



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

INGRIDH MEDEIROS SIMÕES

ESTRESSE TÉRMICO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra*

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2021

INGRIDH MEDEIROS SIMÕES

ESTRESSE TÉRMICO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Dalbergia nigra*

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

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

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M488e Medeiros Simões, Ingridh, 1994-
Estresse térmico e morfogênese in vitro de sementes de Dalbergia nigra / Ingridh Medeiros Simões. - 2021.
62 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.
Coorientadores: José Carlos Lopes, Marcos Vinícius Winckler Caldeira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Jacarandá da Bahia. 2. cultivo in vitro. 3. estresse abiótico. 4. bioquímica. 5. organogênese. I. Sobreira Alexandre, Rodrigo. II. Lopes, José Carlos. III. Winckler Caldeira, Marcos Vinícius. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 630

**ESTRESSE TÉRMICO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE SEMENTES DE
*Dalbergia nigra***

Ingridh Medeiros Simões

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

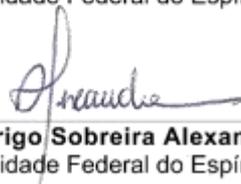
Aprovada em 25 de fevereiro de 2021.



Prof. Dr. Edilson Romais Schmidt (Examinador externo)
Universidade Federal do Espírito Santo



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



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

DEDICATÓRIA

Ao meu grandioso Deus

À minha família, meu alicerce

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades diárias de testemunhar o quão sou amada por Ele. Obrigada por estar sempre presente em tudo, mesmo quando não percebia.

Aos meus pais Maria das Graças Medeiros Simões e Milton Simões por todo amor, carinho, incentivo e força ao longo de todos esses anos de caminhada. Amo vocês infinito!

Ao meu eterno namorado Danilo dos Santos Abreu por todo apoio e companheirismo em todos os momentos difíceis, e me fazer sentir que minhas conquistas são as dele.

Aos meus irmãos Leonardo, Mayriely e Brendha por todo amor, confiança e ajuda durante essa jornada. Vocês são necessários.

Aos meus sobrinhos Ana Luisa, Bernardo e Arthur por tornar tempos críticos em momentos de alegria infinita. Vocês são minhas preciosidades.

A toda equipe do Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais pela ajuda nos experimentos, pelo consolo nos momentos de desespero e por cada risada em momentos de alegria. Em especial a minha amiga do coração Julcinara Oliveira Baptista por tornar essa etapa mais fácil e prazerosa.

Ao meu orientador Rodrigo Sobreira Alexandre, pelos ensinamentos, paciência, orientações e incentivo. Ao senhor minha eterna gratidão.

Ao professor José Carlos Lopes por toda parceria e carinho ao longo desses anos.

Ao professor Edilson Romais Schmildt por apoio e ajuda nas análises estatísticas.

À Universidade Federal do Espírito Santo, em especial o Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que
você sabe.
(Aldous Huxley)*

RESUMO

SIMÕES, Ingridh Medeiros. **Estresse térmico e morfogênese *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra***. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Lopes e Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

A espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth é conhecida popularmente como jacarandá da Bahia, apresenta madeira utilizada para a fabricação de móveis de luxo e construções civis, fator esse que a inseriram na Lista Oficial da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção devido a sua acentuada exploração. Pouco se conhece sobre sua propagação, podendo ser a cultura de tecidos uma importante técnica aliada para a produção de mudas em larga escala desta espécie. Objetivou-se estudar as características fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Dalbergia nigra* sob estresse térmico *in vitro*, bem como a sua morfogênese utilizando-se diferentes explantes sob combinações citocinínicas. Capítulo I: Qualidade fisiológica e bioquímica em sementes de *Dalbergia nigra* sob estresse térmico *in vitro* a 45 °C por diferentes horas (0; 24; 48; 72; 96). Foram realizadas as análises fisiológicas de umidade, condutividade elétrica, índice de velocidade de germinação, plântulas normais e anormais, comprimento de parte aérea, raiz e hipocótilo, diâmetro do coleto, massa seca de parte aérea e raiz e índice de qualidade de Dickson e as análises bioquímicas de carboidratos totais, lipídios totais, fenóis totais, proteínas totais, amido e fibras. As análises estatísticas constaram de regressão e correlação de Pearson. Observou-se redução na germinação e no vigor das sementes com o tempo de estresse térmico, apresentando decréscimo de 95 para 0%, com 0 e 96 horas respectivamente e redução no conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas. Capítulo II: Morfogênese *in vitro* de explantes hipo e epicotiledonares de *Dalbergia nigra*, induzidos por combinações citocinínicas. Foram analisados o número de brotos, número de folhas, comprimento do broto, diâmetro do coleto, número de raízes, comprimento da raiz principal, massa seca do broto e massa seca da raiz. As análises estatísticas constaram de teste de médias de Tukey e correlação de Pearson ($p < 0,05$). O uso de 6-benzilaminopurina (BAP - 2.22 μM) na multiplicação de brotos proporcionou alto

