



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

**BRUNO FREITAS MATOS ALVIM**

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Amburana cearensis***  
**(ALLEMÃO) A. C. SMITH.**

FEIRA DE SANTANA-BA

2012

**BRUNO FREITAS MATOS ALVIM**

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE  
*Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH.**

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2012

**BRUNO FREITAS MATOS ALVIM**

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE  
*Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana  
Co-orientadora Dra. Ana Valéria de Souza

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. (a). Dr (a).**

---

**Prof. (a). Dr (a).**

---

**Prof. Dr. Orientador**  
**Orientador e Presidente da Banca**

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2012

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus por me amparar em momentos difíceis e sempre estar presente em minha vida, sem ele nada disso seria possível.**

**À minha família, meu porto seguro, pelo amor, incentivo, dedicação e confiança deposita em mim.**

**Ao meu orientar Prf. Dr. José Raniere, pela orientação, competência, aprendizado e compreensão durante todo percurso.**

**À Alone pela paciência, dedicação, ensinamentos e confiança.**

**À Cristina pela amizade, incentivo, críticas e sugestões valiosas.**

**Aos meus amigos pela compreensão e apoio, principalmente aqueles que acompanharam de perto meu trabalho (Priscila, Tecla, Mara, Fernando), agradeço a Deus por coloca-los em minha vida, tenho a certeza que o convívio com vocês tornou essa trajetória mais proveitosa.**

**Aos funcionários pela atenção e disponibilidade.**

**A todos que participaram e contribuem para minha formação pessoal e profissional.**

**Obrigado!**

## RESUMO

*Amburana cearensis* A.C. Smith, conhecida popularmente como imburana-de-cheiro, amburana-de-cheiro e cumaru, tem ampla distribuição nas regiões de Caatinga e Cerrado. Destaca-se devido a sua multiplicidade de usos, tais como forrageiro, alimentar, madeireiro e medicinal. Em virtude da degradação de seus habitats naturais e sua exploração predatória, é listada como espécie ameaçada de extinção. O objetivo deste estudo foi otimizar o protocolo de micropropagação e desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* de *Amburana cearensis*. No primeiro capítulo, para a multiplicação *in vitro*, foram utilizados diferentes reguladores vegetais (BAP, ANA, AIA, KIN) e explantes (embrião zigótico e segmentos nodal e cotiledonar; na fase de enraizamento foram testadas as auxinas AIA, AIB e ANA e combinações de AIB com carvão ativado. No segundo capítulo, foi avaliado o efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol e dos retardantes de crescimento paclobutrazol e ancymidol na conservação *in vitro* de *A. cearensis*. O meio utilizado nos experimentos foi o WPM acrescido de 87,64mM de sacarose, exceto nos tratamentos utilizando agente osmótico que continham variações na concentração de sacarose. O melhor resultado para multiplicação foi obtida utilizando o segmento nodal em meios de cultivo acrescido de 1µM de BAP e 0,05 µM ANA. A adição de 2mM de carvão ativado associado a 4µM de AIB proporcionou as melhores porcentagens de enraizamento dos brotos (54%). A suplementação de 262,92µM de sacarose ao meio de cultivo possibilitou a conservação de plantas de *A. cearensis* por 300 dias com 77,5% de sobrevivência.

**Palavras-chave:** Reguladores de crescimento. Carvão ativado. Agente osmótico. Leguminosae.

## ABSTRACT

*Amburana cearensis* AC Smith, popularly known as "imburana-de-cheiro", "amburana-de-cheiro" and "cumaru", has wide distribution in regions of Caatinga and Cerrado. It stands out due to its multitude of uses, such as forage, food, timber and medicinal. By virtue of degradation of their natural habitats and predatory exploitation, it is listed as endangered species. The aim this study was to optimize the micropropagation protocol and develop a protocol for in vitro conservation *Amburana cearensis*. In the first chapter, for in vitro multiplication, were used different plant regulators (BAP, ANA, AIA, KIN) and explants (zygotical embryo, nodal and cotyledonary segments; in stage of rooting were tested auxins AIA, AIB, ANA and AIB combination with activated carbon. In the second chapter, was evaluated the effect of osmotic agents sucrose, sorbitol and mannitol and growth retardants paclobutrazol and ancymidol on vitro conservation of *A. cearensis*. The medium used in the experiments was the WPM supplemented with 87.64 mM sucrose, except in treatments using osmotic agent that contained variations in the concentration of sucrose. The best result was achieved for multiplication using nodal segments in culture environment added with 1  $\mu$ M BAP and 0.05  $\mu$ M ANA. The addition of 2 mM activated carbon associated with 4  $\mu$ M AIB gave the best rooting percentages of shoots (54%). Supplementation of 262.92mM sucrose in the environment enabled the preservation of plants *A. cearensis* for 300 days with 77.5% survival.

**Keywords:** Growth Regulators. Activated Charcoal. Osmotic Agent. Leguminosae.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	
	<b>ABSTRACT</b>	
1.1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	10
1.2	Referências	14
1.2.1	<b>CAPÍTULO 1- Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Amburana cearensis</i> (alemão) a. C. Smith.</b>	16
1.2.2	RESUMO	17
1.2.3	ABSTRACT	18
1.2.3.1	INTRODUÇÃO	19
1.2.3.2	MATERIAL E MÉTODOS	21
1.2.3.3	Condições gerais dos experimentos	21
1.2.3.4	Meio de cultura e condições experimentais	21
1.2.4	Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>A. cearenses</i>	22
1.2.4.1	Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de <i>A. cearensis</i> .	22
1.2.4.2	Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de <i>A. cearensis</i> .	22
1.2.5	Efeito de diferentes concentrações de cinetina (KIN) em segmentos nodais de <i>A. cearensis</i> .	23
1.3	Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) ácido naftaleno acético (ANA) na indução de brotações utilizando o explante embrião zigótico de <i>A. cearensis</i> .	23
1.3.1	Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i> .	23
1.3.2	Efeito das auxinas, ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indolacético (AIA) na formação de raízes <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i> .	23
1.3.3	Efeito do carvão ativado combinado com AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i> .	24
1.3.4	Análise estatística	24
1.3.5	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	25
1.3.6	Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) na indução de brotações utilizando os explantes segmento nodal e cotiledonar de <i>A. cearenses</i> .	25
1.4	Efeito do benzilaminopurina (BAP) e do ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de <i>A. cearensis</i> .	27
1.5	Efeito da cinetina (KIN) na indução de brotações utilizando o explante segmento nodal de <i>A. cearensis</i> .	39
	Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) ácido naftaleno acético (ANA) na indução de brotações utilizando o explante embrião zigótico de <i>A. cearensis</i> .	41
	Efeito das auxinas, ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indolacético (AIA) no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i> .	44
	Efeito do carvão ativado no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i> .	46
2.1	<b>CONCLUSÃO</b>	51
2.2	<b>REFERÊNCIAS</b>	52
2.2.1	<b>CAPÍTULO 2-Conservação <i>in vitro</i> de <i>Amburana cearensis</i> (ALLEMÃO) A. C. SMITH.</b>	56
2.2.2	RESUMO	57
2.2.3	ABSTRACT	58
2.2.4	INTRODUÇÃO	59
2.2.5	MATERIAL E MÉTODOS	62
2.3	Condições gerais dos experimentos	62
2.3.1	Meio de cultivo e inoculação das sementes	62



2.3.2	Efeito dos agentes osmóticos sacarose, manitol e sorbitol na conservação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	63
2.4	Efeitos dos retardantes de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancimidoI (ANC)	64
2.5	Análises estatística	64
	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
	Efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na conservação <i>in vitro</i> de <i>A. cearensis</i>	65
	Efeitos dos retardantes de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancimidoI (ANC)	75
	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>84</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta uma ampla diversidade de espécies arbóreas nativas que se destacam pela qualidade madeireira, uso medicinal, industrial, utilização ornamental e paisagística, além da relevância ecológica através do reflorestamento e recomposição de áreas degradadas. Parte destas espécies florestais é comercializada, representando cerca de 4% do Produto Interno Bruto do país. Na Caatinga esse comércio é representado principalmente por plantas nativas (CAMPANHOLA, 2012).

O bioma Caatinga, representa o maior ecossistema do nordeste brasileiro, ocupando mais de 50% do território baiano. Esse bioma não é homogêneo, podendo ser encontrado diversos tipos, variando desde uma estrutura de florestas semi a caducifólias, com sub-bosques de arbustos caducifólios a ervas anuais, onde predominam especialmente as leguminosas (GIULIETTI et al., 2006).

A família Leguminosae possui representatividade significativa neste ecossistema (QUEIROZ et al., 2006) apresentando destaque no setor econômico, em que são inúmeras suas utilidades. Dentre as espécies dessa família destaca-se *Amburana cearensis* A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) Papilionoideae (Fabaceae), conhecida popularmente como imburana-de-cheiro, amburana de cheiro e cumaru, com ampla distribuição no Brasil, ocorrendo no Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (MAIA, 2004; LEAL, 2006).

*A. cearensis* destaca-se devido a sua multiplicidade de usos, tais como forrageiro, alimentar, madeireiro, medicinal e cultural. Essa espécie apresenta alto valor agregado, devido às qualidades de sua madeira e propriedades terapêuticas, resultando na sua exploração predatória até a exaustão nos locais de ocorrência (RAMOS et al, 2004). A retirada da casca para fins medicinais acaba intensificando esse processo, por provocar anelamento do caule, uma vez que, são utilizadas técnicas destrutivas para obtenção do produto afetando os sistemas condutores das plantas e levando à morte da planta (GOMES, 2008).

Outro fator que permanece contribuindo para a redução das populações dessa espécie é atribuída à coleta indiscriminada das sementes para fins comerciais, uma vez que limita a sua propagação natural (CARVALHO, 1994; HILTON-TAYLOR, 2000; IUCN, 2005; LEITE, 2005; MAIA, 2004; MMA, 2011).

Todos esses fatores colaboraram para a inserção da *A. cearensis* na lista de espécies ameaçadas de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000).

Diante da relevância socioeconômica e por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção, é prioritário o desenvolvimento de alternativas que possam propagá-las e conservá-las *in situ* e *ex situ*.

As técnicas de cultura de tecidos podem auxiliar nesse processo, uma vez que possibilita a obtenção de grande quantidade de plantas, bem como, a conservação de espécies em bancos de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade do táxon em estudo.

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, tem-se a micropropagação que possibilita a produção de um grande número de plantas a partir de um único indivíduo, podendo ser utilizada como uma alternativa viável para a propagação de *A. cearensis*. Além das altas taxas de multiplicação obtidas nesse processo, reduzido tempo de cultivo e espaço físico são requeridos para a produção das mudas, quando comparados aos métodos de propagação vegetativa *in vivo* (ALMEIDA et al., 2002).

Para a obtenção de um protocolo de regeneração eficiente, além da escolha do explante mais adequado, é necessário a indução dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, responsáveis pela formação de tecidos e órgãos, através do uso de reguladores de crescimento capazes de estimular a formação de parte aérea e raízes. A indução de brotações em explantes pode ser realizada por meio da utilização de citocininas exógenas, promovendo o crescimento inicial das gemas axilares pela quebra da dominância apical (TAIZ e ZEIGER, 2004). As citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) são comumente utilizadas na cultura de tecidos e, segundo Hu e Wang (1983), apresentam diferença quanto ao potencial de indução dos brotos nos explante.

O papel das auxinas na indução e desenvolvimento das raízes tem sido estudado, estando envolvidas no controle do crescimento e na divisão celular (KERBAUY, 2008). Diversas auxinas, como o ácido indolbutírico (AIB), o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indolacético (AIA) são comumente utilizados neste processo, em concentrações que variam de acordo com a espécie (SILVEIRA et al. 2001).

A rizogênese é uma etapa chave na produção de mudas micropropagadas, já que, para o crescimento e a sobrevivência das plântulas

durante o processo de aclimatização, a formação de um sistema radicular bem definido é importante, bem como, alternativas que minimizem a perda de água das plântulas.

No processo de enraizamento, um dos fatores físicos necessários para o crescimento e desenvolvimento de raízes é a ausência de luz. O carvão ativado tem sido utilizado em meios de cultura para estimular o enraizamento, devido a sua alta habilidade em reduzir a luz do meio e também por adsorver compostos fenólicos liberados pelos tecidos, uma vez que esses compostos podem inibir o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Além de protocolos para a produção de mudas *in vitro*, a cultura de tecidos tem sido empregada como ferramenta viável para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. O crescimento mínimo é um dos métodos de conservação *in vitro* que promove a redução do metabolismo da planta (FARIA et al., 2006). Sendo viabilizado pela redução da temperatura, luminosidade e pela aplicação de agentes osmóticos e retardantes que diminuem o crescimento e desenvolvimento das plantas, sem induzir efeitos fitotóxicos ou de má formação (GROSMANN, 1990; SIQUEIRA e SALOMÃO, 2002).

A utilização de agentes osmóticos, tais como a sacarose, sorbitol e o manitol, em trabalhos de conservação *in vitro*, tem por finalidade reduzir o potencial hídrico do meio, tornando a água indisponível para a cultura, determinando, assim, o baixo crescimento da planta. Já os retardantes de crescimento hormonais, como o ancymidol e paclobutrazol, agem inibindo a síntese da giberelina, os quais atuam bloqueando a etapa da conversão do ent-caureno a ácido ent-caureno na rota metabólica da biossíntese de giberelina (RADEMACHER, 2000); reduzindo dessa forma o crescimento da planta, visto que as giberelinas aumentam a alongação e a divisão celular, proporcionando o crescimento vegetal (TAIZ e ZAIGER, 2004).

Essa estratégia de conservação amplia o tempo entre os subcultivos, reduzindo a ocorrência de contaminação, erro na manipulação do material, falhas nos equipamentos, mudanças no genótipo devido à instabilidade genética, além de diminuir os custos com a manutenção do banco de germoplasma (ENGELMANN, 1991; CANTO et al., 1994; JARRET, 1997).

Pesquisas anteriores com *A. cearensis* realizadas por Campos (2009), obtiveram baixas taxas de multiplicação *in vitro*. Por isso a necessidade de

realização de novos estudos para a micropropagação e o desenvolvimento de um protocolo de conservação *in vitro* desta espécie.

Diante do exposto, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes explantes e/ou reguladores de crescimento na multiplicação e enraizamento de brotos, bem como o estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* para *A. cearensis*, como forma alternativa e complementar a outras técnicas de conservação.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W. A. B. et al. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p. 296-300, 2002.
- ANDRADE. S. R. M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. EMBRAPA cerrados, Planaltina, 2002.
- CAMPANHOLA, Clayton. Ambiente Florestal: A pesquisa Florestal Brasileira, 2012. Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/florestal/artigos/a\\_pesquisa\\_florestal\\_brasileira.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/florestal/artigos/a_pesquisa_florestal_brasileira.html)>. Acesso em: 6 de fevereiro. 2012.
- CANTO, A.M.E. et al. Conservação in vitro de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v .39, n.7 p. 717-720, 1994.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades E Uso Da Madeira**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 640.
- ENGELMANN, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant germplasm- a review. **Euphytica**. v.57, p. 227-243, 1991.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. D.; SOUZA, A. S. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- GIULIETTI, A. M. ET AL. Flora da Bahia. **Sitientibus**. v.6, n.3, p.169-173, Séries Ciências Biológicas, 2006.
- GIULIETTI, A. M; QUEIROZ, L. P. **Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímico e Atividade biológica**. Recife. Associação Plantas do Nordeste, v.4, 2006.
- GOMES, E. C. S; Plantas da caatinga de uso terapêutico; levantamento etnobotânico. **Engenharia ambiental**, v.5, n.2, p. 74-85, mai/ago, 2008.
- GROSSMANN, K. Plant growth retardants as tools in physiology research. **Phsiologia Plantarum**. v. 78, n.4, p.640-648, 1990.
- HILTON-TAYLOR, C. (compiler) 2000. **2000 IUCN Red List of Threatned Species**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Disponível em: <[www.biodiversitas.org.br/listasmg/iucn.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/listasmg/iucn.pdf)> em : Acesso em 17 de novembro de 2011.
- IUCN. **Lista da flora ameaçada de extinção com ocorrência no Brasil**. Disponível em: <[www.biodiversitas.org.br/floraBr/iucn.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/iucn.pdf)>. Acesso em : 17 de novembro de 2011.

JARRET, R.L.; MERRICK, L.C.; HOLMS, T.; EVANS, J. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]. **Genome**, v.40, p.433-449. 1997.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008. p.116-223.

LEAL, L. K. M. **Contribuição para validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo**. Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, v.1, p.178, 2006.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, v.13, p.49–65, 2005.

MAIA, G. M. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª Ed. São Paulo. D e Z computação gráfica e editora, 2004. p.413.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). BRASIL. **Instruções normativas**. Disponível em: <[www.mma.gov.br/estruturas/ascom\\_boletins/\\_arquivos/83\\_19092008034949.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf)>. Acesso em : 14 de novembro de 2011.

QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Nordeste Semi-Árido: caracterização geral e lista das fanerógamas. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. (eds.). **Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi – árido Brasileiro**. Recife: Associação de plantas do Nordeste. Vol. I. Instituto do Milênio do Semi – Árido, Associação Plantas do Nordeste, Ministério da Ciência e Tecnologia, Recife, 2006. p. 15–364.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review. of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 51, p. 501-531, 2000.

RAMOS, K. M. O. et al. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemao) A.C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta Botanica Brasílica**, v.18, n.2, 2004.

SILQUEIRA, D. L; SALMÃO, L. C. C. Efeito do paclobutrazol no crescimento e florescimento dos citros. **Laranja**, v.23, n.2, p. 355-369, 2002.

SILVEIRA, C. A. P; CITADIN, I. FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do Porta – enxerto de macieira M-7 (*Malus sp.*) sob diferentes tipos e concentrações de auxinas. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.7 n 2, p. 107-109, 2001.

## CAPÍTULO I

---

**MULTILICAÇÃO *IN VITRO* DE *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A.  
C. SMITH.**



## RESUMO

*A. cearensis* é uma espécie arbórea nativa brasileira importante nas regiões de Cerrado e Caatinga, sua madeira alcança bons preços no mercado nacional e internacional, além disso, a espécie apresenta propriedades medicinais. Em consequência do extrativismo predatório, foi constatada a brusca redução das populações locais, resultando na inserção da *A. cearensis* na lista de espécies ameaçadas de extinção. Assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas de propagação, como a micropropagação. O presente trabalho teve o objetivo induzir brotações em diferentes explantes de *A. cearensis* utilizando reguladores de crescimento. Para o primeiro experimento, foram utilizados segmentos nodais e cotilédones inoculados em meio WPM, acrescido de 4 $\mu$ M de BAP combinado com diferentes concentrações de AIA (0,0; 0,01; 0,02; 0,05  $\mu$ M). No segundo experimento, os explantes (segmento nodal e cotilédonar) foram inoculados em meio WPM contendo combinações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4  $\mu$ M) e ANA (0,0; 0,01; 0,02 e 0,05  $\mu$ M). No terceiro experimento, foi utilizado o explante embrião zigótico, inoculados em meio de cultura WPM associado a combinações de BAP (2,0; 4,0; 8,0 e 16  $\mu$ M) e ANA (0,0 e 0,5  $\mu$ M). Na fase de enraizamento foram testadas as auxinas (AIA, AIB E ANA) nas concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4  $\mu$ M) e combinações de 4 $\mu$ M de AIB com carvão ativado (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mM). O melhor resultado para multiplicação foi obtido utilizando o segmento nodal em meios de cultivo acrescido de 1 $\mu$ M de BAP e 0,05  $\mu$ M de ANA. A adição de 2mM de carvão ativado associado a 4 $\mu$ M de AIB proporcionou as melhores porcentagens de enraizamento (54%).

**Palavras-chave:** Auxinas. Citocininas. Cumaru. Carvão ativado

## ABSTRACT

*A. cearensis* is a Brazilian native tree species important in the regions of Cerrado and Caatinga, its wood reaches good prices in the domestic and international markets, moreover, the species has medicinal properties. As a result of predatory extraction, there was observed the abrupt reduction of local populations, resulting in the insertion of *A. cearensis* at the list of endangered species. Thus, it is necessary to develop alternative techniques of propagation, such as micropropagation. This work aimed to induce plantlets on different explants of *A. cearensis* using growth regulators. For the first experiment, nodal segments and cotyledons were inoculated in WPM medium supplemented with 4 µM of BAP combined with different concentrations of AIA (0.0, 0.01, 0.02, 0.05 µM). In the second experiment, the explants (nodal segments and cotyledonary) were inoculated in WPM medium containing combinations of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4 µM) and ANA (0.0, 0.01, 0.02 and 0.05 µM). In the third experiment, zygotic embryo explants were inoculated in WPM culture medium linked to combinations of BAP (2.0, 4.0, 8.0 and 16 µM) and ANA (0.0 and 0.5 µM). In the rooting phase, auxins (AIA, AIB and ANA) were tested at concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4 µM) and combinations of 4 µM AIB with activated carbon (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mM). The best result for multiplication was obtained using nodal segments in culture medium supplemented with 1 µM BAP and 0.05 µM ANA. The addition of 2 mM activated carbon associated with 4 µM AIB gave the best rooting percentage (54%).

