacani Cruz.

Coorientadoras: Magali Gonçalves Garcia, Raírys Cravo Herrera.


Tese (doutorado) - Programa Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana,
2024.

1. Acapu. 2. *Vouacapoua americana* Aubl. 3. Leguminosae. 4. Fenologia.
5. Cultivo *in vitro*. 6. Conservação. I. Título. II. Cruz, Claudinéia Regina
Pelacani, orient. III. Garcia, Magali Gonçalves, coorient. IV. Herrera, Raírys
Cravo, coorient. V. Universidade Estadual de Feira de Santana.


CDU 582.736:581.54

Luis Ricardo Andrade da Silva - Bibliotecário - CRB-5/1790


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 LUCIANO COUTINHO SILVA
Data: 29/06/2024 10:00:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva
(Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Documento assinado digitalmente
 GUSTAVO CARVALHO SPANNER
Data: 16/07/2024 08:34:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Gustavo Carvalho Spanner
(Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas)

Documento assinado digitalmente
 MARILZA NEVES DO NASCIMENTO RIBEIRO
Data: 17/07/2024 09:47:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marilza Neves do Nascimento Ribeiro
(Universidade Estadual de Feira de Santana -UEFS)

Documento assinado digitalmente
 REYJANE PATRICIA DE OLIVEIRA
Data: 04/07/2024 08:54:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Reyjane Patrícia de Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana -UEFS)

Documento assinado digitalmente
 RAIrys CRAVO HERRERA
Data: 15/07/2024 22:50:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Raírys Cravo Herrera
(Universidade Federal do Pará - UFPA)
Coorientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2024

Dedico a minha mãe in memoriam Edy Suely por todo seu amor e dedicação para a realização dos meus sonhos.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por sempre colocar as coisas no seu devido lugar e ter guiado os meus passos até aqui. As minhas mães Edy Suely (*in memoriam*), Aldenira Sousa, por terem me auxiliado sempre que precisei e sempre estiveram ao meu lado e sonhando comigo, graças a vocês consegui chegar aqui. Apesar da minha mãe Edy não está mais aqui sei que cuida de mim onde estiver, “te amarei de janeiro a janeiro”. Ao Jackis Gomes que foi meu companheiro, amigo, confidente e sempre me apoiou com o seu amor, carinho e dedicação quando em toda a minha vida acadêmica e pessoal, foi uma das pessoas mais essenciais para a conclusão desta parte da minha vida. Agradeço também a minha irmã Gabriela que sempre torceu por mim, você foi essencial me ajudando seja nas crises de choro ou no dia a dia, o nosso amor não se mede em palavras doces e sim em atitudes e em virtude disso te agradeço imensamente. Aos meus irmãos, Guilherme e Vitória que sempre entenderam a minha ausência e torceram imensamente por mim. A minha tia Edy Paula por ter sido como uma mãe para mim.

Agradeço também as pessoas que foram bastante importantes nesse processo e são ótimas amigas que são a Ana Paula, Lorrany Malcher, Maianny Rodrigues e Luciana Lobo, obrigada por todo o apoio. As pessoas maravilhosas que desde o início me acompanharam em tudo, dos experimentos em que me ajudaram ou seguraram a minha mão quando precisei: Tainá Rocha, Cleonice Teixeira que sabem que as amo como irmãs, em especial a Tainá que neste processo do doutorado foi mais que uma amiga, sem você este trabalho não teria chegado aonde chegou, saiba que não tenho palavras para expressar minha gratidão a você. Ao meu amigo Hairon Rodrigues que esteve comigo em cada processo, o meu muito obrigado por ter me auxiliado e me apoiado quando mais necessitei, serei eternamente grata. A Minha amiga Solange Trevisan que esteve ao meu lado sendo uma amiga essencial e a Magali Gonçalves Garcia que além de orientadora é a minha amiga, que sempre torceu por mim, me apoiou e arrancou muitas risadas, saiba que é um dos meus maiores presentes que a vida me deu e claro é o meu presentinho de limão e o meu grudinho que amo de paixão.

A Universidade Estadual de Feira de Santana e aos professores do PPG-RGV pela dedicação e compromisso com seus alunos durante a nossa formação, buscando sempre proporcionar o melhor a todos. A minha querida orientadora Claudinéia Regina Pelacani Cruz e as minhas coorientadoras Raírys Cravo Herrera, Magali Gonçalves Garcia, por estarem ao meu lado sempre que precisei, resolvendo qualquer obstáculo que aparecesse em meu caminho. Todas vocês foram peças fundamentais para a conclusão dessa etapa, mas agradeço especialmente a professora Raírys Herrera que além das normas e ensinamentos acadêmicos também me ensinou a ser determinada, eficiente e teve toda a paciência do mundo ao

compreender as minhas limitações e sempre torceu por mim, as conversas, risadas no laboratório e os puxões de orelha foram essenciais.

A Universidade Federal do Pará em especial o Laboratório de Biotecnologia (Biotec), que me deu o prazer de conhecer pessoas maravilhosas de um coração enorme como a Israeli, o Gabriel e a Silvia ao qual compartilhamos muitos momentos. Ao laboratório de Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (Lamol), juntamente com o André, Daniele e João me auxiliaram e deram suporte nas análises moleculares, foram essenciais para a conclusão deste trabalho. E a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na minha formação. A Norte Energia S.A pela disponibilidade de dados fenológicos.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Projeto PROCAD-AM, edital 21/2018. E ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP)".

RESUMO

Vouacapoua americana Aubl., é uma espécie amazônica conhecida popularmente como Acapu, geralmente encontrada em ambiente de terra firme, que nos últimos anos vem sendo amplamente explorada, principalmente no estado do Pará. A avaliação das atividades fenológicas permite conhecer os padrões vegetativos e reprodutivos das espécies. Paralelamente o cultivo *in vitro*, especialmente a organogênese, emerge como uma ferramenta promissora para a conservação *ex situ* dessa espécie, permitindo uma rápida multiplicação em larga escala, livre de doenças. Os objetivos desta pesquisa foram caracterizar fenologicamente as populações naturais de *Vouacapoua americana* Aubl e estabelecer um protocolo de propagação *in vitro*. A fenologia, foi avaliada durante sete anos (2016-2022) através do método de observação da copa, destacando as fenofases reprodutivas e vegetativas. Para as análises de propagação *in vitro* foram utilizados diferentes explantes de *V. americana* obtidas de mudas cultivadas em viveiro, em que foram testados: tipos de assepsias, germinação, indução de brotações e de calos, com diferentes reguladores de crescimento. Em fenologia os resultados evidenciaram uma correlação positiva para as fenofases reprodutivas com precipitação e umidade relativa, apresentando pico no período de maior precipitação pluviométrica. As fenofases foliares tiveram uma correlação positiva com a insolação e temperatura. Os resultados da propagação *in vitro* com *V. americana* destacaram que a assepsia com hipoclorito e álcool 70° são eficazes contra micro-organismos, porém isso varia de acordo com o explante testados e tempo de imersão, e que o PPM, é eficaz no controle dos micro-organismos em explantes foliares. Além disso, o Picloram foi o melhor regulador de crescimento para indução de calos. A análise morfológica dos calos evidenciou a mudança na coloração dos calos e formato das células de acordo com a concentração e evidenciaram células com formatos isodiamétricos. Para a germinação dos embriões a melhor assepsia foi a de imersão das sementes e nos embriões em hipoclorito de sódio por 5 minutos. Em suma, Acapu demonstrou ser uma espécie sazonal e anual, sendo tais informações importantes para pesquisas de conservação *ex situ* e *in situ*, além disso tem-se a importância de otimizar protocolos específicos para assepsia de acordo com o tipo de explante, considerando as condições ambientais e as características intrínsecas dos tecidos vegetais.

Palavras-chave: Ameaçada, Fenofases, Micropropagação e Espécie Florestal.

ABSTRACT

Vouacapoua americana Aubl., is an Amazonian species popularly known as acapu, generally found in dry land environments, which in recent years has been widely explored, mainly in the state of Pará. The evaluation of phenological activities allows us to know the vegetative and reproductive patterns of species. At the same time, *in vitro* cultivation, especially organogenesis, appears as a promising tool for the *ex situ* conservation of this species, allowing rapid, disease-free, large-scale multiplication. Therefore, the objective of this research is to phenologically characterize the natural ecosystem of *Vouacapoua americana* Aubl and establish an *in vitro* propagation protocol. Phenology was evaluated for 7 years (2016-2022) using the canopy observation method, highlighting the reproductive and vegetative phenophases. For *in vitro* propagation analyses, different explants of *V. americana* obtained from seedlings grown in a nursery were used, in which the following were tested: types of asepsis, induction of shoots, callus and germination with different growth regulators. In phenology, the results showed a positive clarity for the reproductive phenophases with occurrence and relative humidity, presenting a peak in the period of greatest rainfall. Leaf phenophases had their greatest intensity during the dry period and had a positive relationship with sunshine and temperature. The results of this *in vitro* propagation study with *V. americana* highlight that asepsis with hypochlorite and 70° alcohol are effective against pathogens, however, this varies according to the explant tested and experimentation time, that PPM is effective in controlling microorganism's organisms in leaf explants. Furthermore, Picloram was the best growth regulator for callus induction. The morphological analysis of the callus showed a change in the color of the callus and shape of the cells according to the concentration and showed cells with isodiametric shapes. In short, Acapu is declared to be a seasonal and annual species, and this information is important for *ex situ* and *in situ* conservation research. Furthermore, it is important to update specific protocols for asepsis according to the type of explant, considering the environmental conditions and the intrinsic characteristics of plant tissues.

Keywords: Endangered, Phenophases, Micropropagation and Amazon.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. OBJETIVO GERAL:	17
2.1 Objetivos específicos:	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA	32
Capítulo 01 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO FENOLÓGICO DE <i>Vouacapoua americana</i> Aubl.....	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4. RESULTADOS.....	48
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO 02 – INDUÇÃO DE CALOS E REGENERAÇÃO DE SEGMENTOS APICAIS E NODAIS DE <i>Vouacapoua amricana</i> Aubl.....	62
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3. RESULTADOS.....	70
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÃO	87
6. REFERÊNCIAS	88
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Floresta Amazônica possui uma biodiversidade imensurável de espécies vegetais, estima-se que ela tenha em torno de mais de 14.647 espécies, sendo que dessas 2.661 são endêmicas da Amazônia brasileira (Reflora, 2024). Muitas dessas espécies amazônicas apresentam grande importância econômica pois, podem ser utilizadas para diversos fins como matérias primas para indústrias que vão desde a farmacêutica, alimentícia, construção dentre outras (Rao, 2004; Cruz *et al.* 2013).

Devido a essas características e do potencial de várias espécies principalmente madeiras, além do avanço do agronegócio, ocorreu o desmatamento desenfreado da floresta Amazônica brasileira (Amorim *et al.* 2023). Somente entre os meses de agosto de 2020 e julho de 2021 o Projeto de Monitoramento do Desmatamento na Amazônia Legal por Satélite (PRODES), constatou uma taxa de desmatamento na Amazônia Legal brasileira de 13.235km², um aumento de 21,97% quando comparado ao PRODES de 2020 (INPE, 2022).

O estado do Pará liderou as taxas de desmatamento contribuindo com 5.257Km², para o mesmo período representando 39,72%, quando comparados com os outros estados da Amazônia Legal (INPE, 2022). Com isso, se tem a extrema preocupação na perda de inúmeras espécies, pois a exploração florestal desordenada, resulta no isolamento de populações vegetais, na redução da diversidade genética e, conseqüentemente, na diminuição da capacidade adaptativa das espécies, fatores que, algumas vezes, podem contribuir para extinção de espécies (Vié, Craig e Simon, 2009; Barlow *et al.*, 2016).

Além dos fatores supracitados, o desmatamento também implica no comportamento ecológico das espécies como por exemplo a alteração do seu ciclo fenológico, em seus processos fisiológicos e principalmente na dinâmica florestal (Castelo *et al.*, 2018; Dário, 2022). Considerando a importância e os danos que o desmatamento ocasiona, estudos voltados para as temáticas sobre o comportamento fenológico, ecofisiológico e estratégias de conservação *ex situ* são essenciais para ações de recuperação de áreas degradadas ou mesmo da biodiversidade (Braz, *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Cabral *et al.*, 2019).

Em virtude das informações apresentadas tem-se a importância de avaliar os padrões fenológicos das espécies que estão sofrendo as pressões antrópicas como o desmatamento e as queimadas, estudos voltados para essa temática são importantes ferramentas na determinação da dinâmica florestal, pois abordam os eventos biológicos que acontecem durante o ciclo de vida vegetal (Neves, *et al.*, 2010). Essa abordagem facilita a compreensão de processos ecológicos como a reprodução e dispersão e o sucesso de estabelecimento de espécies em seu

habitat e a sua relação e resposta aos fatores bióticos, abióticos, endógenos e as suas restrições filogenéticas (Lieth 1974; Wright e Calderon 1995; Williams-Linera e Meave 2002; Tannus *et al.*, 2006; Silva, 2017; Gonçalves, 2018).

Ao compreender a relevância da fenologia e o quão correlacionada está com as variáveis ambientais, nota-se que ela é um importante indicador para as alterações climáticas globais e como estes eventos afetam os processos fisiológicos das espécies florestais ao longo do tempo, como respiração e assimilação fotossintética (Parmesan e Yohe, 2003; Sophia, 2021). Adicionalmente a fenologia propicia informações contundentes a respeito da coleta de propágulos, tanto para a propagação sexuada quanto para a assexuada.

Além da importância do comportamento fenológico, estudos que busquem a conservação *ex situ* como cultura de tecidos vegetais de espécies ameaçadas e com valor econômico, torna-se uma alternativa para conservação destes genótipos, além de assegurar os mesmos para pesquisas futuras (Alves; Azevedo, 2018).

A cultura de tecidos é uma técnica biotecnológica de conservação e melhoramento de germoplasmas, ela permite uma rápida multiplicação em larga escala de tecidos, células, órgãos ou plantas inteiras livres de micro-organismos e doenças, sob condições nutricionais e ambientais extremamente controladas (Thorpe, 2007; Oseni, Pande e Nailwal, 2018).

Uma das técnicas de cultivo *in vitro* é a organogênese, que consiste na capacidade de diferenciação e regeneração de órgãos ou plantas, podendo ser através da via direta que se origina a partir do meristema ou via indireta que depende da proliferação celular que formam calos (Nogueira *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2022). Sendo que esta última via pode ampliar a variabilidade genética, através do aparecimento de variantes somaclonais como forma de adaptação celular as condições do cultivo (Kaeppler, Kaeppler e Rhee, 2000; Ramirez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015; Gole *et al.*, 2020).

Os eventos fisiológicos supracitados para ocorrerem na maioria das vezes necessitam de estímulos, que se dão pela utilização de reguladores de crescimento, sendo que os mais utilizados são as auxinas que promovem o enraizamento de brotos e indução de calos e as citocininas que propiciam o desenvolvimento celular e de gemas axilares (Taiz *et al.*, 2017; Romo-Paz *et al.*, 2023). Os reguladores de crescimento podem atuar de maneiras diferentes em cada espécie, além das concentrações e das suas combinações, o que pode gerar inúmeros resultados nos protocolos de estabelecimento *in vitro* (De Souza *et al.*, 2022).

Outro processo importante para o cultivo *in vitro* é a assepsia. Entretanto para as espécies florestais tal condição é um desafio em virtude da dificuldade de obter material vegetal

livres de contaminações por micro-organismos e oxidações fenólicas (Thorpe *et al.*, 1991; Grattapaglia e Machado, 1998; Kushnarenko, 2022).

Inúmeras espécies florestais já tiveram estudos voltados para a micropropagação como: Cerejeira brasileira (*Amburana acreana* Ducke) (Fermino Jr *et al.*, 2007); Pau rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) (Jardim *et al.*, 2010); Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess) (Mello *et al.*, 2020); Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) (Carvalho *et al.*, 2021); Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth.) (McVaugh) (Araujo *et al.*, 2021). Porém, para a espécie *Vouacapoua americana* Aubl., as informações na literatura a respeito do seu comportamento fenológico e propagação *in vitro* são escassos.

Vouacapoua americana Aubl, conhecida popularmente como Acapu, pertencente à família Leguminosae, está entre as madeiras mais utilizadas na Amazônia e apresenta um histórico de intenso uso desde o século XX (Leite e Leras, 1993). Somente no Estado do Pará, entre os anos de 2006 a 2016, foram extraídos 1.623.417m³ em toras de madeira nativa de Acapu (PARÁ, 2022). Atualmente o Acapu integra a lista de espécies ameaçadas ou sob o risco de extinção elaborada pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN, 2024) classificada como criticamente em perigo, também sendo encontrada na lista de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2022).

Além da intensa exploração *V. americana* possui um padrão de distribuição agregado, e o seu sistema de reprodução é misto (alógamo e autógamo) com polinização entomófila de espécies com voos curtos (MAUÉS, 1999). A densidade média de adultos por população é geralmente inferior a nove indivíduos por hectare (Dutech *et al.*, 2002). A partir das características de distribuição, polinização e densidade, pode-se prever diferenciação substancial entre as populações de *V. americana*, baixo fluxo gênico e baixa diversidade genética dentro das populações (Dutech *et al.*, 2004). Quando uma determinada população possui uma baixa variabilidade genética, por motivos naturais, juntamente com a exploração por atividades antrópicas, ela se torna extremamente propícia a extinção.

Além dos eventos supracitados suas sementes apresentam comportamento recalcitrante, e uma rápida deterioração por ataques de fungos e insetos, fatores que dificultam o seu armazenamento e a conservação de seus germoplasmas (Cruz e Pereira, 2016; Souza, 1999). Como o principal meio de propagação da espécie é por via de sementes, o comportamento recalcitrante torna inviável a propagação em períodos diferentes ao da dispersão (NICK *et al.* 2010). Além disso as suas sementes são extremamente predadas por roedores o que dificulta ainda mais a disponibilidade da mesma (FORGET, 1990; GOMES *et al.*, 2021).

Considerando a importância das informações acima citadas, o estudo em conjunto da fenologia e do cultivo *in vitro* é essencial para compreender e otimizar o processo de regeneração de plantas em condições controladas e os aspectos ecológicos da espécie mediante aos fatores abióticos e bióticos, tais abordagens contribuem para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes na conservação de *V. americana*.

2. OBJETIVO GERAL:

Investigar os padrões fenológicos de *V. americana* Aubl. e explorar as estratégias eficazes para a propagação sexuada e assexuada desta espécie florestal por meio do *cultivo in vitro*.

2.1 Objetivos específicos:

- Investigar os ciclos fenológicos reprodutivos e vegetativos de *V. americana*;
- Averiguar se a espécie apresenta ciclos biológicos anuais ou bianuais;
- Avaliar como variáveis climáticas locais afetam na frequência e duração das fenofases de *V. americana*;
- Definir um protocolo de estabelecimento *in vitro* para *V. americana*;
- Determinar a melhor concentração dos reguladores de crescimento na regeneração de segmentos apicais e nodais;
- Analisar a interação dos reguladores de crescimento do grupo das auxinas, Picloram e 2,4D, na indução de organogênese indireta no processo de calogênese;
- Investigar o efeito do BAP e Melatonina no processo de formação de brotos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Domínio Fitogeográfico Amazônico

A Floresta Amazônica, está situada no norte da América do Sul, e é considerada um dos tesouros naturais mais significativos do planeta, o Brasil possui a maior extensão deste bioma, cobrindo cerca de 4,2 milhões de quilômetros quadrados, o que representa mais de 60% de toda a área amazônica (Lemos e Silva, 2011). É uma floresta tropical extremamente úmida com precipitação anual de 2.300mm, sendo abundante em água, além da sua extrema umidade a mesma também possui conexões com a atmosfera, rios e lagos (Luizão, 2007, MMA, 2024).

O bioma amazônico apresenta heterogeneidade e uma amplitude de fitofisionomias como a floresta densa, savana, planícies, cerrado, terras altas, secas e inundadas (Neves *et al.*, 2020). Além disso o bioma amazônico atua nos ciclos hidrológicos através da evaporação e transpiração da floresta, influenciando fortemente nos regimes de chuva do Brasil e países vizinhos (Lima *et al.*, 2017; Ferreira, 2021; Moreto *et al.*, 2021, Tosto *et al.*, 2022). Além dos serviços hidrológicos o bioma amazônico também atua sobre o sequestro do dióxido de carbono, pesquisas apontam que somente a flora da Amazônia tem em torno de 100 bilhões de toneladas de dióxido de carbono armazenadas, o que a torna uma grande aliada na redução do efeito estufa (Aragón, 2018; David *et al.*, 2022).

Porém a floresta amazônica nos últimos anos vem sofrendo com grandes pressões antrópicas como o desmatamento e queimadas desenfreadas, esses fatores ocasionam alterações nos ciclos hidrológicos, reduzindo as taxas de evapotranspiração da floresta e com isso interferindo nos níveis de precipitação no Bioma Amazônia (Copertino *et al.*, 2020).

Além disso, as pressões antrópicas promovem a perda de espécies e de habitats ocasionando erosão genética e isolamento populacional, esses fatores resultam na redução da variabilidade genética encontrada dentro das populações (Pflüger *et al.*, 2018). Esta redução na diversidade genética pode levar uma espécie diretamente ao declínio e encaminhar a mesma para o processo de extinção (Gonçalves, 2020).

3.2 *Vouacapoua americana* Aubl.

Vouacapoua americana é uma espécie amazônica de porte arbóreo, representante da família Leguminosae que apresenta ocorrência na Guiana Francesa, Suriname, Guiana e no Brasil, distribuindo-se pelos Estados do Maranhão, Amapá e Pará em floresta pluvial de terra firme (Leite e Lleras, 1993; Maestri *et al.*, 2021; COTA, 2022).

É conhecida popularmente como Acapu e pode atingir até 30 metros de altura, apresenta folhas do tipo compostas imparinadas (Figura 01: a, b e c), as inflorescências são terminais de coloração amarelada (Figura 01: a, b e c) sua polinização é entomófila, realizada na maior frequência por Sirfídeos e Meliponíneos (representantes da família Apidae), que são polinizadores de curto alcance de vôo (Maues *et al.*, 1999). Sua copa é arredondada (Figura: h), com tronco sulcado (Figura 01: i) (Souza, 2022).

A espécie apresenta um padrão de distribuição agregado, um sistema reprodutivo misto (alógamo e autógeno), seus frutos são de características legume do tipo drupáceo e deiscente, com formato oval e com apenas uma semente grande, sua dispersão é barocórica com características recalcitrantes (Figura 01: d, e, f, g) (Lorenzi, 1989; Sabatier, 1985).

Os principais atuantes na sua dispersão são duas espécies de roedores, *Dasyprocta leporina* LINNAEUS, 1758 e *Myoprocta exilis* WAGLER, 1831 que enterram as sementes predominantemente a até 10 m de distância das árvores maternas (Forget, 1990; Gomes *et al.*, 2021).

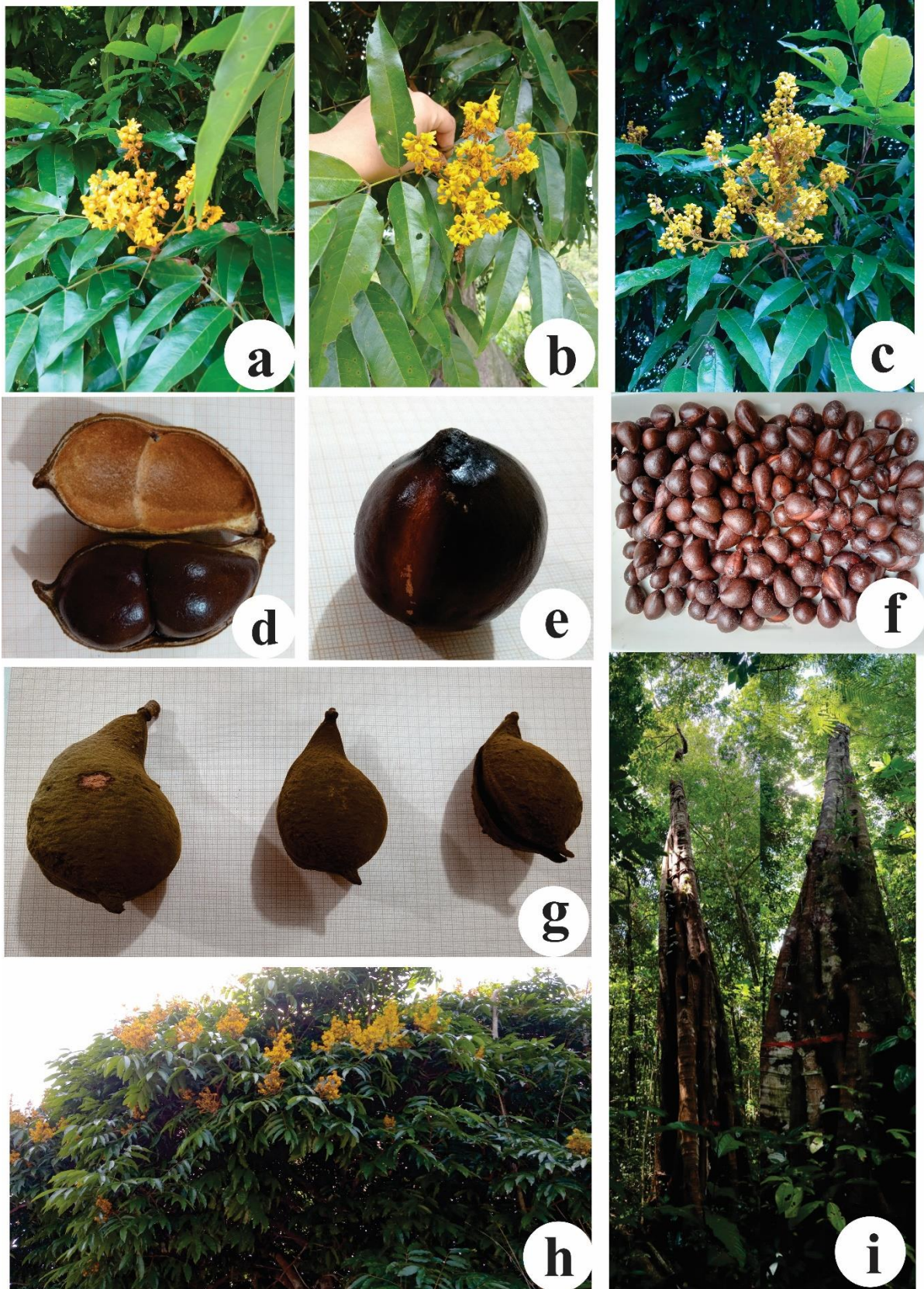


Figura 01: Aspectos morfológicos de *Vouacapoua americana* Aubl. a) Inflorescência e padrão foliar. b) Inflorescência. c) Ramo com inflorescências. d) Legume com semente dupla. e) Semente. f) Diversidade no tamanho da semente. g) Diferenças biométricas no tamanho do fruto. h) Copa. i) Tronco e copa.