fator de multiplicação, comprimento e massa seca de brotos, número, comprimento e massa seca de raiz, quando associada ao explante nó cotiledonar.

Palavras-chave: Jacarandá da Bahia, cultivo *in vitro*, estresse abiótico, bioquímica organogênese.

ABSTRACT

SIMÕES, Ingridh Medeiros. **Heat stress and *in vitro* morphogenesis of *Dalbergia nigra* seeds.** 2021. Dissertation (Master in Forest Sciences) - Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisor: Prof. Dr. José Carlos Lopes and Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

The species *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth is popularly known as jacaranda from Bahia, it has wood used for the manufacture of luxury furniture and civil constructions, a factor that included it in the Official List of the Endangered Brazilian Flora due to its sharp exploitation. Little is known about the propagation of this species, and tissue culture may be an important allied technique for the production of large-scale seedlings of this species. The objective of this study was to study the physiological and biochemical characteristics of *Dalbergia nigra* seeds under heat stress *in vitro*, as well as their morphogenesis using different explants under cytokinetic combinations. Chapter I: Physiological and biochemical quality of *Dalbergia nigra* seeds under heat stress *in vitro* at 45 ° C for different hours (0; 24; 48; 72; 96). Physiological analyzes of moisture, electrical conductivity, germination speed index, normal and abnormal seedlings, root and hypocotyl shoot length, collar diameter, shoot and root dry mass and Dickson quality index were performed and biochemical analysis of total carbohydrates, total lipids, total phenols, total proteins, starch and fibers. The statistical analyzes consisted of Pearson's regression and correlation. There was a decrease in germination and vigor with the hours of thermal stress, with a decrease from 95 to 0%, with 0 and 96 hours respectively and a reduction in the content of carbohydrates, lipids and proteins. Chapter II: *In vitro* morphogenesis of hypo and epicotyledon explants of *Dalbergia nigra*, induced by cytokinetic combinations. The number of shoots, number of leaves, shoot length, stem diameter, root number, root

length, dry mass of the shoot and dry mass of the root were analyzed. The statistical analyzes consisted of Tukey's means test and Pearson's correlation ($p < 0.05$). The use of 6-benzylaminopurine (BAP - $2.22 \mu\text{M}$) in the multiplication of shoots provided a high multiplication factor, length and dry mass of shoots, number, length and dry mass of root, when associated with the explant cotyledon node.

Keywords: Jacaranda da Bahia, *in vitro* cultivation, abiotic stress, organogenesis biochemistry.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Qualidade fisiológica e bioquímica em sementes de *Dalbergia nigra* sob estresse térmico *in vitro*.....28

Figura 1. Umidade e condutividade elétrica em sementes de *Dalbergia nigra in vitro* sob estresse térmico à 45 °C. (a) umidade; (b) condutividade elétrica (CE) ($p < 0,05$).....34

Figura 2. Germinação e viabilidade de sementes de *Dalbergia nigra in vitro* submetidas a estresse térmico a 45 °C. (a) germinação (%); (b) índice de velocidade de germinação (IVG); (c) plântulas normais (%); (d) plântulas anormais (%) ($p < 0,05$).....35

Figura 3. Variáveis de crescimento e qualidade de mudas, formadas a partir de sementes de *Dalbergia nigra in vitro* sob estresse térmico à 45 °C. (a) comprimento do hipocótilo (cm); (b) comprimento da raiz (cm); (c) comprimento da muda (cm); (d) diâmetro do coleto (mm); (e) massa seca da parte aérea (mg); (f) massa seca da raiz (mg); (g) índice de qualidade de Dickson (IQD) ($p < 0,05$).....36

Figura 4. Variáveis bioquímicas de sementes de *Dalbergia nigra in vitro* sob estresse térmico à 45 °C. (a) lipídios totais (%); (b) carboidratos totais (%); (c) fenol total (%); (d) proteínas totais (%); (e) amido total (%); (f) fibras totais (%) ($p < 0,05$).....38