**Keywords:** Auxins. Cytokinins. Cumaru. Activated Charcoal

## 1.1 INTRODUÇÃO

*Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH, conhecida popularmente como cerejeira, amburana de cheiro, imburana e camarú, ocorre no Brasil, especialmente na Caatinga, mas pode ser encontrada nas regiões de cerrado, Minas Gerais, norte da Argentina, sul da Bolívia e nordeste do Peru (MAIA, 2004).

É uma das espécies de múltiplos usos mais conhecida da Caatinga. Sua madeira alcança bons preços no mercado nacional e internacional, além disso, a espécie apresenta propriedades medicinais. A casca pode ser utilizada contra reumatismo e para avaliar sinusite e gripe; com suas sementes são produzidos medicamentos populares destinados ao tratamento de afecções pulmonares, tosse, asma, bronquite e coqueluche (MAIA, 2004).

Estudos comprovaram a atividade biológica de alguns compostos presentes tanto na casca quanto nas sementes, confirmaram atividade antimalárica, antiprotozoária, antifúngica, antibacteriana (BRAVO et al.,1999), anti-inflamatório e antitumoral da espécie em estudo (COSTA-LOTUFO et al.,2003).

O uso de plantas medicinais tem reduzido o número de indivíduos no ambiente, devido ao caráter meramente extrativista dessa prática, já que em umburana a retirada da casca para fins medicinais provoca o anelamento do caule, levando a planta a morte, enquanto que a colheita indiscriminada das sementes tem reduzido a principal via de propagação da espécie (SANTOS et al., 2009).

Combinado a essas práticas e por apresentar excelente qualidade madeireira, a *A. cearensis* tem sido explorada até a exaustão nos locais de ocorrência (RAMOS et al, 2004). Diante da exploração excessiva, foi constatada a brusca redução das populações locais, resultando na inserção da *A. cearensis* na lista de espécies ameaçadas de extinção (HILTON-TAYLOR, 2000).

A propagação assexuada é vantajosa para a obtenção de mudas de espécie em risco de extinção. Assim, a cultura de tecidos por meio da micropropagação, permite a obtenção de um grande número de plantas em qualquer época do ano, em um curto espaço de tempo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Várias condições influenciam o comportamento das culturas *in vitro*, sejam fatores químicos (composição do meio de cultura, pH, reguladores de crescimento e outros), biológicos (tipo e condição fisiológica do explante, características genéticas e outros) e físicos (temperatura, luminosidade e fotoperíodo) (ANDRADE, 2002).

Os reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas, desempenham importante função no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, no entanto, é fundamental o balanço adequado entre os reguladores vegetais (AMÉRICO et al., 2003).

Para a maioria das espécies lenhosas as citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, já que promovem a quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares, entretanto, o tipo e concentração desses reguladores vegetais são os fatores que mais influenciam neste processo (HU e WANG, 1983).

A cultura de segmentos nodais é a técnica mais utilizada na multiplicação *in vitro* e baseia-se na capacidade que possuem os meristemas axilares de funcionarem como broto principal na ausência de gema apical (HU e WANG, 1983). De acordo com George (1993), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotações axilares.

Frequentemente, as brotações são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas e, subseqüentemente, estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina, as quais estão associadas à promoção de raízes, controlam o crescimento celular e estão relacionadas ao controle da divisão celular (KERBAUY, 2008).

Neste contexto, a utilização de técnicas de cultura de tecidos pode desempenhar um importante papel na propagação de *A.cearensis*. Entretanto, trabalhos anteriores apontaram dificuldades para a obtenção de protocolo para a , propagação *in vitro* dessa espécie (CAMPOS, 2009).

Este trabalho teve por objetivo induzir brotações em diferentes tipos explantes de *A. cearensis* utilizando reguladores de crescimento e o seu posterior enraizamento, a fim de estabelecer sua exploração sustentável.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), localizado no município de Feira de Santana, Bahia.

Foram utilizadas sementes de *A. cearensis* coletadas em área de Caatinga situada próxima à Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE. Após a coleta, as sementes foram armazenadas em sacos de papel Kraft, em câmara fria nesta instituição. Na Unidade Experimental Horto Florestal, ficaram armazenadas à temperatura ambiente, até o momento de instalação dos experimentos.

Para obtenção de plantas *in vitro*, as sementes de amburana foram lavadas em água corrente por 10 minutos, em seguida desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em etanol a 70% por 1 minutos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 10 minutos. Após esse período, foram lavadas 4 vezes com água destilada estéril e inoculadas em tubos contendo 15 mL de meio de cultura, conforme metodologia estabelecida por Campos (2009).

### 1.2.2 Meio de cultura e condições experimentais

O meio de cultura utilizado em todos os ensaios foi o WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar (Himedia®). O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, antes da autoclavagem. Foram distribuídos 15 ml de meio de cultura em tubos de ensaio (25x150 mm) vedados com tampa plástica e esterilizados por autoclavagem durante 15 min à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica e os recipientes fechados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25  $\pm$ 3°C, sob fotoperíodo de 16 horas, com radiação fotossintética ativa de 60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  obtidas a partir de lâmpadas brancas fluorescentes.

### **1.2.3 Multiplicação *in vitro* de *A. cearenses***

#### **1.2.3.1 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de *A. cearensis*.**

Os explantes segmento cotiledonar e segmento nodal foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 4  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com diferentes concentrações de AIA (0,0; 0,01; 0,02; 0,05  $\mu\text{M}$ ).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, cada uma composta por cinco unidades experimentais.

Após 45 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: número de brotos, comprimento do maior broto, número de folhas, matéria fresca e seca das brotações.

#### **1.2.3.2 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de *A. cearensis*.**

Os explantes segmento cotiledonar e segmento nodal foram inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4  $\mu\text{M}$ ) e ANA (0,0; 0,01; 0,02 e 0,05  $\mu\text{M}$ ).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x5x 4, (tipos de explante x concentrações de BAP x concentrações de ANA) com seis repetições, cada uma constituída por cinco unidades experimentais.

Após 45 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes responsivos, número de brotos e o comprimento do maior broto, número de folhas, matéria fresca e seca das brotações.

### **1.2.3.3 Efeito de diferentes concentrações de cinetina (KIN) em segmentos nodais de *A. cearensis*.**

O explante segmento nodal foi inoculado meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de KIN (0,0; 0,5; 2,0; 4,0 e 8,0  $\mu\text{M}$ ). Cada tratamento foi constituído por seis repetições, composta por cinco unidades experimentais.

Após 45 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: percentagem de explantes responsivos, número de brotos, comprimento do maior broto, número de folhas, matéria fresca e seca das brotações.

### **1.2.3.4 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) ácido naftaleno acético (ANA) na indução de brotações utilizando o explante embrião zigótico de *A. cearensis*.**

As sementes desinfestadas conforme metodologia proposta por Campos (2009), foram embebidas em água destilada estéril por 12 horas, logo após, com auxílio de um bisturi, as sementes foram excisadas de modo que os embriões fossem retirados intactos. Em seguida, o explante embrião zigótico foi inoculado em tubos de ensaio contendo meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de BAP (2,0; 4,0; 8,0 e 16  $\mu\text{M}$ ) e ANA (0,0 e 0,5  $\mu\text{M}$ ).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (concentrações de BAP x concentrações de ANA), com seis repetições, cada uma composta por cinco unidades experimentais.

Após 30 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: número de brotos, comprimento do maior broto, número de folhas, matéria fresca e seca das brotações.

## **1.2.4 Enraizamento *in vitro* de *A. cearensis*.**

### **1.2.4.1 Efeito das auxinas, ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indolacético (AIA) na formação de raízes *in vitro* de *A. cearensis*.**

Os brotos obtidos do experimento de multiplicação, item 1.2.3.2, foram inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes tipos (AIA, ANA e AIB) e concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{M}$ ) de auxinas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 5 (tipos de auxina x concentrações) com seis repetições, cada uma composta por cinco unidades experimentais.

Após 60 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagem enraizamento, número de raízes, comprimento da maior raiz e matéria fresca das raízes.

#### **1.2.4.2 Efeito do carvão ativado combinado com AIB no enraizamento *in vitro* de *A. cearensis*.**

As brotações obtidas do experimento de multiplicação, item 1.2.3.2, foram inoculadas em meio de cultura suplementado (4  $\mu\text{M}$ ) ou não com AIB, combinado com diferentes concentrações de carvão ativado (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0mM). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, (presença ou ausência de AIB x concentrações de carvão ativado) com seis repetições por tratamento, cada uma composta por cinco unidades experimentais.

Após 60 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagem enraizamento, número de raízes, comprimento da maior raiz e matéria fresca das raízes.

#### **1.2.5 Análise estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey e através de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. O programa utilizado foi o SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA (FERREIRA, 2011).



### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1.3.1 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) na indução de brotações utilizando os explantes segmento nodal e cotiledonar de *A. cearenses*.

Observou-se efeito altamente significativo ( $P < 0,01$ ) do fator tipo de explante, para as variáveis número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), número de folhas (NF) e matéria seca dos brotos (MF) e significativo ( $P < 0,05$ ) para matéria fresca dos brotos (Tabela 1).

**Tabela 1** - Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), número de folhas (NF), matéria fresca dos brotos (MF) e matéria seca dos brotos (MS) de *A. cearensis*, em diferentes concentrações de AIA (0,0; 0,05; 0,01; e 0,5  $\mu\text{M}$ ) combinado e isolado com 4 $\mu\text{M}$  de BAP, em meio de cultura WPM. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados médio				
		NB	CB	NF	MF	MS
AIA	4	0,189 <sup>NS</sup>	0,947 <sup>NS</sup>	0,399 <sup>NS</sup>	4,133 <sup>NS</sup>	0,318 <sup>NS</sup>
EXP	1	5,209 <sup>**</sup>	161,474 <sup>**</sup>	3,586 <sup>**</sup>	150,068 <sup>*</sup>	18,168 <sup>**</sup>
AIA X EXP	4	0,185 <sup>NS</sup>	2,422 <sup>NS</sup>	0,118 <sup>NS</sup>	12,016 <sup>NS</sup>	0,984 <sup>NS</sup>
Resíduo	50	0,195	6,0672	0,168	21,018	0,993
CV(%)		74,14	78,06	104,88	100,39	91,43

<sup>\*\*</sup>Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>\*</sup>Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os explantes segmento nodal e segmento cotiledonar foram responsivos para formação de brotos, entretanto, o explante segmento nodal obteve melhor resposta para formação de brotos (0,89), em comparação ao segmento cotiledonar, o qual obteve média inferior na promoção dos brotos (0,30), (Tabela 2). Verifica-se que não houve interação entre o tipo do segmento e a concentração do regulador de crescimento. Diniz et al. (2006), em um estudo sobre multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Mikania glumerata* Spreng, verificou que a presença do AIA influenciou negativamente na indução de gemas axilares. Provavelmente, o tipo e as concentrações utilizados não foram capazes de promover um balanço hormonal endógeno favorável à promoção de brotos de *A. cearensis*.

Tabela 2 - Número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), número de folhas (NF), matéria fresca dos brotos (MF) e matéria seca dos brotos (M.S) obtidos na fase de multiplicação dos tipos de explantes, segmento nodal (SN) e segmento cotiledonar (SC) e 4 $\mu$ M de BAP, em meio de cultura WPM. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

Explantes	NB	CB(cm)	NF	MF(mg)	MS(mg)
SN	0,89a	4,79 a	0,63 a	6,14 a	1,63 a
SC	0,30 b	1,51 b	0,14 b	2,98 b	0,54 b

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

No entanto, Jardim *et al.* (2010), investigando o efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), verificaram o maior número de brotos ao combinar 17,76 $\mu$ M de BAP com 34,2 $\mu$ M de AIA; o mesmo foi reportado por Carvalho *et al.* (2005), na regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) obtendo as melhores médias nos meios suplementados com diferentes concentrações e/ou combinações dos reguladores de crescimento BAP, AIA e ZEA (zeatina).

Diante dos resultados obtidos neste experimento, verifica-se que concentrações de auxina AIA combinado com BAP não foram eficientes na multiplicação *in vitro* de *A. cearenses*, corroborando Noletto e Silveira (2004) na multiplicação de *Copaifera langsdorffii* Desf verificou que o acréscimo de AIA até 0,57 $\mu$ M não exerceu influência para número e comprimento dos brotos.

Porém, os tipos de explantes apresentaram diferença significativa, sendo que o segmento nodal obteve as melhores médias em todas as variáveis analisadas, resultado semelhante foi registrado por Gutiérrez (2011) na multiplicação de *Bauhinia cheilantha*, em que obteve maior número de brotos utilizando o mesmo tipo de explante. Contrariamente, Campos (2009) com a espécie em estudo, obteve as melhores respostas para número de brotos, comprimento do maior broto utilizando o segmento cotiledonar.

### 1.3.2 Efeito do benzilaminopurina (BAP) e do ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações em diferentes tipos de explantes de *A. cearensis*.

Verificou-se efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ), da interação tripla (concentrações de BAP x concentrações de ANA x tipo de explante) para as variáveis: número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), matéria fresca dos brotos (MF) e matéria seca dos brotos. As interações duplas (BAP x ANA; ANA x EXP) foram altamente significativas ( $p < 0,01$ ) para número de folhas, enquanto que, a interação (BAP x EXP) apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ), para esta variável (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos (%ER), número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), número de folhas (NF), matéria fresca dos brotos (MF) e matéria seca dos brotos (MS) de *A. cearensis*, em função das diferentes concentrações de ANA e de BAP e tipo de explante, em meio de cultura WPM, após 45 dias de cultivo. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados Médios					
		%ER	NB	CPA	NF	MF	MS
BAP (A)	4	0,292**	1,306**	184,12**	2,638**	507,32**	27,12**
ANA (B)	4	0,005 <sup>NS</sup>	0,057 <sup>NS</sup>	16,63 <sup>NS</sup>	1,103 <sup>NS</sup>	37,50 <sup>NS</sup>	4,45 <sup>NS</sup>
EXP (C)	1	4,876**	8,908**	605,85**	12,154**	82,22 <sup>NS</sup>	0,53 <sup>NS</sup>
A X B	6	0,330**	1,685**	82,22**	5,212**	252,26**	9,222**
B X C	4	0,064 <sup>NS</sup>	0,238 <sup>NS</sup>	100,88**	10,08*	234,23**	9,98*
A X C	4	0,186**	0,967**	88,90**	1,362*	243,93**	21,61**
A X B X C	16	0,119**	0,660**	36,3**	0,653 <sup>NS</sup>	185,36**	7,89**
Resíduo	250	0,461	0,190	13,88	0,418	53,318	3,46
CV(%)		37,31	44,26	53,30	69,78	56,27	75,08

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A formação dos brotos a partir dos segmentos nodais e cotiledonares foi observada na ausência e presença dos reguladores de crescimento BAP e ANA testadas (Figura 1).

Em *A. cearensis* foi verificada a formação de brotos mesmo nos explantes inoculados em meio livre de regulador de crescimento, indicando que não houve necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a brotação em segmentos nodais e cotiledonares. Contudo, a adição de BAP e ANA ao meio incrementou a formação de brotos nos dois tipos de explantes utilizados.

Para porcentagem de explantes responsivos, a curva de regressão indicou um comportamento quadrático ( $p < 0,01$ ) dos dois tipos de explantes em função das concentrações de BAP testadas (Figura 1).

A maior porcentagem de regeneração (100%) foi obtida a partir do segmento nodal ao combinar  $2\mu\text{M}$  de BAP com  $0,01$  ou  $0,02\mu\text{M}$  de ANA, Corroborando Campos (2009) verificou a maior porcentagem para essa variável utilizando como fonte de explante o segmento nodal e ápice caulinar em meios de cultura suplementados com  $4,44$  e  $2,22\mu\text{M}$  de BAP.

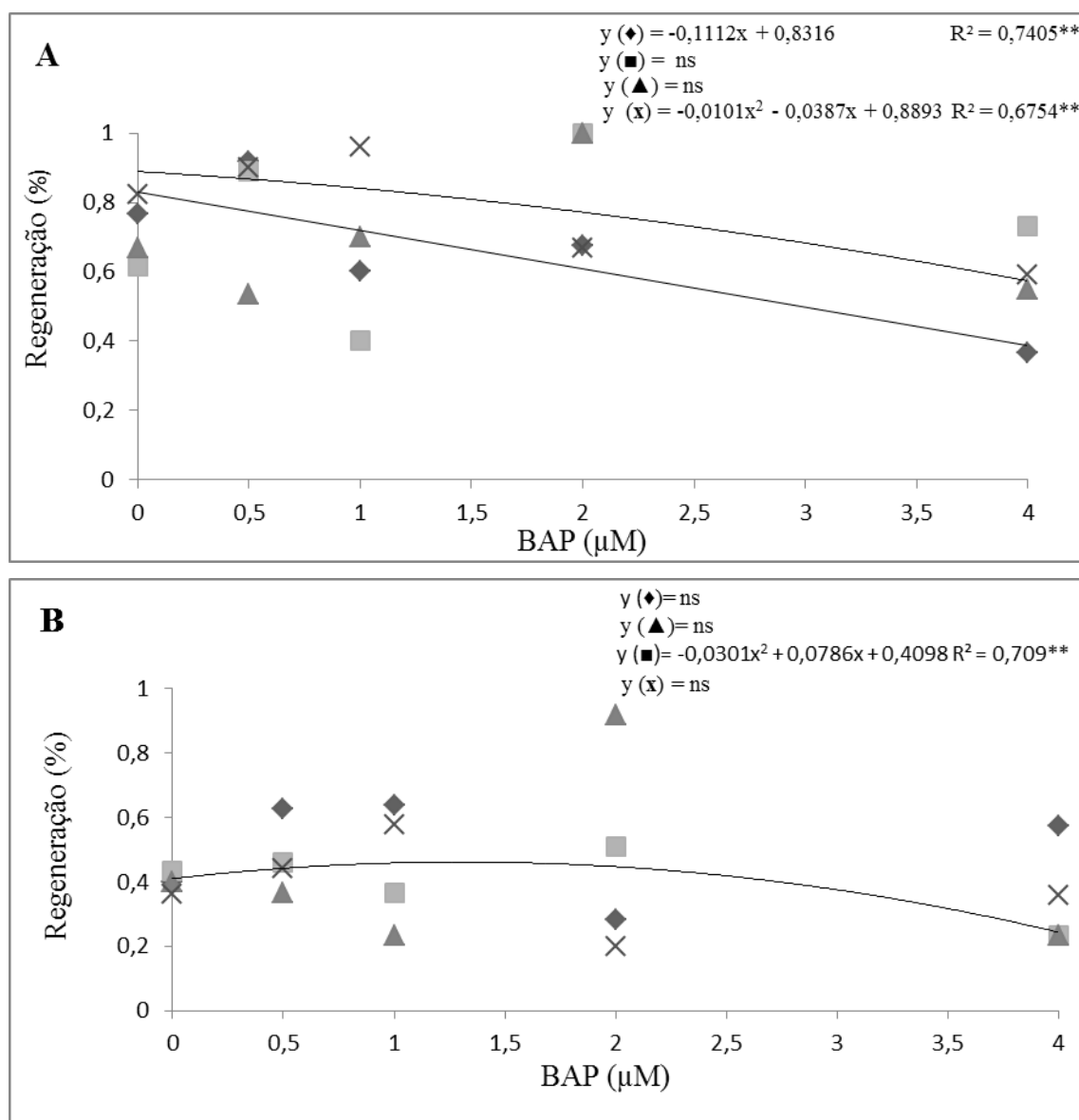


FIGURA 1 –Regeneração (%) a partir do segmento nodal (A) e do segmento cotiledonar (B) de *A. cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes combinações de BAP e ANA ( $\blacklozenge$   $0,0\mu\text{M}$ ; ANA  $\blacksquare$   $0,01\mu\text{M}$ ; ANA  $\blacktriangle$   $0,02\mu\text{M}$ ; ANA X  $0,05\mu\text{M}$ ) (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

Estes resultados são semelhantes aos de Gutiérrez et al. (2011) em trabalhos com *Bauhinia cheilantha*, os quais obtiveram altas taxas de regeneração (96,4%), utilizando os mesmos tipos de explante e reguladores.

Em relação ao número de brotos a análise de regressão verificou um comportamento linear ( $p < 0,01$ ) decrescente em função das concentrações de BAP, na ausência de ANA e quadrático quando o meio foi suplementado com  $0,05 \mu\text{M}$  de ANA (Figura 2-A).