A densidade média de adultos por população é geralmente inferior a nove indivíduos por hectare (Dutech *et al.*, 2002). A partir das características de distribuição, polinização e densidade, pode-se prever diferenciação substancial entre as populações de *V. americana*, baixo fluxo gênico e baixa diversidade genética dentro das populações (Dutech *et al.*, 2004).

Sua madeira apresenta ótima resistência mecânica e a podridão devido a isso é bastante utilizada na indústria madeireira desde a construção naval (Fonseca, 1922), construção civil (Loureiro *et al.*, 1979) produção de móveis e marcenaria de luxo (decorações, tacos de bilhar etc.) (Lorenzi, 1989).

Devido as características nobres de sua madeira a espécie é altamente explorada, em virtude disso no ano de 2014 na portaria 443 do Ministério do Meio Ambiente, acapu passou a fazer parte da lista das espécies consideradas em perigo de extinção (EN) (MMA, 2014). No ano de 2022 com a atualização da portaria 148 o Acapu continua tendo a sua comercialização e corte proibidos (MMA, 2022), na União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) que é responsável pela lista vermelha de espécies em extinções, o Acapu é considerado como criticamente ameaçado (CR) (IUCN, 2024).

3.3 Fenologia

A fenologia é uma ciência que estuda os eventos cíclicos biológicos vegetais, focada na previsão e monitoramento destes e suas relações com os fatores bióticos e abióticos (Lieth 1974; Morellato e Leitão, 1990). A fenologia auxilia na compreensão da dinâmica florestal e populacional de uma espécie, pois ao avaliar os ciclos foliares, floração e reprodução obtém-se uma compreensão maior de como os polinizadores, dispersores atuam e conseqüentemente como se dá o desenvolvimento vegetativo da mesma (Locatelli, Machado e Medeiros, 2004; Morellato e Leitão, 1990; Silva, 2019; Costa e Lameira, 2021).

Informações dos padrões fenológicos são valiosas para estudos botânicos, principalmente nas relações planta-planta, tendo em vista que as mesmas podem competir por recursos hídricos e nutritivos, além de polinizadores e dispersores (Talora e Morellato, 2000; Neves *et al.*, 2010). Nos últimos anos estudos fenológicos vêm recebendo posição de destaque principalmente em assuntos como mudanças climáticas globais, devido aos ciclos biológicos serem ótimos indicadores de respostas a essas mudanças (Abernethy *et al.*, 2018).

Morellato *et al.*, (2016) ressaltam que o aquecimento global já ocasionou mudanças na distribuição das espécies e em seu modo de reprodução, porém nos trópicos essas alterações na temperatura não ocasionam tantos danos nas fenofases das espécies, como a variação na sazonalidade de precipitação.

Por outro lado, é importante salientar que algumas espécies não são totalmente influenciadas pela precipitação e sim por sua tolerância hídrica ou fotoperíodo, tornando estas variáveis importantes na descrição do tempo, periodicidade e sincronia de eventos reprodutivos da espécie, principalmente em florestas tropicais em que a existência de sazonalidade climática é baixa (Reich e Borchert, 1984; Borchert, *et al.*, 2005; Morellato *et al.*, 2016).

Em virtude das informações citadas, determinar os padrões fenológicos são bem mais complexos do que em florestas temperadas (Pau *et al.*, 2011). Esses padrões em zonas tropicais são geralmente caracterizados pelos períodos de estiagem e chuvosos, o que tornam os estudos fenológicos para floresta tropical mais escassos, do que para os demais tipos de floresta no mundo (Morellato; Camargo; Gressler, 2013). Dados compostos a longo prazo se tornam mais raros ainda (Chambers, *et al.*, 2013; Sakai e Kitajima, 2019).

Outros fatores além da sazonalidade podem atuar sobre a duração e frequência das fenofases (Borchert e Rivera, 2001). O que pode ser o caso de espécies amazônicas que passam por estresses como o desmatamento ou queimadas.

Entretanto estes estresses ocasionados pela sazonalidade e atividades antrópicas podem não atuar em espécies com períodos de gerações mais longas, pois os processos microevolutivos, podem ser lentos o bastante, evitando assim o acompanhamento destes a mudanças climáticas (Visser, 2008).

Além disso um outro fator deve ser levado em consideração, que é a plasticidade fenotípica das espécies deve ser levada em consideração, pois podem gerar flexibilidade nesses eventos biológicos fornecendo assim uma ferramenta de proteção contra os impactos negativos de mudança ambiental, além de ser uma indicadora útil na identificação de espécies com capacidade de adaptação (Chambers, *et al.*, 2013).

As análises fenológicas se baseiam em métodos que avaliam a intensidade de cada fenofases que podem variar de 0 a 100%, ou a ausência e presença de cada uma (Fournier, 1974; Fournier e Charpantier, 1975; Morellato *et al.*, 1990; Newstrom *et al.*, 1994). Para avaliação destes dados, a estatística circular se torna uma das mais eficazes, em virtude de possibilitar uma estimativa de sincronia, além dos cálculos de variáveis como: data média, duração, distribuição, divergência ou aleatoriedade de uma determinada fenofases, além destas modelos que auxiliem a ver a relação entre as fenofases e variáveis ambientais também são amplamente usados nesta ciência (Morellato *et al.*, 2010).

3.4 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos ou cultivo *in vitro* é uma técnica que envolve o isolamento de pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) de um organismo, que são cultivados em meio nutritivo de forma asséptica por períodos variados (Paiva e Paiva, 2001). Esta técnica permite a formação de plantas completas, tanto de maneira direta a partir do explante quanto indiretamente por meio de calos celulares (Lakshmana *et al.*, 2005).

Devido a isso e as suas formas de aplicação o cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante para a biotecnologia vegetal pois, compreende um conjunto de métodos biotecnológicos que impactam significativamente tanto na agricultura quanto na indústria pois, fornecem plantas em grande escala geneticamente homogêneas, isentas de doenças ou com alta variabilidade genética se o método de indução for através da variação somaclonal ou gametaclonais (Kaepler, Kaepler e Rhee, 2000; Hussain *et al.*, 2012; Ramirez-Mosqueda e Iglesias Andreu, 2015; Gole *et al.*, 2020, Carmo, 2023).

Além da sua importância citada acima a cultura de tecidos, também possui outra aplicação importante na preservação da biodiversidade vegetal (Oseni, Pande, Nailwal, 2018). Com a diminuição do número de espécies que há uma necessidade crescente de proteger o patrimônio genético, relacionado a isso os protocolos de cultura de tecidos permitem clonar genótipos ameaçados e armazená-los por longos períodos (Lemos *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2018, Alves e Azevedo, 2018).

A micropropagação consiste na técnica de clonagem de um genótipo selecionado a partir de uma parte da planta, permitindo assim obter clones, diminuindo tempo e espaço, isso ocorre em virtude das células vegetais apresentarem totipotência o que propiciam a elas a capacidade de gerarem órgãos novos ou uma planta inteira, refletindo a alta capacidade celular (Asmar *et al.*, 2013, Long *et al.*, 2022).

Contudo, essa capacidade de regeneração pode variar de acordo com o tipo de planta, o órgão selecionado e a fase de desenvolvimento do tecido, em virtude das células que compõem os explantes estarem em diferentes estágios fisiológicos, bioquímicos e de crescimento. Geralmente os explantes de plantas jovens que ainda estão em desenvolvimento apresentam respostas melhores quando submetido ao cultivo *in vitro* (Long, *et al.*, 2022).

Relacionado a esses fatores a micropropagação podem ser divididas em diferentes fases (Hussain *et al.*, 2012):

Fase 0 – Preparação e seleção das matrizes e explantes;

Fase 1 – Fase do estabelecimento de uma cultura asséptica;

Fase 2 – Fase da Multiplicação;

Fase 3 – Fase do enraizamento;

Fase 4 – Fase da Aclimação.

Para obtenção de todas as fases da micropropagação a fase 0 e 1 são essenciais para qualquer trabalho que busque utilizar as técnicas de micropropagação (Oliveira; Freire; Aloufa, 2019). Além destes fatores os novos tecidos ou órgãos vegetais podem ser obtidos através de duas rotas morfogênicas: A organogênese refere-se à produção de órgãos vegetais, tais como raízes, brotos e folhas, que podem se desenvolver diretamente a partir do meristema ou indiretamente de massas celulares indiferenciadas (calos) (Nogueira *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2022). A outra rota é a embriogênese somática que se trata de um processo no qual células ou tecidos somáticos dão origem a embriões diferenciados (Hussain *et al.*, 2012). Esses embriões somáticos têm a capacidade de se desenvolver em plantas completas sem a necessidade de passar pelo processo de fertilização sexual, como ocorre com os embriões zigóticos (Gatti *et al.*, 2016).

3.5 Estabelecimento

O estabelecimento *in vitro* é a primeira etapa da micropropagação, que tem como objetivo manter as culturas e os explantes livres de contaminação e oxidações, para os experimentos posteriores como a multiplicação, enraizamento, brotações e indução de calos (Rocha *et al.*, 2024). Para a garantia do estabelecimento de uma cultura o primeiro passo se detém ao processo de desinfestação de explantes, pois ao serem expostos à contaminação microbiana, tem-se à mortalidade do tecido vegetal (Singh, 2018; Lima, 2020).

Entretanto a desinfestação dos explantes representa um dos maiores desafios dentro da cultura de tecidos, pois um protocolo eficaz para uma espécie pode não ser aplicável para outra independentemente de serem da mesma família ou gênero, e essa variação na definição de um protocolo de assepsia pode ocorrer até em diferentes explantes oriundos da mesma planta (Mezzalira e Kuhn, 2021; Dantas, 2023).

Como forma de estratégia para um protocolo eficaz geralmente são utilizadas várias técnicas para a eliminação dos micro-organismos, como água e agentes químicos incluindo o detergente, hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio e etanol, finalizando com o enxague em água estéril, esse processo pode ser dividido entre a pré-assepsia, que ocorre antes da excisão do explante e assepsia que é após excisão (Loberant e Altman, 2010).

Contudo algumas das substâncias acima citada podem ser tóxicas aos explantes e ocasionarem danos ao tecido vegetal como necrose por exemplo, para isso tempo de imersão,

concentração e combinações entre os métodos devem ser testadas para manter a viabilidade dos explantes (Singh, 2018).

Além da desinfestação dos explantes a esterilização do meio de cultura e do material que será utilizado para a manipulação do explante é essencial, pois os micro-organismos também se alojam nestes materiais, um dos métodos de esterilização mais eficiente para estes produtos é a autoclave a mesma elimina os micro-organismos através da temperatura aliada com a pressão (Singh, 2018).

Outro fator importante para o sucesso de um estabelecimento eficaz do cultivo *in vitro*, é o tipo de meio nutritivo escolhido, pois as plantas em ambientes naturais obtêm seus macros e micronutrientes através da absorção do solo e atmosfera (Rojas, 2024). Porém no cultivo *in vitro* é necessário fornecer às plantas os nutrientes fundamentais para o seu crescimento para o controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (Silva *et al.*, 2006). Além destes fatores um meio de cultura que esteja inadequado pode ocasionar distúrbios fisiológicos ou a morte dos tecidos

Existem vários tipos de meio, porém os mais comumente utilizados são MS (Murashige e Skoog, 1962) e suas modificações como MS meia ($\frac{1}{2}$ -MS), este é bastante utilizado em espécies de mono e dicotiledôneas devido as boas taxas de regeneração ocasionada pelos altos níveis de nitrogênio, contudo para muitas espécies o mesmo não é bom para o crescimento (Phillips e Garda, 2019). Em virtude disso outros tipos de meio foram implementados para atender as demandas e exigências de algumas espécies, entre elas as espécies lenhosas que necessitam de menos sais de macronutrientes, relacionado a isso surgiu o Woody Plant Medium (WPM) que possui uma menor concentração dos sais e nitrogênio com intuito de atender as exigências das plantas Lenhosas (Lloyd e Mccown, 1980; Araruna *et al.*, 2017; Phillips e Garda, 2019). As composições dos meios MS e WPM estão listados no quadro 1.

Quadro 1: Composições químicas dos meios nutritivos MS e WPM.

Componentes	Meios de Cultura (mg L ⁻¹)	
	MS	WPM
Macronutrientes		
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,0	96,0
Ca (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	-	556,0
KH ₂ PO ₄	170,0	170,0
KNO ₃	1900,00	-
K ₂ SO ₄	-	990,0

MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	370,0
Na ₄ NO ₄	1650,0	400,0
Micronutrientes		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
K	0,83	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
Fe(SO ₄).7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2	37,2
Orgânicos		
Ácido Nicotínico	0,5	-
Glicina	2,0	-
Mio-inositol	100	-
Piridoxina HCl	0,5	-
Tiamina HCl	0,1	1,0

Fonte: Adaptado de Quinsen e Angelo (2008).

3.6 Reguladores de crescimento

Após atender às necessidades nutricionais básicas dos tecidos vegetais, torna-se necessário induzir novas respostas no desenvolvimento explantes, estas são estimuladas pela adição de reguladores de crescimento (Phillips e Garda, 2019). Os reguladores de crescimento vegetal, são biomoléculas importantes nas plantas que existem em baixas concentrações e sua atuação é principalmente relacionada a sinalização bioquímica mediando praticamente todos os processos fisiológicos do desenvolvimento vegetal (Erland *et al.*, 2017).

Quando adicionados ao meio de cultura os reguladores de crescimento, desempenham uma função fundamental no crescimento das culturas e/ou nas respostas morfogênicas (Silva, *et al.*, 2006). Dentre os reguladores de crescimento existem os que ocorrem naturalmente biosintetizados pelas plantas denominados de fitohormônios ou hormônios, estes controlam processos fisiológicos como: divisão e aumento celular, crescimento radicular, início dos

botões, dormência, floração e amadurecimento, interações micorrízicas, sinalizadoras de estresses, fotomorfogênese, senescência foliar e etc. (Trigiano e Gray, 2010). Além dos fitohormônios existem os reguladores que são sintéticos, sendo mais resistentes à degradação enzimática e, portanto, apresentam maior eficácia.

Os reguladores podem ser divididos em nove categorias as giberelinas, o etileno (ou anti-etileno), o ácido salicílico, o ácido abscísico, os jasmonatos, as estrigolactonas, os brassinosteroides, as auxinas e as citocininas, sendo essas duas as mais comumente utilizadas no cultivo *in vitro* (Taiz *et al.*, 2017; Philips e Garda, 2019). As auxinas desempenham diversas funções como: o estímulo ao crescimento e a divisão celular, regulação do crescimento das gemas axilares, dominância apical, promove a formação de raízes, acelera ou retarda a abscisão dos frutos e embriogênese somática (Trigiano e Gray, 2010; Taiz *et al.*, 2017).

As auxinas mais utilizadas no cultivo *in vitro* são: ácido α -naftalenoacético (NAA) e o ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico (PICLORAM) (Gaspar *et al.*, 1996). O AIA é sintetizado naturalmente nas plantas a partir do triptofano (Taiz *et al.*, 2017).

O 2,4-D e o picloram são dois herbicidas sintéticos que em baixas concentrações mimetizam a auxina, esses dois herbicidas auxínicos são amplamente utilizados para induzir produção de calos e o enraizamento em espécies cultivadas *in vitro*, em muitas espécies os 2,4-D promoveu a indução da embriogênese somática, entretanto também a registros desta indução a partir do uso do Picloram (Philips e Garda, 2019).

As citocininas também são extremamente importantes no cultivo *in vitro*, elas promovem a divisão celular e a iniciação e crescimento de brotos *in vitro*, elas são derivadas da base nitrogenada púrica adenina. As citocininas mais comumente usados são zeatina, diidrozeatina, cinetina, 6-benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ) (Beyl, 2011). O BAP é uma das citocininas que são as mais testadas e apresenta os melhores resultados para a indução de brotos em segmentos nodais (Moura *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2018).

Além dos reguladores já conhecidos novos estudos estão surgindo na busca de outros reguladores um deles é a melatonina, que é encontrada em muitas espécies vegetais, e parece contribuir para uma maior tolerância ao estresse e recentemente vem sendo estudada como um possível regulador que estimula o crescimento de explantes *in vitro* (Murch e Saxena, 2002). A biossíntese da melatonina também está ligada a rota do triptofano, assim como as auxinas, estudos apontam para a sua ação na produção de brotos e principalmente no enraizamento (Murch e Saxena, 2002; Arnão e Ruiz, 2018; Duran, Kilic e Coskun, 2019; Mao *et al.*, 2020; Andrade, 2021; Neamah e Jdayea, 2022).

Contudo vale ressaltar que assim como todos os reguladores de crescimento a melatonina, as auxinas e citocinas suas funções e os seus efeitos dependem de suas diferentes combinações e concentrações, bem como sobre as espécies de plantas e o tipo de explante (Hemmati, Cheniany, Ganjeali, 2020).

3.7 Organogênese

A organogênese é o processo de regeneração de órgãos ou tecidos vegetais a partir de um explante submetido ao cultivo *in vitro*, que pode resultar na formação de uma nova plântula (Andrade, 2005). Para obtenção deste evento fisiológico *in vitro*, é necessário a ação de vários fatores e interações que vão desde o tipo do explante, meio de cultura, reguladores de crescimento, condições de luz e etc. (Alves *et al.*, 2004).

A organogênese pode se dar por duas vias: a direta que se origina-se a partir de gemas ou primórdios de gemas que são induzidos a regeneração de órgãos ou brotos diretamente do explante (Nogueira *et al*, 2007; Rodrigues *et al*, 2022). Em plantas que respondem bem a rota morfogênica direta os brotos adventícios podem ser formados a partir de diversos tipos de explantes (por exemplo, folhas, caules, pétalas de flores ou raízes (George *et al.*, 2007) (Figura 02).

Rotas morfogenéticas

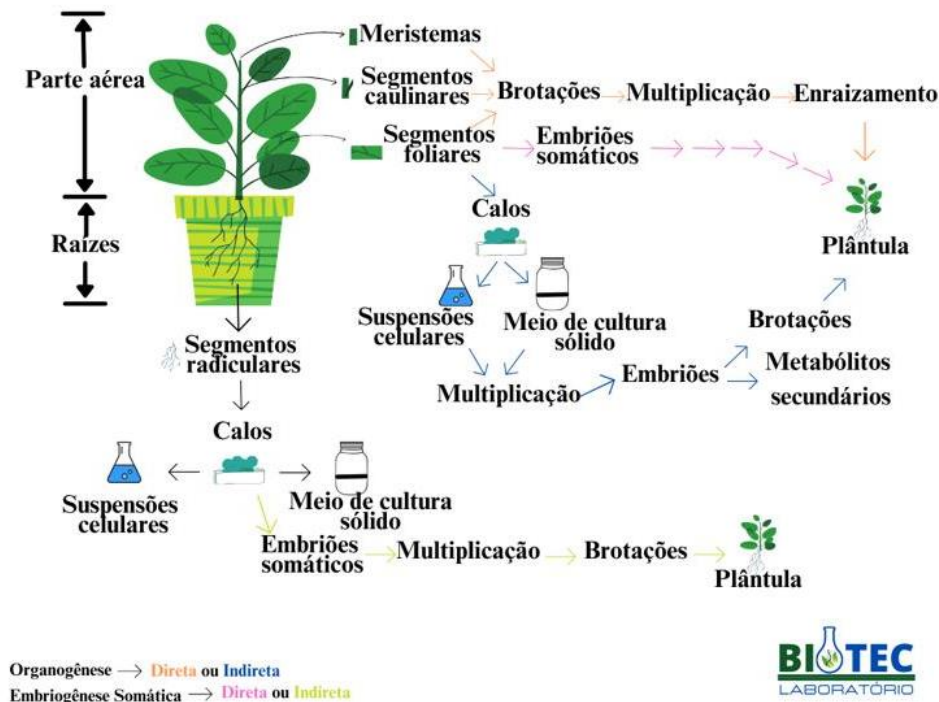
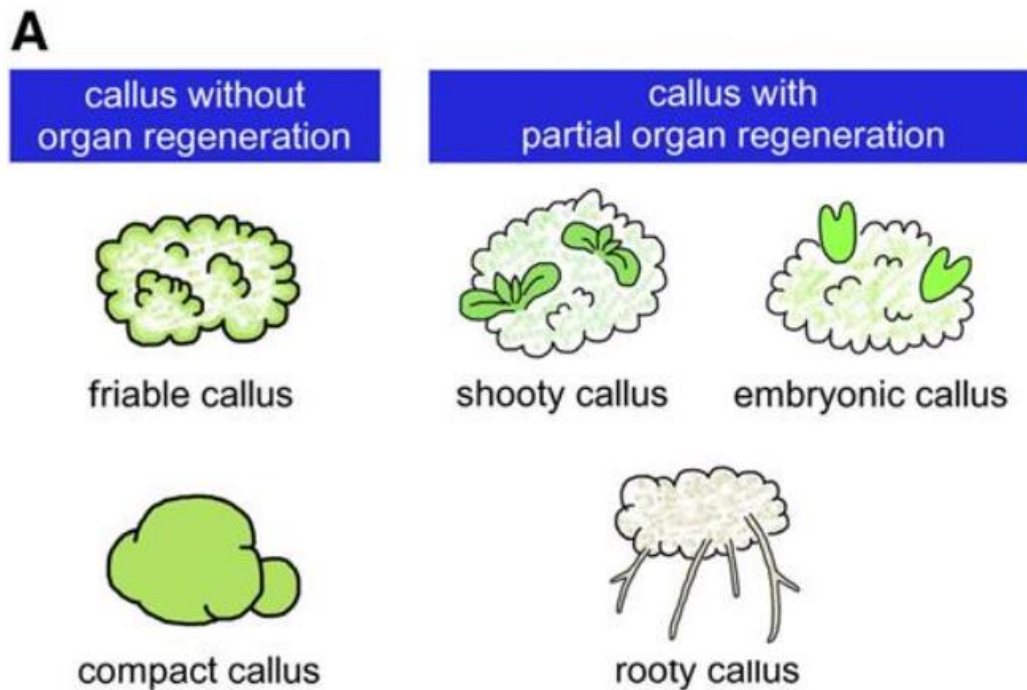


Figura 02: Processo da organogênese direta e indireta. Fonte: BIOTEC, 2024.

Além da via direta se tem a organogênese via indireta que se origina a partir da formação de massas celulares denominadas de calos e são induzidos ao processo de dediferenciação (Nogueira *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2022). Os calos são massas celulares formadas pela intensa de divisão de células no explante, que ocorrem quando são submetidos ao cultivo *in vitro* e expostos ou não aos reguladores de crescimento (Cordeiro *et al.*, 2007) (Figura 02). Esta via é mais complexa em virtude das variações somaclonais que podem ocorrer durante a formação dos calos, entretanto este método propicia o aumento da variabilidade genética e os brotos formados a partir deles não são clones como nas demais vias (George *et al.*, 2007).

Os calos podem ser considerados de diversos tipos como embriogênico, friável e compacto (Figura 3), o tipo formado vai depender do grau de diferenciação, idade da planta, tipo de explante e o meio e os reguladores (George *et al.*, 2007). Esses tipos podem ser identificados a partir da textura, análise histológica ou anatômica dos mesmos, além da coloração dos calos (Cordeiro *et al.*, 2007).



Representação dos tipos de calos formados. Fonte: IKEUCHI, SUGIMOTO E IWASE, 2013.

Contudo, para que ocorra o estabelecimento *in vitro* de calos, alguns passos devem ser seguidos: 1º – a indução via ativação do metabolismo para a dediferenciação e divisão celular; 2º - proliferação celular; e 3º - dediferenciação, onde as células crescem, apresentam maiores formações de vacúolos, reduzindo a taxa de divisão e com isso se tem um equilíbrio entre a divisão e a expansão celular (Souza *et al.*, 2018).

Os calos podem ser utilizados para diversas finalidades como: na geração de embriões somáticos; cultivo de células em suspensão; renovação de híbridos; análises de plantas transgênicas; provocação de variação somaclonal; além de propiciar um sistema *in vitro* sustentável na produção de compostos bioativos e de matéria-prima para investigações biológicas e fitoquímicas (Lima, 2020).

3.8 Cultivo *in vitro* de espécies florestais

O emprego do cultivo *in vitro* com espécies florestais vem sendo realizados desde 1940, com a utilização de gemas adventícias da espécie *Ulmus campestris* Huds, ao passar dos anos estudos voltados para estabelecerem foram realizados com inúmeras espécies florestais em

virtude da perda de genótipos por causa das ações antrópicas nas florestas (Debergh e Zimmerman, 1990; Pasqual *et al.*, 2012).

Entretanto as pesquisas para as espécies florestais ainda são baixas quando comparadas com as agronômicas, isso se deve em relação às dificuldades de trabalhar com material de plantas de campo e controle das condições ambientais que as mesmas são submetidas e a extrema contaminação por micro-organismos o que inviabiliza o estabelecimento *in vitro* (Alves *et al.*, 2018). Quando se restringem ao bioma Amazônia, as pesquisas são mais incipientes ainda (Pasqual *et al.*, 2012). Contudo trabalhos com espécies florestais amazônicas conseguiram estabelecer e padronizar protocolos de regeneração direta e indireta, como por exemplo nas seguintes espécies: *Carapa guianensis* Aublet; *Copaífera multijuga* Hayne; *Aniba roseadora* Ducke; *Astrocaryum aculeatum* Meyer; *Dipteryx Odorata* (Aubl.) Forsyth F; *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson e *Bagassa guianensis* Aubl. (Brandão, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Rocha, 2021; Rocha *et al.*, 2024).