Figura 5. Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis fisiológicas/morfológicas e bioquímicas em sementes de *D. nigra* submetidas ao estresse térmico a 45 °C. UMI, umidade (%); CE, condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$); G, germinação (%); IVG, índice de velocidade de germinação; PN, plântulas normais (%); PA, plântulas anormais (%); CPA, comprimento de parte aérea (cm); CR, comprimento da raiz (cm); CH, comprimento do hipocótilo (cm); DC, diâmetro do coleto (mm); MSPA,

massa seca da parte aérea (mg); MSR, massa seca da raiz (mg); IQD, índice de qualidade de Dickson; LT, lipídios totais (%); CT, carboidratos totais (%); FT, fenol total (%); PT, proteínas totais (%); A, amido (%); F, fibras (%) (p <0,05).....40

CAPÍTULO II: Morfogênese *in vitro* de explantes hipo e epicotiledonares de *Dalbergia nigra*, induzidos por combinações citocinínicas.....48

Figura 1. Esquema evidenciando ramo com frutos de *D. nigra* (a), semente (b), germinação *in vitro* em meio WPM com formação de plântula normal (c), secção de explantes (segmentos hipocotiledonares (d, e) e epicotiledonares (e, f).....52

Figura 2. Morfogênese *in vitro* de explantes juvenis de *D. nigra* após tratamentos com combinações entre BAP e TDZ, (a) número de brotações, (b) comprimento de brotos (cm), (c) número de folhas e (d) massa seca de brotos (mg).....53

Figura 3. Morfogênese *in vitro* de explantes juvenis de *D. nigra* após tratamentos com combinações entre BAP e TDZ, (a) diâmetro de calos (mm), (b) número de raiz, (c) comprimento de raiz (cm) e (d) massa seca de raiz (mg).....56

Figura 4. Correlação de Pearson entre as variáveis morfológicas: número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB), número de folhas (NF), massa seca de brotos (MSB), diâmetro de calos (DC), número de raiz (NR), comprimento de raiz (CR) e massa seca de raiz (MSR).....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 O gênero <i>Dalbergia</i> e da espécie <i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth	16
3.2 Cultura tecidos vegetais.....	19
3.2.1 A técnica	19
3.2.2. Organogênese no gênero <i>Dalbergia</i>	20
3.3 Bioquímica de sementes	18
4. REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO I: Qualidade fisiológica e bioquímica em sementes de <i>Dalbergia nigra</i> sob estresse térmico <i>in vitro</i>	28
RESUMO	28
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	33
4. CONCLUSÕES	41
5. REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO II: Morfogênese <i>in vitro</i> de explantes hipo e epicotiledonares de <i>Dalbergia nigra</i> , induzidos por combinações citocinínicas.....	48
RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth é conhecida popularmente como jacarandá da Bahia e pertence à família Leguminosae-Fabaceae. Apresenta ocorrência natural no hotspot da biodiversidade Floresta Atlântica, podendo ser encontrada desde o Sudeste do Brasil até os estados do Nordeste (PAULA; ALVES, 1997; LORENZI, 2016). Sua madeira é muito apreciada na fabricação de móveis de luxo e construções civis, fatores que a inseriram na Lista Oficial da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, devido a sua acentuada exploração (ROLIM; CHIARELLO, 2004; MARTINELLI; MORAES, 2013; MMA, 2014; LORENZI, 2016).

Um das formas de propagação em massa desta espécie é pelo cultivo *in vitro*, fundamentada no princípio da totipotência celular, e consiste no cultivo de tecidos, órgãos ou células em meio nutritivo sob condições assépticas e ambiente controlado. Diversas são as vantagens de seu uso, tais como, produção em massa de plantas em um curto período de tempo, sendo essa de grande interesse para espécies ameaçadas de extinção e de difícil propagação via sementes, possibilitando também a produção de plantas livres de doenças (LINEBERGER, 1981; SARASAN et al., 2006).

O crescimento e a morfogênese via organogênese direta ou indireta *in vitro* depende da interação entre as substâncias de crescimento, que ocorrem de forma natural (hormônios) ou sintética (fitorreguladores), sendo elas do grupo das auxinas e citocininas. As citocininas atuam na divisão celular, formação de gemas adventícias e estimulam as brotações laterais, enquanto as auxinas atuam na formação de raízes, crescimento e alongamento celular (GEORGE, 1996; TAIZ et al., 2017). Além disso, o balanço entre esses dois fitorreguladores atua na diferenciação celular, através da formação de massas de calos que na indução suas células se tornam competentes e determinadas a formar parte aérea e raiz (SKOOG; MILLER, 1957; ALVES et al., 2004).