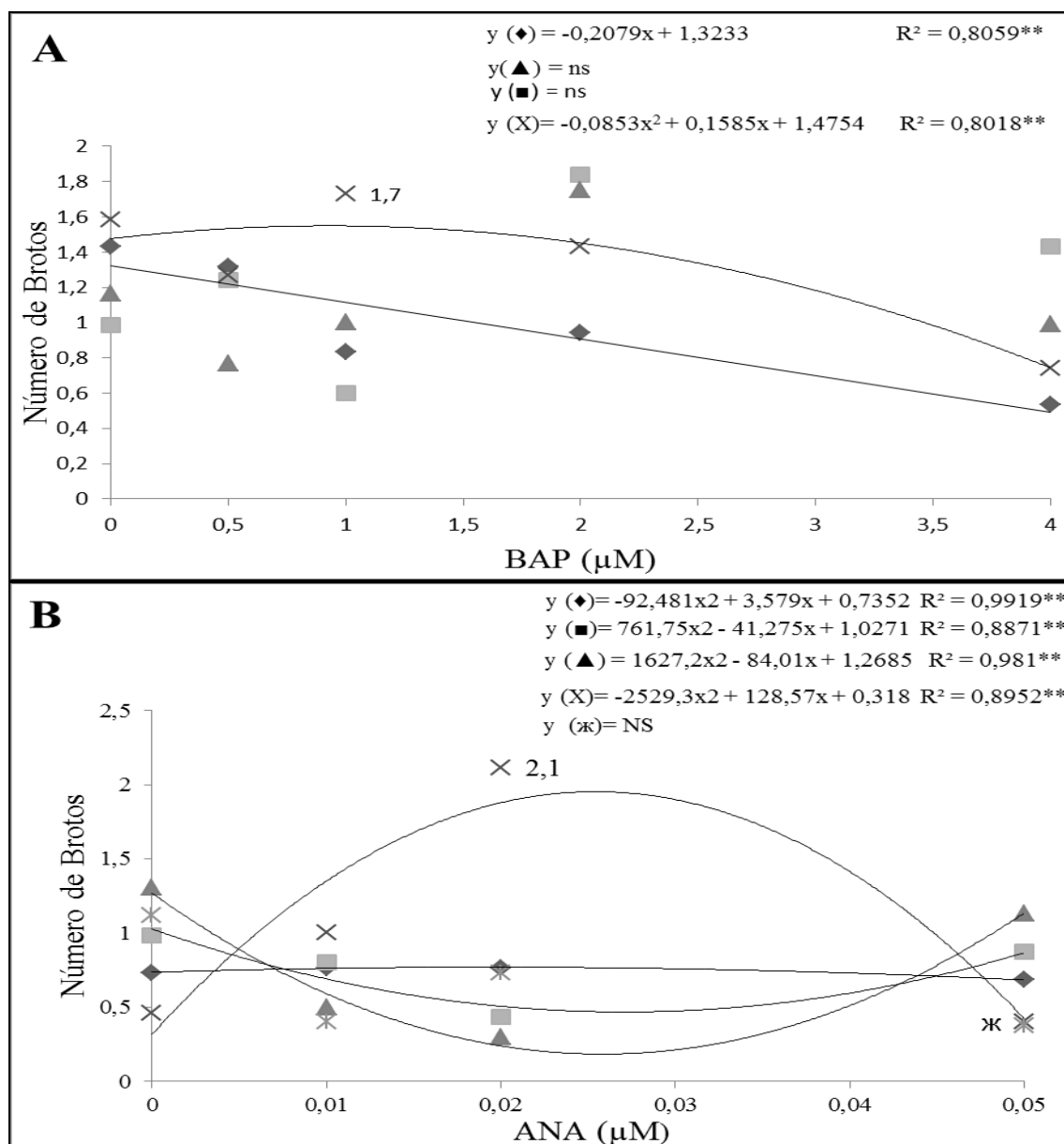


FIGURA - 2. Número de brotos a partir do segmento nodal (A) e do segmento cotiledonar (B) de *A. cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes combinações de BAP ( $\blacklozenge$   $0,0 \mu\text{M}$  BAP;  $\blacksquare$   $0,5 \mu\text{M}$  BAP;  $\blacktriangle$   $1 \mu\text{M}$  BAP; X  $2 \mu\text{M}$ ; ж  $4 \mu\text{M}$  BAP) e ANA  $^{**}$  Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F;  $^*$  Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F;  $^{NS}$  Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

A multiplicação das brotações foi verificada em todos os tratamentos testados, com número de brotos que variam de 0,3 a 2,1 brotos por explante (Figura 2). Com relação ao segmento nodal, a adição de BAP ao meio promoveu o incremento do número de brotos em segmento nodal até a concentração de  $1\mu\text{M}$ , quando combinado com  $0,05\mu\text{M}$  de ANA ( $1,72$  broto/explante), concentrações maiores desta citocinina promoveram uma redução das brotações.

Essa média foi maior que a encontrada por Campos (2009) ( $1,24$  broto/explante) na micropropagação de *A. cearensis*, utilizando o mesmo tipo de explante com  $4,44\mu\text{M}$  de BAP. Até mesmo na ausência do BAP acrescido de  $0,05\mu\text{M}$  de ANA, foi verificada uma média superior ( $1,53$  brotos/explante) (Figura 2-A).

Os resultados para a espécie em estudo estão de acordo com Rocha et al. (2007), que também verificaram baixas taxas de multiplicação ( $1,77$  brotos), em culturas de segmentos nodais de *Cabralea canjerana*, no tratamento com  $2,5\mu\text{M}$  de BAP.

A ausência ou reduzidas concentrações de citocininas na fase de multiplicação, tem sido reportada por diversos autores: Soares et al. (2011) em estudos de multiplicação *in vitro* e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo de *Hancornia speciosa* Gomes, registraram brotações na ausência de reguladores de crescimento vegetal; Flores et al. (2011) em ensaios de multiplicação de *Luehea divaricata*, obtiveram as maiores médias para número de brotos na ausência de reguladores de crescimento. Comportamento similar também foi reportado por Martins et al. (2011) na micropropagação de *Macrosyphonia velame*. Já Moura et al. (2008), em culturas de *Peper nigrum* registraram maiores médias para número de brotações com menor concentração de BAP ( $2,22\mu\text{M}$ ).

Muitas vezes, o que se tem observado é que a inibição ou o desenvolvimento anormal dos brotos podem estar relacionados à utilização de elevadas concentrações de reguladores, uma vez que, um balanço hormonal desfavorável pode resultar na redução e má formação dos brotos, como foi observado no presente estudo, ao utilizar a maior concentração do regulador BAP (Figura 2.).



Figura 3 – Broto inoculado em meio de cultura suplementado com 4  $\mu\text{M}$  de BAP (Barra=0,5cm). Feira de Santana, 2012.

Com relação ao explante segmento cotiledonar, foi observado um comportamento quadrático ascendente ( $p < 0,01$ ) para as concentrações de ANA, na ausência e presença de 2  $\mu\text{M}$  de BAP e comportamento quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) quando utilizou-se 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  de BAP (Figura 2-B).

As melhores respostas para o número de brotos foram registradas em meios de cultivo suplementado com 2  $\mu\text{M}$  BAP associado a 0,02  $\mu\text{M}$  de ANA, obtendo uma média de 2,11 brotos/explante. Resultados similares foram encontrados por Campos (2009) utilizando 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP em estudos com a mesma espécie (2,36 brotos/explante) (Figura 2-B).

O maior número de brotações foi registrado nos meios de cultura suplementados com BAP e ANA. A citocinina BAP promoveu a proliferação da parte aérea, sendo responsável pela quebra da dominância apical e multiplicação de brotações adventícias. Combinações de auxinas com BAP favorecem a proliferação de brotações (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998) (Figura 2-A). Este resultado é semelhante ao observado em *Aniba rosaeodora* Ducke (JARDIM, 2010), *Maclura tinctoria* (GOMES, 2010), *Caryocar brasiliensis* (SANTOS, 2006) o qual combinações de BAP com auxinas induziram maior número de brotações.

Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito eficiente para promover a multiplicação de diversas espécies lenhosas. Esta citocinina parece ser a mais indicada para promover a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (HU & WANG, 1983). Segundo Caldas (1998), o BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser também a melhor citocinina na indução de gemas adventícias.

No entanto, na multiplicação de *A. cearensis*, percebe-se que a suplementação de altas concentrações da citocinina BAP, além de reduzir o número de brotos, para ambos os explantes (segmento nodal/segmento cotiledonar), também atrofia o crescimento dos brotos. Nesse caso, pôde-se inferir que concentrações altas do BAP, produzem efeito fitotóxico na espécie em estudo (Figura 3).

Semelhante foi observado por Moura et al. (2008), Stein et al. (2008), Andrade et al. (2000), Diniz et al. (2006) na multiplicação de *Piper nigrum*, *Inga vera*, *Myracrodruon urundeuva*, *Mikania glomerata*, respectivamente. Esses autores verificaram efeito inibitório no tamanho das brotações e redução do número das brotações com o aumento das concentrações de BAP no meio de cultura.

Segundo Grattapaglia & Machado (1990), os sintomas de toxidez pelo uso excessivo de citocinina são falta de alongamento das culturas, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e vitrificação generalizada da cultura, além da redução do número de brotos induzidos.

Diversos autores registraram grande variação nas taxas de multiplicação, tanto entre as espécies, quanto nos diferentes tipos de explante. Segundo Fortes e Pereira (2001), cada espécie e/ou cultivar possuem características genéticas próprias, o que pode vir a justificar, as diferenças encontradas na taxa de multiplicação das espécies lenhosas propagadas *in vitro*.

Os resultados obtidos para *A. cearensis* corroboram aqueles observados em várias espécies lenhosas, os quais registraram uma baixa taxa de multiplicação *in vitro*, como *A. cearensis* (2,36 brotos/explante) (CAMPOS, 2009) *Luehea divaricata* (1,6 brotos/explantes) (FLÔRES et al., 2011), *canjerana* (1,66 brotos/explante) (ROCHA et al., 2007 1,66 brotos) e *Schizolobium amazonicum* (2,14 brotos/explante) (CORDEIRO et al., 2004)

Para a variável número de folhas, o modelo matemático representativo foi o quadrático ascendente ( $p < 0,01$ ) para as concentrações de ANA na presença de 0,5 $\mu$ M e 2 $\mu$ M de BAP, linear decrescente ( $p < 0,01$ ) quando adicionado 4 $\mu$ M de BAP e quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) ao suplementar o meio de cultivo com 0,5 $\mu$ M e 1,0 $\mu$ M de BAP (Figura 4).



A melhor média para número de folhas (2,87 folhas) foi obtido ao adicionar 2  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com 0,02  $\mu\text{M}$  de ANA, os demais tratamentos apresentaram respostas inferiores, variando de 0,3 a 1,53 folhas. Estes resultados discordam dos alcançados por Flôres et al. (2011), em culturas de *Luehea divaricata* que constataram o maior número de folhas na ausência de reguladores de crescimento.

Ao utilizar 2  $\mu\text{M}$  de BAP, observa-se o incremento no número de folhas até o valor estimado de 0,025  $\mu\text{M}$  de ANA, em concentrações superiores a estas verifica-se o decréscimo da variável analisada.

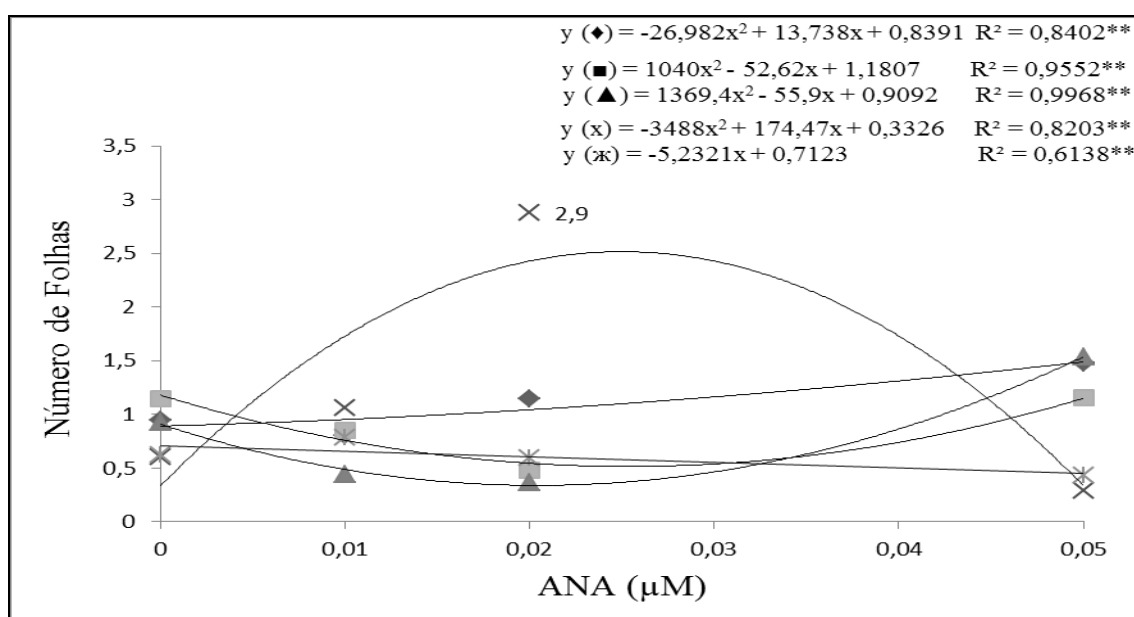


Figura 4 - Número folhas dos brotos originados a partir do segmento nodal e do segmento cotiledonar de *A.cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes combinações de BAP (◆0,0 $\mu\text{M}$  BAP; ■0,5  $\mu\text{M}$  BAP; ▲1  $\mu\text{M}$  BAP; X 2  $\mu\text{M}$ ; ⌘4  $\mu\text{M}$  BAP) e ANA (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

Segundo Moore (1979), a inibição do crescimento que ocorre nesses tecidos quando a concentração de auxina está em excesso é devida ao efeito inibitório do etileno que se sobrepõe ao efeito promotor da auxina. Dessa forma, a resposta dos tecidos vegetais a auxina varia com a concentração de auxina aplicada. Na maioria dos casos, as concentrações baixas são promotoras e as concentrações altas inibitórias.

Neste estudo, observa-se que as maiores concentrações de BAP (2 e 4 $\mu$ M) quando associados à 0,05 $\mu$ M de ANA, resultam no menor desenvolvimento foliar, o que pode estar ligado à maior liberação do etileno no microambiente; visto que, as auxinas estimulam a síntese do etileno, via incremento da síntese ACC sintase (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Com relação ao comprimento da parte aérea dos brotos provenientes do segmento nodal, houve ajuste do modelo linear decrescente para as concentrações de BAP, na ausência de regulador, a medida que, com 0,05 $\mu$ M de ANA, observou-se um comportamento quadrático ( $p < 0,01$ ) descendente (Figura 5-A).

Já para o comprimento da parte aérea utilizando segmento cotiledonar, foi notado comportamento quadrático ascendente ( $p < 0,01$ ), para as concentrações de ANA, ao suplementar o meio de cultura com 2 $\mu$ M de BAP, ao passo que com 0,5 e 1 $\mu$ M de BAP, a tendência para o comprimento dos brotos foi um comportamento quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) e linear decrescente quando adicionado 4 $\mu$ M de BAP ao meio (Figura 5-B).

Os maiores brotos (19,87mm) foram obtidos com o segmento nodal, registrados em meios de cultivo suplementados apenas com 0,05  $\mu$ M de ANA, sendo que, com o aumento das concentrações de BAP, observou-se um decréscimo no comprimento dos brotos independente das concentrações de ANA testadas, alcançando o menor valor (3,6mm) na ausência da auxina (Figura 5-A).

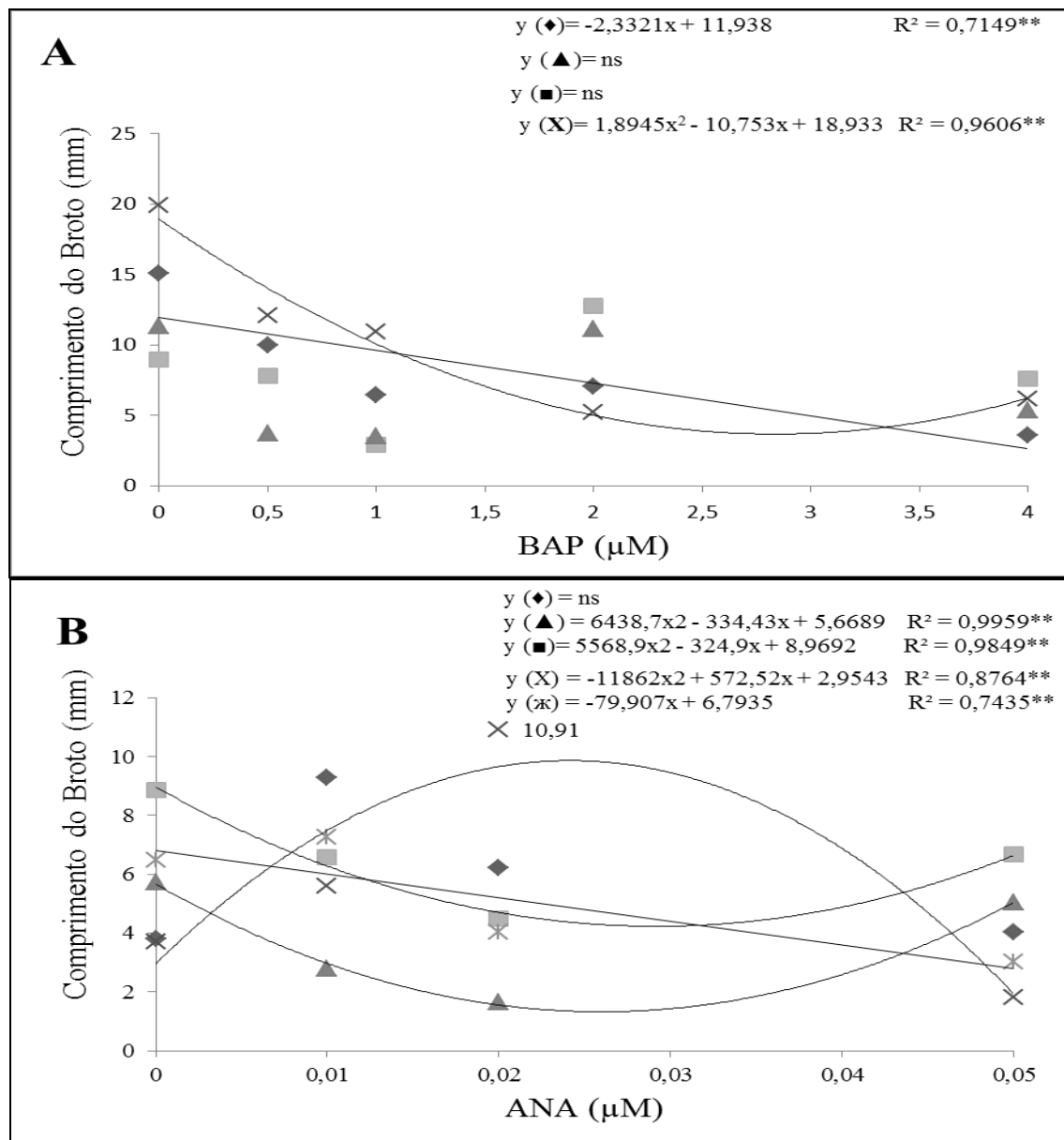


Figura 5 - Comprimento da parte aérea dos brotos oriundos dos segmento nodal (A) e do segmento cotiledonar (B) de *A. cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes combinações de BAP ( $\blacklozenge$  0,0 $\mu\text{M}$  BAP;  $\blacksquare$  0,5  $\mu\text{M}$  BAP;  $\blacktriangle$  1  $\mu\text{M}$  BAP; X 2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{X}$  4  $\mu\text{M}$  BAP) e ANA. (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

Esta resposta pode ter ocorrido pela indução de divisões celulares promovidas pelas citocininas, resultando no aumento do número de células e menor tamanho celular (TAIZ e ZEIGER, 2009), e conseqüentemente em brotos menores.

O maior tamanho médio dos brotos ocorreu com segmento nodal, distinguindo dos resultados encontrados por Kielse et al. (2009) em um estudo sobre regeneração *in vitro* de angico-vermelho (*Parapiptadenia rígida*), no qual apresentaram o maior comprimento dos brotos com segmento cotiledonar.

Para a variável matéria fresca da parte aérea dos brotos, em relação ao segmento nodal, a análise de regressão indicou um comportamento quadrático descendente em função da concentração de BAP, quando combinado a 0,05 $\mu$ M de ANA ou na ausência da auxina (Figura 6-A).