Em virtude dessas lacunas nas espécies florestais amazônicas a micropropagação da *V. americana* pode se tornar uma excelente alternativa para superar gargalos existentes na sua conservação *ex situ*.

4 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

- ABERNETHY, K. et al. Current issues in tropical phenology: a synthesis. **Biotropica**, v. 50, n. 3, p. 477-482, 2018.
- ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. Embrapa network for brazilian plant genetic resources conservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 5, p. 350– 360, 2018.
- ALVES, J. R. et al. Assepsia de Sementes e Segmentos Nodais de *Eugenia Punicifolia* (Kunth) DC de Genótipos da Amazônia Brasileira e Avaliação das Taxas de Germinação In Vitro e Ex Vitro das Sementes desta Planta Medicinal. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 7, p. 56-68, 2018.
- ANDRADE, F. H. A. MELATONINA E AIB NO ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE CAFEEIRO ARÁBICA. 97F. 2021. TESE (Programa de pós-graduação em Agronomia), **Universidade Federal de Lavras**.
- ARAGÓN, L. E. The international dimension of the Amazon: a contribution for its interpretation. **Revista Nera**, n. 42, p. 14-33, 2018.
- ARAÚJO, M. da C. da R. et al. Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, 2021.
- ARARUNA, E. da C. et al. Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata* in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 1295-1300, 2017.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator?. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 38-48, 2018.
- ASMAR, S. A. et al. Características morfofisiológicas de bananeiras ‘Grande Naine’ aclimatizadas em resposta a utilização de silício in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 73-81, 2013.
- Amorim, L., Santos, B., Ferreira, R., Ribeiro, J., Dias, M., Brandão, I., Souza Jr., C., & Veríssimo, A. **Sistema de Alerta de Desmatamento (SAD)** – Março de 2023. Belém: Imazon, 2023.
- BEYL, C. A. PGRs and their use in micropropagation. *In: Plant tissue culture, development, and biotechnology*, Trigiano, R. N, Gray, D. J. ed. CRC Press, p. 33-56, 2011.
- BARLOW, J. et al. Anthropogenic disturbance in tropical forests can double biodiversity loss from deforestation. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 144-147, 2016.
- BORCHERT, R.; RIVERA, G. Photoperiodic control of seasonal development and dormancy in tropical stem-succulent trees. **Tree Physiology**, v. 21, n. 4, p. 213-221, 2001.
- BORCHERT, R. et al. Photoperiodic induction of synchronous flowering near the Equator. **Nature**, v. 433, p. 627-629, 2005.

- BRANDÃO, H. L. M.. Propagação in vitro de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau-rosa (*Aniba roseodora* Ducke). 97F. 2011. TESE (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia), **Universidade Federal do Amazonas**.
- BRAZ, L. C. et al. A situação das áreas de endemismo da Amazônia com relação ao desmatamento e às áreas protegidas. *Boletim de Geografia*, v. 34, nº 3, pag: 45-62, 2016.
- CABRAL, I. F. et al. Início e propagação de incêndio florestal: Estudo de caso na Unidade de Conservação Serra de Santa Barbara/MT. *Biodiversidade Brasileira*, v. 1, nº 135, 2019.
- CARMO, L. P. Efeito de bioestimulantes derivados de macroalgas na atenuação do estresse e propagação in vitro de *Comanthera mucugensis* (Giul.) LR Parra & Giul. 105F.2023. TESE (Programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais), **Universidade Estadual de Feira de Santana**, Feira de Santana, Bahia.
- CARVALHO, S. D. et al. In vitro propagation of the Amazonian medicinal plant guayusa (*Ilex guayusa*) and effects of light in the growth and development of this shade tolerant plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 147, p. 503-517, 2021.
- CASTELO, T. B. et al. Governos e mudanças nas políticas de combate ao desmatamento na Amazônia. *Revibec: revista de la Red Iberoamericana de Economía Ecológica*, v. 28, p. 0125-148, 2018.
- CHAMBERS, L. E. et al. Phenological changes in the southern hemisphere. *PloS one*, v. 8, n. 10, p. e75514, 2013.
- CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Indução de calos in vitro de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). *Plant Cell Cult. Micropropag.*, Lavras, v.3, n.1, p. 35-40, 2007.
- COPERTINO, M. et al. Desmatamento, fogo e clima estão intimamente conectados na Amazônia. *Ciência e Cultura*, v. 71, n. 4, p. 04-05, 2019.
- COSTA, A. DA S.; LAMEIRA, O. A. Avaliação do comportamento fenológico da *Copaifera martii* (Hayne) com dados climáticos em Floresta Secundária. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, p. e41810917973-e41810917973, 2021.
- COTA, M.M.T. *Vouacapoua in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83868>>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- CRUZ. C. C. et al. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, v. 2, n. 2, pag. 73-95, 2013.
- CRUZ, E.D.; PEREIRA, A.G. Germinação de sementes de espécies amazônicas: acapu 795 (*Vouacapoua americana* Aubl.). Comunicado técnico, 288, Embrapa Amazônia Oriental, p.4, 796 2016. Disponível em:< <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1059268>>. Acesso em 797 05/01/17

- SILVA, S. Cultivo in vitro de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson em diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina. **Scientia Amazonia**, v. 6, n.3, 128-133, 2017.
- DANTAS, A. dos S. Germinação de sementes e estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Libidibia Ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz. 52F. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Faculdade de Ciências Biológicas), Universidade Estadual do Amazonas.
- DARIO, F. R. **Processos ecológicos para recuperação de áreas degradadas**. Editora Senac São Paulo, 2022. 264p.
- DAVID, H. C. et al. The tropical biomass & carbon project—An application for forest biomass and carbon estimates. **Ecological Modelling**, v. 472, p. 110067, 2022.
- DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation**, 1ª Ed. Kluwer Academic Publishers, 1990. 474p.
- DE-SOUZA, R. et al. Growth regulators and their reflection on different hop genotypes cultivated under in vitro conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.
- DURAN, R. E.; KILIC, S.; COSKUN, Y. Melatonin influence on in vitro callus induction and phenolic compound production in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 468-475, 2019.
- DUTECH, C. et al. Tracking a genetic signal of extinction-recolonization events in a neotropical tree species: *Vouacapoua americana* Aublet in French Guiana. **Evolution**, n. 57, v. 12, p. 2753–2764, 2002.
- DUTECH, C.I; JOLY, H. I.; JARNE, P. Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guianan populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. **Heredity**, v. 92, n. 2, p. 69-77, 2004.
- ERLAND, L. A. E et al. A simple and efficient method for analysis of plant growth regulators: a new tool in the chest to combat recalcitrance in plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 131, p. 459-470, 2017.
- FERMINO, J. R. P. C. P. et al. Calogênese e organogênese in vitro a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Sm.) da Amazônia Ocidental: Estabelecimento e regeneração de brotos. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 900-904, 2007.
- FERREIRA, F. Análise da biopirataria de fitoterápicos na Amazônia Brasileira. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, p. 1-7, 2021.
- FONSECA, E. T. da. Indicador de madeira e plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: **Officinas Graphics**. Villas Boas & G. p.343, 1922.
- FONSECA, L. d’A. M. et al. análise da fenologia e da produtividade primária bruta de uma floresta alagável na Amazônia através do índice de vegetação melhorado (EVI). 2019. **In: Anais do simpósio brasileiro de sensoriamento remoto**. INPE, SANTOS-BRASIL.

FORGET, P-M. Ten-Ano seedling dynamics in *Vouacapoua americana* in French Guiana: a hypothesis. **Biotropica**, p. 124-126, 1990.

FOURNIER, L. A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, v. 24, n. 4, p. 422-423, 1974.

FOURNIER, L. A.; CHARPENTIER, C. E. El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones en el estudio de las características fenológicas de los árboles tropicales. **Turrialba**, v. 25, n. 1, p. 45-48, 1975.

GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GATTI, I. et al. In vitro tissue culture in breeding programs of leguminous pulses: use and current status. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, p. 543-559, 2016.

GEORGE, E. F. et al. **Plant propagation by tissue culture: volume 1**. The background. 3ª ed. Science & Business Media, 2007. 504p.

GOMES, F. J. A et al. Avaliação fitossociológica de um fragmento florestal em área urbana na transição Cerrado–Floresta Amazônica. **Nativa**, v. 10, n. 2, p. 211-218, 2022.

GOMES, J. M. et al. Regeneração Natural de Espécies Ameaçadas de Extinção em Áreas Experimentais na Amazônia Oriental. **Biodiversidade Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 1-11, 2021.

GONÇALVES, A. R. **Variabilidade genética e conservação de *Stryphnodendron adstringens* (leguminosae)**.90F. 2020. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas), **Universidade Federal de Goiás**.

GONÇALVES, B. H. L. **Avaliação fenológica e nutricional de três cultivares de abacateiro em clima subtropical do estado de São Paulo**. 124F. 2018. Tese (Programa de pós-graduação em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp -Campus de Botucatu.

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semi lenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC.(Myrtaceae). **Cerne**, v. 19, p. 77-82, 2013.

GOLLE, D. P. et al. Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, 2020.

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

HEMMATI, N.; CHENIANY, M.; GANJEALI, A. Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. **Botanica serbica**, v. 44, n. 2, p. 163-173, 2020.

HUSSAIN, A. et al. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *In*: **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. Ed. IntechOpen, 2012. p. 1-28.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The plant cell**, v. 25, n. 9, p. 3159-3173, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Estimativa de desmatamento por corte raso na Amazônia Legal para 2021 é de 13.235 km²**. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Brasil, 2022.

IUCN 2024. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. DISPONÍVEL EM: <http://www.iucnredlist.org>. ACESSO EM 24 Jun. 2024.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, p. 275-279, 2010.

KAEPPLER, Shawn M.; KAEPPLER, Heidi F.; RHEE, Yong. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant gene silencing**, p. 59-68, 2000.

KUSHNARENKO, S. et al. Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 6, p. 964-971, 2022.

LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In vitro cellular & developmental biology-Plant**, v. 41, p. 345-363, 2005.

LEITE, A. M. C.; LLERAS, E. Areas prioritarias na amazonia para conservacao dos recursos geneticos de especies florestais nativas: fase preliminar. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**-Artigo em periódico indexado (ALICE), 1993.

LEMOS, A. L. F.; SILVA, J. de A. Desmatamento na Amazônia Legal: evolução, causas, monitoramento e possibilidades de mitigação através do Fundo Amazônia. **Floresta e Ambiente**, v. 18, n. 1, p. 98-108, 2011.

LEMOS, E. E. P. de et al. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1359-1364, 2002.

LIETH, H. Introduction to phenology and the modeling of seasonality. In Phenology and seasonality modeling (H. Lieth, ed.). **Ecological Studies**, Springer-Verlag, Berlin, v.8, pag: 3-19, 1974.

LIMA, L. M. Cultura de tecidos vegetais in vitro de *Vismia japurensis* Reichardt (Hypericaceae). 123F. 2020. Dissertação (Programa Integrado de Pós-Graduação em Botânica), **Instituto de Pesquisas Amazonicas (INPA)**.

LIMA, M. R. S. GEOPOLÍTICA DA AMÉRICA DO SUL. *In*: ACÁCIO, I. D. P. et al. **Atlas da política brasileira de defesa**, 1ª ed, CLACSO. 2017. p. 52-69.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators'** vol. 30, 421-427 1980.

LOBERANT, B; ALTMAN, . Micropropagation of plants. **Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology**. Wiley, New York, p. 3499-3515, 2010.

LOCATELLI, E.; MACHADO, I. C.; MEDEIROS, P. Saranthe klotzschiana (Koer.) Eichl.(Marantaceae) e seu mecanismo explosivo de polinização. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, p. 757-765, 2004.

LORENZI, H. 1989.**Arvores Brasileiras**. Ed. 2ª . Plantarum, São Paulo, 384p.

LOUREIRO, A. L.; SILVA, M. F. 1968. **Catálogo das madeiras da Amazônia**. Belém, V. 2 ed. SUDAM, pag. 333.

LONG, Y. et al. New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. **Frontiers in plant science**, v. 13, p. 926752, 2022.

LUIZÃO, F. J. Ciclos de nutrientes na Amazônia: respostas às mudanças ambientais e climáticas. **Ciência e Cultura**, v. 59, n. 3, p. 31-36, 2007.

MAESTRI, M. P. et al. Community Forest Management of the Virola Jatobá Sustainable Development Project:: Scenarios for the Exploration of Vouacapoua americana Aublet. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, n. 1, 2021.

MAO, J. et al. Melatonin promotes adventitious root formation in apple by promoting the function of MdWOX11. **BMC Plant Biology**, v. 20, p. 1-11, 2020.

MAUÉS, M. M.; MCQUEEN, D.; SANTOS, L. F. Biologia da polinização do cumaru (*Dipteryx odorata*, Leg. Pap.), essência florestal nativa da Amazônia. **In: SIMPÓSIO SILVICULTURA NA AMAZÔNIA ORIENTAL: contribuições do Projeto EMBRAPA/DFID (1999, Belém, PA). Resumos expandidos...** Belém: Embrapa-CPATU/DFID. Pag: 116-120, 1999.

MELLO, T. et al. Establishment and in vitro morphogenesis of sapucaia explants (*Lecythidaceae*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 56, p. 882-893, 2020

MEZZALIRA, F. K.; KUHN, B. C. Padronização de um protocolo para assepsia de segmentos nodais de *Phalaenopsis* para clonagem in vitro. **Colloquium Agrariae**, v.17, n. 01, pag:10-17, 2021.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **PORTARIA MMA Nº 443, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014**. Disponível em:

http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf. Acesso em: Maio de 2022.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Amazônia**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-ecossistemas/ecossistemas/biomas/amazonia>>. Acesso em: maio 2024.

- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **PORTARIA MMA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022**. Disponível em:
<https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf>
Acesso em: Maio de 2022.
- MITTERMEIER, R. A. et al. Wilderness and biodiversity conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10309-10313, 2003.
- MORELLATO, L. P. C.; CAMARGO, M. G. G. GRESSLER, E. **A review of plant phenology in South and Central America**. In: SCHWARTZ, M. D. Phenology: an integrative environmental science. 2. ed. Springer, p. 91-113, 2013.
- MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO, F. H. F. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta semidecídua na Serra do Japí, Jundiá, São Paulo. **Revista brasileira de Biologia**, v. 50, n.01, p. 163-173, 1990.
- MORELLATO, L. P. C. et al. Linking plant phenology to conservation biology. **Biological conservation**, v. 195, p. 60-72, 2016.
- MORELLATO, L. P. C. et al. Applications of circular statistics in plant phenology: a case studies approach. In: **Phenological research**. Springer, Dordrecht, 2010. p. 339-359.
- MORETO, R. F. et al. Potencial das geotecnologias para monitoramento do impacto da colonização na floresta nativa na microbacia do rio Enganado, Amazônia Ocidental, Brasil. **Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, n. 7, p. 1-12, 2021.
- MOURA, L. C. de et al. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 47, p. 1691-1698, 2012.
- MURCH, S J.; SAXENA, P. K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development?. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, p. 531-536, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.
- NEAMAH, S. I. et al. Positive response of *Hyoscyamus pusillus* callus cultures to exogenous melatonin on biochemical traits and secondary metabolites under drought conditions. **International Journal of Agronomy**, p. 1-10, 2022.
- NEVES, E. L.das. et al. Comportamento fenológico de três espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) da Caatinga, semi-árido do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, p. 155-166, 2010.
- NEVES, R. S. et al Análise da produção bibliográfica sobre hidrologia florestal no bioma amazônico. **Revista Sítio Novo**, v. 4, n. 4, p. 133-140, 2020.
- NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W.; BAKER, H. G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, p. 141-159, 1994.

- NICK, C. et al. **Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos**. In: PEREIRA, T. N. S. Germoplasma: Conservação, manejo e uso no Melhoramento de Plantas. Viçosa, MG, Arca, pag. 59-88, 2010.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 48-50, 2007.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 366-370, 2007.
- OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M; ALOUFA, M. A. I. Influência de reguladores de crescimento e do tipo de explante na morfogênese in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 6, n. 4, p. 60-74, 2019.
- OLIVEIRA, M. S. et al. Conhecimento e Uso Tradicional das Espécies Madeiras e Medicinais Utilizadas no Município de Aldeias Altas, Maranhão, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, pag: 1160-1173, 2016.
- OSANI, O. M.; PANDE, V.; NAILWAL, T. K. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 7, n. 7, p. 3778-3786, 2018.
- PARÁ. Secretaria de Estado de Meio Ambiente. **Extração e movimentação de toras de madeira nativa**. 2010. Disponível em:
<file:///C:/Users/Francinei%20Vulc%C3%A3o/Downloads/Extracao%20e%20Comercio%20de%20Toras%20de%20Madeira%20Nativa%20por%20Municipio%20consolidado.pdf
>Acesso: 26/06/2022.
- PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature**, [s.l.], v. 421, n. 6918, p. 37-42, 2003.
- PAIVA, R. PAIVA, P. D. O. **Cultura de Tecidos**. Ed. UFLA, 2001, 97p.
- PASQUAL, M. A. E., et al. Tissue Culture Techniques for Native Amazonian Fruit Trees. In: **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. pag 162-164, InTech, (2012). 504p.
- PAU, S. et al. Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. **Global change biology**, v. 17, n. 12, Pag: 3633-3643, 2011.
- PFLÜGER, F. J.; SIGNER, J; BALKENHOL, N. A perda de habitat causa erosão genética não linear em espécies especializadas. **Ecologia e Conservação Global**, v. 17, p.507, 2018.
- PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019.
- QUISEN, R. C. ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 44 p. 2008.

- RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African J. Biotech.* V. 3, n. 2, pag: 136–145, 2004.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, p. 657-664, 2015.
- ROMO-PAZ, F. de J. et al. Micropropagation of *Physalis angulata* L. and *P. chenopodiifolia* Lam.(Solanaceae) via indirect organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 59, n. 4, p. 497-506, 2023.
- REICH, P. B.; BORCHERT, R. Water Stress and Tree Phenology in a Tropical Dry Forest in the Lowlands of Costa Rica. **Journal of Ecology**, v. 72, n. 1, p. 61-74, 1984.
- ROCHA, T. T. et al. Diferentes Explantes e Reguladores de Crescimento na Indução de Calos em *Dipteryx Odorata* (Aubl.) Forsyth F. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 12–16, 2024.
- ROCHA, T. T. et al. Estabelecimento in vitro de *Bagassa guianensis* Aubl. a partir de explantes foliares. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 03, 2021.
- RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação in vitro de tucumã do Amazonas. **Ciência Rural**, v. 43, p. 55-59, 2011.
- RODRIGUES, M. A. et al. Regeneração de pitaya por organogênese indireta avaliada por microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 57, n. 5, p. 01-23, 2022.
- ROJAS, J. B. S. Estabelecimento in vitro e avaliação química de *Jatropha gossypifolia* L. 133F. 2024. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia). **Universidade Federal do Amazonas**.
- SABATIER, D. Saisonnalité et déterminisme du pic de fructification en forêt guyanaise. **Revue d'Ecologie**, v. 2, n. 40, p. 289 - 320, 1985.
- SAKAI, S; KITAJIMA, K. Tropical phenology: Recent advances and perspectives. **Ecological Research**, v. 34, n. 1, p. 50-54, 2019.
- SINGH, C. R. Review on problems and its remedy in plant tissue culture. **Asian J. Biol. Sci**, v. 11, n. 4, p. 165-172, 2018.
- SILVA, J. P. et al. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Rosa* sp. *Revista Agroecossistemas*, v. 9, n. 2, p. 370-380, 2018.
- SILVA, L. C. da et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento in vitro de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SILVA, N. A. et al. Ácido ascórbico e carvão ativado no controle de oxidação fenólica em explantes de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. **In: 9º Congresso Florestal Brasileiro**. p. 556-558. 2022.

SILVA, R. A. R. Ecologia reprodutiva, diversidade genética e sistema reprodutivo de *Copernicia prunifera* (ARECACEAE). 52F.2017. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em ciências florestais). **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**.

SILVA, S. M. M. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de bambu do gênero *Guadua* na região sul-ocidental da Amazônia. 116F. 2019. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE), **Universidade Federal do Acre**.

SOPHIA, G. M. Modelagem da relação entre fenologia foliar e hidráulica das plantas na floresta Amazônica: uma abordagem trait-based dos efeitos da precipitação reduzida. 99F. 2021. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ecologia) **Universidade Estadual Paulista**.

SOUZA, A. C. Crescimento e desenvolvimento inicial de mudas de *Vouacapoua americana* Aubl. em função de fertilizante de liberação controlada. 29F. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso, **Universidade Federal Rural da Amazônia**, 2022.

SOUZA, J. C. de et al. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269-280. 2018.

SOUZA, L. A. G. de. Acapu (*Vouacapoua americana*). In: CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R.; 834 SAMPAIO, P. de T. B. (Ed.). **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de 835 utilização**. Manaus: INPA: SEBRAE. p. 317-324, 1999.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. Artmed Editora, 888p. 2017.

TALORA, D. C.; MORELLATO, P. C. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 23, p. 13-26, 2000.

TANNUS, J. L. S. et al. Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina – SP. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 3, p. 1-27, 2006.

TOSTO, S. G. et al. O Projeto ASEAM: construção do conhecimento e sistematização de experiências sobre valoração e pagamento por serviços ecossistêmicos e ambientais no contexto da agricultura familiar amazônica, *In: NOGUEIRA-JUNIOR, L.R, et al 2022. Serviços ecossistêmicos e pagamento por serviços ambientais: aspectos teóricos e estudo de caso*. Embrapa, 2022, p.36-49.

TRIGIANO, R. N; GRAY, D. J. **Cultura, desenvolvimento e biotecnologia de tecidos vegetais**. 1ª ed. Imprensa CRC. 608p. 2010. <https://doi.org/10.1201/9781439896143>

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular biotechnology**, v. 37, p. 169-180, 2007.

THORPE, T. A. et al. Application of micropropagation to forestry. *In: Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. p. 311-336.

VIÉ, J. C.; CRAIG H. T; SIMON, N. S. **Wildlife in a changing world: an analysis of the 2008 IUCN**. Red List of threatened species. IUCN, 2009. 180p.

VISSER, M. E. Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1635, p. 649-659, 2008.

WILLIAMS-LINERA, G.; MEAVE, J.A. Patrones fenológicos de bosque lluvioso neotropical de bajura. In *Ecología de bosques lluviosos Neotropicales* (M. Guariguata & G. Kattan, eds.). **Libro Universitario Regional**, Costa Rica, pag:407-431, 2002.

WRIGHT, S.J.; CALDERON, O. **Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies**. **Journal of Ecology**, V.83, pag:937-948, 1995.

Capítulo 01 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO FENOLÓGICO DE *Vouacapoua americana* Aubl.

Resumo: Os estudos fenológicos são essenciais para o entendimento da estrutura e dinâmica da comunidade florestal e na compreensão da influência do clima nas espécies vegetais. Florestas tropicais como a Amazônia, apresentam uma imensa biodiversidade de espécies vegetais, principalmente lenhosas. Uma destas é *Vouacapoua americana*, popularmente conhecida como Acapu, que é uma espécie ameaçada de extinção, que possui um importante potencial econômico. O objetivo da presente pesquisa é avaliar o comportamento fenológico, durante um período de sete anos (2016-2022) e sua correlação com as variáveis ambientais. Foram avaliados 35 indivíduos mensalmente, através do método de observação da copa, as fenofases reprodutivas: botão floral, antese, frutos imaturos, maduros e dispersão. E as fenofases vegetativas: abscisão e brotamento foliar. Para a análise fenológica foi utilizado os testes de Análises dos Componentes Principais, análise Circular e o teste de Rayleigh, todos realizados no software R. Em fenologia os resultados evidenciaram uma correlação positiva para as fenofases reprodutivas com precipitação e umidade relativa e uma alta intensidade ocorrendo no período de maior precipitação pluviométrica, que são os meses de janeiro a abril. As fenofases foliares tiveram a sua maior intensidade com o período seco e uma correlação positiva com insolação e temperatura. Acapu demonstrou ser uma espécie sazonal e anual, sendo assim tais informações auxiliarão nos programas de conservação *ex situ* e *in situ*, e no uso sustentável da espécie.

Palavras-chave: Amazônia, Espécie ameaçada, Fenofases.

1. INTRODUÇÃO

A fenologia é uma ciência que estuda os eventos cíclicos biológicos vegetais, focada na previsão e monitoramento destes e suas relações com os fatores bióticos e abióticos (Lieth 1974; Morellato e Leitão, 1990, Assato *et al.*, 2023).

Informações dos padrões fenológicos são valiosas para estudos botânicos, principalmente nas relações planta-planta, tendo em vista que as mesmas podem competir por recursos hídricos e nutritivos, além de polinizadores e dispersores (Talora e Morellato, 2000; Neves *et al.*, 2010).

Nos últimos anos estudos fenológicos vêm recebendo posição de destaque principalmente em assuntos como mudanças climáticas globais, devido aos ciclos biológicos como frutificação, floração, brotamento e abscisão foliar serem interligados a variáveis ambientais como precipitação, fotoperíodo, umidade relativa do ar, intensidade de radiação etc. o que os tornam ótimos indicadores de respostas a essas mudanças (Alencar, 1994; Silva, 1998; Oliveira *et al.*, 2016; Abernethy *et al.*, 2018, Cerro e Holloway, 2020).

Estes eventos de mudanças na temperatura ocasionam também alterações nos ciclos hidrológicos, pois, reduzem as taxas de evapotranspiração da floresta e com isso interferem nos níveis de precipitação (Copertino *et al.*, 2020). Morellato *et al.*, (2016) ressaltam que o aquecimento global já ocasionou mudanças na distribuição das espécies e em seu modo de reprodução, sendo assim a fenologia desempenha um papel fundamental na modulação de processos ecossistêmicos (Cerro e Holloway, 2020).

Por outro lado, é importante salientar que algumas espécies não são totalmente influenciadas pela precipitação e sim por sua tolerância hídrica ou fotoperíodo, tornando estas variáveis importantes na descrição do tempo, periodicidade e sincronia de eventos reprodutivos da espécie (Reich e Borchert, 1984; Borchert, *et al.*, 2005; Morellato *et al.*, 2016). Em razão destes fatores os padrões fenológicos podem ser sazonais ou não, geralmente em florestas tropicais em virtude da falta de estações bem definidas, determinar os ciclos fenológicos são bem mais complexos do que em florestas temperadas (Pau *et al.*, 2011).