Dentre as técnicas de propagação *in vitro*, a germinação permite o fornecimento de explantes juvenis para a organogênese (SILVA et al., 2017). Contudo se faz necessário a utilização de lotes de sementes de alta qualidade, visando à produção de plântulas normais.

As condições climáticas vêm sofrendo alterações como aumento de temperatura, isto em função da ação antrópica por meio das mudanças na paisagem natural, tais como, desmatamentos, poluição atmosférica, que causam danos irreversíveis no clima local e global (LIIRA et al., 2007; CAVIEDES; IBARRA, 2017). O estresse térmico pode levar a deterioração de sementes, promovendo a diminuição do vigor e a perda da capacidade germinativa, e conseqüentemente na liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam danificando o material genético e causando mudanças na estrutura celular (EBONE et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Além da diminuição da capacidade de germinação das sementes, as mudas podem sofrer anormalidades e podem apresentar baixo pegamento na fase de estabelecimento em campo (TEIMORI et al., 2019).

A germinação ocorre dentro de uma faixa de temperatura máxima, mínima, ótima e abaixo ou acima da qual não irá ocorrer a germinação, e isto irá variar de acordo com a espécie (DÜRR et al., 2015). Sementes expostas a estresses térmicos podem apresentar alterações bioquímicas e fisiológicas, aumento das taxas respiratórias, condutividade elétrica e atividade de enzimas peroxidases (SILVA et al., 2020). Os efeitos deletérios causados por altas temperaturas e umidade estão associados a danos nas membranas, nos níveis proteicos, rápido consumo de reservas durante a germinação, degradação de lipídeos levando a peroxidação lipídica (FUJIKURA; KARSSSEN, 1995; SILVA et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as características fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Dalbergia nigra* sob estresse térmico *in vitro*, bem como a sua morfogênese utilizando diferentes explantes sob combinações citocinínicas.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o potencial germinativo e o vigor de sementes *D. nigra* sob estresse térmico *in vitro*.

- Estudar a qualidade de mudas de *D. nigra* provenientes de sementes sob estresse térmico.
- Estudar o comportamento bioquímico de sementes de *D. nigra* sob estresse térmico.
- Estudar diferentes tipos de explantes na morfogênese *in vitro* de *D. nigra*.
- Estudar a resposta a resposta de explantes *D. nigra* ao uso de combinações citocinínicas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Dalbergia* e a espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth

O gênero *Dalbergia* pertencente à família Leguminosae-Fabaceae, apresenta cerca de 100 espécies de árvores, arbustos e lianas, dentre as quais no Brasil ocorre a presença de 40 espécies deste gênero, sendo sua maior ocorrência distribuída em vegetações de Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica (LORENZI, 2016). Nesse gênero encontram-se espécies de importância econômica, devido ao uso da madeira para diversos fins, como a *Dalbergia cearensis* Ducke uma espécie característica da caatinga do Nordeste brasileiro, conhecida como jacarandá-violeta (CARVALHO, 2003). Para outros fins como extração de óleos voláteis Mendes et al. (2012) relatam que foram encontrados 60 compostos voláteis destacando-se: linalol, β -damascenona, α -ionona, geranil-acetona e β -ionona como sendo característicos da espécie *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (jacarandá branco) e, identificaram que o rendimento de óleo volátil é influenciado pelas condições ambientais, evidenciando um comportamento diretamente proporcional à temperatura e nebulosidade e inversamente proporcional à precipitação.

A espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth, popularmente conhecida como jacarandá da Bahia, apresenta maior ocorrência nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (LORENZI, 2016). Conhecida a mais de trezentos anos por apresentar madeira de alta qualidade, considerada como nobre, muito procurada para móveis de luxo, fabricação de pianos, acabamentos internos na construção civil, como molduras, portas (CARVALHO, 2003). Sua folhagem delicada e a forma aberta de sua copa apresenta grande potencial ornamental (LORENZI,

2016). É uma arbórea recomendada para recuperação de áreas degradadas e arborização de pastagens, pois apresenta boa adaptabilidade a solos com baixa fertilidade e baixo teor de alumínio, pH superior a 5,2, solos profundos, boa drenagem (CARVALHO, 2003; GONÇALVES et al., 2014).