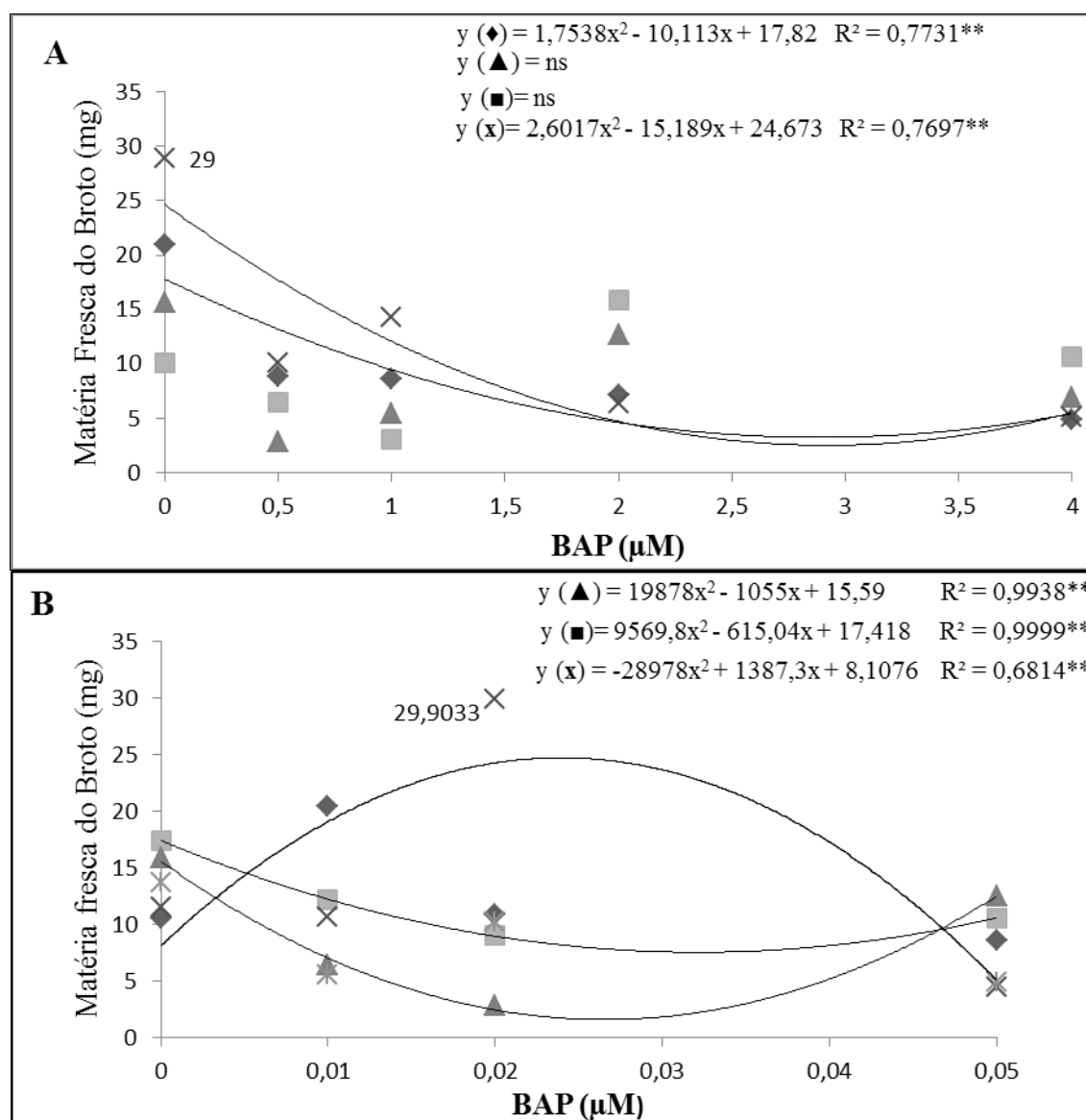


Figura 6 - Matéria fresca da parte aérea dos brotos oriundos dos segmento nodal (A) e do segmento cotiledonar (B) de *A.cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP e ANA ( $\blacklozenge$ 0,0 $\mu$ M; ANA $\blacksquare$ 0,01;  $\mu$ M ANA;  $\blacktriangle$ 0,02  $\mu$ M ANA; X0,05  $\mu$ M ANA) . \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

Com relação ao explante segmento cotiledonar, foi possível o ajuste de modelo matemático quadrático ( $p < 0,01$ ) descendente em função das concentrações de BAP, quando suplementado com 0,02 e 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA, e ascendente na presença de 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA (Figura 6-B).

Para matéria fresca dos brotos, as maiores médias para segmento nodal e cotiledonar foram muito próximas, 29 mg e 29,9 mg, respectivamente. Os menores valores utilizando segmento nodal foram registrados na maior concentração (4,0  $\mu\text{M}$ ) de BAP (Figura 6-A).

As concentrações de BAP mostraram comportamento quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) na presença de 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA e tendência linear decrescente ( $p < 0,01$ ) na ausência de auxina, para matéria seca da parte aérea dos brotos advindos do segmento nodal (Figura 7-A).

A mesma tendência foi verificada para segmento cotiledonar em meio suplementado com 0,01  $\mu\text{M}$  de ANA, um comportamento quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) e linear decrescente ( $p < 0,01$ ) para a citocinina, quando o meio de cultura foi acrescido de 0,01  $\mu\text{M}$  de 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA, respectivamente (Figura 7-B).

Para matéria seca do broto as maiores médias registradas 6,77 mg e 5,79mg, para segmento nodal e cotiledonar, resultaram da adição de 0,05 e 0,02  $\mu\text{M}$  de ANA, respectivamente. Foi observado a redução desta variável com o aumento das dosagens de BAP, evidenciando o efeito fitotóxico do regulador quando adicionado em concentrações supra ótimas (Figura 7-A)

Diante dos resultados alcançados neste estudo, verifica-se que o aumento da dosagem da citocinina promoveu a redução no valor das variáveis analisadas: porcentagem de explantes responsivos número de brotos, comprimento do maior broto, número de folhas, matéria fresca dos brotos e matéria seca dos brotos. As maiores médias alcançadas foram utilizando o segmento nodal, exceto número de brotos, sendo assim, foi possível a obtenção de 1,72 brotos por explante, suplementando o meio de cultura WPM com 1  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA.

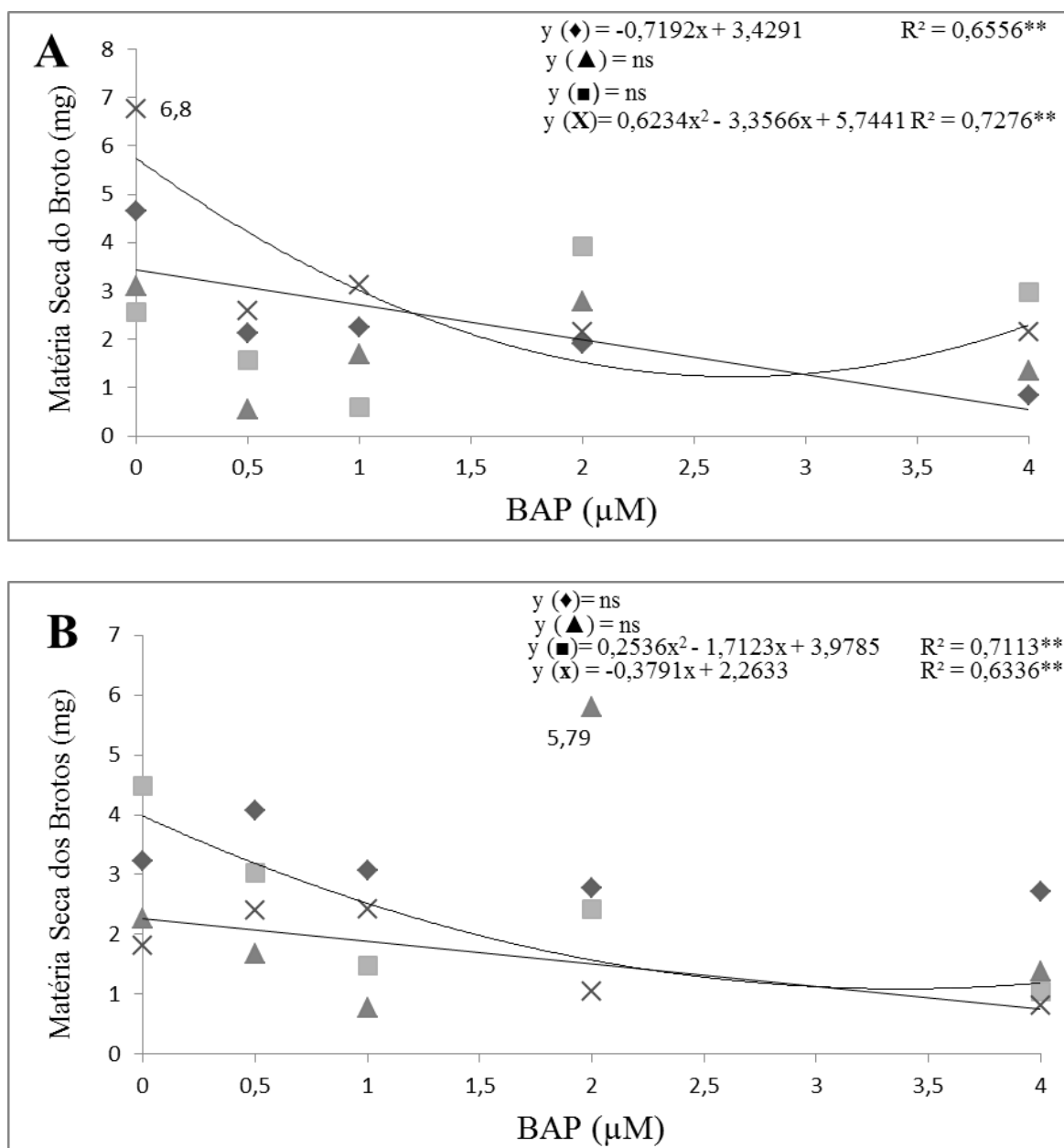


Figura 7- Matéria seca da parte aérea dos brotos oriundos dos segmento nodal (A) e do segmento cotiledonar (B) de *A. cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de ANA ( $\blacklozenge$  0,0 $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$  0,01;  $\mu\text{M}$  ANA;  $\blacktriangle$  0,02  $\mu\text{M}$  ANA;  $\text{X}$  0,05  $\mu\text{M}$  ANA) (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

### 1.3.3 Efeito da cinetina (KIN) na indução de brotações utilizando o explante segmento nodal de *A. cearensis*.

Observou-se efeito significativo ( $p < 0,05$ ) das concentrações de cinetina (KIN) apenas para a variável comprimento do broto (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes responsivos (%ER), número de brotos (NB), comprimento do maior broto (CB), matéria fresca dos brotos (MF) e matéria seca dos brotos (MS) de *A. cearensis*, em diferentes concentrações de Cinetina (KIN) em meio de cultura WPM, após 45 dias de cultivo. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados Médios				
		%ER	NB	CB	MF	MS
KIN	4	0,05 <sup>NS</sup>	0,147 <sup>NS</sup>	57,04*	373,67 <sup>NS</sup>	2,47 <sup>NS</sup>
Resíduo	25	0,03	0,107	17,86	252,02	3,92
CV(%)		19,51	27,81	40,03	91,51	53,41

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Para esta variável, a curva de regressão indicou um comportamento quadrático ( $p < 0,01$ ) descendente em função das concentrações de KIN, sendo que foi verificado a redução do comprimento dos brotos até o valor estimado de 5,2 $\mu$ M de KIN, valores acima destes promoveram o aumento do comprimento dos brotos (Figura 8).

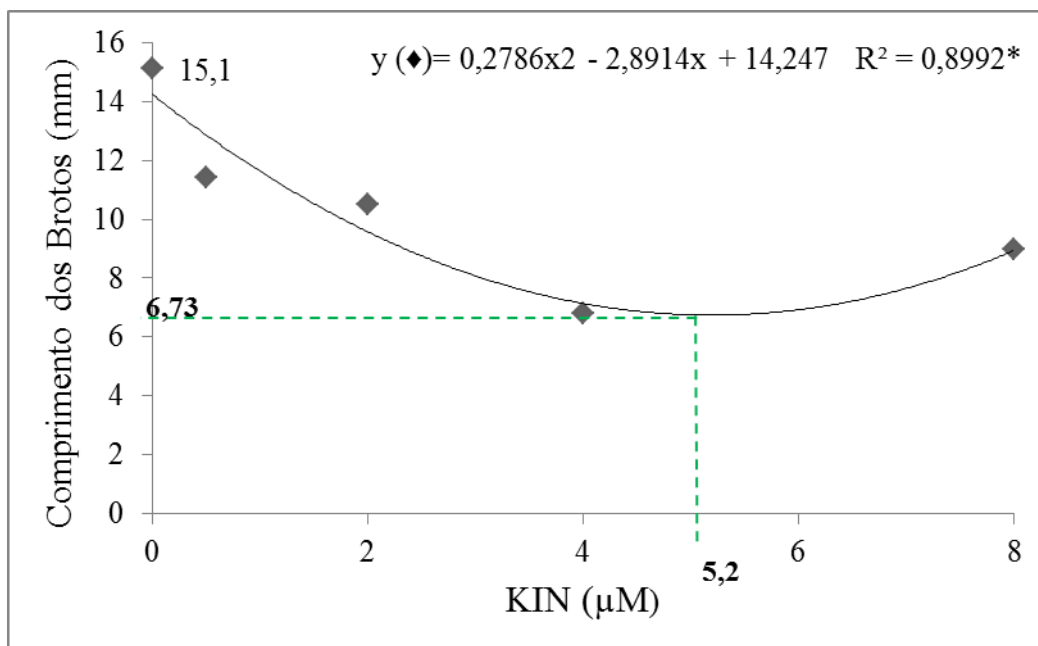


Figura 8 - Comprimento dos brotos oriundos do segmento nodal de *A.cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de cinetina. \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; F. Feira de Santana, BA, 2012.

No entanto, a maior média para a variável analisada, foi obtida na ausência de reguladores de crescimento, a adição de cinetina promoveu o atrofiamento dos brotos. A suplementação do meio com reguladores de crescimento tem por finalidade suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz (Borgatto e Hayashi, 2002). Porém, não foi possível a obtenção de um balanço hormonal favorável na promoção de brotações adventícias com a adição de cinetina ao meio de cultura.

Os resultados encontrados para *A. cearensis* estão de acordo com Ferreira e Pasqual (2008), em *Ficus carica*, em que o maior comprimento dos brotos foi obtido em meio de cultura isento de regulador de crescimento. No entanto, trabalhos realizados por Bopana e Saxena (2008), em *A. racemosus* e por Raghu et al. (2006), em *T. cordifolia*, discordam dos obtidos neste estudo, já que as médias de comprimento das brotações foram melhor favorecidas em meio de cultura suplementado com KIN.



### 1.3.4 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) ácido naftaleno acético (ANA) na indução de brotações utilizando o explante embrião zigótico de *A. cearensis*.

Observou-se efeito altamente significativo do BAP ( $p < 0,01$ ) para as variáveis número de brotos e número de folhas e efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para comprimento da parte aérea. Para a fonte de variação concentração de ANA, observou-se efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para comprimento da parte aérea e número de folhas (Tabela 5).

Tabela - 5. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (FN), matéria fresca (MFPA) e matéria seca (MSPA) da parte aérea de embriões zigóticos de *A. cearensis*, em diferentes combinações de BAP e ANA em meio WPM, após 45 dias de cultivo. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados médios				
		NB	CPA	NF	MF	MS
BAP	3	1,103**	156,67*	3,42**	14726565,18 <sup>NS</sup>	5751,07 <sup>NS</sup>
ANA	1	0,574 <sup>NS</sup>	252,24*	4,19*	157164,81 <sup>NS</sup>	1654,93 <sup>NS</sup>
BAP X ANA	3	0,139 <sup>NS</sup>	22,44 <sup>NS</sup>	1,25 <sup>NS</sup>	71604,45 <sup>NS</sup>	2731,60 <sup>NS</sup>
RESÍDUO	60	0,082	21,62	0,27	92216,43	92216,43
CV(%)		58,82	74,42	93,68	64,31	64,31

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A análise de regressão indicou um modelo linear decrescente ( $p < 0,01$ ) das concentrações de BAP para a variável número de brotos (Figura 9). O modelo matemático de resposta na presença de BAP indica que a utilização desta citocinina não favoreceu a formação de brotos. A maior média (0,68 brotos) foi alcançada com a menor concentração de BAP testada.

Dessa forma, verifica-se que não foi possível obter um balanço ideal entre auxinas e citocininas, que favorecessem a formações de brotações, apesar da utilização do embrião zigótico como fonte de explante, o qual apresenta grande potencial organogênico (KERBAUY, 2008). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o tipo de explante deve ser escolhido de acordo com a sua capacidade

para se adequar às condições *in vitro*, sendo recomendados os que contenham maior proporção de tecido meristemático por apresentarem uma maior capacidade de expressar a totipotência.

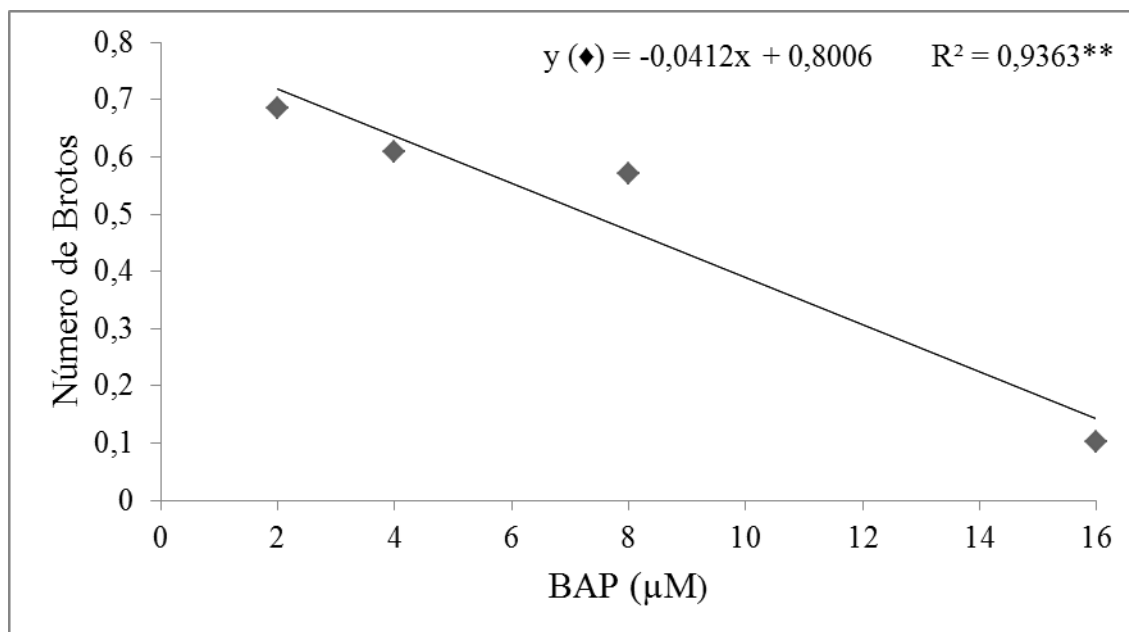


Figura 9. Número de brotos oriundos do embrião zigótico de *A.cearensis*, aos 30 dias inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

Para número de folhas, as concentrações de BAP apresentaram tendência linear decrescente ( $p < 0,01$ ). Estima-se que o número de folhas seja desfavorecido com o uso crescente de concentrações dessa citocinina, indicando que seu uso em concentrações elevadas apresente efeito fitotóxico (Figura 10).

Ao analisar o comprimento do broto constatou-se efeito linear decrescente ( $p < 0,05$ ) das concentrações de BAP sob esta variável (Figura 11). Dessa forma, foi observado a tendência de diminuição do comprimento das brotações com o aumento da citocinina, assim, a falta de alongamento pode caracterizar efeito fitotóxico desta cultura a elevadas concentrações de BAP (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

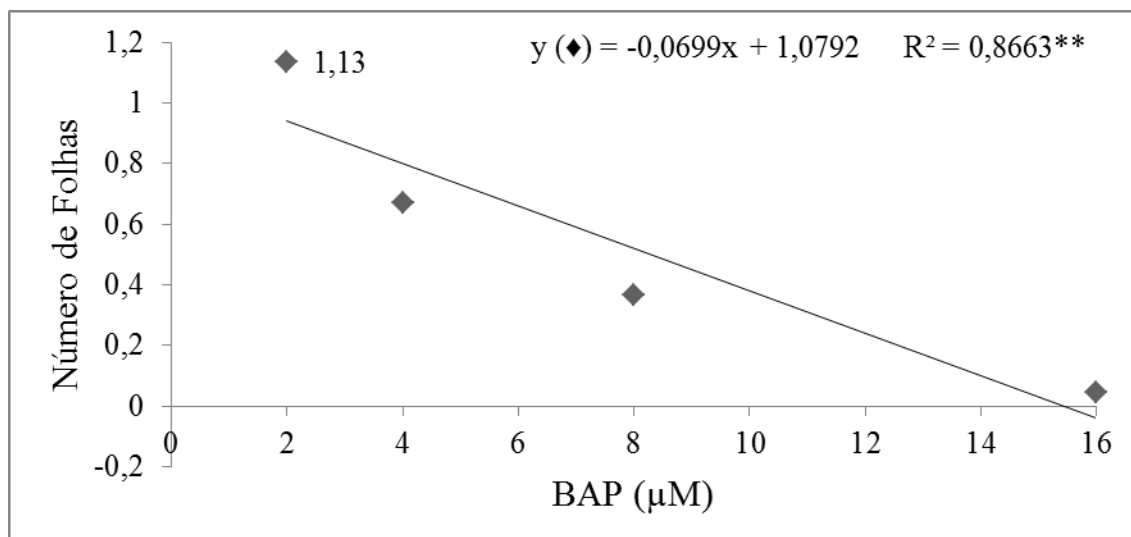


Figura 10 - Número de folhas oriundas do embrião zigótico de *A. cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

Resultados similares foram obtidos por Diniz et al. (2006), estes autores verificaram um aumento médio do número de gemas na multiplicação de *Mikania glomerata* ao acrescentar BAP até a concentração de 17,76µM, havendo uma redução a partir desse nível. Corroborando Schwertner e Zaffari (2003) verificaram um aumento no número de brotações em *Syngonium angustatum* com adição de 4,44µM de BAP, havendo uma redução quando utilizaram as concentrações de 11,1 e 17,76µM

Conforme Lameira et al. (1993) no cultivo *in vitro* de *Capchaelis ipecacuanha*, a redução no número de gemas emitidas em concentrações elevadas de BAP expressa o efeito inibidor das citocininas quando são utilizadas em concentrações mais altas.