A maioria das espécies tropicais não apresentam sincronicidade em seus eventos fenológicos, ou são de difícil reconhecimento (Bencke e Morellato, 2002). Um exemplo é a floresta Amazônica em que geralmente as suas espécies não apresentam um padrão e as florações podem ocorrer no período seco, ou entre o período de transição da estiagem e o

chuvoso, porém as frutificações da maioria das espécies tendem a serem sazonais (Morellato; Camargo; Gresler, 2013).

Além da falta de sazonalidade, as mudanças na temperatura e níveis de precipitação ao longo dos anos estão afetando a Amazônia que é a maior floresta tropical do mundo. A mesma está entrando em um novo sistema de clima, sendo mais quente, com a predominância de estações mais secas e prolongadas (Lima *et al.*, 2017; Copertino *et al.*, 2020; Ferreira, 2021; Moreto *et al.*, 2021, Tosto *et al.*, 2022).

Ao considerarmos as informações supracitadas, estudos fenológicos de espécies florestais amazônicas são extremamente importantes, uma vez que estas espécies podem apresentar uma regularidade ou não em seus ciclos biológicos, além das divergências que ocorre entre e dentre as espécies e as populações conforme o ecossistema em que estão inseridas (Silva e Lameira, 2021).

Uma espécie florestal amazônica bastante conhecida e com estudos fenológicos escassos é *Vouacapoua americana* Aubl., uma representante da família Leguminosae conhecida popularmente como Acapu (Maestri *et al.*, 2021). É uma espécie arbórea de terra firme, que pode chegar até 30 metros de altura, sendo uma espécie emergente de dossel, apresenta padrão de distribuição agregado, inflorescências amareladas e sistema reprodutivo misto e seu fruto contém uma única amêndoa grande, sua dispersão primária é barocórica e a secundária zoocórica (Lorenzi, 1998; Sabatier, 1985; Forget, 1990; Gomes *et al.*, 2021).

A mesma foi e é uma espécie bastante explorada devido as características nobres de sua madeira (MMA, 2022; Pereira Junior *et al.*, 2023), garantindo seu uso nas industriais moveleiras, navais e de construção civil (Loureiro *et al.*, 1978; Loureiro *et al.*, 1979 e Fonseca, 1922). Atualmente *V. americana* compõe a lista vermelha da IUCN com classificação CR (criticamente em perigo de extinção) (IUCN, 2022).

Em relação ao seu padrão fenológico a literatura apresenta dados que divergem entre si, considerando uma espécie bianual com períodos reprodutivos na estação seca (Sabattier, 1985; Batista *et al.*, 2020). Neste estudo, caracterizamos os padrões fenológicos reprodutivos e vegetativos de *Vouacapoua americana* em um ambiente de floresta nativa. Mais especificamente pretendemos responder às seguintes questões: (i) Como a frequência e a duração das fenofases reprodutivas e vegetativas variam ao longo do ano? (ii) As fenofases fenológicas exibem correlação com os fatores abióticos de temperatura, precipitação e umidade relativa?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO FENOLÓGICA

2.3 Área de estudo

As áreas de coleta e estudo foram no município de Vitória do Xingu - PA, em uma área que fica localizada próximo ao reservatório da usina hidrelétrica de Belo Monte. Na região a precipitação média anual fica em torno de 1914mm e a temperatura média por volta 28°C (INMET, 2022). Os maiores índices pluviométricos e a maior umidade relativa do ar concentram-se entre os meses de janeiro a março (período chuvoso) e o período mais seco ocorre nos meses de julho a outubro (Figura: 01). O clima é classificado como Am (Monção) de acordo com a escala de Köpen.

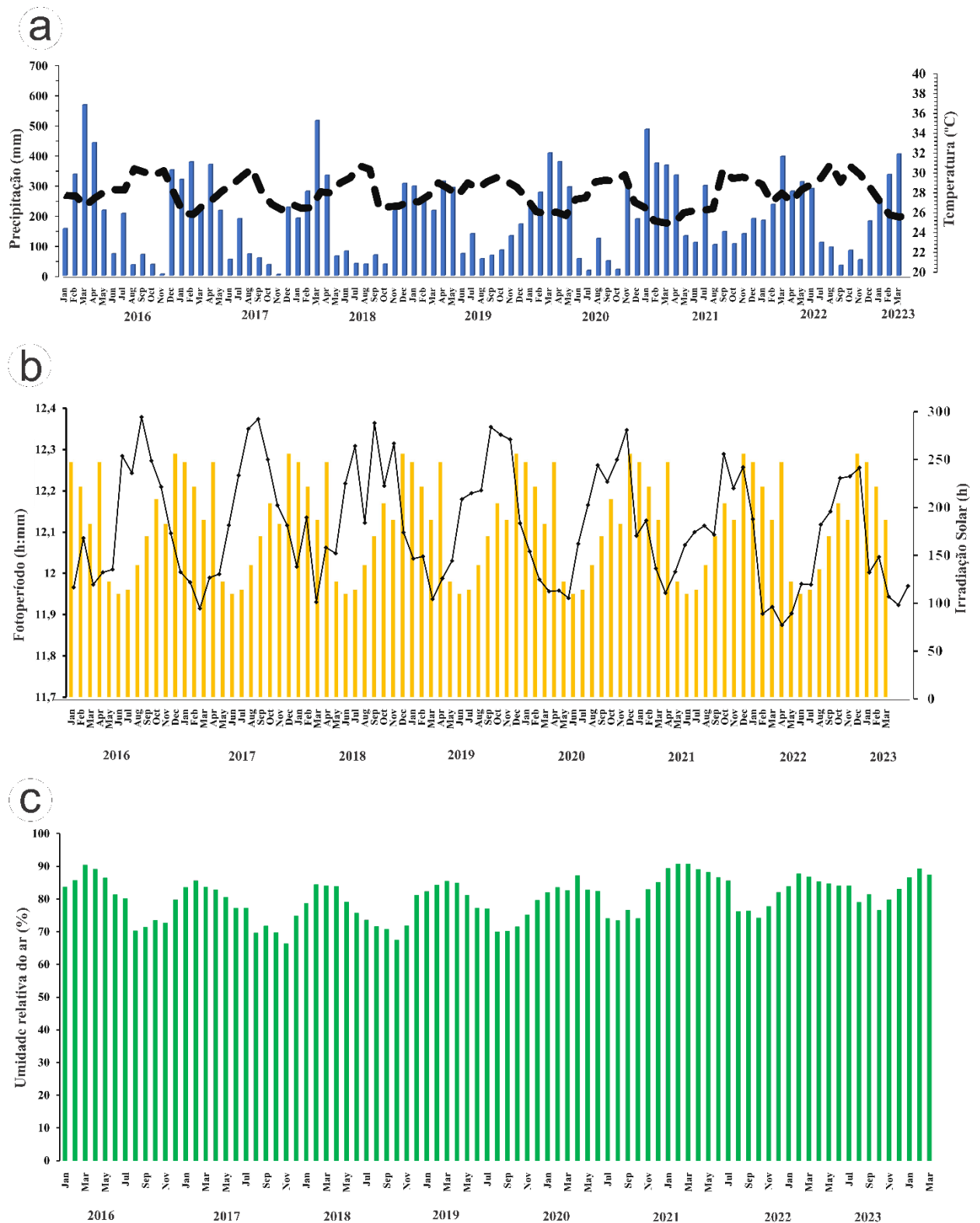


Figura 1. Medições mensais de precipitação e temperatura (janeiro de 2016 a Março de 2023). Precipitação total e temperaturas médias mensais a partir de janeiro 2016 a março de 2023 no município de Vitória do Xingu, Área de influência da Usina Hidrelétrica de Belo Monte, Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Altamira. a) barras: precipitação (mm). Linha: temperatura (°C). b) barras: fotoperíodo (h). Linha: insolação (h). c) barras: Umidade relativa do ar (%).

Os dados climáticos da precipitação total mensal, temperaturas médias mensais, umidade relativa do ar média mensal, média mensal radiação solar, foram obtidos no banco de

dados do INMET da Estação Meteorológica de Altamira-Pará (3° 11' 41" S 52° 12' 33"W), altitude 109m.

2.3 Fenologia

Para a avaliação fenológica da espécie de *V. americana* foi adotado o método qualitativo que indica a presença e ausência do evento fenológico e consiste na observação direta da copa da árvore com o auxílio de um binóculo com ampliação de 10X (CABRERA; ROBERTO; ZHOFRE, 2018). A partir deste método tem-se a possibilidade de em nível populacional, indicando a quantidade de indivíduos da população que está em determinada fenofase, permitindo assim inferir sobre o índice de atividade (porcentagem de indivíduos) na comunidade (sincronia intraespecífica) (MORELLATO et al, 1990 e NEWSTROM et al, 1994). Os padrões foliares foram descritos segundo Frankie et al. (1974) e os reprodutivos de acordo com Newstrom et al. (1994).

Os dados fenológicos foram fornecidos pela empresa Norte Energia S.A. que realizaram as avaliações mensais durante o período de 2016 a 2022, como requisito ao Projeto Ambiental da Usina Hidrelétrica Belo Monte. Foram selecionadas 35 matrizes a partir destes dados, no qual foram acompanhadas posteriormente pelos autores para a suplementação dos dados, para confirmação da espécie exsicatas de alguns indivíduos foram depositadas no herbário Padre José Maria de Albuquerque, com o número de registro HATMa002320 e no Sisgen com o número A3B5089.

2.4 Análises de dados fenológicos

A interação das fenofases com as variáveis ambientais foram analisadas usando a Análise de Componentes Principais (PCA), para avaliar a relação das fenofases estudadas e os fatores ambientais considerados (precipitação, temperatura, umidade relativa do ar, radiação solar). As análises foram realizadas usando o software R, versão 4.3.0, com a adição do pacote “FactorMiner” (R Core Team 2023).

A sazonalidade dos dados fenológicos foi avaliada com base nas estatísticas circulares, estas são as melhores na visualização e no entendimento dos condutores de eventos fenológicos em florestas tropicais (David *et al.*, 2022), os meses do ano foram convertidos em intervalos angulares de 30°, indo de 0° (janeiro) a 330° (dezembro) (Morellato *et al.*, 2010, David *et al.*, 2022). Para a fenofase, calculou-se o ângulo médio, o desvio padrão angular, o comprimento do vetor r e o teste de Rayleigh (z) para determinar se as datas demonstraram uniformidade nas distribuições ao longo do ano (Zar, 2010). Foi utilizado o software R, com a adição da versão de pacote “circular” (R Core Team 2023).

A versão do artigo em inglês foi submetida na revista “Plant Species Biology” - <https://esj-journals.onlinelibrary.wiley.com/journal/14421984>

4. RESULTADOS

A análise de componentes principais (PCA), que retrata manifestação dos eventos fenológicos de *V. americana*, e sua interação com as variáveis ambientais são representados na figura 02. Nota-se que estes eventos apresentaram um padrão de distribuição sazonal quando comparados as variáveis ambientais, e isso se deve a proporção de explicação dos eixos que deram 59,7% da variação total, sendo que o primeiro eixo contribuiu com 49,3% (PC1) e o segundo eixo (PC2) com 16,3%.

No primeiro eixo conseguimos observar a relação das fenofases reprodutivas com as seguintes variáveis ambientais insolação, temperatura, precipitação e umidade relativa, no segundo eixo temos a interação com o fotoperíodo (Figura 02). As fenofases botão floral, antese, frutos imaturos tiveram uma correlação positiva com precipitação e umidade relativa do ar, isso se deve em decorrência da proximidade em que as fenofases e as variáveis ambientais foram plotadas no eixo 1(PC1).

Ao observarmos o comportamento das fenofases reprodutivas e suas correlações com as variáveis insolação e temperatura nota-se uma relação negativa, na medida que aumenta a temperatura e a insolação as fases reprodutivas diminuem (Figura 02). Quanto o fotoperíodo a sua contribuição maior foi com o segundo eixo (PC2), teve uma correlação positiva com os eventos fenológicos reprodutivos, porém esta foi baixa devido a distância que o mesmo foi plotado no eixo (Figura 02). O mesmo padrão é encontrado para frutos maduros, divergindo apenas em que ocorreu uma correlação mais fraca entre as variáveis apresentadas anteriormente e a fenofase (Figura 02).

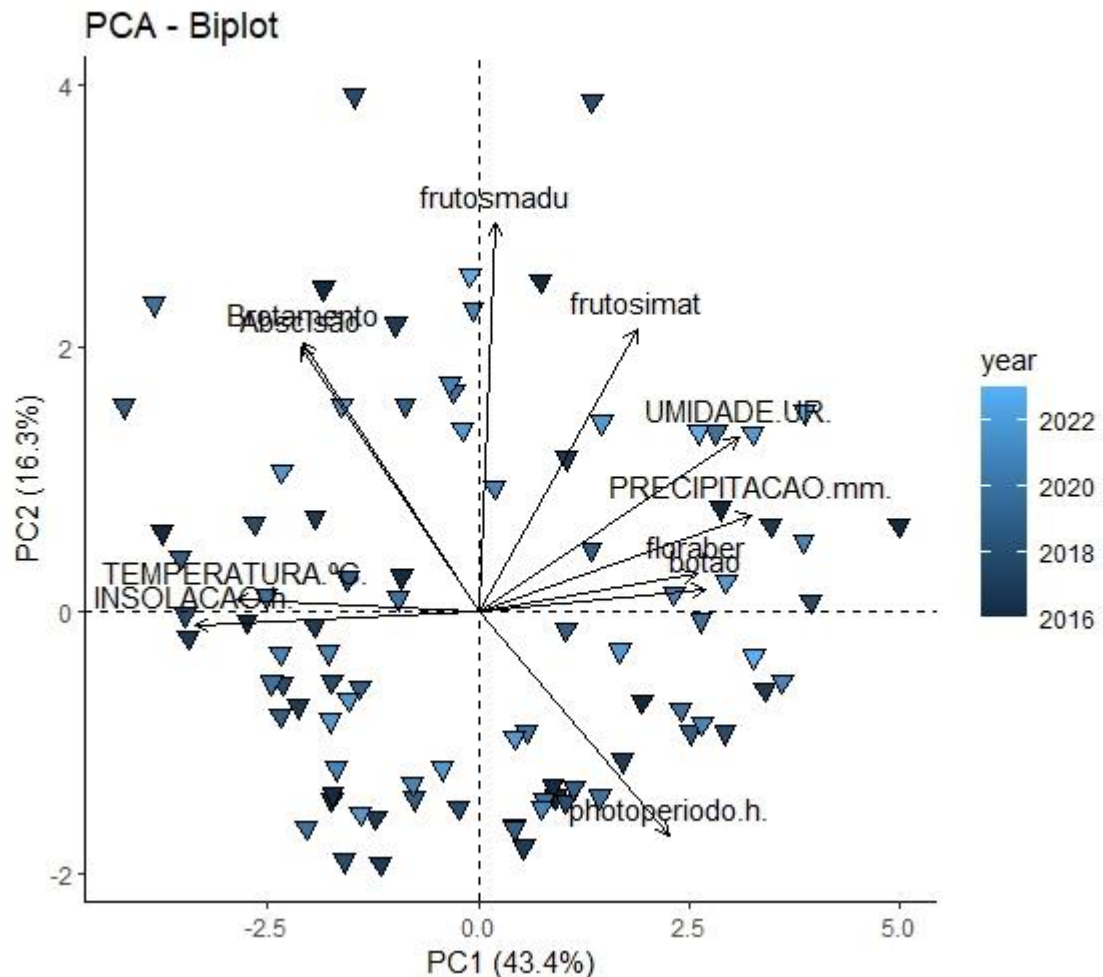


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) das fenofases foliares e reprodutivas e suas interações com as variáveis ambientais de planta *Vouacapoua americana*. O primeiro eixo explica 43,4% e o segundo eixo 16,3% da variância dos dados. Os triângulos invertidos representam os anos de avaliação (2016-2022).

As fenofases foliares abscisão e brotamento também contribuíram para o eixo 1 (PC1) e PC2, porém devido o brotamento ocorrer logo em seguida a abscisão ambas se sobrepuseram. As fenofases foram correlacionadas positivamente com insolação e temperatura e negativamente com fotoperíodo, precipitação e umidade relativa do ar (Figura 02).

Os testes de estatística circular evidenciam qual foi o período em que a espécie apresentou a fenofase reprodutiva concentrada, o mesmo indica uma forte sazonalidade para as fenofases de botão floral, flor aberta para o período chuvoso, sendo significativa pelo teste de Rayleigh ($P < 0,01$) (Tabela 01). Devido as suas datas médias de pico serem entre os meses de fevereiro e março, observa-se também que ao longo dos anos esses picos foram poucos alterados (Tabela 01), porém como observados nos histogramas da figura 03, nota-se um decréscimo da quantidade de indivíduos que entraram nesta fenofase.

Tabela 01. Estatística circular da fenologia da floração e frutificação (presença e ausência) de *Vouacapoua americana* Aubl. em uma área de floresta amazônica de influência direta pela usina hidrelétrica de Belo Monte, em Vitória do Xingu – Pará.

FENOFASES	Ano	Data média	Ângulo médio	Comprimento do vetor (r)	Desvio Padrão Angular
BOTÃO FLORAL	Ano 1	16 – Fev	46,78°	0,94*	20,06°
	Ano 2	15 – Fev	45,99°	0,95*	17,37°
	Ano 3	17- Fev	47,67°	0,93*	20,62°
	Ano 4	03 – Fev	33,10°	0,97*	13,35°
	Ano 5	09 – Fev	39,10°	0,90*	25,45°
	Ano 6	16 – Fev	46,30°	0,91*	24,16°
	Ano 7	16 – Fev	46,70°	0,96*	14,99°
FLORAÇÃO	Ano 1	27- Fev	57,89°	0,97*	13,66°
	Ano 2	23 – Fev	53,13°	0,97*	53,13°
	Ano 3	25- Fev	55,98°	0,95*	12,69°
	Ano 4	01 – Fev	31,96°	0,97*	13,20°
	Ano 5	12 – Fev	42,49°	0,95*	20,60°
	Ano 6	20 – Fev	50,44°	0,91*	23,87°
	Ano 7	15 – Fev	45,80°	0,96*	15,06°
FRUTOS IMATUROS	Ano 1	14 – Abr	103,37°	0,82*	35,10°
	Ano 2	22- Mar	80,98°	0,74*	43,73°
	Ano 3	09 – Abr	98,23°	0,94*	19,18°
	Ano 4	18 – Mar	76,34°	0,95*	17,73°
	Ano 5	18 – Mar	76,47°	0,91*	24,77°
	Ano 6	28 – Mar	86,47°	0,85*	31,93°
	Ano 7	07 – Fev	37,76°	0,79*	38,39°
FRUTOS MADUROS	Ano 1	02 – Jun	151,91°	0,79*	38,33°
	Ano 2	16 – Mai	135,57°	0,89*	27,04°
	Ano 3	22- Abr	111,13°	0,93*	20,70°
	Ano 4	01 – Mai	120,00°	0,91*	24,78°
	Ano 5	21 – Abr	110,79°	0,91*	30,38°
	Ano 6	19 – Mai	138,23°	0,86*	35,30°
	Ano 7	22 – Mar	80,03°	0,90*	25,62°

*Rayleigh test (P<0,01)

Para as fenofases de frutificação os histogramas circulares nos permitem identificar que para frutos imaturos o pico variou ao longo dos anos nos meses de fevereiro, março e abril (Figura 03). Em frutos maduros o pico ocorreu no período de transição do chuvoso para o de estiagem, sendo junho o início do período seco (Figura 03). As datas médias corresponderam ao período de 22 de março a 1 de junho, sendo observados ao longo dos anos exceto para o ano de 2022 que teve uma maior intensidade desta fenofase no período chuvoso que é no mês de março (Tabela 01).

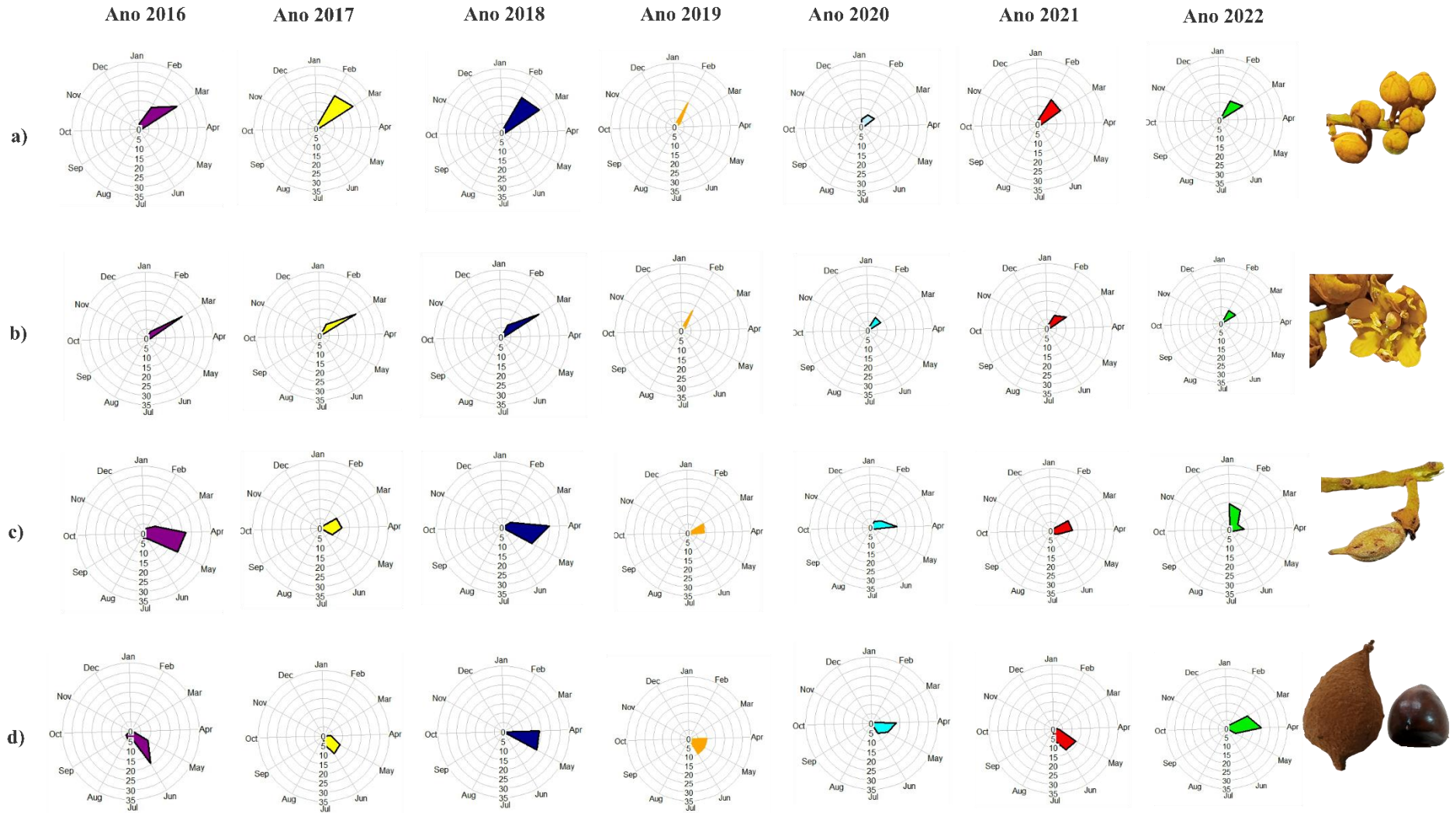
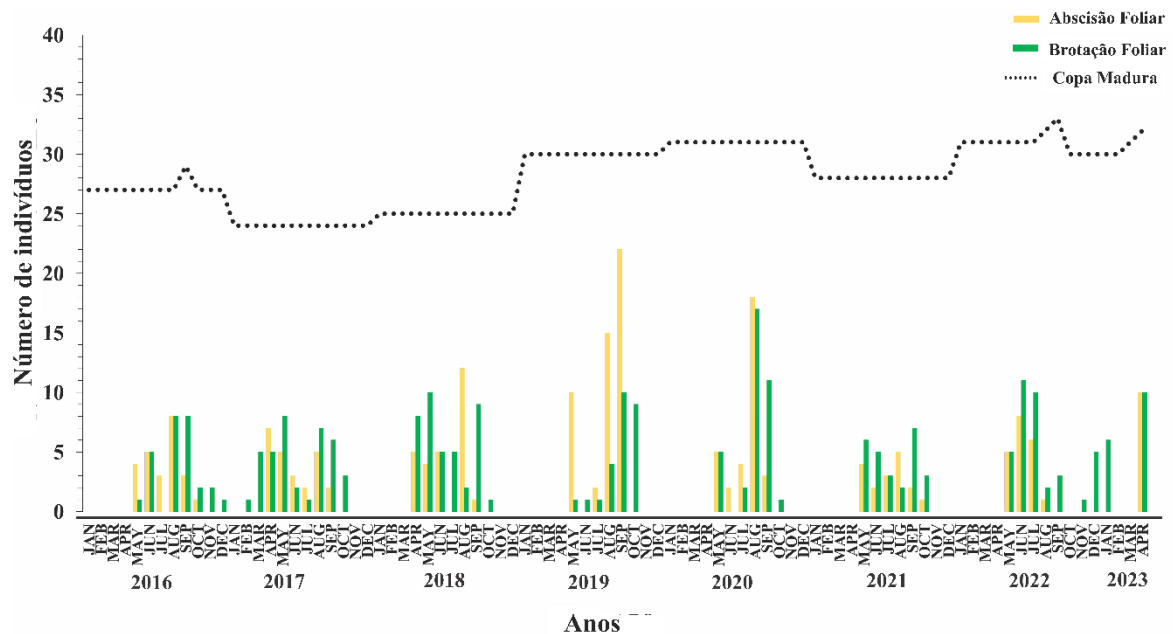


Figura 03: Fenologia da floração representada por histogramas circulares de frequências (presença e ausência) das fenofases: a) botão floral, b) antese (flor aberta), c) frutos imaturos, d) frutos maduros durante período de 2016 a 2022 de *Vouacapoua americana* em uma área de influência da usina hidrelétrica de Belo Monte, no município de Vitória do Xingu, - Pará. As fenofases anuais estão agrupadas com indicação de cores diferenciadas.