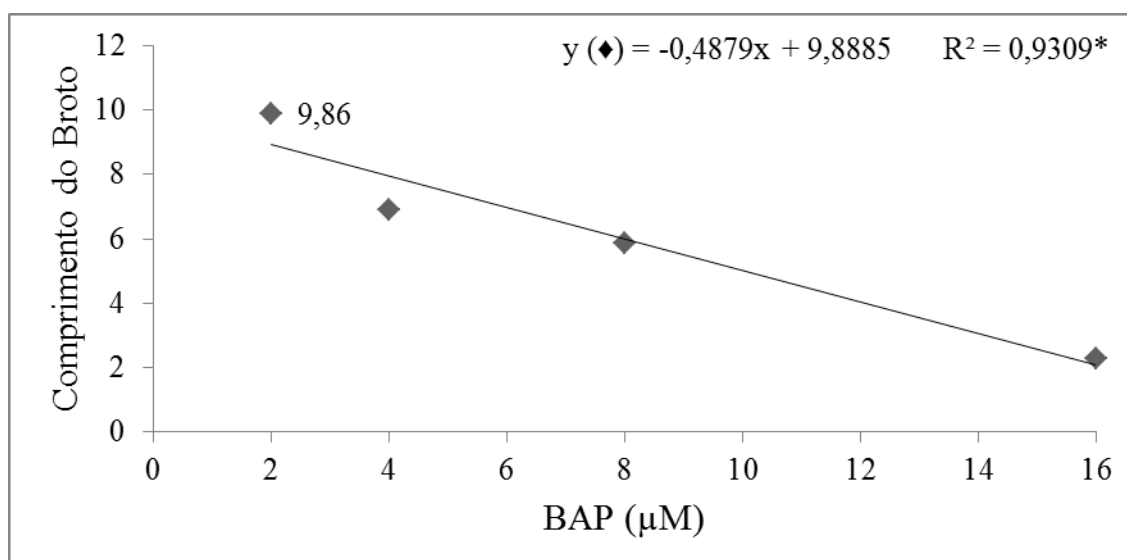


Figura - 11. Número de brotos oriundos do embrião zigótico de *A.cearensis*, aos 45 dias inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de BAP. \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, BA, 2012.

### 1.3.5 Efeito das auxinas, ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indolacético (AIA) no enraizamento *in vitro* de *A. cearensis*.

Não foi observado efeito significativo das auxinas testadas para as variáveis porcentagem de enraizamento (%E), número de raiz (NR), comprimento da raiz (CR), matéria fresca (MF) e matéria seca da raiz (MS) (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para porcentagem enraizamento (%R), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e matéria fresca das raízes (MF) de *A.cearensis*, nas diferentes tipos e concentrações de auxinas, em meio de cultura WPM, após 60 dias de cultivo. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados Médios			
		%E	NR	CR	MF
Tipo de auxina (A)	2	0,022 <sup>NS</sup>	0,037 <sup>NS</sup>	2,398 <sup>NS</sup>	71,125 <sup>NS</sup>
Concentração (B)	4	0,012 <sup>NS</sup>	0,033 <sup>NS</sup>	1,282 <sup>NS</sup>	21,25 <sup>NS</sup>
A.X B	6	0,022 <sup>NS</sup>	0,059 <sup>NS</sup>	0,841 <sup>NS</sup>	34,356 <sup>NS</sup>
Resíduo	65	0,0142	0,031	1,993	28,482
CV(%)		128,28	187,04	144,53	498,72

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A formação de calo na base do broto (dados não mostrados) foi verificado nos tratamentos que utilizaram concentrações mais altas de auxinas, o que pode comprometer a rizogênese.

Conforme TORRES e CALDAS (1990), em espécies lenhosas o enraizamento é mais difícil. O sucesso desta fase depende de vários fatores entre eles, da qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação, dos níveis de auxinas endógena, da concentração de auxinas exógena e do tempo prolongado a exposição de altas concentrações de citocininas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

A adição das auxinas AIB, ANA E AIA nas concentrações testadas neste trabalho não foram eficiente para promover a formação de raízes *in vitro* de brotos de *A. cearensis*, resultando no enraizamento inferior a 20% (dados não mostrados). Estes resultados discordam dos encontrados por Rocha et al. (2007) que verificaram altas taxas no enraizamento (87,5%) de canjarana (*Cabralea canjerana*) utilizando o AIB, como fonte de auxina exógena.

Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto ao número, comprimento, matéria fresca e matéria seca de raízes. Resultados similares foram obtidos por Souza et al. (2011) no enraizamento *in vitro* de *Mandevilla velutina*, os quais verificaram que a adição de ANA e AIB não foram eficiente na promoção de raízes.

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias pode ser influenciado por diversos fatores, entre eles os reguladores vegetais, que podem promover ou inibir o enraizamento, como pôde ser observado no presente estudo.

O uso das auxinas na promoção de raízes tem sido bastante reportado, dentre elas, o uso do AIB encontra-se muito difundido, por não causar fitotoxicidade ao explante em uma larga faixa de concentração e ser eficiente em muitas espécies vegetais lenhosas (HARTMANN et al., 1997)

Mesmo não havendo diferença significativa, a utilização de AIB na concentração 4 $\mu$ M promoveu a maior porcentagem de enraizamento. Por esse motivo, instaurou-se outro experimento utilizando este regulador.

### 1.3.5 Efeito do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de *A. cearensis*.

Observou-se efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ), da interação dupla (concentração de regulador de crescimento x concentração de carvão ativado) para as variáveis % porcentagem de enraizamento (%E), número de raiz (NR), comprimento da raiz (CR) e efeito significativo ( $p < 0,05$ ), das concentrações de carvão ativado para a matéria fresca da raiz (MF) (Tabela 7).

Para porcentagem de enraizamento, observa-se o ajuste de um modelo matemático descendente ( $p < 0,01$ ), na presença de  $4\mu\text{M}$  de AIB, o qual retoma seu crescimento na concentração calculada de  $0,62\text{mM}$  de carvão ativado. Foram obtidas taxas de enraizamento de até 54% na presença da concentração mais elevada de carvão ativado ( $2\text{mM}$ ) combinado com  $4\mu\text{M}$  de AIB (Figura 10-A).

Estes resultados são semelhantes ao reportado por Campos (2009), em trabalhos com mesma espécie, em que as médias para enraizamento na presença de AIB e carvão ativado não passaram de 60% e também similar aos resultados reportados por Gutiérrez (2011), com a espécie *Bauhinia cheilantha*, obteve a maior porcentagem de formação de raiz (66,67%) ao combinar auxina com  $6,0\text{mM}$  de carvão ativado, independente do tipo de auxina utilizado. Todavia, os resultados para enraizamento reportado neste trabalho são superiores aqueles encontrados por Kielse et al. (2009) em cultura de *P. rígida*, os quais verificaram uma taxa de enraizamento de 15% independente da concentração de AIB utilizada, enquanto que para *Cicer arietinum*, (PATIL et al., 2009) foi registrado uma taxa de indução de raízes menor que 5%.

Entretanto, a porcentagem de enraizamento da espécie em estudo é baixa quando comparada aquela de 85,5% obtidas em brotos de *Myracrodruon urundeuva* inoculados em meio MS acrescido de  $4,8\mu\text{M}$  de ANA (ANDRADE et al., 2000), ou ainda as taxas de 90% e 84% de enraizamento reportados por Balaraju et al. (2008) Tilkat et al. (2009), respectivamente para *V. agnus-castus* e *P. vera* em meio de cultura suplementado com  $0,49\mu\text{M}$  de AIB e  $9,84\mu\text{M}$  de AIB

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para porcentagem enraizamento (%R), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e matéria fresca das raízes (MF) de *A. cearensis*, em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de carvão ativado associado ou não com, após 60 dias de cultivo. UEFS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados Médios			
		%E	NR	CR	MF
AIB (A)	1	0,05 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>	8268,8 <sup>NS</sup>	473,7 <sup>NS</sup>
Carvão ativado (B)	2	0,22 <sup>**</sup>	1,10 <sup>*</sup>	40664,2 <sup>**</sup>	2035,2 <sup>*</sup>
A x B	2	0,19 <sup>**</sup>	1,32 <sup>*</sup>	41594,1 <sup>**</sup>	919,64 <sup>NS</sup>
Resíduo	30	0,01	0,28	5723,4	546,8
CV(%)		62,22	113,99	100,22	178,34

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

No entanto, não foi possível o ajuste de um modelo matemático para porcentagem de enraizamento na ausência de carvão ativado, o qual obteve médias inferiores a 20 % de enraizamento (Figura 10-A). Em *A. acreana* os melhores resultados para esta variável foram obtidos com o uso de 2,46µM de AIB, concentrações superiores promoveram o decréscimo desta variável (FERMINO e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

Estes resultados demonstram o efeito benéfico da auxina quando associado ao carvão ativado, uma vez que ele promove a adsorção de produtos do metabolismo de plantas (exudatos) e metabólicos tóxicos, como os compostos fenólicos, além de simular a condição de escuro, a qual as raízes normalmente desenvolvem-se melhor (EBERT et al., 1993).

Quanto ao número de raiz, o modelo que melhor se ajustou foi o linear crescente para as concentrações de carvão ativado na presença de AIB. Na ausência de regulador vegetal não foi possível o ajuste de um modelo matemático significativo (Figura 10-B).

A adição de carvão ativado favoreceu o aumento no número de raízes, a maior média (2,25) foi obtida na maior concentração (2,0mM) de carvão ativado testada (Figura 10-B). Este resultado estão de acordo com Nepomuceno et al. (2009) que verificaram o incremento no número de raízes na presença de carvão ativado.

Dessa forma, pode-se sugerir que o carvão ativado reduziu os efeitos tóxicos do regulador de crescimento, auxina, e/ou tenha adsorvido algumas substâncias inibidoras do meio de crescimento, portanto, alterando proporções de

componentes do meio de cultura, desta maneira, favorecendo o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

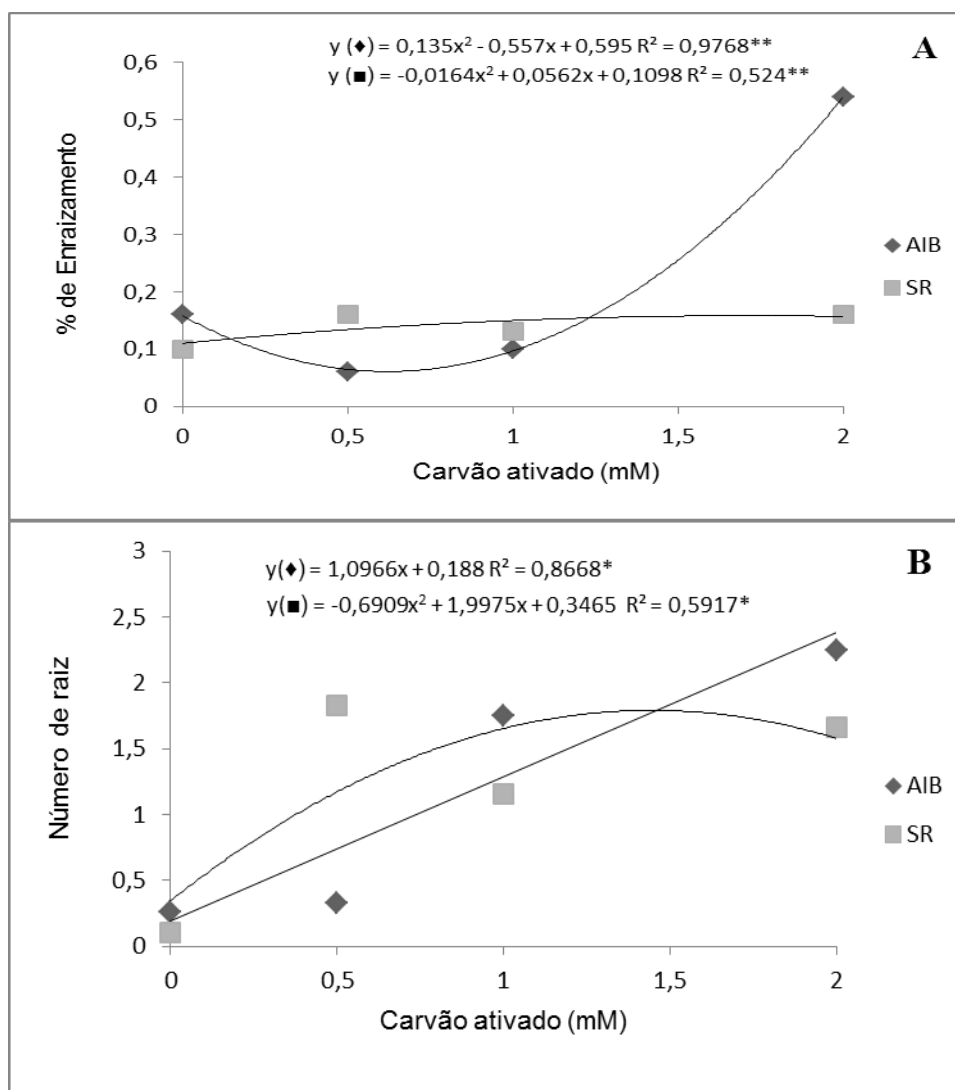


Figura – 12 Porcentagem de enraizamento (%E) (A) e número de raiz de *A. cearensis* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio WPM com diferentes concentrações de carvão ativado na presença ou ausência de AIB.

Analisando a matéria fresca da raiz, observa-se a mesma tendência verificada no número de raiz, confirmando os dados obtidos anteriormente, já que o maior número (2,25) e matéria seca da raiz (72,77mg) foram obtidos na presença do AIB e na maior concentração (2mM) de carvão ativado testados.



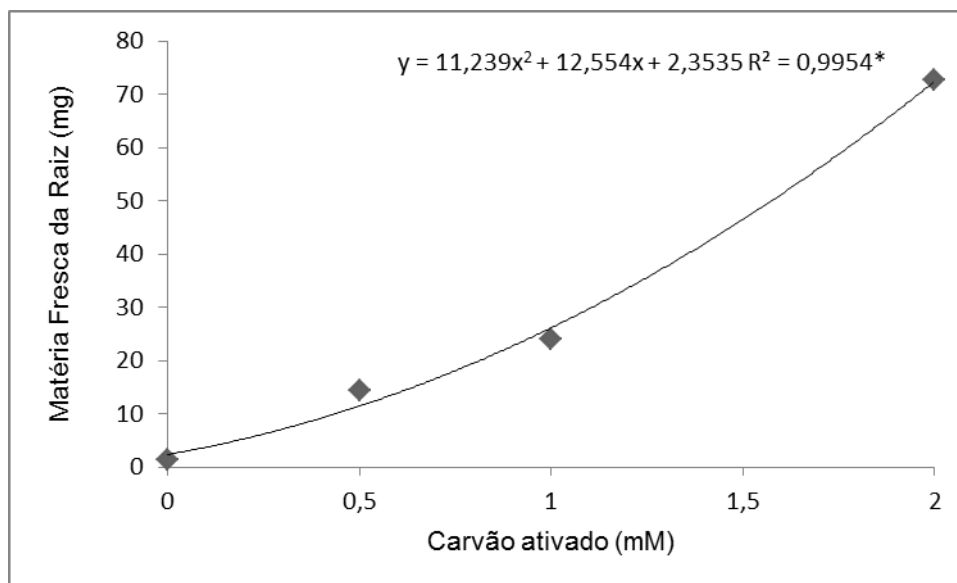


Figura – 13 Matéria fresca da raiz de *A. cearensis* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio WPM com diferentes concentrações de carvão ativado.

Para comprimento da maior raiz, não foi observado diferença entre as concentrações de carvão ativado testadas, no entanto, a ausência de auxina proporcionou o maior crescimento da raiz (29,12 mm).

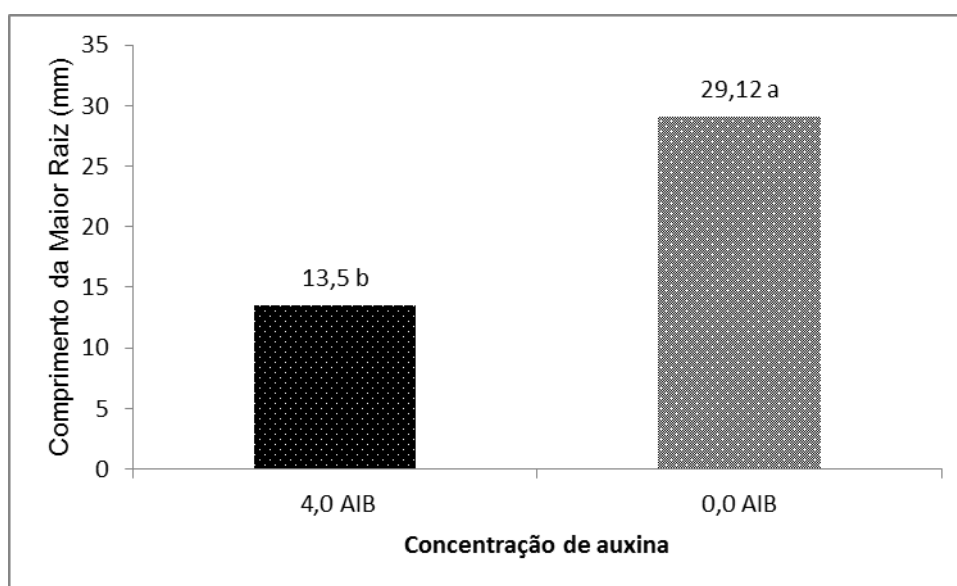


Figura 14 - Comprimento da maior raiz de *A. cearensis* aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio WPM com diferentes concentrações de carvão ativado na presença ou ausência de AIB.

O carvão ativado desencadeia muitos efeitos sobre o tecido vegetal, por proporcionar um ambiente escuro pode facilitar a diferenciação da raiz (PAN & STADEN, 1998), além disso, atua como um agente quelante para muito compostos, incluindo os reguladores de crescimento vegetais, os quais, embora necessários, podem prejudicar ou mesmo inibir o enraizamento, já que em concentrações acima do ideal, tornam-se tóxicos.

No enraizamento *in vitro* de *A. cearensis* a presença do carvão ativado mostrou-se necessária, os resultados evidenciaram que a adição de auxina exógena associado ao carvão ativado foi essencial para induzir a formação de raiz *in vitro* nesta espécie.

## 1.4 CONCLUSÃO

A utilização de elevadas concentrações de BAP mostrou-se pouco eficiente na multiplicação de *A. cearensis*.

O explante embrião zigótico não apresentou capacidade organogênica na presença de BAP e ANA.

O regulador de crescimento cinetina não foi eficiente na multiplicação *in vitro* de *Amburana cearensis*.

O carvão ativado foi eficiente no enraizamento *in vitro* de brotos de *A. cearensis* na presença de AIB. Sendo recomendado o estudo de concentrações mais elevadas desse composto, já que o seu incremento no meio de cultura proporcionou o aumento na porcentagem de enraizamento, número e matéria fresca da raiz.

A propagação *in vitro* de *A. cearensis* é possível utilizando o segmento nodal e cotiledonar, no entanto, a baixa taxa de multiplicação obtida nesse estudo indica a necessidade de novos estudos com a espécie.

## 1.5 REFERÊNCIAS

- AMÉRICO, W. J.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do Porta-enxerto de almeixeira Julior. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 121-124. 2003.
- ANDRADE. S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: EMBRAPA cerrados, 2002. Disponível em: <www.cpac.embrapa.br/download/285/t> Acesso em: 15.01.2012.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciências e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / Embrapa-CNPB, 1998, p.261-296.
- BALARAJU, K. et al. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)—a valuable medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Wallingford, UK, v. 44, n.5, p. 436-441, 2008.
- Bravo, J. A. et al. Bioactive phenolic phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**. v.50, n.1, p.71-74, 1999.
- BOPANA, N.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Wallingford, UK, v. 44, n.6, p. 525-532, 2008.
- BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A. de; KLUGE, R.A. (org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-254.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPACNPB, 1998. v.1. p.183-260.
- CAMPOS, V. C. A. **Micropropagação de *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH**, Dissertação (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, p.102, 2009.
- CARVALHO, P. E. R.; **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, v. 1, 2003. 1039p
- CARVALHO, J. F. R. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. regeneração *in vitro* de urucum (*bixa orellana*) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, V.29, n.6, p.887-895, 2005.
- CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**. v. 10, n.1, p. 118-124. 2004

COSTA-Lotufo L.V. et al. Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, v. 58, n. 9/10, p. 675-680, 2003.

DINIZ, J. D. N et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de guaco. **Revisa Ciências Agronômicas**. v.37, n.1, p. 59-64, 2006.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v.33, p.157–162, 1993.

FERMINO, P. C. P; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e Propagação *in vitro* de Cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.22, n.1, p.1-9, jan-marc, 2012.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p.1039-1042, nov./dez., 2011.

FLÔRES, A.V.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.A; CUNHA, A.C.M.C.M; GOLLE, D.P.; BASSAN, J.S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, jan./mar, 2011.

FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. Otimização de protocolo para micropropagação da figueira “Roxo de Valinhos”. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1149-1153, 2008.

FIRMINO, P. C. P. Nagao, E. O.; Pereira, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L. F.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, vl.37, n.84, p.427-435, dez, 2009.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.10, p.1261-1264, 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The technology. 2.ed. Edington, Wilts, London: Exegetics, 1574p. 1993.

Gomes, g. A. C. Et al. Micropropagation of *maclura tinctoria* l.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, v.36, n.1, p.25-30, 2010.

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

Gutiérrez, I. E. M.; Nepomuceno, C. F.; Ledo, C. A. S.; Santana, j. R. F. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (na importante medicinal plant). **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n.8, p.1353-1358, february, 2011.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p 549-622.

HILTON-TAYLOR, C. (compiler) 2000. **2000 IUCN Red List of Threatened Species**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Disponível em: <www.biodiversitas.org.br/listasmg/iucn.pdf.> Acessado em : 17/11/2011.

HU, C. Y.; WANG, P.J. **Meristem, shoot tip and bud cultures**. In: EVANS, D.A. et al. Handbook of plant cell culture. New York: MacMillan Publishing Company, v.1, p. 177-227, 1983.

JARDIM, L. S et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta amazônica**. vl. 40, n.2, p. 275-280, 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, p.116-223 2008.

KIELSE, P.; Franco, E. T. H.; Paranhos, J. T.; Lima, A. P. S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, jul, 2009.

LAMEIRA, O. A.; GOMES, M. R.de.O.; NETO, O. G. de R.; SANTIAGO, E. J. A. de; RODRIGUES, I. A. Efeito de auxinas sobre o enraizamento de estacas de raiz de *Cephaelis ipecacuanha*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.51, n.1, p.81, 1993.

MAIA, G. M. **Caatinga: árvores e arbustos e sua utilidades**. 1ª Ed. São Paulo. D e Z computação gráfica e editora, 2004. p.413.

Martins, L. M.; Pereira, A. M. S.; França, S. C.; Bertoni, B. W. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hill.).. **Ciência Rural**, v.41, n.3, 2011.

MOORE, T. **Biochemistry and physiology of plant hormones**. New York: Springer Verlag, 1979.

MOURA, E. F.; MENEZES, M I.; LEMOS, O. F. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.72-76, jan-fev, 2008.

NEPOMUCENO, C. F. et al. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, p. 481-490, 2009.

NOLETO, L. G; SILVEIRA, C. E. S. Propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.109-120,p? 2004.

PAN, MJ, VAN STADEN, J. The use of charcoal in vitro culture review. **Plant Growth Reg.** . v.26, p.155-163, 1998.

PATIL, G. et al. Glutamine improves shoot morphogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Acta Physiology Plant**, v. 31, p.1077–1084, 2009.

RAGHU, A. V. et al. *In vitro* clonal propagation through mature nodes of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F. & Thoms.: an important Ayurvedic Medicinal Plant. **In**

**Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Wallingford, UK, v. 42, n.6, p. 584–588, 2006.

RAMOS, K. M. O; Felfili, J. M; Fagg, C. W; Silva, J. C. S; Franco, A. C. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta Botanica Brasileira**, São Paulo . v18, n.2, 2004.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**. v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.293-296, 2006.

SANTOS, L.W; COELHO, M. F. B; PIRANI, F.R. Fenologia de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.11, n.1, p.12-17, 2009.

SCHWERTNER, A. B. S.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de singônio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, n.2, p.135-142, 2003.

SOARES, F. P. et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.1, p.152-157, 2011.

SOUZA, A. V. et al. Conservação e enraizamento in vitro de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.13, n.3, p.319-327, 2011.

STEIN V. C. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro. **Magistra**, v.20, n.2, p.128-133, 2008.

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

TILKAT, E. et al. Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia vera* L. **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 361–365, 2009.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, p. 53-74, 2007.

## CAPÍTULO II

---

**CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A.  
C. SMITH.**



## RESUMO

A cultura de tecidos, através do crescimento mínimo, possibilita a conservação *in vitro* dos recursos genéticos de plantas, tornando-se uma técnica complementar aos métodos convencionais de conservação. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de reguladores vegetais e agentes osmóticos na conservação *in vitro* de *Amburana cearensis*. Plantas com 10 dias foram inoculadas em meio de cultura WPM contendo 0,7% de Agar. No primeiro experimento o meio foi suplementado com diferentes concentrações de sacarose (87,64; 131,46; 175,28 e 262,92mM) combinado com manitol ou sorbitol, nas concentrações (0,0; 43,8; 65,73; 87,64 e 131,46 mM). No segundo experimento, as plantas foram inoculadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0  $\mu$ M) de PBZ e ANC. Ao final dos 300 dias e 210 dias para o primeiro e segundo experimento, respectivamente, foram avaliados número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) comprimento da raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e matéria fresca da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e número de brotos (NB), para esta variável avaliada consta, apenas para os testes com agentes osmóticos. A conservação da espécie mostrou-se viável, com a suplementação de 262,92 mM de sacarose ao meio de cultivo, com percentual de sobrevivência de 77%, por um período de até 300 dias.

**Palavras-chave:** Crescimento lento. Agente osmótico. Retardante de crescimento. camarú

## ABSTRACT

The tissue culture by growing at least, allows the in vitro conservation of plant genetic resources, becoming a complementary technique for conventional methods of conservation. The purpose of this study was to evaluate the effect of plant regulators and osmotic agents on in vitro conservation *Amburana cearensis*. Plants were inoculated with 10 days in WPM culture medium containing 0.7% Agar. In the first experiment the medium was supplemented with different concentrations of sucrose (87.64, 131.46, 175.28 and 262.92 mM) combined with mannitol or sorbitol at concentrations (0.0, 43.8, 65.73; 131.46 and 87.64 mM). In the second experiment, plants were inoculated in culture medium containing different concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0  $\mu$ M) of PBZ and ANC. At the end of 300 days and 210 days to the first and second experiment, respectively, were evaluated number of senescent leaves (NFS), aerial part length (CPA) root length (RL), fresh matter of aerial part (MFPA) and root fresh matter (MFR), aerial part dry matter (SDM) , root dry matter (MSR) and number of shoots (NB), for this variable evaluated appears only for the tests with osmotic agents. The conservation of the species shown to be viable, with the addition of 262.92 mM sucrose to the medium, with survival rates of 77% for a period of 300 days.

**Keywords:** Growth slow. Osmotic agent. Growth retardant. Camarú

## 2.1 INTRODUÇÃO

*Amburana cearensis* é uma espécie arbórea, pertence à família das leguminosas, conhecida popularmente como imburana de cheiro, amburana de cheiro e cumaru, ocorrente nas regiões de Caatinga e Cerrado do Brasil (MAIA, 2004; LEAL, 2006).

Ainda que estes biomas ocupem grandes extensões, estudos de conservação apontam que grande parte destas áreas já foi degradada. De acordo com MMA (2002) a Caatinga é classificada como o bioma brasileiro mais crítico no que se refere à conservação, com 80% de seu território antropizado. O Cerrado, bioma também de ocorrência natural da *A. cearensis*, conta com apenas 20% de sua cobertura original, de acordo com estudos da Conservation International (ALHO, 2005).

A espécie em estudo apresenta uso múltiplo, na medicina popular a casca da *A. cearensis* é utilizada contra reumatismo, avaliar sinusite e gripe; com suas sementes são produzidos medicamentos populares destinados ao tratamento de afecções pulmonares, tosse, asma, bronquite e coqueluche (MAIA, 2004). Análises fitoquímicas e farmacológicas confirmaram a atividade de alguns compostos presentes tanto na casca quanto nas sementes, Bravo et. al. (1999) comprovaram atividade antimalárica, antiprotozoária, antifúngica e antibacteriana, já Costa-Lotufo et al. (2003) evidenciaram efeito anti-inflamatório e antitumoral.

Outra utilidade da *A. cearensis* é na movelaria, na qual desempenha importante atividade comercial, já que com sua madeira são fabricados móveis de luxo. No entanto, a exploração madeireira tem ocorrido até a exaustão nos locais de ocorrência (RAMOS et al., 2004).

Em consequência a estas práticas puramente extrativistas e à coleta indiscriminada das sementes para fins comerciais, que resulta na redução da propagação natural dessa espécie, a *A. cearensis* foi incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção (HILTON-TAYLOR 2000).

Diante do exposto, é evidente a necessidade de medidas emergenciais para preservação desta espécie. Esse táxon foi incluído na relação de 23 espécies prioritárias para o Brasil, elaborado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) através do Centro Nacional de Recursos Genéticos

(Cenargen) para o governo brasileiro em conexão à estratégia de conservação (LEITE, 2005).

Por conta do habitat natural da espécie em estudo apresentar características desiguais de formação das florestais do Cerrado, e a crescente fragmentação das áreas mais povoadas do nordeste e centro-sul, são fundamentais esforços que lidem com o problema de conservação, sendo necessário levar em conta a natureza dos habitats, os quais favorecem altas taxas de endogamia, progressiva diversidade genética e, no longo prazo, a extinção das espécies (LEITE, 2005).

Dessa forma, há premência do desenvolvimento de alternativas para a conservação da amburana de cheiro em bancos de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade desta espécie.

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos tem permitido a formação de BAGs *in vitro* de várias espécies de plantas, como a *Hancornia speciosa* Gomes (SÁ et al., 2011; SANTOS et al., 2011), *Cochlospermum regium* (CAMILLO et al., 2009), *Eucalyptus* sp. (BUNN, 2005), *Cocos nucifera* L. (LÉDO et al., 2007), *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Lima-Brito et al., 2011) os quais apresentam vantagens quando comparado aos BAGs *ex vitro*, dentre elas: a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo ou mesmo em condições de telado e casa de vegetação.

Adicionalmente, permite a disponibilização imediata de material para propagação, a manutenção da integridade genética e biológica das plantas, a produção de matrizes livres de patógenos e a simplificação do intercâmbio de germoplasma, tanto em nível nacional como internacional (ENGELMANN, 1998; NASS, 2001; RAO, 2004; FARIA et al., 2006). Dessa forma, a manutenção de coleções *in vitro* é indicada como um método alternativo à conservação de germoplasma (SANTOS et al., 2011).

Uma das maneiras de conservar o material vegetal é através do crescimento mínimo, um método de conservação *ex situ* que promove a redução do metabolismo da planta, por meio de modificações químicas e/ou físicas no meio e nas condições de cultivo (FARIA et al., 2006; SÁ et al. 2011).

Esta técnica de conservação é viabilizada pela redução da temperatura e luminosidade e pela aplicação de agentes retardantes e osmóticos que diminuem

o crescimento e desenvolvimento das plantas, sem induzir efeitos fitotóxicos ou de má formação (GROSMANN, 1990; SIQUEIRA e SALOMÃO, 2002).

A utilização de agentes osmóticos como sacarose, sorbitol e manitol reduz o potencial hídrico do meio, tornando a água indisponível para a cultura, restringido a absorção de nutrientes e água pela planta (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991).

Já os retardantes hormonais como o ancymidol e paclobutrazol agem inibindo a síntese da giberelina bloqueando a etapa da conversão do ent-caureno a ácido ent-caureno na rota metabólica da biossíntese de giberelina (RADEMACHER, 2000). Segundo TAIZ & ZAIGER (2004) as giberelinas aumentam a alongação e a divisão celular, proporcionando o crescimento vegetal.

Esta estratégia de conservação tem com vantagem a ampliação do tempo entre os subcultivos, reduzindo a ocorrência de contaminação por meio de erro na manipulação do material, falhas nos equipamentos, mudanças no genótipo devido à instabilidade genética, além de diminuir os custos com a manutenção do banco de germoplasma (ENGELMANN, 1991; CANTO et al., 1994; JARRET, 1997).

Leite (2005), em um estudo sobre o estado de conhecimento da *Amburana cearensis* A.C. Smith para a conservação genética no Brasil, evidenciou que as ações *ex situ* de conservação são altamente recomendados para partes específicas, em locais que as perdas de recursos já são tão extensos que as medidas *in situ*, por si só, são desaconselháveis.

Diante do exposto, é necessário o estabelecimento de protocolo de conservação *in vitro* para *Amburana cearensis*, como forma alternativa de conservação de germoplasma. Dessa forma, o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos agentes osmóticos e retardantes de crescimento na conservação *in vitro* de *A. cearensis*.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), localizado no município de Feira de Santana, Bahia.

Foram utilizadas sementes de *A. cearensis* coletadas em área de Caatinga situada próxima à Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE. Após a coleta, as sementes foram armazenadas em sacos de papel Kraft, em câmara fria nesta instituição. Na Unidade Experimental Horto Florestal, ficaram armazenadas à temperatura ambiente, até o momento de instalação dos experimentos.

Para obtenção de plantas *in vitro*, as sementes de amburana foram lavadas em água corrente por 10 minutos, em seguida desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em etanol a 70% por 1 minutos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 10 minutos. Após esse período, foram lavadas 4 vezes com água destilada estéril e inoculadas em tubos contendo 15 mL de meio de cultura, conforme metodologia estabelecida por Campos (2009).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  obtidas através de lâmpadas branca fluorescentes.

### 2.2.2 Meio de cultivo e inoculação das sementes

O meio de cultura WPM (Woody Plant Medium) de Lloyd & Mccown (1980), foi utilizado em todos os experimentos e solidificado com 0,7% de Agar. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem. Logo após, o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (25x150 mm) vedados com tampa plástica e esterilizados por autoclavagem durante 15 min à temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  e pressão de 1 atm.

### 2.2.3 Efeito dos agentes osmóticos sacarose, manitol e sorbitol na conservação *in vitro* de *A. cearensis*

Plantas germinadas com dez dias, conforme item 2.2.1., foram inoculadas em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura suplementados com diferentes concentrações de sacarose sorbitol ou manitol (Quadro 1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, cada uma composta por cinco unidades experimentais.

Quadro 1. Tratamentos representando as diferentes concentrações e combinações dos agentes osmóticos sacarose, manitol e sorbitol.

Tratamento	Sacarose (mM)	Manitol (mM)	Sorbitol (mM)
T1	87,6	–	–
T2	131,46	–	–
T3	175,28	–	–
T4	262,92	–	–
T5	87,6	43,8	–
T6	131,46	65,73	–
T7	175,28	87,64	–
T8	262,92	131,46	–
T9	87,6	–	43,8
T10	131,46	–	65,73
T11	175,28	–	87,64
T12	262,92	–	131,46

A porcentagem de sobrevivência (%SOB) foi avaliada bimensalmente, constituindo o fatorial “tempo de cultivo x concentração do agente osmótico” e ao final de 300 dias foram analisadas: número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) comprimento da raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e número de brotos (NB).

#### **2.2.4 Efeitos dos retardantes de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancimidol (ANC)**

Plantas geminadas, conforme item 2.2.1, foram inoculadas em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura suplementado com 87,64mM de sacarose e diferentes concentrações de retardantes de crescimento PBZ e ANC (0,5; 1;0, 2,0; 4  $\mu$ M).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 6 (retardantes hormonais x concentrações) com seis repetições por tratamento, cada uma composta por cinco unidades experimentais.

A porcentagem de sobrevivência (%SOB) foi avaliada bimensalmente, constituindo o fatorial “tempo de cultivo x concentração do agente osmótico” e ao final de 210 dias foram analisadas: número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) comprimento da raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e número de brotos (NB).

#### **2.2.5 Análises estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Scott-Knot e através de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. O programa utilizado foi o SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA (FERREIRA, 2011).



## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Efeito dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol na conservação *in vitro* de *A. cearensis*

A variável porcentagem de sobrevivência foi avaliada ao logo do tempo, enquanto, as demais variáveis a análise ocorreu após os 300 dias. Dessa forma, foram montadas duas tabelas representando o resumo da análise de variância.

Houve efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da interação agente osmótico x tempo, para porcentagem de sobrevivência das plantas (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência (% Sobrevivência), de plantas de *Amburana cearensis* aos 300 dias, em função das concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrados médios
Agente Osmótico (A)	11	1713,7**
Tempo (B)	4	37469,16**
A x B	44	1043,4**
Resíduo	300	140,53
CV(%)		14,22

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) das concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol e manitol, para as variáveis analisadas, número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) comprimento da raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e número de brotos (NB) (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para número de folhas senescentes (NFS), comprimento da parte aérea (CPA) comprimento da raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca da raiz (MFR) e da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e número de brotos (NB) de *Amburana cearensis* aos 300 dias, em função das concentrações dos agentes osmóticos (AO) sacarose, sorbitol e manitol. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrados Médios							
		NFS	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR	NB
AO	1	373,1**	2060,7**	2905,3**	206075,9**	290527,8**	11770,1**	26026,0**	10,4**
Resíduo	5	62,2	298,9	1400,5	29891,0	140058,0	2750,0	9298,6	0,63
CV(%)		58,1	34,5	44,9	34,5	44,9	33,7	47,8	71,2

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Ao avaliar a porcentagem de sobrevivência das plantas percebeu-se uma redução desta variável com o passar do tempo. O modelo matemático que melhor se adequou aos resultados obtidos foi o quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) para T12 e linear decrescente para os demais tratamentos (Figura 1).

Aos 240 dias de cultivo em meio acrescido de sacarose e sorbitol (262,92 mM e 131,46 mM, respectivamente) foi observado a sobrevivência de 100% das plantas. No entanto, após 300 dias em meio de cultivo, a maior porcentagem de sobrevivência (77,5%) das plantas foi registrada no tratamento T4, acrescido de 262,92 mM de sacarose (Figura 1). Essas médias são superiores as obtidas por Biondo et al., (2007) no cultivo de *Mandevilla velutina*, utilizando 2% de manitol, sacarose e dextrose, como agentes osmóticos, os quais registraram porcentagem de sobrevivência inferior a 50%. Já Divakaran et al. (2006), obtiveram êxito na conservação *in vitro* de *Mandevilla velutina* com a redução da sacarose e o acréscimo de 54,9 ou 82,34mM de manitol, por até 360 dias.

Aos 300 dias, todas as plantas inoculadas no tratamento (T8) contendo as maiores concentrações de sacarose e manitol (262,92 e 131,46 mM, respectivamente) morreram. Esses resultados sugerem que o manitol em altas concentrações apresenta efeito tóxicos à plantas, corroborando Sá et al. (2011), Léo (2007), Santos (2011) e Silva et al. (2011) que relataram efeito tóxico do manitol e decréscimo na porcentagem de sobrevivência na conservação de microestacas de mangabeiras, coqueiro anão, segmentos nodais de mangabeira e *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum*, respectivamente.

Segundo Dumet et al. (1993) o manitol é um álcool açúcar que, ao ser adicionado ao meio de cultura, atua externamente, removendo o excesso da água intracelular através do gradiente osmótico, resultando no crescimento mais lento da cultura. Esse fato pode explicar o efeito estressante do manitol sobre as culturas. Neste estudo a maior concentração de manitol (131,46 mM) testada, resultou na morte de todas as plantas, ao fim dos 300 dias de cultivo.

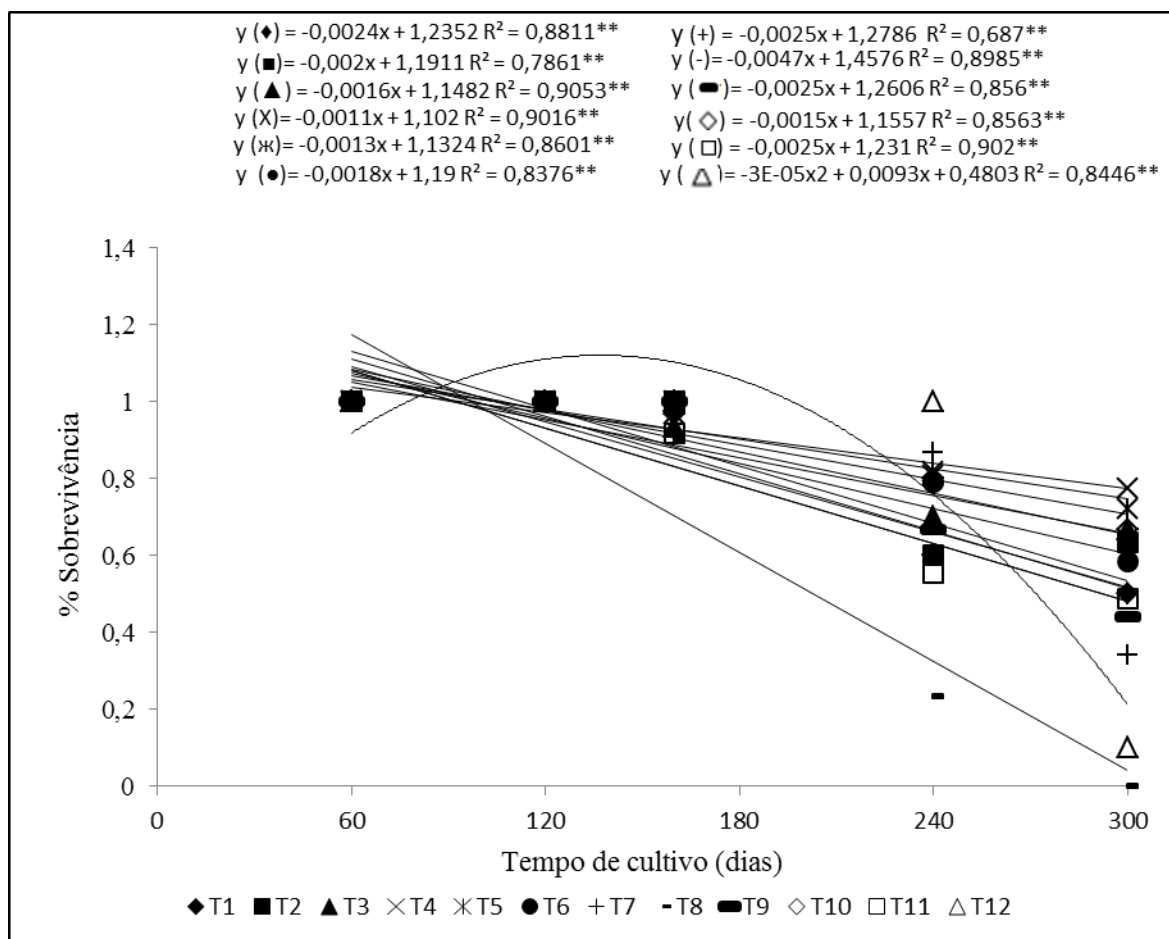


Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência de plantas de *A. cearensis* ao longo de 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos (SAC), manitol (MAN) e sorbitol (SORB). T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

Com relação ao número de folíolos senescente, os melhores resultados foram registrados nos tratamentos contendo a maior concentração de sacarose

(262,92mM) isolada, ou quando combinados com manitol e sorbitol (exceto nos meios utilizando 43,8mM de manitol ou sorbitol) (Figura 2). O tratamento T12 não apresentou folíolos senescentes, no entanto, apenas 10% das plantas sobreviveram ao fim dos 300 dias.