As fenofases foliares brotamento e abscisão não foram avaliadas pelo teste circular, sendo representadas em histogramas de frequências e linhas que evidenciaram que o período de maior intensidade de ambas fenofases ocorrem no período seco (Figura 04). Sendo que logo após o período de reprodução, a espécie *V. americana* começa perder as suas folhas mais velhas e inicia o período de brotamento, com picos nos meses de agosto e setembro (Figura 04). As trocas foliares ocorrem de forma gradual, mantendo sua fase vegetativa por todo o ano. A abscisão foliar do Acapu leva em torno de um ano e meio.



acompanharem 8 indivíduos de acapu, no município de Anapu-Pará em três populações diferentes, observaram que a maior intensidade da floração ocorreu nos meses de maio e junho, que é considerado o final do período chuvoso e início do período de estiagem.

Outras espécies amazônicas também obtiveram o maior pico de floração no período úmido como *Dinizia excelsa* Ducke, *Peltogyne paradoxa* Ducke, *Goupia glabra* Aubl, *Aniba duckei* Kostermans e *Simarouba amara* Aubl., *Aniba parviflora* (Meins.) (Magalhães; Alencar, 1979); Freitas *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2005; Felseburgh *et al.*, 2016). Resultado compartilhado também com outras espécies amazônicas da família Leguminosae como por exemplo *Libidibia ferrea* Martius ex Tul, e *Copaifera multijuga* Hayne, que também apresentaram os seus picos de floração no período chuvoso (Araujo, 1970; Ramires *et al.*, 2019).

Costa *et al.* (2023) também avaliaram cerca de 11 espécies nativas amazônicas na floresta nacional do Carajás no Estado do Pará, e notaram que a maioria destas espécies tiveram seus picos de floração no período chuvoso. Há relatos em que a maioria das espécies de florestas tropicais, incluindo a Amazônia, florescem entre o período de transição do chuvoso-seco ou no período seco (Leão; Carvalho, 2001; Maués; Couturier, 2002; Araujo, 1970; Pinto, Morellato; Barbosa, 2008).

A floração em períodos chuvosos atua como um gatilho para que se inicie os processos finais do desenvolvimento dos botões e com isso promovendo uma sequência na abertura das flores, isso acontece devido as espécies não estarem mais expostas a um estresse hídrico e/ou em ambientes com temperaturas elevadas (Opler *et al.*, 1976, Morellato *et al.*, 2013, Arruda *et al.*, 2021). *Vouacapoua americana* apresentou uma sincronia no seu processo de floração, Borchert, (1983), Belo *et al.*, (2013) e Da Costa *et al.*, (2023), corroboram que a sincronização do período de floração que as espécies têm entre e dentro de uma população comprovam a necessidade da água para o desenvolvimento das suas estruturas reprodutivas. Ademais eventos de floração em sincronia favorecem a polinização cruzada, devido os polinizadores forragear vários indivíduos e com isso realizar a transferência do pólen entre as árvores vizinhas, promovendo a variabilidade genética entre os indivíduos (Nilsson e Wastljung, 1987; Stevenson *et al.*, 2008; Braga e Collevatti, 2011; Dantas *et al.*, 2021).

As fenofases de floração também tiveram relação com o fotoperíodo e temperatura, porém Wang *et al.* (2020), afirmam que a maioria das espécies de plantas lenhosas não usam o fotoperíodo como um regulador externo para a indução da floração.

Após o período de floração veio a frutificação, em que os frutos imaturos surgiram no meio da estação chuvosa e a maturação e dispersão dos frutos e sementes foram no período final e de transição do úmido para o seco que correspondem aos meses de abril, maio e junho. O período de maturação dos frutos durou em média de dois meses.

Os resultados foram semelhantes aos encontrados por De Souza *et al.*, (2000), que avaliaram a frutificação de Acapu na região do médio Tocantins e de Santos *et al.*, (2018) que também encontram o mesmo padrão fenológico nas populações do sudeste do Amapá. Muniz (2008) analisou os eventos fenológicos de 89 espécies amazônicas, no município de Buriticupu no estado do Maranhão e notou que a frutificação das espécies de dossel tem uma correlação mais negativa com o período de alta intensidade de precipitação, apresentando baixa produção de frutos, enquanto mantém uma alta produção nos períodos de transição entre a estação úmida e seca.

As sementes de Acapu são recalcitrantes e perdem a viabilidade muito rápido (Lorenzi, 1989), o que explica a rapidez no seu processo germinativo e a alta taxa de germinação que a espécie apresenta. Devido a estratégia da frutificação de acapu ocorrer no período chuvoso seguido da dispersão no final deste ou entre o de transição de período de seca, garantem que essas sementes encontrem ainda um solo úmido e rico em nutrientes, aumentando assim a possibilidade do sucesso nas fases de emergência e do desenvolvimento das plântulas (Foster, 1992; Pereira; Tonini, 2012).

A frutificação do acapu ocorreu anualmente, porém os picos se alteraram ao longo do ano, em que um determinado ano apresentava alta e posterior baixa produção de frutos, estes resultados divergem dos encontrados por Sabatier (1985) e Batista *et al.*, (2020), que declararam que a espécie possui padrão de frutificação bianual. Porém a avaliação de ambos corresponde a menos de cinco anos de observação, o que também divergem do presente estudo que apresenta cinco anos.

Este fenômeno em que há uma alta produção de frutos em alguns anos, pode ser uma estratégia da espécie para atrair dispersores. Leigh (1999) ressalta que quando há sincronização de dispersão em espécies que apresentam sementes grandes e únicas e que tenham roedores como dispersores, garantem uma maior chance de ser enterrada e esquecida por estes. Desta forma propiciam o sucesso da germinação, pois quando há alimentos em abundância tais animais enterram para se alimentarem em períodos de escassez. Atrasos ou antecipação de fenofases também podem afetar as interações planta/polinizador e a capacidade das espécies de competir (Costa *et al.*, 2023).

As fenofases foliares, foram todas correlacionadas positivamente com a temperatura e insolação e uma resposta negativa com precipitação e umidade foram presentes nos meses de estiagem entre julho e novembro. Este resultado divergente do encontrado por Santos, Freitas e Santos (2018) que observaram o processo de abscisão e brotamento das folhas no período chuvoso.

Alencar (1994) ao avaliar as fenologias foliares de espécies amazônicas, percebeu que a grande maioria das árvores perderam suas folhas no período da estação seca e o brotamento foi observado próximo ao período chuvoso. Estes eventos podem estar correlacionados com uma resposta fisiológica da espécie para garantir a sua sobrevivência, durante o período de maior temperatura e déficit hídrico Taiz; Zaiger, 2017).

A abscisão foliar em florestas tropicais é um episódio regular, pois à medida que novas folhas vão surgindo, as folhas maduras são descartadas (Lucena, Leite; Matos, 2015). Lorenzi (2013), em sua pesquisa ressalta que a espécie *V. americana* possui características decíduas, com perdas e brotamentos foliares anuais, assim como encontrados neste estudo.

Além das variáveis climáticas os eventos fenológicos podem ser definidos também pela plasticidade fenotípica e a diversidade genética, estes são mecanismos extremamente eficazes que contribuem na capacidade das espécies de responderem as mudanças ambientais de maneira rápida, garantindo assim a sobrevivência (Donohue, 2005, Pigliucci *et al*, 2006, Rahman *et al*, 2019). Ademais, árvores de grande porte, como é o caso de *V. americana*, tem acesso a reservas de águas mais profundas no solo o que as auxiliam na compensação de um déficit hídrico a curto prazo (Atkins e Agee, 2019).

A sincronia que o Acapu evidenciou em suas fenofases é de suma importância para contribuir com informações em projetos de restauração florestal e programas de manejos, indicando o melhor momento de coletar frutos e sementes (Bassaco; Nogueira, 2019).

6. CONCLUSÃO

O Acapu demonstrou ser uma espécie sazonal uma vez que as fases reprodutivas apresentaram correlação positiva, com o período de maior precipitação. As fenofases foliares apresentaram padrão inverso tendo uma correlação positiva no período mais seco do ano. Ao longo dos sete anos as plantas mostraram ser uma espécie anual e com características decíduas.

As informações coletadas neste estudo demonstram que as variáveis climáticas locais exercem um papel fundamental nos eventos fenológicos de *Vouacapoua americana* e devem ser levados em consideração em estratégias de manejo e conservação desta espécie amazônica ameaçada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERNETHY, Katharine et al. Current issues in tropical phenology: a synthesis. **Biotropica**, v. 50, n. 3, p. 477-482, 2018.
- ALENCAR, J. da C. et al. Fenologia de espécies florestais em floresta tropical úmida de terra firme na Amazônia Central. **Acta amazônica**, v. 9, p. 163-199, 1979.
- ALENCAR, J. da C. Fenologia de cinco espécies arbóreas tropicais de Sapotaceae correlacionada a variáveis climáticas na reserva Ducke, Manaus, AM. **Acta Amazonica**, v. 24, p. 161-181, 1994.
- ARAGÓN, L. E. The international dimension of the Amazon: a contribution for its interpretation. **Revista Nera**, n. 42, p. 14-33, 2018.
- ARAUJO, C. Fenologia de essências florestais amazônicas 1., BOLETIM DO INPA PESQUISAS FLORESTAIS, **INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA**, Nº 4, 1970.
- ARRUDA, L. J. et al. Phenological behavior of herbaceous and woody species in the highly threatened Ironstone Rupestrian Grasslands. *South African Journal of Botany*, v. 140, p. 135-142, 2021.
- ATKINS, J. W.; AGEE, E. Phenological and structural linkages to seasonality inform productivity relationships in the Amazon Rainforest. **New Phytologist**, 2019.
- BONATO ASATO, Ana E. et al. On the phenology of soil organisms: Current knowledge and future steps. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 4, p. e10022, 2023.
- BASSACO, Marcos Vinícius Martins; NOGUEIRA, Antônio Carlos. Comportamento fenológico de *Sebastiania brasiliensis* em floresta ombrófila mista aluvial. **Biotemas**, v. 32, n. 2, p. 45-53, 2019.
- BENCKE, C.S.C.; MORELLATO, L.P.C. Comparação de dois métodos de avaliação de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica**, V. 25, Nº 3, p:269-275, 2002.
- BRAGA, A. C.; COLLEVATTI, R. G. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, v. 106, n. 6, p. 911-919, 2011.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Portaria MMA nº 148**, de 7 de Junho de 2022. DOU Nº 245 Seção 1, 18 de dezembro de 2014.
- CABRERA, A.; ROBERTO, M.; ZHOFRE, A. Index of phenological activity of ten Amazonian fruit species in the El Padmi Experimental Station, Zamora Chinchipe, Ecuador. **Bosques Latitud Cero**. v. 08, n. 01, p. 17-31.
- CHAMBERS, L. E. et al. Phenological changes in the southern hemisphere. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75514, 2013.
- CHAPMAN, C.A. et al. Fruit and flower phenology at two sites in Kibale National Park, Uganda. **Journal of Tropical Ecology**, nº15, p. 189-211, 1999.
- CHAPMAN, C.A. et al. A long-term evaluation of fruiting phenology: importance of climate change. **Journal of Tropical Ecology**, v.21, p.31-45, 2005.

- CERRO, R. DE L. T.; HOLLOWAY, P. A review of the methods for studying biotic interactions in phenological analyses. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 227-244, 2020.
- COPERTINO, M. et al. Desmatamento, fogo e clima estão intimamente conectados na Amazônia. *Ciência e Cultura*, v. 71, n. 4, p. 04-05, 2019.
- CRUZ, C. D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35: 271-276, 2013.
- DA COSTA, Ana Carolina Galindo et al. Reproductive phenology of critical native plant species for mineland restoration in the eastern Amazon. *Plant Species Biology*, 2023.
- DANTAS, A. R. et al. Phenological behavior and floral visitors of *Pentaclethra macroloba*, a hyperdominant tree in the Brazilian Amazon River estuary. *Trees*, v. 35, p. 973-986, 2021.
- DAVID, H. C. et al. The tropical biomass & carbon project—An application for forest biomass and carbon estimates. *Ecological Modelling*, v. 472, p. 110067, 2022.
- DE SOUZA, L. A. G. et al. Período de Frutificação e Viabilidade das sementes de acapu (*Vouacapoua americana* AUBL.-Leg. caesalp.) da região do médio rio Tocantins, Pará, Brasil. 2000.
- DONOHUE, K. Niche construction through phenological plasticity: life history dynamics and ecological consequences. *New Phytologist*, v. 166, n. 1, p. 83-92, 2005.
- DOS SANTOS, A. C.; DA LUZ FREITAS, J.; DOS SANTOS, E. S. Phenological Behavior of Forest Species with Timber Potential in Terra Firme Ecosystem, Eastern Amazon. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 11, n. 3, p. 924-933, 2018.
- FORGET, P-M. Ten-Ano seedling dynamics in *Vouacapoua americana* in French Guiana: a hypothesis. *Biotropica*, p. 124-126, 1997.
- FOSTER, R. B. Ciclo estacional de caída de frutos *Ci. Fl.*, v. 22, n. 1, jan.-mar., 2012
Fenologia da andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl., Meliaceae) no sul do Estado ... 57 en la isla de Barro Colorado. In: LEIGH, E. G., RAND, A. S., WINDSOR, D. M. (Ed.). *Ecología de un bosque tropical*, Balboa: Smithsonian Tropical Research Institute, p. 219-241, 1992.
- FRANKIE, G.W. et al. Comparative phenological studies of trees in tropical lowland wet and dry forest sites of Costa Rica. *Journal of Ecology*, nº 62, p. 881-913. 1974.
- FREITAS, J. DA L. et al. Fenologia reprodutiva de cinco espécies arbóreas em ecossistema de terra firme na Amazônia Brasileira. *Biota Amazônia* v. 5, n. 2, p. 38-44, 2015.
- FONSECA, E. T. da. Indicador de madeira e plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: **Officinas Gráficas**. Villas Boas & G. p.343, 1922.
- GOMES, F. J. A et al. Avaliação fitossociológica de um fragmento florestal em área urbana na transição Cerrado–Floresta Amazônica. *Nativa*, v. 10, n. 2, p. 211-218, 2022.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas) (2012), “IBGE Cidades: MUNIC ano 2012”, IBGE, Rio de Janeiro, Brasil
<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/santarem/pesquisa/1/21682?ano=2012&localidade1=150145>>, acesso em: 6 de junho de 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Estações automáticas**. Disponível em: <<https://bdmep.inmet.gov.br/>>Acesso em: 27 junho 2022.
A versão do artigo em inglês foi submetida na revista “Plant Species Biology” - <https://esj-journals.onlinelibrary.wiley.com/journal/14421984>

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Estimativa de desmatamento por corte raso na Amazônia Legal para 2021 é de 13.235 km²**. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Brasil, 2022.

IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. DISPONÍVEL EM:<<
http://www.iucnredlist.org.>> ACESSO EM 24 Jun. 2022.

J. M. et al. Regeneração Natural de Espécies Ameaçadas de Extinção em Áreas Experimentais na Amazônia Oriental. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, v. 11, n. 3, p. 1-11, 2021.

JANZEN, D.H. Synchronization of sexual reproduction of trees within the dry season in Central America. **Evolution**, 21: 620-637, 1967.

LAMEIRA, O. A. et al. Relação entre a fenologia da espécie *Phyllanthus betulifolia* (Kunth) Greene e elementos climáticos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, 2021.

LEÃO, N. V. M.; DE CARVALHO, J. O. P. **Fenologia reprodutiva de 25 espécies arbóreas da Amazônia**. 2001.

LEIGHT E. G. **Tropical Forest Ecology**. New York: Oxford University Press, 245 p. 1999.

LIEBERMAN, D. 1982. Seasonality and phenology in a dry tropical forest in Ghana. *Journal of Ecology*, 70:791-806.

LOUREIRO, A. L.; SILVA, M. F. **Catálogo das madeiras da Amazônia**. Belém, V. 2 ed. SUDAM, pag: 333, 1968.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. da C. **Essências madeiras da Amazônia**. Manaus: INPA, v.1, p.245, 1979.

LORENZI, H.- **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. V.2. ed. Editora Plantarum, 1998.

LORENZI, H., **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, Nova Odessa: **Plantarum 2**, 4ª edição. 2013.

LUCENA, I.C., LEITE, M.B.; MATOS, D.M.S.. A deciduidade foliar indica a vulnerabilidade de espécies lenhosas ao fogo. *Revista Árvore* 39, 59-68. 2015.

MAESTRI, M. P. et al. Community Forest Management of the Virola Jatobá Sustainable Development Project:: Scenarios for the Exploration of *Vouacapoua americana* Aublet. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, n. 1, 2021.

MAGALHÃES, L. M. S.; ALENCAR, J. da C. Fenologia do pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans), Lauraceae, em floresta primária na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 9, p. 227-232, 1979.

MAUÉS, M. M. Estratégias reprodutivas de espécies arbóreas e sua importância para o manejo e conservação florestal: Floresta Nacional do Tapajós (Belterra-PA). 206 F. Tese (Doutorado em Ecologia) - **Universidade de Brasília**. Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, DF, 2006.

MAUÉS, MÁRCIA M.; COUTURIER, Guy. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, p. 441-448, 2002.

A versão do artigo em inglês foi submetida na revista "Plant Species Biology" - <https://esj-journals.onlinelibrary.wiley.com/journal/14421984>

- MORELLATO, L. P. C. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta de altitude na Serra do Japi, Jundiá São Paulo. **Revista brasileira de Biologia**, v. 50, p. 149-162, 1990.
- MORELLATO, L. Patricia C.; ALBERTI, L. F.; HUDSON, Irene L. Applications of circular statistics in plant phenology: a case studies approach. In: **Phenological research**. Springer, Dordrecht, p. 339-359. 2010.
- MORELLATO, L. P. C.; CAMARGO, M. G. G. GRESSLER, E. **A review of plant phenology in South and Central America**. In: SCHWARTZ, M. D. Phenology: an integrative environmental science. 2. ed. Springer, p. 91-113, 2013.
- MORELLATO, Leonor Patrícia Cerdeira et al. Linking plant phenology to conservation biology. **Biological conservation**, v. 195, p. 60-72, 2016.
- MORETO, R. F. et al. Potencial das geotecnologias para monitoramento do impacto da colonização na floresta nativa na microbacia do rio Enganado, Amazônia Ocidental, Brasil. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 2, n. 7, p. e27588-e27588, 2021.
- MUNIZ, F. H. Padrões de floração e frutificação de árvores da Amazônia Maranhense. **Acta amazônica**, v. 38, p. 617-626, 2008.
- NEWSTROM, L. et al. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, p. 141-159, 1994.
- NILSSON, S. G.; WASTLJUNG, U. Predação de sementes e polinização cruzada em manchas de faia (*Fagus sylvatica*). **Ecologia**, v. 68, n. 2, pág. 260-265, 1987.
- OLIVEIRA, CSA et al. Fenologia e prospecção fitoquímica do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 621-627, 2016.
- OPLER, P. A. et al. Rainfall as a factor in the release, timing, and synchronization of anthesis by tropical trees and shrubs. **Journal of Biogeography**, p. 231-236, 1976.
- PAU, S. et al. Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. **Global change biology**, v. 17, n. 12, Pag: 3633-3643, 2011.
- PARÁ. Secretaria de Estado de Meio Ambiente. Extração e movimentação de toras de madeira nativa. 2010. Disponível em:
<file:///C:/Users/Francinei%20Vulc%C3%A3o/Downloads/Extracao%20e%20Comercio%20de%20Toras%20de%20Madeira%20Nativa%20por%20Municipio%20consolidado.pdf
>Acesso: 26/06/2022.
- PEREIRA, Maria Rutinéia Nobre; TONINI, Helio. Fenologia da andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl., Meliaceae) no sul do estado de Roraima. **Ciência Florestal**, v. 22, p. 47-58, 2012.
- Pereira Junior, R. A., Ruschel, A. R., Costa, D. C. L., Pereira, D. C. P., Silva, U. S. D. C. Diameter Distribution of *Vouacapoua americana* Aublet in the Brazilian Amazon. *Journal of Agricultural Science*, 15(2), 82, 2023.
- PIGLIUCCI, Massimo; MURREN, Courtney J.; SCHLICHTING, Carl D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2362-2367, 2006.

- PINTO, A. M. et al. Fenologia de Simarouba amara Aubl. na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM. **Acta Amazonica**, v. 35, p. 347-352, 2005.
- PINTO, A. M.; MORELLATO, L. P. C.; BARBOSA, A. P. Fenologia reprodutiva de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (Fabaceae) em duas áreas de floresta na Amazônia Central. **Acta amazônica**, v. 38, p. 643-649, 2008.
- PORTELA, J. G. A.; PAULETTO, D. Análise bibliométrica da produção científica brasileira sobre *Dipteryx odorata* no período de 2009 a 2018. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 19-28, 2020.
- R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
- RAHMAN, I. U. et al. Phenological plasticity in *Berberis lycium* Royle along temporal and altitudinal gradients. **Appl. Ecol. Environ. Res.**, v. 17, p. 331-341, 2019.
- RAMIRES, A. C. S. et al. Avaliação fenológica do jucá (*Libidibia ferrea*) Martius ex Tul.(Fabaceae). In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 23., 2019, Belém, PA. Anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019., 2019.
- STEVENSON, P. R. et al. Flowering patterns in a seasonal tropical lowland forest in western Amazonia. **Biotropica**, v. 40, n. 5, p. 559-567, 2008.
- SABATIER, D. Saisonnalité et déterminisme du pic de fructification en forêt guyanaise. **Revue d'Ecologie, Terre et Vie**, v. 40, n. 3, p. 289-320, 1985.
- SILVA, A. C.; LAMEIRA, O. A. Avaliação do comportamento fenológico da *Copaifera martii* (Hayne) com dados climáticos em Floresta Secundária. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e41810917973-e41810917973, 2021.
- SILVA, S.M.P. da. Arnica de Campos Rupestres *Lychnophora pinaster* Mart. Asteraceae: aspectos da fenologia e de aquênios. In: MING, L.C. (Ed.). **Plantas Medicin**, 1998.
- SILVA, T. M. et al. O mercado de amêndoas de *Dipteryx odorata* (cumaru) no estado do Pará. **Floresta**, v. 40, n. 3, 2010.
- TAIZ, L. ZAIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal** . Artmed Editora, 2017.
- TOSTO, S. G. et al. O Projeto ASEAM: construção do conhecimento e sistematização de experiências sobre valoração e pagamento por serviços ecossistêmicos e ambientais no contexto da agricultura familiar amazônica, In: **NOGUEIRA-JUNIOR, L.R, et al 2022. Serviços ecossistêmicos e pagamento por serviços ambientais: aspectos teóricos e estudo de caso**. Embrapa, p.36-49, 2022.
- WATSON, J. E. M.; et al. The exceptional value of intact forest ecosystems. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 4 p. 599-610, 2018.
- YANAI, A. E. Patentes de produtos naturais amazônicos:análise de impacto da inovação tecnológica mundial. Dissertação (Mestrado em Ciência, Tecnologia e Sociedade) - **Universidade Federal do São Carlos**, São Carlos, 2012.
- ZAR, J.H. 2010. **Biostatistical analysis**. 5th. edn. Upper Saddle River, Pearson Prentice-Hall.

WANG, H. et al. The interactive effects of chilling, photoperiod, and forcing temperature on flowering phenology of temperate woody plants. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 443, 2020.

CAPÍTULO 02 – INDUÇÃO DE CALOS E REGENERAÇÃO DE SEGMENTOS APICAIS E NODAIS DE *Vouacapoua americana* Aubl.

RESUMO

Vouacapoua americana Aubl., popularmente conhecida como Acapu, é uma árvore amazônica endêmica, amplamente explorada, listada como espécie em perigo de extinção. A cultura de tecidos oferece potencial para conservação de genótipos ameaçados, em virtude disso este estudo tem como objetivo avaliar a regeneração e estabelecimento de *V. americana*. Para as análises de propagação *in vitro* foram utilizados diferentes explantes de *V. americana* obtidas de mudas cultivadas em viveiro, em que foram testados: tipos de assepsias, indução de brotações, calos e germinação de embriões sob efeito de Auxinas (2,4-D, Picloram, BAP e Melatonina) em diferentes concentrações e combinações. Os resultados deste estudo de propagação *in vitro* destacam a importância de otimizar protocolos específicos para assepsia de acordo com o tipo de explante, considerando as condições ambientais e as características intrínsecas dos tecidos vegetais. Protocolos abrangentes e eficientes para indução de calos *in vitro* com o uso do regulador Picloram a partir de explantes foliares oriundos de viveiro. Esses avanços nos protocolos de propagação *in vitro* de Acapu, podem auxiliar na conservação *ex situ* e em programas de reflorestamento.

Palavras-Chaves: Amazônia, Cultura de tecidos, Espécie ameaçada e Reguladores de crescimento.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Vouacapoua americana* Aubl. é uma árvore florestal conhecida popularmente como Acapu, representante da família Leguminosae, endêmica da Amazônia e de ocorrência em floresta pluvial de terra firme na Guiana Francesa, Suriname, Guiana e Brasil (Flora do Brasil, 2024). No Brasil, distribui-se pelos Estados do Maranhão, Amapá e Pará (Leite e Lleras, 1993; Maestri *et al.*, 2021). Sua madeira possui ótima resistência mecânica e a podridão, características que fazem com que *V. americana* seja amplamente utilizada na indústria madeireira para a construção naval (Fonseca, 1922), construção civil (Loureiro *et al.*, 1979) produção de móveis e marcenaria de luxo (decorações, tacos de bilhar etc.) (Lorenzi, 1989).

Por ser uma espécie altamente explorada, em 2014 através da portaria 443 do Ministério do Meio Ambiente, *V. americana* passou a fazer parte da lista das espécies consideradas em perigo de extinção (EN) (Brasil, 2014), tendo a sua comercialização e corte proibidos. O Acapu encontra-se ainda na lista vermelha de espécies em extinção da União Internacional de

Conservação da Natureza (IUCN), sendo classificada como criticamente ameaçada (CR) (IUCN, 2024).