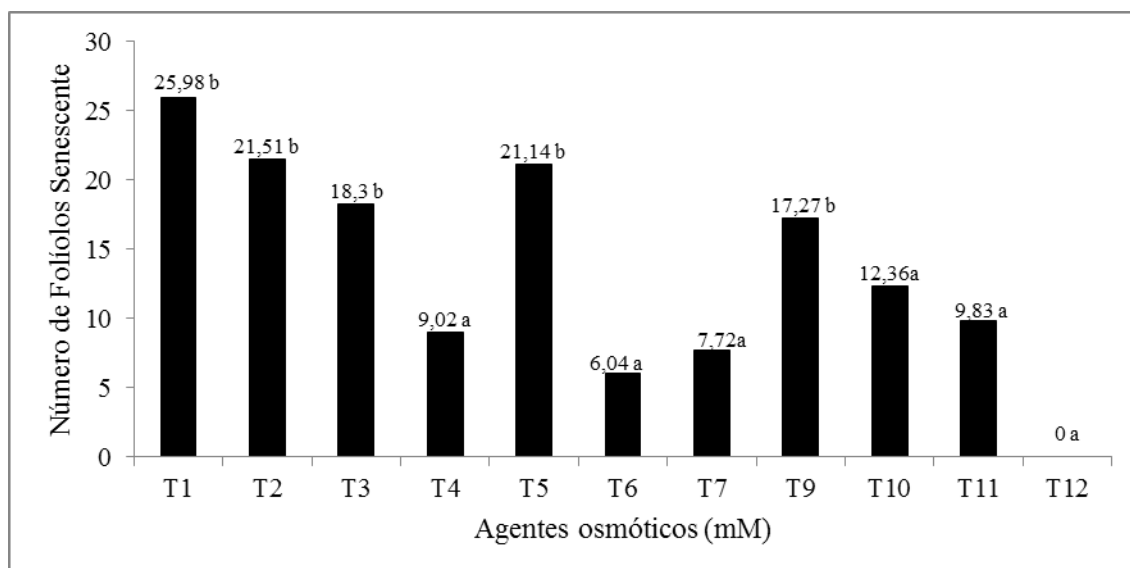


Figura 2 - Número de folíolos senescentes de plantas de *A. cearensis* aos 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos (SAC), manitol (MAN) e sorbitol (SORB). T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

As maiores médias para número de folíolos senescente foram registradas nas menores concentrações de sacarose testadas (87,6mM), ou quando associados a 43,8mM de manitol ou sorbitol. Isto pode ser explicado pelo fato dos açúcares álcool, em baixas concentrações, não atuarem como redutores do potencial hídrico.

Quanto à sacarose, ótimas concentrações disponibilizam uma boa fonte energética, proporcionando o aumento da atividade metabólica vegetal *in vitro* e por consequência, o acúmulo de substâncias provenientes do metabolismo, já que, a forma como os tubos são fechados limita as trocas gasosas com o ambiente externo, impedindo a liberação de compostos tóxicos (ZOBAYED et al., 2002),

dentre eles, o gás etileno. Este, por sua vez, tem como forte indicativo de presença, a queda de folhas de plantas cultivadas *in vitro*. Assim, o acúmulo deste regulador de crescimento, pode interferir na morfogênese das culturas, acelerando a senescência e induzindo a abscisão foliar (NEPOMUCENO, 2009; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Neste estudo, a adição do manitol e sorbitol, bem como o acréscimo nas concentrações de sacarose, restringiram o crescimento de plantas de *A. cearensis*. Segundo, Fortes & Scherwinski-Pereira (2001) os agentes osmóticos como sacarose, manitol e sorbitol, podem atuar como retardantes de crescimento, reduzindo o potencial hídrico e reduzindo a disponibilidade de água para os explantes, promovendo o estresse osmótico no material em conservação.

Para comprimento da parte aérea o pior tratamento foi observado utilizando 175,28mM (T3) de sacarose, o qual apresentou o maior crescimento, no entanto, concentração mais alta deste carboidrato (T4), isolado, obteve a menor média (Figura 3), já que a sacarose em elevados concentrações atua como agente osmótico, reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente dificultando a absorção de água e nutrientes (CALDAS et al., 1998; ENGELMANN, 1991).

A alta pressão osmótica provoca o decréscimo no metabolismo das plantas (CALDAS et. al., 1998), fato este que foi refletido no menor crescimento da parte aérea em *A. cearensis*. Esses resultados estão de acordo com Lédo (2007) que obtiveram crescimento mínimo *Cocos nucifera* var. *nana* com o acréscimo da concentração de sacarose e com Inácio (2011) que obtiveram as melhores respostas quando o meio de cultivo foi acrescido de manitol na conservação *in vitro* de algodão do campo (*Cochlospermum regium*).

A associação da sacarose com sorbitol ou manitol também favoreceu a redução do comprimento da parte aérea das plantas, sendo registrando a menor média (21,2) quando combinado sacarose e sorbitol (T12), contudo, esses valores não diferem estatisticamente dos resultados alcançados nos tratamentos T6 (35,46) e T7 (35,27), (131,46mM sacarose e 65,73mM manitol; 175,28mM sacarose e 87,64 mM manitol, respectivamente) (Figura 3).

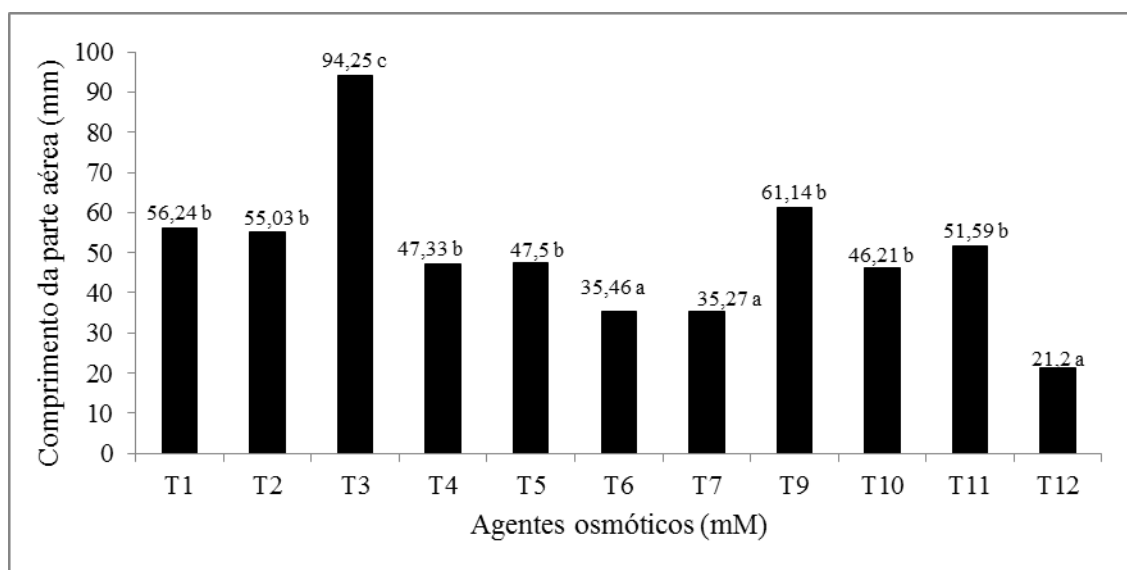


Figura 3 - Comprimento da parte aérea de plantas de *A. cearensis* aos 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos. T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

Com relação ao comprimento da maior raiz os tratamentos T3, T4 e T11 diferiram estatisticamente dos demais, apresentando os maiores valores (12,23; 11,28 e 10,38mm, respectivamente). A menor média (4,39 mm) foi observada quando combinado a maior concentração de sacarose (262,92 mM) com a de sorbitol (131,46 mM) (Figura 4).

Para matéria fresca da parte aérea, foi verificada a mesma tendência obtida para comprimento da parte aérea, na ausência dos açúcares álcool, o menor valor para esta variável, foi encontrado na maior concentração de sacarose testada (262,92mM). Quando adicionado manitol ou sorbitol ao meio de cultivo, foi verificada a redução da matéria fresca da parte aérea em resposta ao aumento das concentrações dos agentes osmóticos, exceto no tratamento T11 (Figura 5-A).

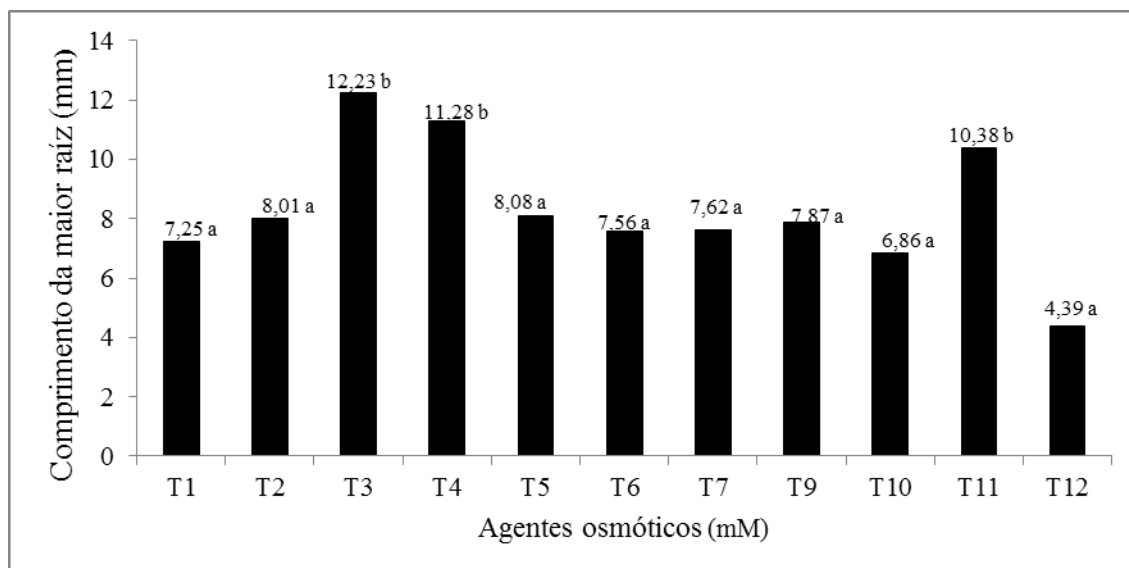


Figura 4 - Comprimento da maior raiz de plantas de *A. cearensis* aos 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos (SAC), manitol (MAN) e sorbitol (SORB). T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

O valor da matéria fresca é uma variável que expressa o desenvolvimento e a conservação das plantas *in vitro*, já que, plantas maiores apresentam valores de matéria fresca superiores. A partir desse parâmetro, pode-se associar menores valores desta variável ao maior grau de conservação da cultura *in vitro*, ao passo que, maiores valores de matéria fresca indicam menor conservação do material em cultivo. Desta forma, verificou-se que os tratamentos T6 (354,63mg), T7 (352,69mg) e T12 (212mg), determinaram o melhor potencial de conservação *in vitro* das mudas de *A. cearensis* (Figura 5).

Os resultados obtidos com a matéria seca da parte aérea confirmam o menor acúmulo de biomassa encontrado nos tratamentos T6 (105,52mg), T7 (110,77mg) e T12 (74,33mg). Dessa forma, observa-se que a presença dos agentes osmóticos sorbitol e manitol, bem como, a maior concentração de sacarose testada, promoveram a redução do metabolismo de plantas de *A. cearensis* e por consequência seu crescimento (Figura 5-B).

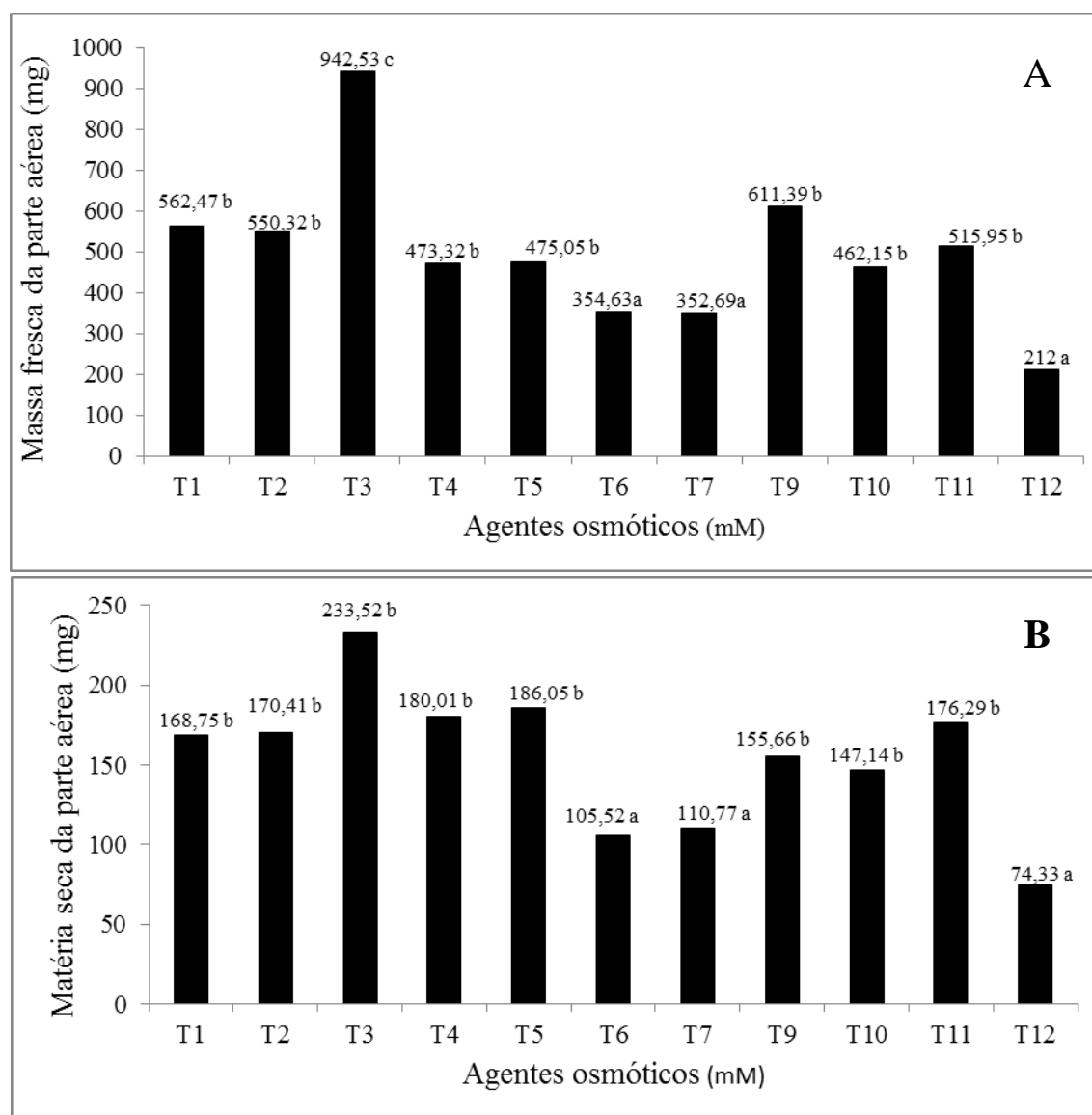


Figura 5. Matéria fresca (A) e matéria seca da parte aérea (B) de plantas de *A. cearensis* aos 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos (SAC), manitol (MAN) e sorbitol (SORB). T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

Para matéria fresca das raízes, observou-se diferença significativa dos tratamentos T3 (1223,42mg), T4 (1128,15mg) e T11 (103,8mg) com os demais, os quais apresentaram as maiores médias (Figura 6-A).



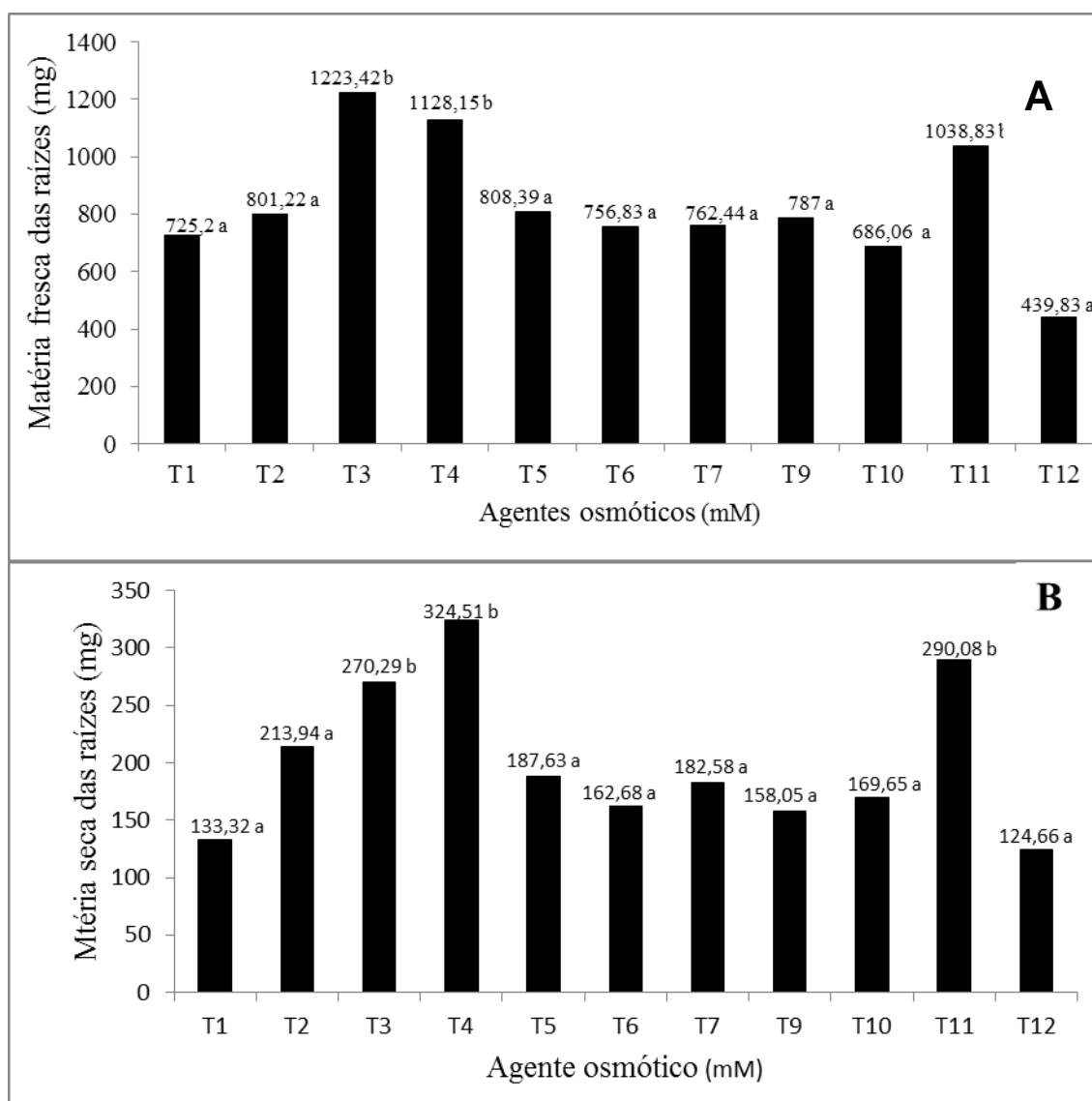


Figura 6. Matéria fresca (A) e seca (B) de raízes de plantas de *A. cearensis*, aos 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos (SAC), manitol (MAN) e sorbitol (SORB). T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

Quanto à matéria seca da raiz, verificou-se que o aumento nos valores desta variável é proporcional ao acréscimo das concentrações de sacarose, isolada. De acordo com George (1993), de modo geral, o aumento da concentração de sacarose estimula o crescimento e formação de raízes de algumas espécies. No entanto, Veierskov et al., (1982) relatam que altas concentrações de carboidrato no meio de cultura têm um efeito negativo sobre o

enraizamento, devido ao acúmulo de açúcar acima dos níveis fisiológicos nos tecidos.