A conservação de germoplasmas *ex situ* também é afetada pelo comportamento recalcitrante das sementes, a rápida deterioração por ataques de fungos e insetos, fatores que dificultam o seu armazenamento (Cruz e Pereira, 2016; Souza, 1999). Como o principal meio de propagação da espécie é por via de sementes, o comportamento recalcitrante torna inviável a propagação em períodos diferentes ao da oferta natural (Nick *et al.* 2010). Além disso as suas sementes são extremamente predadas por roedores o que dificulta ainda mais a disponibilidade da mesma (Forget, 1990; Gomes *et al.*, 2021).

Neste contexto, a utilização da espécie e sua exploração exacerbada contribuem para o processo de extinção e perda da sua variabilidade genética, considerando esses fatores, métodos que busquem a conservação de *V. americana* de maneira eficiente são essenciais (Valejos-Torres *et al.*, 2021). Desta forma, a cultura de tecidos de propágulos vegetais de espécies ameaçadas e com valor econômico, torna-se uma alternativa para conservação destes genótipos, além de assegurar a disponibilidade para pesquisas futuras (Alves; Azevedo, 2018).

Dentre as técnicas de propagação *in vitro*, se tem a organogênese, que consiste na capacidade de diferenciação e regeneração de órgãos ou plantas, podendo acontecer através da via direta que se origina a partir do meristema ou via indireta que depende da proliferação celular e formando calos (Nogueira *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2022). Esta última via pode ampliar a variabilidade genética, através do aparecimento de variantes somaclonais como forma de adaptação celular as condições do cultivo (Kaeppler, Kaeppler e Rhee, 2000; Ramirez-Mosqueda e Iglesias Andreu, 2015; Gole *et al.*, 2020).

Os eventos fisiológicos supracitados necessitam de estímulos que se dão pela utilização de reguladores de crescimento, sendo que os mais utilizados são as auxinas que promovem o enraizamento de brotos e indução de calos e as citocininas que propiciam o desenvolvimento celular e de gemas axilares (Taiz *et al.*, 2017; Romo-Paz *et al.*, 2023). Os reguladores de crescimento podem atuar de diferentes maneiras em cada espécie, variando em doses e combinações, produzindo inúmeros resultados nos protocolos de estabelecimento *in vitro* (De-Souza *et al.*, 2022).

Outro processo importante para o cultivo *in vitro* é a condição asséptica, entretanto para as espécies florestais, tal condição é um desafio em virtude da dificuldade de obter material vegetal livres de contaminações por micro-organismos devido principalmente a contaminação

endógena e oxidação fenólica (THORPE et al., 1991; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; KUSHNARENKO, 2022).

Na literatura, trabalhos de cultivo *in vitro* já foram publicados com espécies florestais: Cerejeira brasileira (*Amburana acreana* Ducke), Pau rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess), Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.), Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth.) (McVaugh)), Cumaru (*Dipteryx Odorata* (Aubl.) Forsyth F) (FERMINO JR et al., 2007; JARDIM et al., 2010; MELLO et al., 2020; CARVALHO et al., 2021; ARAUJO et al., 2021; ROCHA et al., 2024). Porém para *V. americana* os estudos são escassos e quase inexistentes na literatura, considerando a pressão antrópica sofrida pela espécie, e visando ampliar as informações sobre ela, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o estabelecimento, a formação de calos e a regeneração de segmentos apicais e nodais de *Vouacapoua americana* Aubl.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Vegetal

100 frutos de 5 matrizes de *V. americana* foram coletados no município de Vitória do Xingu, em uma área de floresta natural. Após a coleta, eles foram levados ao laboratório de biotecnologia da Universidade Federal do Pará, *campus* de Altamira (BIOTEC-ATM), onde passaram por beneficiamento. 50 sementes foram acondicionadas em sacos de polipropileno contendo substrato comercial (terra preta), mantidas em condições de sombrite a 50% e irrigação diária. Passados 90 dias da germinação, segmentos foliares juvenis ($\pm 2,0$ cm²) e segmentos apicais e nodais ($\pm 2,0$ cm), foram utilizados como fonte de explantes para a condução dos ensaios *in vitro* de *V. americana*.

As outras 50 sementes coletadas, foram utilizadas para os experimentos de embriogênese *in vitro*.

2.2 Pré-assepsia dos explantes para o cultivo *in vitro*

Após a coleta, as sementes e os segmentos foliares, apicais e nodais oriundos de plantas cultivadas em viveiro, foram levemente escovados com detergente neutro comercial e lavados em água corrente por 30 minutos (Silva *et al*, 2021). Antes da assepsia em fluxo laminar, as sementes passaram ainda por solução de hipoclorito de sódio a 2% v/v por 1h. Após assepsia, todos os explantes foram levados a câmara de fluxo laminar.

2.3 Meio de Cultura básico

Após assepsia, todos os explantes foram inoculados em meio de cultura básico WPM (Lloyd; Mccown, 1981) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 800 mg L⁻¹ de Polivinilpirrolidona (PVP), e solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel. O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 ±0,1 e esterilizados por 20 minutos em autoclave a 121°C e pressão de 1,5 kgf/cm² (Lameira *et al.*, 2000).

2.4 Ensaio *in vitro*

2.4.1 Experimento 1

2.4.1.1 Assepsia de segmentos apicais e nodais

Após pré-assepsia, em câmara de fluxo laminar, os segmentos passaram por assepsia em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo durante 20 minutos (em constante agitação), seguido de tríplice lavagem em água destilada autoclavada (Silva *et al.*, 2021). Posteriormente foram imersos em solução de ácido ascórbico a 10 mg L⁻¹ onde permaneceram por 15 minutos em agitação, para evitar a oxidação dos explantes (Morandi, 2020), e inoculados em meio de cultivo WPM (descrito no tópico 2.3).

2.4.1.2 Enraizamento de segmentos apicais

Os segmentos apicais, após assepsia, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura WPM (descrito no tópico 2.3) suplementado com 0,15 mg L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPMTM), e ácido indol-3-butírico (AIB) de acordo com o protocolo de Maravilha *et al.* (2023) com adaptações: T0 (tratamento controle, sem regulador de crescimento), T1(0,1 mg L⁻¹), T2 (0,2 mg L⁻¹), T3 (0,3 mg L⁻¹), T4 (0,4 mg L⁻¹).

2.4.1.3 Indução de brotações com BAP e Melatonina em segmentos nodais

Após assepsia, segmentos nodais de *V. americana* foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio WPM (descrito no tópico 2.3) suplementado com 0,15 mg L⁻¹ de PPM®, e com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e melatonina, compondo cinco tratamentos: T0 (testemunha); T1 (0,025 mg L⁻¹) e T2 (0,05 mg L⁻¹) de BAP; T3 (0,025 mg L⁻¹) e T4 (0,05 mg L⁻¹) de Melatonina.

Os tratamentos T1 e T2 que continham BAP foram autoclavados (como descrito no tópico 2.3), já nos tratamentos T3 e T4, a melatonina foi adicionada após a autoclavagem do meio.

2.4.1.3.1 Condições de incubação e delineamento experimental (Experimento 1)

Após inoculação, o material foi acondicionado em sala de crescimento, mantidos por 7 dias em escuro, e logo após, transferidos para combinação de luz de LED azul e vermelho (irradiância de $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16h e temperatura 25 ± 2 por 35 dias. A cada 5 dias, foram avaliados os parâmetros: de oxidação, de contaminação e de sobrevivência dos explantes e de regeneração.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 5 tratamentos, com 10 tubos de ensaio, cada tubo com um segmento.

2.4.2 Experimento 2

2.4.2.1 Assepsia de explantes foliares

Após pré-assepsia, em câmara de fluxo laminar, os segmentos foliares passaram por assepsia em álcool 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo durante 10 minutos (em constante agitação), seguido de tríplice lavagem em água destilada autoclavada (SILVA et al., 2021). Posteriormente foram imersos em solução de ácido ascórbico a 10 mg L^{-1} onde permaneceram por 20 minutos em agitação, para evitar a oxidação dos explantes (MORANDI, 2020).

Segmentos foliares com 2cm^2 foram inoculados em frascos de vidro com 30 mL de meio WPM (descrito no tópico 2.3), composto por 5 tratamentos para investigar o efeito do PPM[®] no estabelecimento *in vitro*: T0 (tratamento controle, sem PPM[®]), T1 ($0,5 \text{ ml L}^{-1}$), T2 (1 ml L^{-1}), T3 ($1,5 \text{ ml L}^{-1}$) e T4 ($2,0 \text{ ml L}^{-1}$).

O material foi incubado em 25°C e mantidos no escuro por 30 dias. As avaliações foram realizadas a cada cinco dias para avaliar os seguintes parâmetros: porcentagens de oxidação, de contaminação e de sobrevivência dos explantes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 28 frascos por tratamento, cada um contendo três explantes, totalizando 84 explantes por tratamento.

2.4.2.2 Indução de calogênese

Os explantes sobreviventes e livres de contaminação foram transferidos para novo meio de WPM (descrito no tópico 2.3), suplementado com 1,5 ml L⁻¹ de PPM™, ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e Picloram em diferentes concentrações de acordo com o descrito em Chaudary e Prakash (2019) (Tabela 01).

Regulador	Concentração	Tratamento
-	0	T0
2,4D	0,4mg L ⁻¹	T1
2,4D	0,6mg L ⁻¹	T2
2,4D	0,7mg L ⁻¹	T3
Picloram	0,4mg L ⁻¹	T4
Picloram	0,6mg L ⁻¹	T5
Picloram	0,7mg L ⁻¹	T6
2,4D + Picloram	0,4mg L ⁻¹ + 0,1mg L ⁻¹	T7
2,4D + Picloram	0,4mg L ⁻¹ + 0,2mg L ⁻¹	T8
2,4D + Picloram	0,4mg L ⁻¹ + 0,3mg L ⁻¹	T9
Picloram + 24D	0,4mg L ⁻¹ + 0,1mg L ⁻¹	T10
Picloram + 24D	0,4mg L ⁻¹ + 0,2mg L ⁻¹	T11
Picloram + 24D	0,4mg L ⁻¹ + 0,3mg L ⁻¹	T12

O material foi incubado em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 2 no escuro, as avaliações ocorreram a cada 15 dias e foram analisados os seguintes parâmetros: % de contaminação, % de oxidação, e % de indução de calos na cobertura foliar. Para a avaliação de % de indução de calos na cobertura foliar, foram atribuídas notas de 0 a 5 como descrito na Tabela 02.

Tabela 02: Notas atribuídas a cobertura da área foliar pela massa calogênica.

Notas dos calos	Porcentagem de cobertura em área foliar (%)
0	0
1	15
2	30
3	50
4	70

Os calos obtidos foram mantidos neste meio e condições descritas anteriormente por 65 dias, em seguida foram transferidos para o experimento de diferenciação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 13 tratamentos, com 10 frascos e três explantes por frascos.

2.4.2.3 Diferenciação

Para a diferenciação dos calos obtidos (tópico 2.4.2.2 Indução de calogênese) utilizou-se o meio WPM (descrito no tópico 2.3), suplementado com cinco concentrações de BAP: T0 (sem regulador), T1 (0,05 mg L⁻¹), T2 (0,1 mg L⁻¹), T3 (0,15 mg L⁻¹) e T6 (0,2 mg L⁻¹).

Após inoculação, o material foi incubado em sala de crescimento com irradiância de 33 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (combinação de luz de LED azul e vermelho), fotoperíodo de 16h, e temperatura 25 ± 2 por 35 dias. A cada cinco dias, foram avaliados os parâmetros: formação de brotos, de folhas e coloração dos calos. Passados 30 dias, o material vegetal foi transferido para novo meio de cultivo WPM (descrito no tópico 2.3) suplementado com 0,15 mg L⁻¹ BAP.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 30 calos por tratamento, totalizando 150 calos no experimento.

2.4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises do MEV foram conduzidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), do Museu Paraense Emílio Goeldi.

As amostras de calos produzidos durante a fase de indução (tópico 2.4.2.2 Indução de calogênese) foram fixadas em solução de FAA 70% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram mantidas em álcool 70% até o processo de desidratação e análise no MEV.

Para a desidratação, as amostras passaram por uma série de soluções alcoólicas (70, 80, 90%) e duas baterias em álcool 100%. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico com CO₂ (K850, Quorum®), e fixadas em "stubs" com fita adesiva de carbono dupla face e submetidas à metalização com ouro (Desk V, Denton Vacuum™). As micrografias foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Mira3-Tescan®, 5kv), e todas as imagens foram processadas digitalmente no software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

2.4.3 Experimento 3

2.4.3.1 Estabelecimento embriões

Após o processo de pré-asepsia, as sementes de *V. americana* foram levadas para câmara de fluxo laminar onde passaram por quatro tratamentos de assepsia (Tabela 03).

Tratamentos	Tipos de assepsia
T0	Assepsia da semente- imersão das sementes em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo por 30 minutos.
T1	Assepsia da semente e do embrião - Após a assepsia da semente os embriões foram retirados e imersos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% cloro ativo por 5 minutos.
T2	Assepsia da semente e do embrião - os embriões foram retirados e imersos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% cloro ativo por 10 minutos.
T3	Assepsia da semente e embrião – os embriões foram retirados e imersos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% cloro ativo por 15 minutos.

Todos os tratamentos foram inoculados em meio de cultivo WPM (descrito no tópico 2.3), incubados em temperatura de 25 ± 2 e mantidos em escuro por 30 dias. Após 30 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: % de oxidação, % de contaminação e % de germinação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 4 tratamentos, com 20 explantes por tratamento.

4. Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os experimentos 1, 2 e 3 foram analisadas a % de contaminação e de oxidação, mensurados por dados de ausência e presença, onde os explantes contaminados, oxidados ou com calos foram designados com o valor 1, enquanto aqueles livres de contaminação foram representados pelo valor 0.

A homogeneidade dos dados foi avaliada por meio do teste estatístico de Levene ($P > 0,05$), e a normalidade foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$). Para compreender o efeito interativo dos preditores nas variáveis dependentes os dados foram submetidos a um modelo linear (GLM), com distribuição binomial, posteriormente as múltiplas comparações das médias entre os tratamentos foram realizadas pelo teste a posteriori Duncan a 5% de probabilidade (AFRASIAB; RASHID; AKRAM, 2017).

As notas dos calos e a porcentagem de germinação foram analisadas pelo teste não paramétrico Kruskal-wallis com o teste a posteriori de Duncan 5% de probabilidade (SILVA et al., 2022).

Todas as análises foram realizadas utilizando o software RStudio (versão 02.3-492 para Windows™, Microsoft Corporation – EUA). Com adição dos pacotes Mass, Stats, Agricolae, Multcomp e GGplot2 (R Core Team 2024).

3. RESULTADOS

3.1 Experimento 1

3.1.1 Estabelecimento de segmentos nodais e apicais

Para segmentos apicais e nodais de *V. americana*, a assepsia empregada no experimento (desinfestação composto por imersão em álcool 70% por 1 minuto e em 2,5% de cloro ativo por 20 minutos) não foi eficiente para o estabelecimento da cultura *in vitro*, resultando em uma alta em porcentagem de contaminação por bactérias (Figura 01c e 01d) e fungos (Figura 01b e 01e). Aos 5 e 10 dias, para todos os tratamentos independente do regulador e da concentração, foi registrado contaminação.

Com 30 dias, todos os explantes apresentaram contaminação por micro-organismos (bactérias e fungos) e não houve indução de brotações, esses resultados reforçam que, para explantes nodais de *V. americana*, a assepsia utilizada, não foi eficiente e prejudicou a regeneração dos segmentos.

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

Em relação a oxidação, os explantes não apresentaram sinais de oxidação, o que indica que o banho em ácido ascórbico e PVP foi eficiente para impedir a ação da oxidação fenólica.

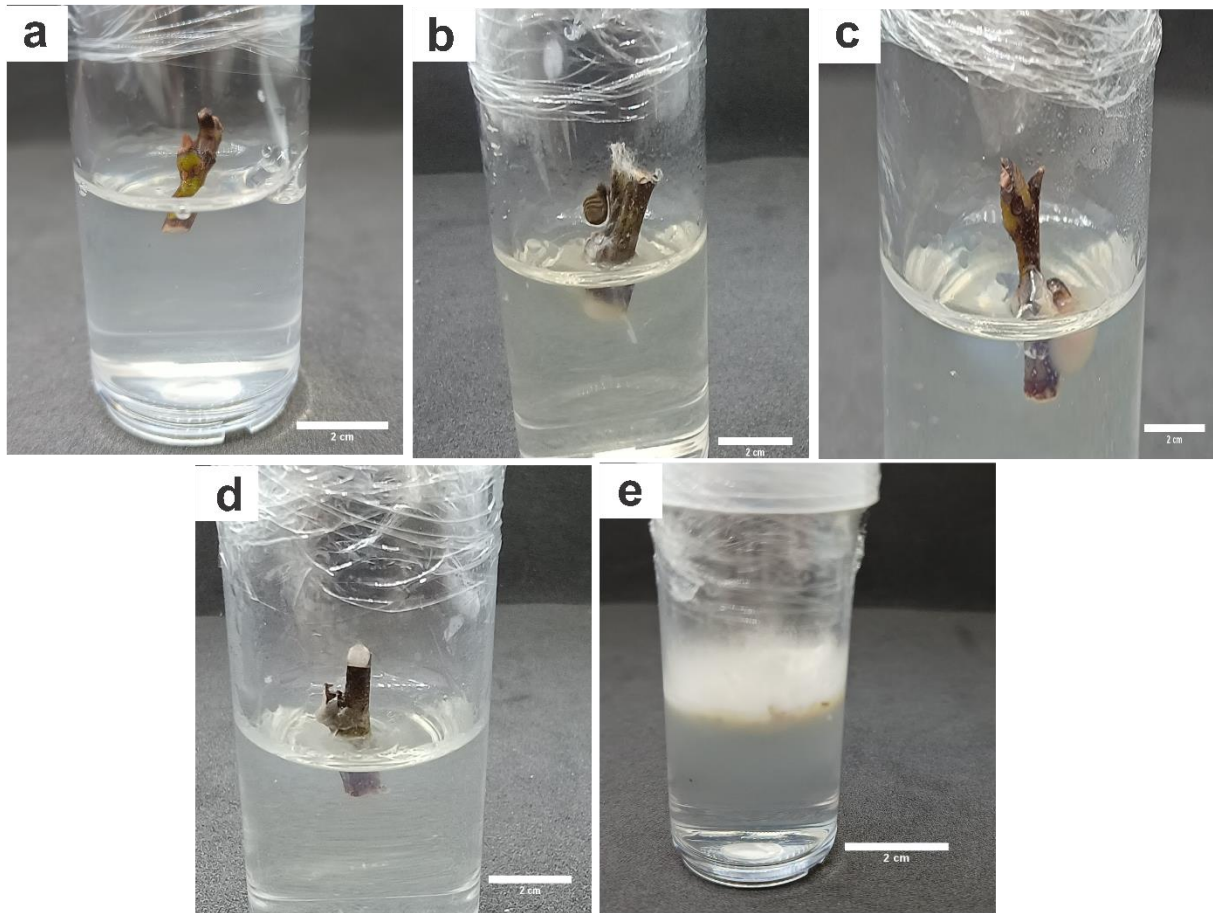


Figura 01: Explantes nodais e apicais de *Vouacapoua americana* Aubl. As escalas representa o tamanho dos segmentos. a) Segmento apical no dia da instalação do experimento. b) Segmento nodal contaminado por fungo. c) Segmento apical contaminado por bactéria. d) Segmento nodal contaminado por fungo. e) Segmento nodal contaminado por fungos com 30 dias de experimento, indicando a inviabilidade dos explantes.

3.1.2 Indução de brotações e enraizamento

Devido ao insucesso no estabelecimento *in vitro* dos segmentos apicais e nodais (item 3.1.1 Estabelecimento de segmentos nodais e apicais), ocasionado pelo alto nível de contaminação dos explantes, não foi possível dar continuidade aos experimentos de brotações e enraizamento.

3.2 Experimento 2

3.2.1 Estabelecimento em Explantes Foliares

Para os explantes foliares, o uso de diferentes concentrações de PPM™ - T0 (tratamento controle, sem PPM™), T1 (0,5 mg L⁻¹), T2 (1 mg L⁻¹), T3 (1,5 mg L⁻¹) e T4 (2,0 mg L⁻¹) –

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

foram significativos ($P < 0,05$) e eficientes ao combate de micro-organismos (Figura 02), sendo os tratamentos suplementados com PPM[®] superiores ao controle T0 (asepsia em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo durante 10 minutos). Os tratamentos T2 (1 mg L^{-1}) e T4 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) também apresentaram contaminações por micro-organismos; entretanto, o tratamento T3 ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) foi o mais eficiente, pois impediu a proliferação total dos agentes contaminantes (Figura 02) mesmo após um período de 30 dias. O tipo de contaminação encontrada nos explantes encontram-se ilustrados na figura 03.

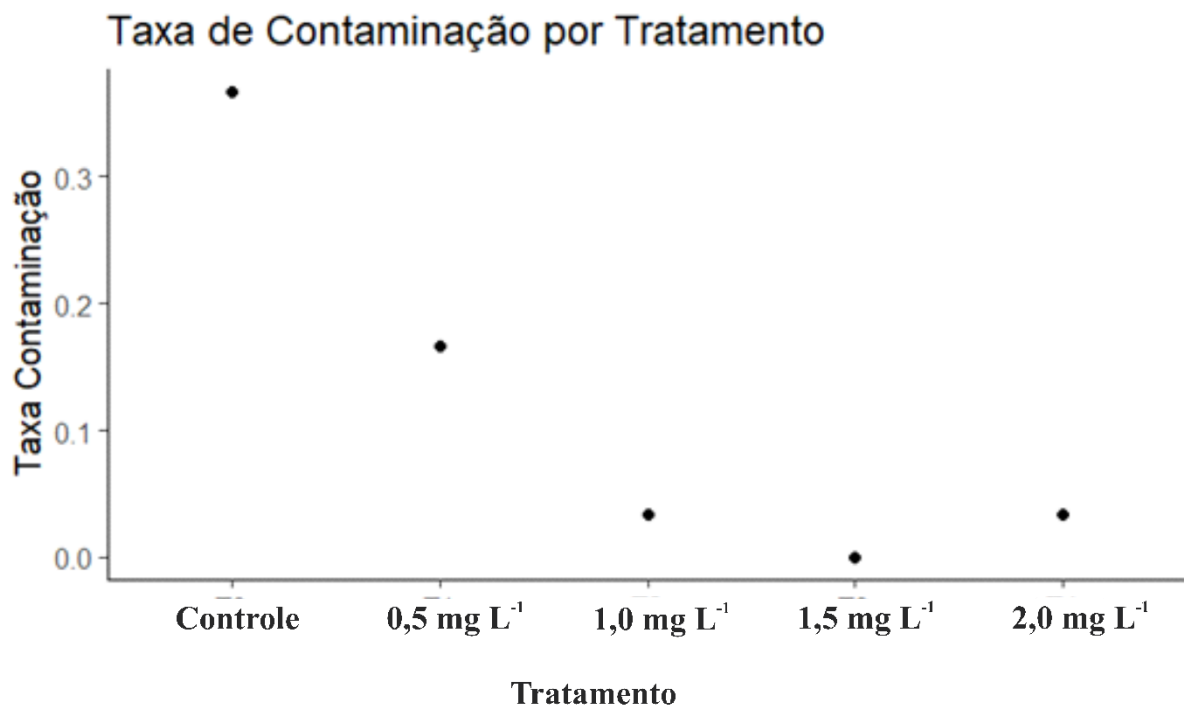


Figura 02: Taxa de contaminação acumulada (30 dias) dos explantes foliares de *Vouacapoua americana* Aubl. submetidos a diferentes concentrações de PPM. Demonstrando a diferença significativa entre os tratamentos, apresentada pela análise GLM Binomial e com teste a posteriori de Duncan com 5% de probabilidade.

Aos 15 dias foi registrada oxidação fenólica e na análise estatística observou-se diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), em torno de 0,25% para o tratamento T0 e 0,20% para o T1, os demais tratamentos apresentaram abaixo de 10% de oxidação fenólica ao longo de todo o período de avaliação do experimento (30 dias) (Figura 03d e figura 04).