O menor valor para matéria seca da raiz foi obtido no tratamento T12, 262,92 mM de sacarose combinado com 131,46mM de sorbitol. Estes resultados corroboram com Faria et al. (2006), estudando o efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti*; os autores verificaram que os menores percentuais de enraizamento ocorreram em meio de cultura suplementado com sorbitol.

As plantas conservadas *in vitro* de *A. cearensis* apresentaram a formação de brotações laterais, tanto na base do cotilédone quanto nas gemas laterais, exceto quando combinados com 262,92 mM sacarose com 131,46 mM de sorbitol,

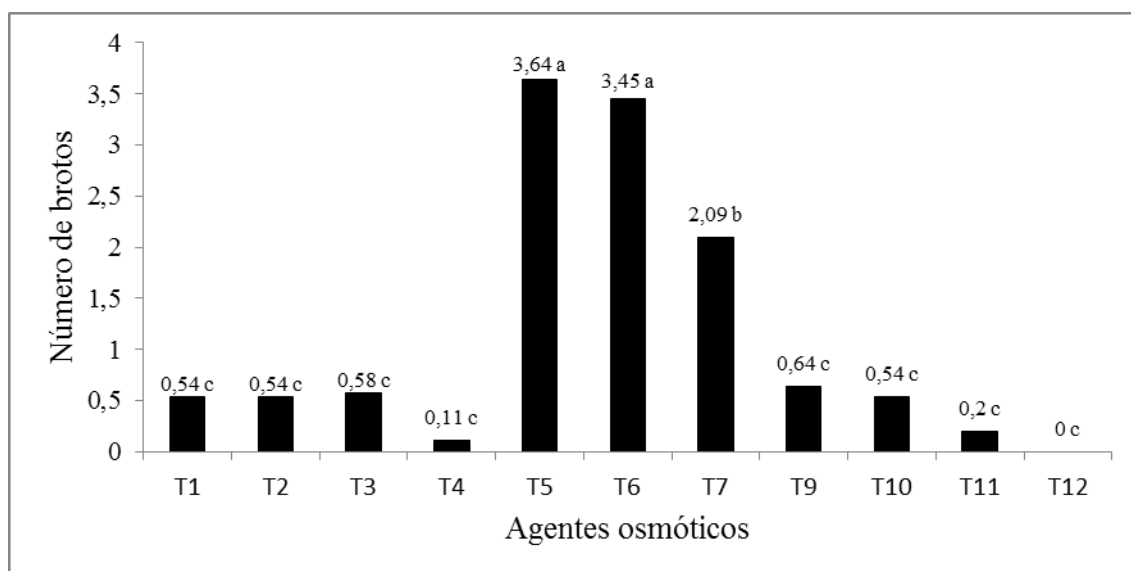


Figura 7. Número de brotos de plantas de *A. cearensis* aos 300 dias, submetidas a diferentes concentrações dos agentes osmóticos (SAC), manitol (MAN) e sorbitol (SORB). T1-(87,6mM SAC); T2-(131,46 mM SAC); T3-(175,28 mM SAC); T4-(262,92 mM SAC); T5-(87,6mM SAC+43,8 mM MAN); T6-(131,46 mM SAC+65,73 mM MAN); T7-(175,28 mM SAC+87,64 mM MAN); T8-(262,92 mM SAC+131,46 mM MAN); T9-(87,6mM SAC+43,8 mM SORB); T10-(131,46 mM SAC+65,73 mM SORB); T11-(175,28 mM SAC+87,64 mM SORB); T12-(262,92 mM SAC+131,46 mM SORB). Feira de Santana, BA. 2012.

As maiores médias para número de brotos foram obtidas quando a sacarose foi associada ao manitol, sendo o maior valor encontrado (3,64 brotos) quando combinou-se 87,6μM de sacarose com 43,8 μM manitol

De acordo com os resultados observados para número de brotos, pode-se sugerir a utilização do manitol para realização de experimentos de multiplicação, já que a espécie em estudo apresenta baixo percentual de número de brotos por explante. Trabalhos anteriores, realizados por Campos (2009), registraram baixa capacidade de multiplicação, 2,36 brotos/explante.

Foi possível a conservação de plantas germinadas *in vitro* de *A. cearenses* com o aumento da concentração de sacarose (262,92 mM) ou com a combinação de 131,46 mM e 65,73 mM de sacarose e manitol, respectivamente.

### 2.3.4 Efeitos dos retardantes de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancimidol (ANC)

A análise de variância revelou que a interação “retardante de crescimento x tempo de cultivo” apresentou efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) para a porcentagem de sobrevivência das plantas de *A. cearensis* (Tabela 3).

Tabela 3- Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência, em função de diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancimidol (ANC) ao longo do tempo (210 dias) de *A. cearenses*. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrado Médio
Tipo de regulador (A)	1	0,08
Concentração (B)	3	0,02
Tempo de cultivo (C)	5	1,89
A x B	3	0,03
A x C	5	0,08
B x C	15	0,01
A x B x C	15	0,02
Resíduo	239	239
CV (%)		17,81

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Ao analisar a taxa de sobrevivência trimestral, foi verificado um comportamento quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) para os retardantes de crescimento PBZ e ANC. Ao final de 210 dias a maior taxa de sobrevivência (58%) foi registrada quando o meio de cultura foi suplementado com ANC. A menor média (38%) foi obtida ao incrementar o meio de cultivo com PBZ. (Figura 4)

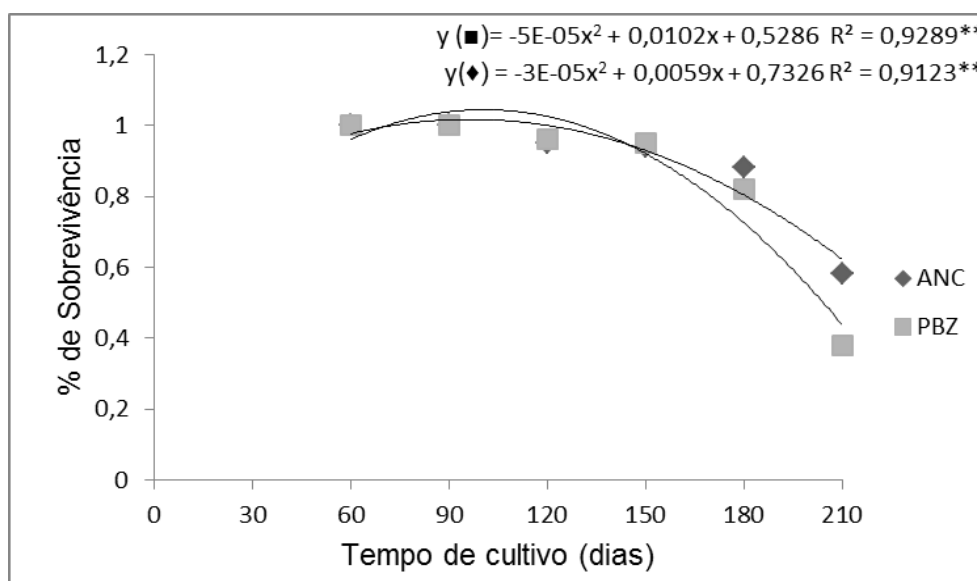


Figura 8 - Porcentagem de sobrevivência de plantas de *A. cearensis* ao longo de 210 dias, submetidas a diferentes concentrações de retardantes de crescimento, paclobutrazol e ancymidol. Feira de Santana, Ba. 2012.

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ( $P < 0,01$ ) dos tipos de retardantes de crescimento, apenas para comprimento da parte aérea e matéria seca da raiz (Tabela 4).

Tabela 4- Resumo da análise de variância para número de folhas senescente (NFS), comprimento da parte aérea (CPA), número de folíolos senescentes (NFS), comprimento da maior raiz (CR), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca das raízes (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca das raízes (MSR) de plantas de *A. cearensis* aos 210 dias, submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ). Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrados Médios						
		NFS	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
C.	3	278,76 <sup>NS</sup>	1494,76 <sup>NS</sup>	361,39 <sup>NS</sup>	313000,5 <sup>NS</sup>	1240712,3 <sup>NS</sup>	5423,46 <sup>NS</sup>	1066,58 <sup>NS</sup>
RG	1	270,98 <sup>NS</sup>	23272,49 <sup>**</sup>	2659,94 <sup>NS</sup>	975783,3 <sup>NS</sup>	2400287,8 <sup>NS</sup>	3788,74 <sup>NS</sup>	28412,57 <sup>**</sup>
CXRG	3	96,16 <sup>NS</sup>	3279,7 <sup>NS</sup>	1100,83 <sup>NS</sup>	896033,5 <sup>NS</sup>	739904,8 <sup>NS</sup>	6151,02 <sup>NS</sup>	1562,47 <sup>NS</sup>
RES D	40	117,90	2583,66	1179,16	475767,5	711481,29	4362,13	3069,02
CV(%)		60,63	35,38	41,93	92,20	123,35	40,78	49,97

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Com relação ao comprimento da parte aérea, verifica-se que o PBZ apresentou as menores médias (121,63) quando comparado ao ANC (165,67). No entanto, não foi verificada uma eficiente redução no comprimento da parte aérea

nas concentrações testadas, já que estes retardantes de crescimento tem como modo de ação a inibição da síntese da giberelina, a qual está relacionada com o aumento da alongação e divisão celular (TAIZ e ZAIGER, 2004) (Figura 9).

Os retardantes de crescimento PBZ e ANC possuem compostos ativos que alcançam os meristemas subapicais da planta inibindo a oxidação do kaureno para ácido kaurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico. O resultado é a redução da divisão celular sem ocasionar citotoxicidade e a consequência morfológica direta é a redução do vigor vegetativo (SILVA e FAY, 2003).

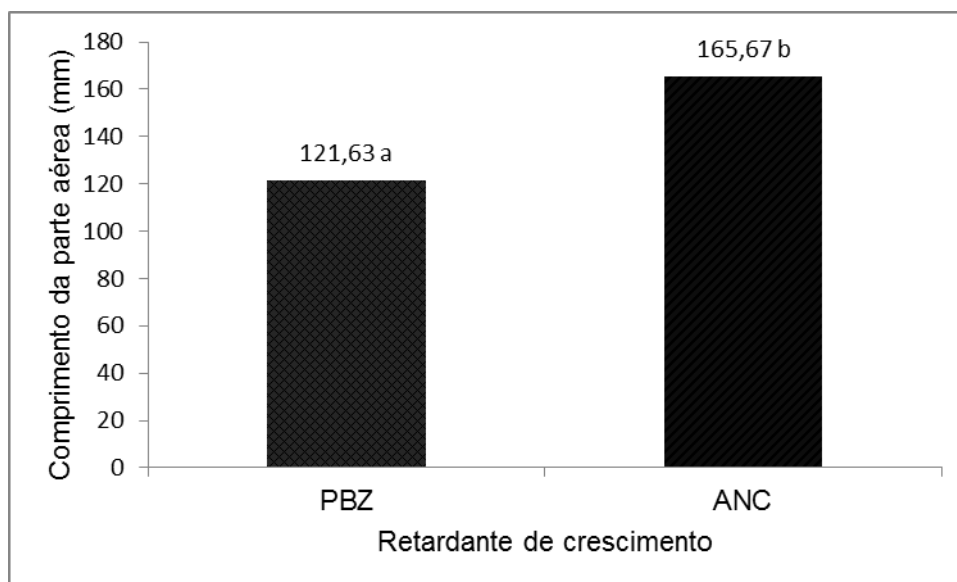


Figura 9 – Comprimento da parte aérea de *A. cearensis*, aos 210 dias, submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancymidol (ANC). Feira de Santana, BA. 2011

Quanto ao sistema radicular, observa-se diferença significativa entre os tipos de retardantes de crescimento testados, a presença do ANC proporcionou o menor crescimento da raiz quando comparado ao PBZ, e menor acúmulo de biomassa, o que pode ser verificado na matéria seca da raiz (86,54 mg e 135,2 mg, na presença de ANC e PBZ, respectivamente). Segundo GIANFAGNA (1987), estes compostos inibem divisão celular no meristema subapical do caule, mas têm pouco efeito na iniciação de primórdios foliares ou em crescimento de raiz (Figura 10).

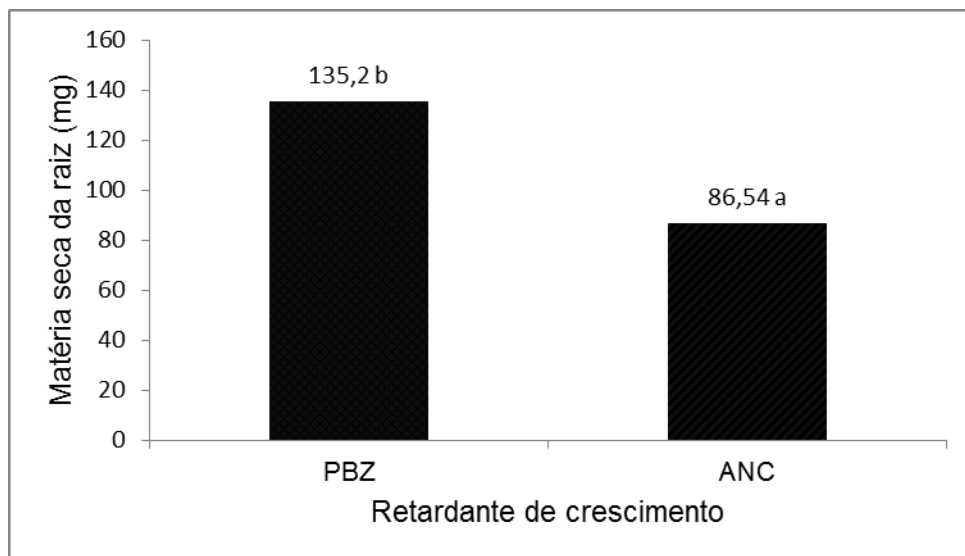


Figura 10 –Matéria seca da raiz de *A. cearensis*, aos 210 dias, submetidas a diferentes concentrações do retardante de crescimento paclobutrazol (PBZ) e ancymidol (ANC). Feira de Santana, BA. 2011

NEPOMUCENO et al. (2007) e ZIUKA E KUSSIENE (2010), observaram influência do Paclobutrazol no sistema radicular, e constataram a redução na matéria seca de *Anadenanthera colubrina* e efeito repressor no comprimento da raiz *Populustremula* L, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos, verifica-se que os retardantes de crescimento ancymidol e paclobutrazol nas concentrações testadas mostraram-se pouco eficientes na conservação *in vitro* de *A. cearensis*.

## 2.4 CONCLUSÃO

A conservação *in vitro* de *A. cearensis* é possível utilizando-se plantas germinadas assepticamente em meio de cultura WPM.

A utilização de elevadas concentrações de sacarose favorecem a conservação *in vitro* de *A. cearensis*, proporcionando altas taxas de sobrevivência ao final de 300 dias.

A combinação de sacarose com manitol ou sorbitol é benéfica à conservação *in vitro* de *A. cearensis*.

Os retardantes de crescimento, paclobutrazol e ancymidol, mostraram-se pouco eficientes na conservação *in vitro* de *A. cearensis*.

A utilização do manitol favoreceu a promoção de brotos nos cultivos *in vitro* de *A. cearensis*. Sendo recomentado o estudo deste agente osmótico em futuros trabalhos, já que esta espécie apresenta baixas taxas de multiplicação *in vitro*.

## 2.5 REFERÊNCIAS

ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.15-22, 2005.

BIONDO, R. et al. Micropropagation, seed propagation and germoplasma bank on *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson. **Scientia Agricola**, v.64, n.3, p.263-8, 2007.

Bravo, J. A. et al. Bioactive phenolic phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**. v.50, n.1, p.71-74, 1999.

BUNN, E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 83, p. 97–102, 2005.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPACNPH, 1998. v.1. p.183-260.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; VIEIRA, R.F.; PEIXOTO, J.R. **Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.11, n.2, p.184-189, 2009.

CANTO, A.M.E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**. V.. 39 n.7 p. 717-720, 1994.

COSTA-Lotufo L.V. et al. Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, v. 58, n. 9/10, p. 675-680, 2003.

DIVAKARAN, M. et al. Conservation of *Vanilla* species *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 02, p. 175-180, 2006.

DUMET, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **CryoLetters**, n. 14, p. 243-250, 1993.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma: a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991.

ENGELMANN, F. *In vitro* germplasm conservation. In: DREW, R.A. [ed.]. *Tropical & Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA – SPI/Embrapa – CNPH. 1998. p. 41-47.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. D.; SOUZA, A. S. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* *Passiflora giberti* N.



E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 28, n. 2, p. 267-270. Jaboticabal – SP, 2006.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p.1039-1042, nov./dez., 2011.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.10, p.1261-1264, 2001.

GIANFAGNA, T.J. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIES, P.J. ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Boston, Martinus Nijhoff, 1987. p.615-655.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The technology. 2.ed. Edington, Wilts, London: Exegetics, 1574p. 1993.

GROSSMANN, K. Plant growth retardants as tools in physiology research. **Phsiologia. Plantarum**. v. 78, n.4 p.640-648, 1990.

HILTON-TAYLOR, C. (compiler) 2000. **2000 IUCN Red List of Threatned Species**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Disponível em: <[www.biodiversitas.org.br/listasmg/iucn.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/listasmg/iucn.pdf)> Acessado em : 17/11/2011.

INÁCIO, M. C.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. In vitro conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Scharank). **Journal of Medicinal Plants Research**. v.5, n.20, p. 4999-5007, September, 2011.

JARRET, R.L.; MERRICK, L.C.; HOLMS, T.; EVANS, J. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai]. **Genome**, v.40, p.433-449. 1997.

LEAL, L. K. M. **Contribuição para validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídio**. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, 1v. p.178, 2006.

LÉDO, A. da S. et al. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento do coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.19, n.4 ,p.346-351, 2007.

LEITE, E. J. STATE-OF-KNOWLEDGE *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A. C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**. v.13, p. 49-65, 2005.

MAIA, G. M. **Caatinga**: árvores e arbustos e sua utilidades. 1ª Ed. São Paulo. D e Z computação gráfica e editora, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**: Avaliação e Identificação de Áreas Prioritárias para Conservação, utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira. Série Biodiversidade, 2002.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p.30-55, 2001.

NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. T. F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v.31, n.5, p.967-975, 2007.

NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. T. F. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v.33, n.3, p.481-490, 2009.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 51, p. 501-531, 2000.

RAMOS, K. M. O; Felfili, J. M; Fagg' C. W; Silva, J. C. S; Franco, A. C. Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo , v.18, n.2, 2004.

RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, kenya, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

SÁ, A. J.; LEDO, A. S.; LEDO.; Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil **Ciência Rural**. Santa Maria. v.41, n.1, p. 57-62. jan, 2011.

SANTOS, M. C.; LEDO, A. S.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, F.V.D.; JUNIOR, J. F. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**. v. 42, n. 3, p. 735-741, jul-set, 2011.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F.; JONSSON, C.M. Paclobutrazol: regulador de crescimento vegetal. In: SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Impacto ambiental do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol**. Jaguariúna, p. 11-16. (Documentos, 30). 2003.

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Conservação *in vitro* de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* sob condições de crescimento lento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.4, p.384-389, abr. 2011

SIQUEIRA, D. L; SALMÃO, L. C. C. Efeito do paclobutrazol no crescimento e florescimento dos citros. **Laranja**, v.23, n.2, p. 355-369, 2002.

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

VEIERSKOV, B.; ANDERSEN, A.S.; ERIKSEN, E.N. Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisum sativum*. 1- Carbohydrate and nitrogen content in pea plants and cuttings grown at two different irradiances. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n.2, p. 167-173, 1982.

ZIAUKA, J; KUUSIENE S. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway Elicit varied responses during in vitro culture of aspen (*Populus tremula* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, n.2, p. 221-228, 2010.

## CONCLUSÃO GERAL

A multiplicação *in vitro* de *A. cearensis* é possível utilizando o segmento nodal e cotiledonar, no entanto, a baixa taxa de multiplicação obtida nesse trabalho indica a necessidade de novos estudos com a espécie.

Concentrações maiores de carvão ativado devem ser avaliadas em novos estudos, já que o seu incremento no meio de cultura proporcionou o aumento na porcentagem de enraizamento, número e matéria fresca da raiz.

Elevadas concentrações de sacarose favorecem a conservação *in vitro* de *A. cearensis*, indicando que concentrações maiores devem ser avaliadas em futuros estudos.

Foi possível conservar plantas *in vitro* de combinando sacarose com manitol ou sorbitol por até 300 dias.

Novos estudos devem ser realizados utilizando o manitol na fase de multiplicação, uma vez que, a sua presença no meio de cultivo, favoreceu a promoção de brotos de *A. cearensis*.