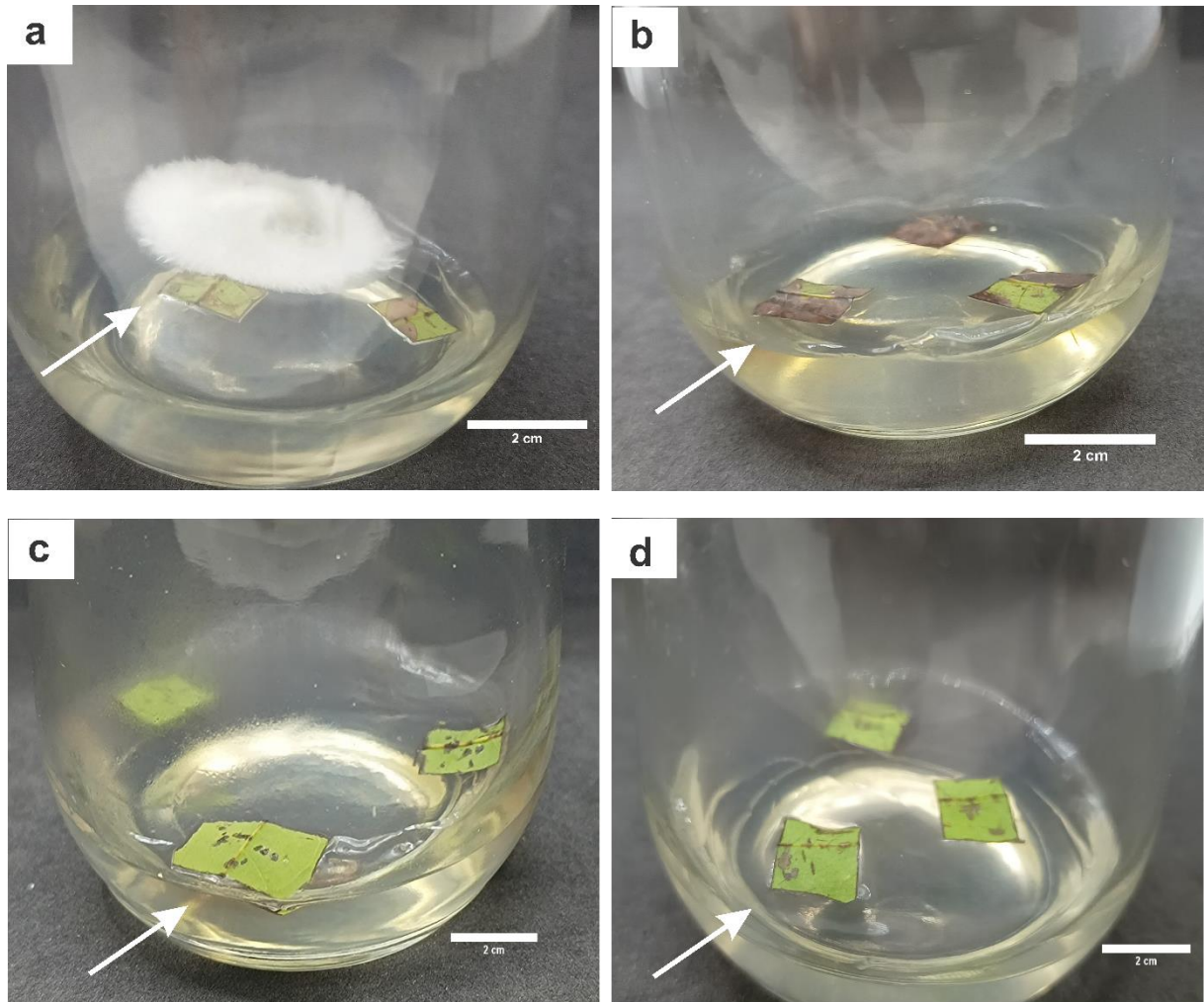


Figura 03: Explantes foliares aos 30 dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de PPM, e banhados com Polivinilpirrolidona e ácido ascórbico. a) Tratamento T0, com fungos, b) Tratamento T1, destaque para a oxidação fenólica. c) Tratamento T3 sem registros de oxidação e contaminação, d) Tratamento T4, sem oxidação e contaminação.

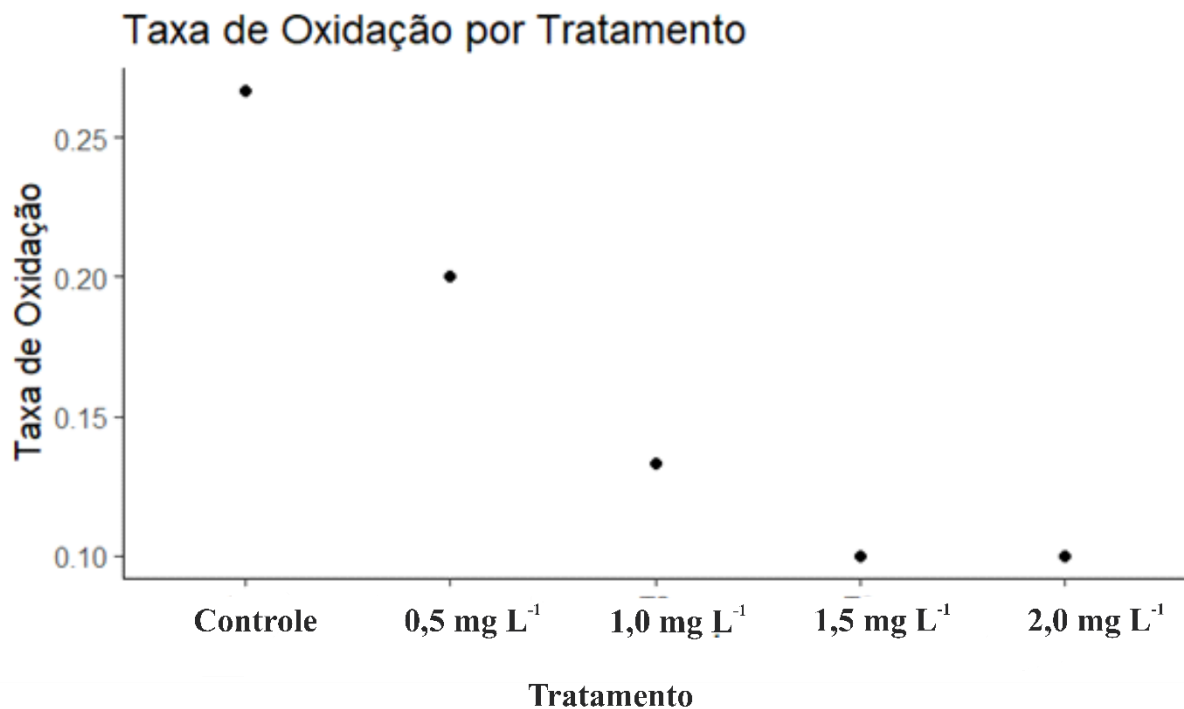


Figura 04: Porcentagem de oxidação acumulada (30 dias) dos explantes foliares de *Vouacapoua americana* Aubl. expostos ao PVP e ácido ascórbico em diferentes concentrações de PPM. Demonstrando a diferença significativa entre os tratamentos, apresentada pela análise GLM Binomial e com teste a posteriori de Duncan com 5% de probabilidade.

3.2.2 Indução de calogênese

Os resultados, conforme apresentados na tabela 1, evidenciam que os tecidos foliares de *V. americana* cultivados em meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D não foram eficientes para a indução do processo de calogênese nos explantes (Tabela 02). Entretanto todas as diferentes concentrações de Picloram e suas combinações com 2,4-D, induziram o processo de calogênese e apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em termos de indução de calos (Tabela 02). Os tratamentos em que havia a maior concentração de Picloram foram os que apresentaram a maior taxa de calos, porém destacam-se as concentrações com 4,0 mg L⁻¹ de Picloram e a combinação 4,0 mg L⁻¹ + 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D que atingiram 100% de indução (Tabela 02).

Tabela 02: Percentual de indução de calos foliares de *Vouacapoua americana* Aubl. sob diferentes tratamentos com os reguladores de crescimento 2,4-D e Picloram, e suas combinações.

Reguladores de crescimento	Concentração mg L ⁻¹	Porcentagem de indução de calos (%)	Porcentagem de área foliar com calos (%)
----------------------------	---------------------------------	-------------------------------------	--

Controle	0,0	0 ^c	0 ^g
	0,4	0 ^c	0 ^g
2,4-D	0,6	0 ^c	0 ^g
	0,7	0 ^c	0 ^g
	0,4	100 ^a	100 ^a
Picloram	0,6	66,66 ^{ab}	70 ^{cd}
	0,7	76,66 ^{ab}	90 ^b
	0,4 2,4-D + 0,1 Picloram	50 ^b	10 ^f
2,4-D + Picloram	0,4 2,4-D + 0,2 Picloram	73,33 ^{ab}	50 ^{de}
	0,4 2,4-D + 0,3 Picloram	76,66 ^{ab}	50 ^d
	0,4 Picloram + 0,1 2,4D	56,66 ^b	65 ^e
Picloram + 2,4- D	0,4 Picloram + 0,2 2,4D	76,50 ^{ab}	25 ^f
	0,4 Picloram + 0,3 2,4D	100 ^a	95 ^b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si estaticamente pelos testes GLM e Kruskall-Wallis, e teste a posteriori de Duncan a 5% de probabilidade.

A proporção da área foliar coberta por calos variou de acordo com o tratamento, resultando em calos que cobriam de 0% a 100% da superfície foliar, como ilustrado na Figura 05. Essas divergências na extensão da cobertura foram estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os diferentes tratamentos e o grupo controle. O tratamento controle e aqueles que continham apenas o regulador de crescimento 2,4-D não apresentaram diferenças significativas entre si, uma vez que não houve formação de calos em ambos os tratamentos (Tabela 02). Contudo, os tratamentos com Picloram resultaram em uma variação na cobertura da área foliar por calos entre 10% e 100%, sendo este último, observado nos tratamentos com 0,4mg L⁻¹ de Picloram e a combinação de 0,4mg L⁻¹ de Picloram com 0,3mg L⁻¹ de 2,4-D (Tabela 02). A formação inicial dos calos foi observada aproximadamente 15 dias após a inoculação, iniciando-se no limbo foliar (Figura 05b). Em média, após 56 dias, obteve-se a cobertura total da área foliar pelos calos.

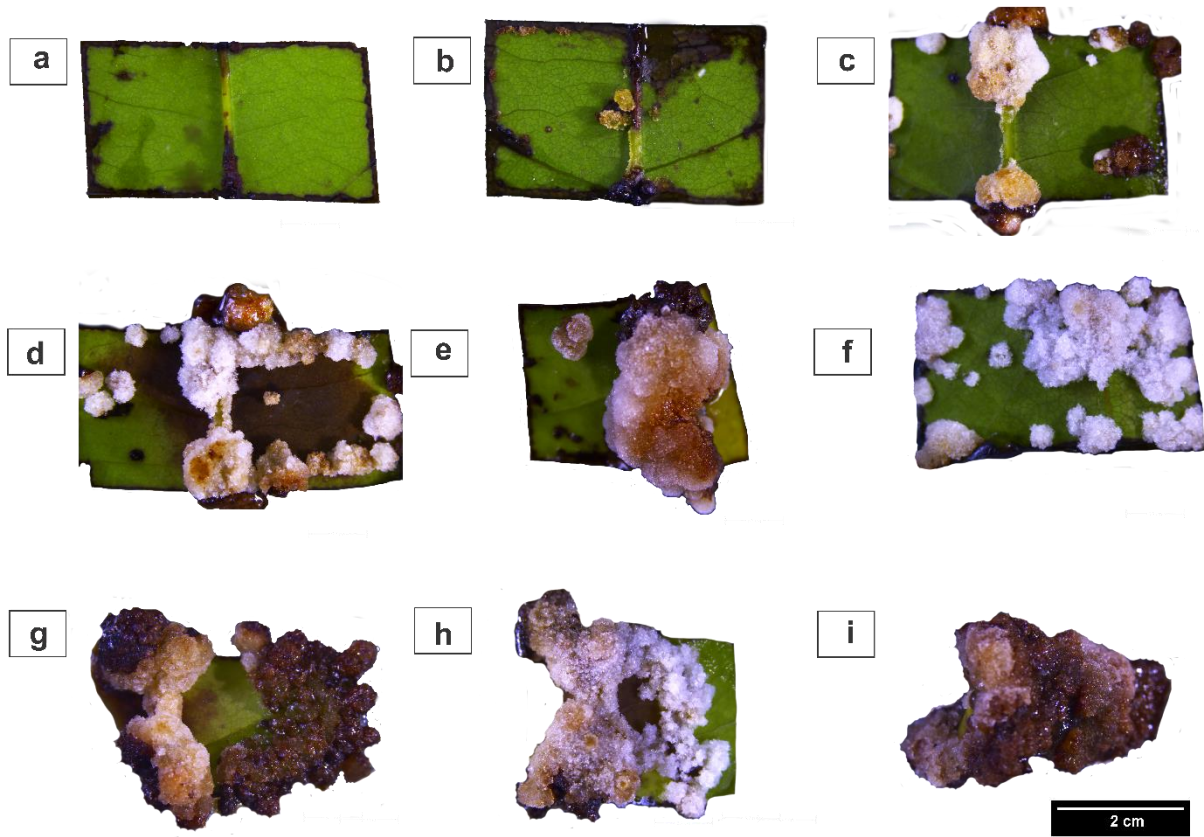


Figura 05: Calos foliares de *Vouacapoua americana* Aubl. em resposta a diferentes tratamentos com os reguladores de crescimento 2,4-D e Picloram, e suas combinações. a) Explante sem a presença de calo b) 1% de cobertura foliar, c) 10% de cobertura foliar, d) 25% de cobertura foliar, e) 50% de cobertura foliar, f) 65% de cobertura foliar, g) 75% de cobertura foliar, h) 90% de cobertura foliar e i) 100% de cobertura foliar. Escala representa o tamanho do explante.

3.2.3 Morfologia dos calos

Em relação a morfologia e a coloração dos calos obtidos nos explantes foliares, independente das variações das concentrações no meio de cultura, foi possível identificar três tipos diferentes de calos. Os calos brancos e amarelados que apresentavam uma textura friável, (Figura 06a e b). Entretanto, os calos marrons amarelados ou escuro demonstraram uma textura compacta (Figura 06c e d). Essas diferenças na coloração e morfologia dos calos foram encontradas em todas as concentrações, porém os calos brancos e friáveis foram mais comuns nas culturas com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Picloram e na combinação de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Picloram com $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, conforme pode ser visualizado na figura 07.

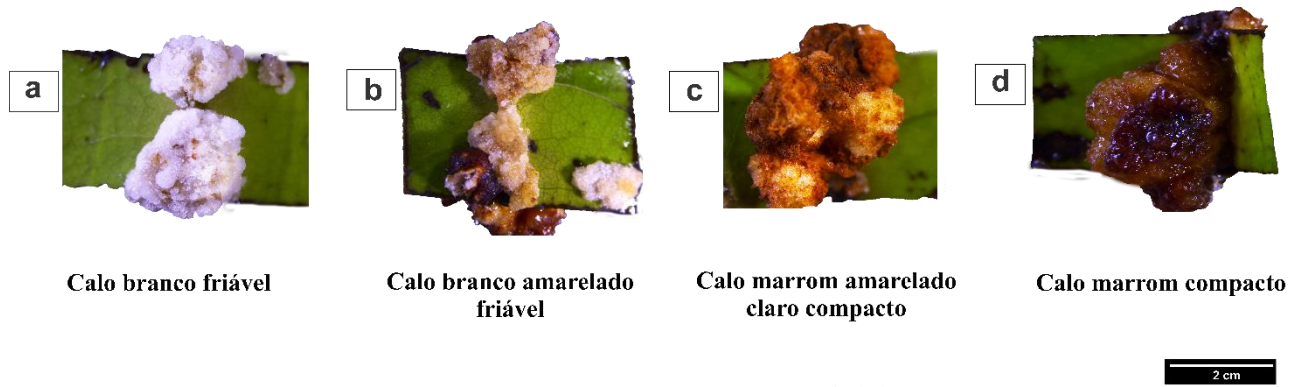


Figura 06: Tipos de calos induzidos em explantes foliares de *Vouacapoua americana* Aubl. sob diferentes concentrações e combinações de Picloram e 2,4-D. a) calo branco com textura friável, b) calo branco passando com tons amarelado e textura friável, c) calo marrom com alguns tons de amarelo com textura compacta, d) calo marrom escuro com textura compacta. Escala representa tamanho do explante.

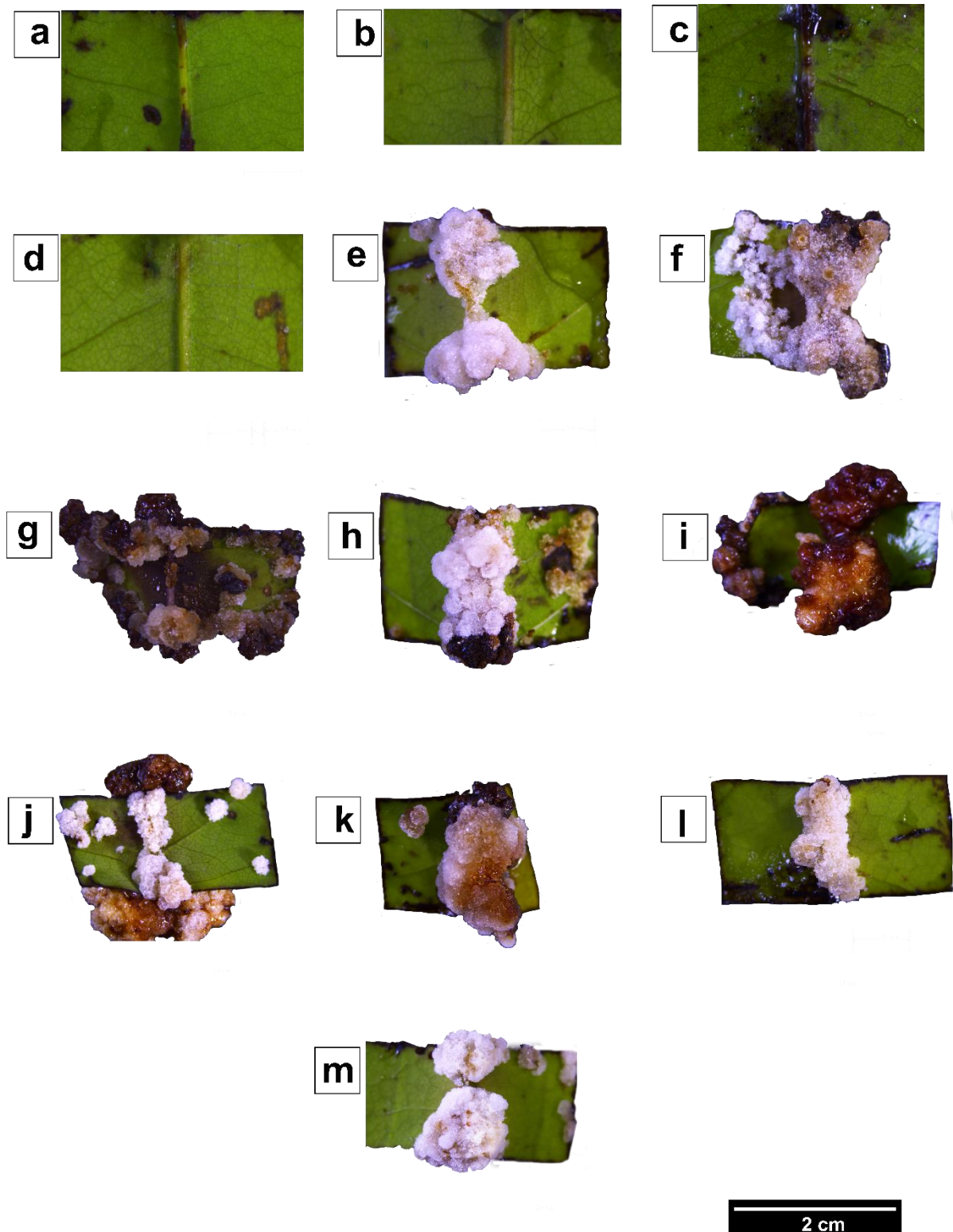
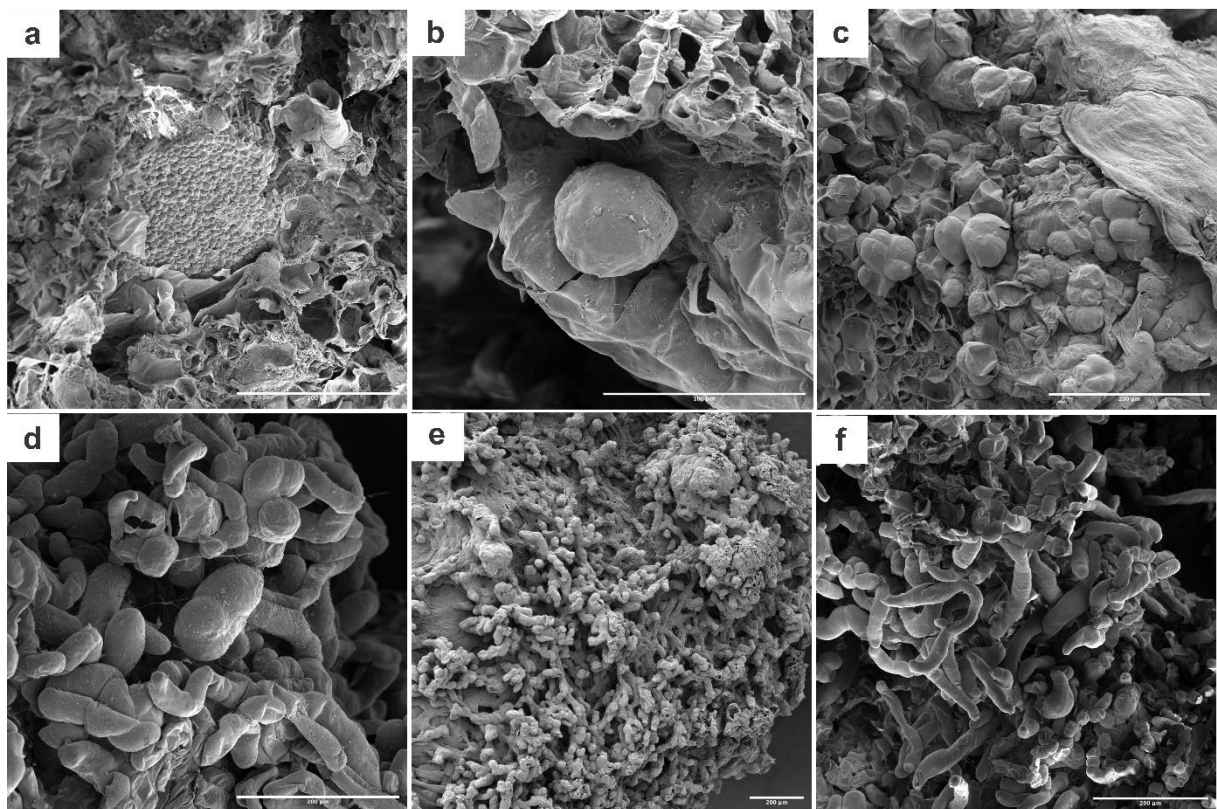


Figura 07: Calos de *Vouacapoua americana* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D e Picloram e suas combinações. a) Tratamento controle; b) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D; c) $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D; d) $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D; e) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram; f) $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram; g) $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram; h) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram; i) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram; j) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram; k) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D; l) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D; m) $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ Picloram + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D.

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

As visualizações em microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciaram a presença de massas de células com formatos isodiamétricos e alongadas aos 75 dias de cultivo (Figura 08a, b, c e d). As células isodiamétricas apareceram na concentração de 0,4 e 0,7 mg L⁻¹ de Picloram e na combinação de 0,4 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg L⁻¹ de Picloram (Figura 08a, b e c). Tais características também são encontradas em calos embriogênicos e foram observadas nos calos de coloração branco e friável. Nos demais tratamentos a maioria das células possuíam formatos alongados (Figura 08d, e, f), sem nenhuma característica de células embriogênicas, estas células alongadas, foram encontradas em calos com coloração amarelada ou marrom principalmente, mas também foram visualizadas em calos de coloração branca.

Figura 08: Eletromicrografia de varredura de células de calos de *Vouacapoua americana* submetidos a diferentes



concentrações de 2,4-D e Picloram e suas combinações. a) Tratamento 0,4 mg L⁻¹ Picloram, b) 0,7 mg L⁻¹ Picloram, c) 0,4 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg L⁻¹ Picloram, d) 0,4 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,2 Picloram, e) 0,4 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,3 Picloram, f) 0,4 mg L⁻¹ Picloram + 0,3 mg L⁻¹ 2,4-D.

3.2.5 Diferenciação

Os calos transferidos para o regulador de crescimento BAP em diferentes concentrações, não responderam ao estímulo promovido pela citocinina e com isso não se obteve a indução de

brotos o que significa que as concentrações testadas foram insuficientes ou os calos não apresentam essa capacidade morfogênica (Tabela 03). Porém os calos cultivados na concentração de 0,15 mg L⁻¹, apresentaram uma mudança na coloração em torno de 35%. Os calos que eram brancos ou marrons claros passaram a ser verdes como podem ser visualizados na figura 09.

Tabela 03: Percentual de calos com brotações obtidos a partir de explantes foliares de *Vouacapoua americana* sob diferentes concentrações do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP).

BAP (mg L ⁻¹)	Produção de Brotações (%)	Mudança na coloração (%)
0	0 ^a	0 ^a
0,05	0 ^a	0 ^a
0,1	0 ^a	0 ^a
0,15	0 ^a	35 ^b
0,2	0 ^a	0 ^a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si estaticamente pelos testes GLM e teste a posteriori de Duncan a 5% de probabilidade.

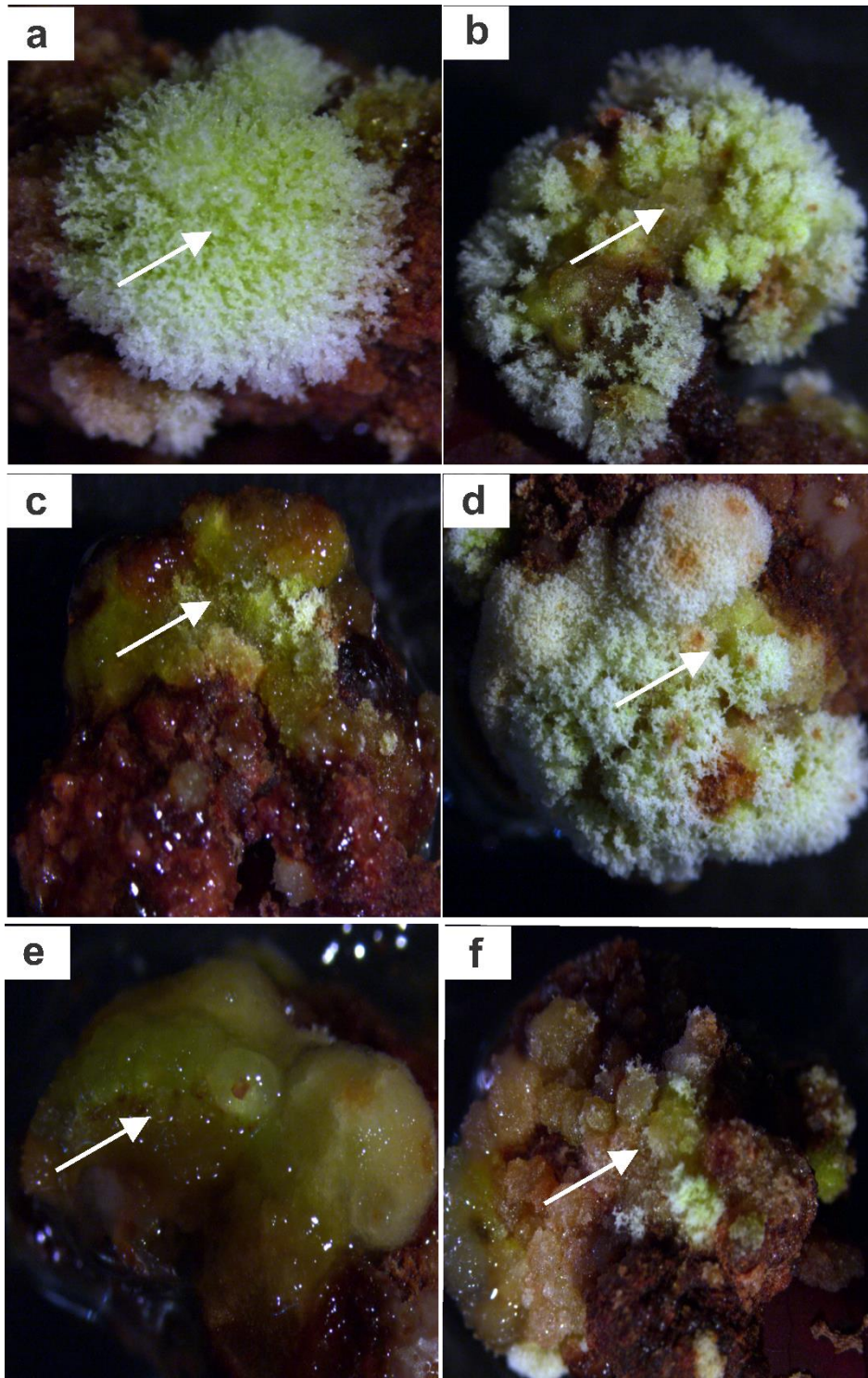


Figura 09: Calos de *Vouacapoua americana* na concentração de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. As setas demonstram a coloração verde e morfologia dos calos. a) Calo com aspecto friável com coloração verde, b) alteração do calo branco para verde. c) Calo compacto marrom com apenas algumas partes verde e com aspecto gelatinoso. d) Mudança na coloração do calo branco friável para verde. e) Calo marrom compacto com massas celulares densa e verde. f) Calos marrons compacto com mudança na coloração para verde.

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

3.3 Experimento 3

3.3.1 Estabelecimento embriões

Os resultados do estabelecimento dos embriões evidenciaram que o tratamento que consistia apenas na assepsia da semente foi o que mais apresentou a proliferação de agentes contaminantes como fungos e bactérias, em torno de 95% e diferiu estatisticamente dos demais ($P < 0,05$). Entretanto também foi o que apresentou a maior taxa de germinação dos embriões quando comparadas com os demais tratamentos, porém não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Os tratamentos em que os embriões foram submetidos a assepsia e ficou apenas cinco minutos de imersão em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), apresentaram 25% de contaminação e 40% de germinação. Os demais tratamentos 10 e 15 minutos de imersão apresentaram 30 e 15% de contaminação respectivamente e 45 e 15% de germinação.

Contudo o tratamento de 15 minutos de imersão foi a que apresentou a menor taxa de germinação e a maior de oxidação o que sugere que o tempo de exposição no hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por 15 minutos interferiu na viabilidade do embrião.

A germinação *in vitro* dos embriões levou, em média, 15 dias após a inoculação, com o primeiro sinal visível ocorrendo aos sete dias, com a ocorrência da abertura dos cotilédones em que estavam inseridos. Posteriormente, o alongamento da raiz começou. A região apical iniciou seu desenvolvimento em torno de nove dias. A emergência dos brotos foi observada após 9 a 10 dias da inoculação e continuou durante o período de cultivo até a formação da plântula.

Tabela 04: Percentual de contaminação, oxidação e germinação de embriões zigóticos de *Vouacapoua americana* Aubl. sob diferentes protocolos de assepsia.

Tratamentos		Contaminação (%)	Oxidação (%)	Germinação (%)
T0	Assepsia da semente	95 ^a	0 ^a	60 ^a
T1	Assepsia da semente e embrião – 5 minutos	25 ^b	0 ^a	40 ^a
T2	Assepsia da semente e embrião – 10 minutos	30 ^b	5 ^b	45 ^a
T3	Assepsia da semente e embrião – 15 minutos	15 ^b	20 ^b	15 ^b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si estaticamente pelos testes GLM e teste a posteriori de Duncan a 5% de probabilidade. T0 assepsia somente na semente, T1 - assepsia na semente e no embrião com tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% de cloro ativo por 5 minutos. T2 - assepsia na semente e no embrião com tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% de cloro ativo por 10 minutos. T3 - assepsia na semente e no embrião com tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% de cloro ativo por 15 minutos.

4. DISCUSSÃO

A cultura de tecidos é uma técnica indispensável na biotecnologia de plantas, que para alcançar o sucesso do cultivo *in vitro* é necessário a determinação de protocolos eficientes para a desinfestação dos explantes (AHMADPOOR *et al.* 2022). Entretanto o estabelecimento eficaz de espécies florestais e materiais vegetais advindos de ambientes naturais é crítico devido à dificuldade na manutenção da cultura limpa, em decorrência da contaminação endógena e exógena (SATO *et al.*, 2001; LIU *et al.* 2023). De acordo com Oliveira, Ribeiro e Souza (2021) o ambiente do cultivo *in vitro* é favorável ao desenvolvimento de micro-organismos, principalmente fungos e bactérias, podendo levar os explantes a morte.

Além disso as elevadas taxas de contaminação estão principalmente associadas às origens dos materiais ou à exposição dos tecidos a ambientes com alta temperatura e umidade, essas condições podem favorecer o surgimento de patógenos e dificultar o processo de desinfestação (MOLINARI *et al.*, 2021). Abdalla *et al.*, (2022), ressaltam que um agente desinfetante é eficaz quando removem os micro-organismos sem propiciar danos ou morte aos tecidos.

Dentre os agentes desinfetantes mais utilizados no estabelecimento de culturas *in vitro*, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é comumente utilizado na assepsia de materiais vegetais, devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade. Porém, a eficácia do NaOCl depende de fatores como tempo de exposição, temperatura e concentração da solução, ao qual o material foi submetido (GOLLE *et al.*, 2013, MELLO *et al.*, 2020). Além disso, o íon de hipoclorito (OCl⁻) produzido a partir de NaOCl é um forte agente oxidante e esses íons hipoclorito ao entrarem em contato com a água, se transformam em ácido hipocloroso (HOCl), que é capaz de penetrar na membrana e na parede celular das bactérias, ocasionando inativação enzimática e degradação de lipídios e ácidos graxos; daí as suas propriedades biocidas (PAIS, *et al.*, 2016; RAHAYU *et al.*, 2019). Contudo, o uso exacerbado de agentes esterilizantes como ativos cloro, podem ocasionar a fitotoxicidade em plantas devido ao escurecimento dos tecidos e inibição do crescimento *in vitro* (Salles *et al.* 2017).

Outro agente eficaz na desinfestação de explantes para o cultivo *in vitro* é o Plant Preservative Mixture (PPM[®]). Dos Santos *et al.* (2019), evidenciam que o PPM[®] age na desativação de enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons penetrando na parede celular de microrganismos atuando como um agente biocida de ampla utilização. Sendo indicado por inativar as células fúngicas, prevenindo a germinação das células de esporos (PCT, 2018).

Neste contexto, ao analisar a eficácia de assepsia em explantes de *V. americana*, se notou a ineficiência no estabelecimento de segmentos nodais e apicais, uma vez que o protocolo de assepsia testado apresentou alta taxa de contaminação fúngica e bacteriana, o que resultou na morte dos explantes, impossibilitando o avanço dos experimentos de brotação e enraizamento. Cavalcante *et al.*, (2015) ao testarem o estabelecimento *in vitro* dos explantes nodais de *Crataeva tapia* L., uma espécie florestal coletada em campo, observaram também alta contaminação o que inviabilizou a continuação dos experimentos.

Esses resultados foram compartilhados também nos trabalhos de Plessis *et al.* (2021), com *Hibiscus coddii* subsp. *Barnardii*, os segmentos nodais apresentaram alta contaminação e consequentemente uma baixa taxa de sobrevivência, ao testarem desinfestação com hipoclorito de sódio. Em contrapartida Nissim, Fadrel e Labrecque (2024) ao testarem a eficiência do hipoclorito de sódio em segmentos apicais de *Salix miyabeana* (Seemen), obtiveram sucesso na eliminação dos micro-organismos nas concentrações de 2 e 3% de cloro ativo.

Quanto aos explantes foliares de *V. americana*, estes responderam positivamente ao controle de contaminação, ao associar o processo de assepsia com a suplementação do meio de cultura com 1,5 ml L⁻¹ PPM. Leão *et al.* (2020) ao testar diferentes concentrações de PPM no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Guadua latifolia* verificaram a eficácia utilizando 2 ml L⁻¹ do biocida acrescidos ao meio de cultura, e Da Silva *et al.* (2021) testando uso de PPM no controle de contaminação em explantes foliares de *Hevea spp.* observaram a eficiência na concentração de 1 ml L⁻¹.

Quanto aos embriões de *V. americana*, foi observado alta taxa de contaminação (95%), quando a assepsia foi aplicada apenas às sementes, e quando a assepsia foi realizada nas sementes e nos embriões, houve uma diminuição na proliferação dos microrganismos à medida que se aumentava o tempo de exposição dos embriões ao hipoclorito de sódio. No entanto, a taxa de oxidação foi menor (0%) e houve maiores taxas de germinação nos embriões (60%) do tratamento em que somente as sementes passaram por assepsia.

Santos *et al.*, 2022 ao testarem a assepsia em embriões de *Ocotea odorifera* (Vell.) com hipoclorito de sódio notaram que o maior tempo de imersão (10 minutos), foi o mais eficaz contra os micro-organismos. Hoffmann *et al.*, (2022) também encontraram uma baixa contaminação ao testar a assepsia com imersão dos embriões de *Raulinoa echinata* R. S. Cowan, por 10 minutos e uma germinação acima de 50%. Martendal *et al.*, (2013) também encontraram resultados semelhantes ao empregarem diferentes concentrações e tempo de exposição de hipoclorito em embriões de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss., eles observaram, que nos maiores tempos (30 minutos) de imersão a taxa de contaminação eram mais baixas, porém a germinação também foi baixa.

Além das contaminações por fungos e bactérias, a oxidação fenólica dos explantes também é um fator limitante para o estabelecimento e sucesso da cultura *in vitro*, a oxidação é causada pela formação de compostos fenólicos (BASSAN, *et al.*, 2006). Mezzalira e Kuhn (2021) recomendam o uso de agentes antioxidantes como ácido cítrico ou ascórbico para evitar a ação dos agentes oxidantes. Os antioxidantes desempenham um papel fundamental na neutralização dos radicais livres, na ligação com íons metabólicos ou na transformação de peróxidos em produtos incapazes de gerar radicais livres com potencial oxidativo (SILVA *et al.* 2022).

As oxidações fenólicas também foram presentes nos explantes de *V. americana*, nos tratamentos submetidos as menores concentrações de PPM e nos embriões nos maiores tempos de exposição ao hipoclorito de sódio. Resultados semelhantes foram encontrados na espécie florestal *Eugenia involucrata* (DC)., quando tiveram seus tecidos em contato por tempos maiores que 10 minutos com o hipoclorito de sódio, ocorreram a oxidação dos mesmos (Gole *et al.*, 2013). Ledo *et al.*, (2019) também observaram a ausência de oxidação dos explantes de *Miscanthus sinensis* em tratamentos com 1 mL L⁻¹ de PPM™.

Outro fator importante para o estabelecimento de uma cultura são as escolhas dos reguladores, o BAP é uma importante citocinina para indução de brotos, entretanto estudos têm apontado o uso da melatonina como um importante modulador na produção de brotos (ERLAND *et al.* 2015; ARNAO e RUIZ, 2019; NEAMAH *et al.* 2022) o que motivou a busca desses resultados em *V. americana*.

Em relação a indução de calos as maiores taxas de cobertura de calos em *V. americana* foram obtidas na presença de Picloram ao meio de cultura sendo 4 mg L⁻¹ a mais responsiva para calogênese, Rocha *et al.* (2024) em testes com reguladores de crescimento para indução de calos em folhas de *Dipteryx odorata*, concluíram que o Picloram foi o regulador mais A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

eficiente, ambas espécies florestais pertencem a família Leguminosae. Ferreira *et al.* (2022) ressaltam ao testarem a indução de calos em explantes foliares com Picloram e 2,4-D, observaram que o Picloram apresentou as maiores taxas, assim como ocorreram nos calos foliares em *V. americana*, entretanto Chaudhury e Prakash, (2019), tiveram as maiores taxas de indução em *Carica papaya* nas concentrações com 2,4-D.

Jayhanti *et al.*, (2015) ressaltam que os resultados de *Elaeis guineensis* (Jacq.) submetidos ao Picloram foram semelhantes ao 2,4-D na indução de calos, porém na combinação de 2,4-D + picloram observaram uma maior indução de calos. Estes resultados também foram encontrados no presente trabalho, indicando que os tratamentos testados em segmentos foliares de *V. americana* são eficazes para a indução de calos.

Os reguladores de crescimento do grupo das auxinas agem na inicialização de divisão celular e no controle do desenvolvimento e alongamento das células vegetais (Nogueira *et al.* 2007). A combinação de Picloram 1mg L^{-1} com 4mg L^{-1} de 2,4-D evidenciaram a indução de calos embriogênicos e formação de plântulas em *Carica papaya*, nas concentrações de 6,0 e $7,0\text{mg L}^{-1}$ alguns calos também apresentaram características embriogênicas (CHAUDHAURY E PRAKASH, 2019). Em *V. americana* nas concentrações de 0,4 e $0,7\text{mg L}^{-1}$ os calos submetidos a essas concentrações apresentaram células potencialmente embriogênicas, como foram observadas em MEV células com formatos isodiamétricos, característica celular vista também em células embriogênicas de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) e no dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Nogueira et al. 2007, Gomes et al, 2024).

Os calos são considerados embriogênicos quando exibem características anatômicas similares às células meristemáticas, como citoplasma denso, paredes celulares delgadas, núcleo central grande e nucléolos mais proeminentes, vacúolos pequenos e fragmentados e principalmente quando apresentam formato celular isodiamétrico (Santana *et al.* 2023). Calos que apresentam células alongadas e com grandes espaços intercelulares, núcleos pouco visíveis e vacúolos bem desenvolvidos, geralmente são classificados como não embriogênicos (BARTOS et al., 2018).

A coloração dos calos também é importante para identificação do tipo de calo, Silva *et al.* (2018), ressaltam que calos com características translúcidas, brancas ou amareladas dos calos geralmente são friáveis que possuem o potencial para gerar embriões somáticos. Maurin, Fitch e Paul (1990) ressaltam que calos verdes são importantes para regeneração longas, em testes com cana de açúcar os calos de coloração verde, mantiveram a capacidade de regeneração por mais de quatro anos.

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo com *V. americana* destacam a importância de otimizar protocolos específicos para assepsia de acordo com o tipo de explante, considerando as condições ambientais e as características intrínsecas dos tecidos vegetais.

Em conclusão, apresentamos protocolos abrangentes e eficientes para indução de calos *in vitro* a partir de explantes foliares oriundos de viveiro com o uso do regulador Picloram. Estes protocolos abrem caminhos para pesquisas futuras com a espécie e determinam outras vias de conservação para *V. americana*.

6. REFERÊNCIAS

ABDALLA, N. et al. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 1-28, 2022.

AFRASIAB, H.; RASHID, N.; AKRAM, M. An Efficient Method for Direct Shoot Regeneration from Leaf Explants of *Solanum nigrum* Induced by Thidiazuron. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 19, n. 2, p.348-354,2017.

AHMADPOOR, F. et al. Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in in vitro cultures *Melia azedarach* L. **AMB Express**, v. 12, p. 1-12, 2022.

ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. Embrapa network for brazilian plant genetic resources conservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 5, p. 350– 360, 2018.
 ARAÚJO, M. C. R. et al. Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. p. 5, 1-8, 2021.

ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator?. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 38-48, 2019.

BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, p. 381-390, 2006.

CARVALHO, S. D. et al. In vitro propagation of the Amazonian medicinal plant guayusa (*Ilex guayusa*) and effects of light in the growth and development of this shade tolerant plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 147, p. 503-517, 2021.

CAVALCANTE, P. F. Desenvolvimento In Vitro De Diferentes Explantes De Trapiá (*Crataeva tapia* L.). In: SEMBIO, 5., 2015. Bahia. **Anais eletrônicos** [...] Bahia: Paulo Afonso, 2015. v. 5, p. 41-47. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Gustavo-Torres-4/publication/348236612_DESENVOLVIMENTO_IN_VITRO_DE_DIFERENTES_EXPLANTES_DE_TRAPIA_Crataeva_tapia_L/links/5ff49c5f299bf1408874c178/DESENVOLVIMENTO-IN-VITRO-DE-DIFERENTES-EXPLANTES-DE-TRAPIA-Crataeva-tapia-L.pdf> Acessado em: 20 abr. 2024.

CHAUDHARY, K.; PRAKASH, J. Effect of 2, 4-D and Picloram on Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* var. P-7-9. **Plant Tissue Cult. Biotechnol.**, v. 29, p. 25-32, 2019.

CRUZ, E.D.; PEREIRA, A. G. **Germinação de sementes de espécies amazônicas: acapu 795** (*Vouacapoua americana* Aubl.). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. p. 1-4.

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista “Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)” - <https://link.springer.com/journal/11240>

(Embrapa Amazônia Oriental - Comunicado técnico, 288). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1059268>. Acesso em: 20 mar. 2024.

DOS SANTOS, D. W. R. et al. Effects of a commercial biocide, kasugamycin and consistency of the culture medium on the in vitro establishment of bamboo1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. e55435, 2019.

ERLAND, L. A. E. et al. A new balancing act: The many roles of melatonin and serotonin in plant growth and development. **Plant signaling & behavior**, v. 10, n. 11, p. 1-15, 2015.

FERMINO JR, P. C. P. et al. Calogênese e organogênese in vitro a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Sm.) da Amazônia Ocidental: Estabelecimento e regeneração de brotos. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 900-904, 2007.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Comparison of 2, 4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, p. 157-163, 1990.

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, v. 19, p. 77-82, 2013.

GOLLE, D. P. et al. Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, p. 1-9, 2020.

GOMES, H. T. et al. Somatic embryogenesis in oil palm from immature leaves with emphasis on leaf position, sequential callus re-collection, use of temporary immersion system, and assessment of genetic and epigenetic fidelity of the resulting clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 2, p. 1-32, 2024.

GUIDI NISSIM, W.; CORTE, G. F.; LABRECQUE, M. Assessment of different procedures for in vitro propagation of *Salix miyabeana*. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 158, n. 1, p. 147-154, 2024.

JAFARI, M.; DANESHVAR, M. H.; LOTFI-JALALABADI, A. Control of in vitro contamination of *Passiflora caerulea* by using of sodium hypochlorite. **Indo-American Journal of Agricultural and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 2, p. 8-15, 2016.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, p. 275-279, 2010.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant gene silencing**, n.43, p. 179-188, 2000.

KUSHNARENKO, S. et al. Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 6, p. 964-971, 2022.

Laboratório Gentaur Portugal. **Mistura de Preservação de Plantas (PPM), tecnologia de células vegetais**. 2018. Disponível em: <<https://gentaur.pt/mistura-de-preservacao-de-plantas-ppm-tecnologia-de-celulas-vegetais/>>. Acesso em: 4 abr. 2024.

LAMEIRA, O. A. et al. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém, ed. Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p.

LEÃO, J. R. A. et al. Controle de contaminantes no estabelecimento in vitro de *Guaduya latifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. 1-7, 2020.

LIU, Y. et al. Establishment of a highly efficient in vitro propagation system of *Diospyros lotus*. **Forests**, v. 14, n. 2, p. 366, 2023.

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

MARAVILHA, L. F. et al. Enraizamento in vitro e aclimatização de plântulas de *Corymbia citriodora*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 43, p. 1-10, 2023.

MARTENDAL, C. O. et al. In vitro cultivation of zygotic embryos from Murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.): establishment, disinfection, and germination. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, p. 221-229, 2013.

MELLO, T. et al. Establishment and in vitro morphogenesis of sapucaia explants (*Lecythydaceae*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 56, p. 882-893, 2020.

MELLO, T. et al. Establishment and in vitro morphogenesis of sapucaia explants (*Lecythydaceae*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 56, p. 882-893, 2020.

MEZZALIRA, F. K.; KUHN, B. C. Padronização de um protocolo para assepsia de segmentos nodais de *Phalaenopsis* para clonagem in vitro. In: **Colloquium Agrariae**. v. 17, n. 1, p. 1-17, 2021.

MOLINARI, L. V. et al. Effects of chemical sterilization of the culture media, porous membranes and luminosity on in vitro culture of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Journal of Forestry Research**, v. 32, n. 4, p. 1587-1598, 2021.

MORANDI, M. A. **Desenvolvimento de protocolos de propagação in vitro de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.)**. p. 1-123, 2020. Dissertação, (Pós-graduação em Ciências) – Universidade de São Paulo.

NEAMAH, S. I. et al. Positive response of *Hyoscyamus pusillus* callus cultures to exogenous melatonin on biochemical traits and secondary metabolites under drought conditions. **International Journal of Agronomy**, v. 2022, p. 1-10, 2022.

NICK, C. et al. **Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos**. In: PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: Conservação, manejo e uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG, Arca, p. 59-88, 2010.

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

NOGUEIRA, A. et al. Ácido ascórbico e carvão ativado no controle de oxidação fenólica em explantes de *Astronium urundeuva* (M. Allemão) Engl. In: **9º Congresso Florestal Brasileiro**, 2022. p. 556-558. **Anais eletrônicos** [...]. Disponível em: <https://publicacoes.softaliza.com.br/congressoflorestalbrasileiro/article/view/2549>, acessado em: 20 mar. 2024.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 48-50, 2007.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 366-370, 2007.

OLIVEIRA, N. P.; RIBEIRO, S. A. F.; SOUZA, M. M. Control of contamination and oxidation in the in vitro cultivation of olive tree (*Olea Europaea* L.) cv. "Koroneiki " Research. **Society and Development**, v. 10, n. 5, p.1-10, 2021

OSANI, O. M.; PANDE, V.; NAILWAL, T. K. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 7, n. 7, p. 3778-3786, 2018.

PAIS, A. K. et al. Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1995-1998, 2016.

PAMULAPARTHI, A.; BANALA, M.; NANNA, R. S. Optimization of culture media for in vitro Zygotic embryo culture of *Senna alata* L. Roxb—An Ethnomedicinal plant. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 3, p. 1-6, 2014.

PLESSIS, H. J. et al. Preliminary study on in vitro shoot culture of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*, an indigenous South African flowering plant. **Ornamental Horticulture**, v. 27, p. 408-416, 2021.

RAHAYU, E. S. et al. The optimal sterilizing compound and culture medium in *Elaeocarpus grandiflorus* L. in vitro shoot induction. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, p. 032040, 2019.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, p. 657-664, 2015.

RODRIGUES, M. A. et al. Regeneração de pitaya por organogênese indireta avaliada por microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 57, n. Z, p. 02312, 2022.

ROMO-PAZ, F. J. et al. Micropropagation of *Physalis angulata* L. and *P. chenopodifolia* Lam. (Solanaceae) via indirect organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 59, n. 4, p. 497-506, 2023.

A versão do artigo em inglês foi submetido na revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" - <https://link.springer.com/journal/11240>

- SANTANA, F. V. et al. Histological studies on induction of somatic embryogenesis in mangabeira. **Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana**, Curitiba, v.21, n.11, p. 22611-22621, 2023.
- SANTOS, J. A. et al. Plant production of *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer by the micro-propagation technique. **Scientia Forestalis**, v.50, p. e3759, 2022
- SATO, A. Y. et al. *Celtis* sp micropropagation: contamination and oxidation control. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.
- SILVA, A. C. L. et al. Indução da calogênese em segmentos foliares de seringueira (*Hevea* spp.) na Amazônia Sul-Occidental. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. 1-10, 2021.
- SILVA, D. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 4, p. 1044-1050, 2018.
- SILVA, F. R. et al. **Análises ecológicas no R**. Ed. Nuppea, 1.ed. São Paulo, 2022. 641p.
- SOUZA, L. A. G. *Acapu* (*Vouacapoua americana*). In: CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R.; 834 SAMPAIO, P. de T. B. **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de 835** utilização. Manaus: INPA: SEBRAE, p. 317-324, 1999.
- SOUZA, R. et al. Growth regulators and their reflection on different hop genotypes cultivated under in vitro conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1-8, 2022.
- TANDON, B. et al. Statistical optimization of in vitro callus induction of wild and cultivated varieties of *Mucuna pruriens* L. (DC.) using response surface methodology and assessment of L-Dopa biosynthesis. **Industrial Crops and Products**, v. 169, p. 113626, 2021.
- THORPE, T.A. History of plant tissue culture. **Mol Biotechnol**, v.37, p. 169–180, 2007.
- VALLEJOS-TORRES, G. et al. Vegetative propagation of *Manilkara bidentata* (A. DC.) A. Chev. using mini-tunnels in the Peruvian Amazon region. **Forest Systems**, v.30, n. 2, p. 1-5, 2021.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

V. americana demonstrou ser uma espécie sazonal uma vez que a atividade das suas fenofases ocorreram apenas uma vez ao ano e foi marcada pelas variáveis ambientais, suas fases reprodutivas foram correlacionadas com o período chuvoso e as foliares com o seco.

A micropropagação de *V. americana* demonstrou que a assepsia é fundamental para o estabelecimento das culturas, os segmentos apicais e nodais apresentaram alta contaminação e inviabilizando os demais passos, entretanto foi possível estabelecer os segmentos foliares e os embriões.

A indução de calos *in vitro* a partir de explantes foliares oriundos de viveiro com o regulador Picloram e combinação com 2,4-D evidenciaram células com características embriogênicas. Estes protocolos abrem caminhos para pesquisas futuras com a espécie e determinam outras vias de conservação para *V. americana*.

O presente estudo evidencia a importância da fenologia e propagação *in vitro* para a conservação de *V. americana*, uma espécie criticamente ameaçada, auxiliando na compreensão do seu comportamento ecológico e em estratégias de manutenção e conservação *ex situ* da espécie, juntas essas abordagens são essenciais para reverter o quadro de conservação a qual a espécie se encontra.