Possui flores perfumadas, melífera, com produção de néctar e pólen (CARVALHO, 2003). O fruto é um legume do tipo samaróide, indeiscente, seco, com coloração marrom escura, superfície rugosa e brilhosa, com formato oblongo, bordos inteiros e levemente curvados, o ápice é acuminado com uma ou duas sementes por fruto (BRAZ et al., 2009). A germinação desta espécie *ex vitro* é caracterizada como fanerocotiledonar e inicia-se após três dias da semeadura sob condições ideais em laboratório, obtendo aproximadamente 80% de germinação após 15 dias. Apresenta radícula de cor marrom clara, ligeiramente curvada e o hipocótilo apresenta cor verde-clara e forma cilíndrica. Os cotilédones são carnosos, opostos, com uma nervura principal bem visível, com forma ovada. O epicótilo é cilíndrico, de cor verde-clara. Os eófilos são compostos, opostos, imparipinados, alternos, com estípulas interpeciolares. Os folíolos possuem formas obovadas, alternos com base obtusa, margem inteira e ápice obtuso (BRAZ et al., 2009).

Sua floração ocorre de acordo com o local em que está inserida, sendo: em Minas Gerais, de setembro a novembro; no Espírito Santo, de outubro a maio; na Bahia, de outubro a novembro e em São Paulo, de novembro a janeiro. O período de frutificação também é variável, se estendendo de maio a outubro, no Espírito Santo; de agosto a janeiro, em São Paulo; de setembro a dezembro, em Minas Gerais, e em dezembro, na Bahia (CARVALHO, 2003).

Suas sementes apresentam suscetibilidade ao ataque das larvas do Curculionidae *Troezon champion* que se criam nas sementes dessa espécie, depositando seus ovos nas sementes e posteriormente essas são consumidas pelas larvas (CARVALHO, 2003).

Com a intensa exploração de sua madeira no decorrer dos anos, devido seu alto valor econômico, a *Dalbergia nigra* encontra-se na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2014) e é classificada, pela Lista Vermelha da Flora do Brasil como vulnerável com avaliação de distribuição nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo, apresentando como justificativa, o seu alto valor econômico, sendo

considerada a melhor madeira do Brasil para construção civil e fabricação de móveis finos. Apesar de ampla distribuição é considerada rara em floresta primária, e devido a intensa exploração no passado, estima-se que 30% da população da espécie tenham sido perdidos (CNCFLORA, 2013).

3.2 Bioquímica de sementes

Os compostos químicos em sementes (carboidratos, proteínas e lipídeos) são as principais fontes de energia para o embrião, e atuam como substrato para estruturas celulares. A quantidade e a mobilização de reservas são variáveis de espécie para espécie e influenciam diretamente no seu vigor (BUCKERIDGE et al., 2000; BUCKERIDGE et al., 2004; CORTE et al., 2006; BEWLEY et al., 2013). O vigor pode ser definido como a quantidade de energia que a semente possui para realizar atividades metabólicas e quebra de compostos no seu interior que resultam na sua germinação, podendo sofrer influência de fatores genéticos, condições climáticas e de armazenamento (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

O estresse térmico, seja por temperaturas acima ou abaixo da ideal, interfere em diversas reações bioquímicas, que regulam os processos metabólicos, além de influenciar na absorção de água pela semente (BEWLEY et al., 2013). Matos et al. (2015), analisando sementes de *Dalbergia nigra*, obtiveram 92% de germinação sob temperatura de 25 °C, e concluíram que essa era a temperatura ideal para a germinação da espécie.

O carboidrato está entre uma das principais substâncias de reserva na semente e tem como principal função o fornecimento de energia ao embrião para seu desenvolvimento durante a germinação. Esse composto está intimamente ligado à armazenabilidade da semente, visto que contribui para o estado vítreo dos espaços intercelulares e conseqüentemente minimiza os efeitos do envelhecimento (LEHNER et al., 2008). Os oligossacarídeos da série rafinose (rafinose, estaquiose, verbascose, ajugose) atuam na defesa da semente a estresses abióticos e estão associados à tolerância contra a dessecação do embrião (SENGUPTA et al., 2015; VIDIGAL et al., 2016).

As proteínas têm duas funções essenciais nas sementes: como substância de reserva e como catálise de reações químicas. Sementes sob estresse ou já em processo de deterioração apresentam decréscimo no teor e na síntese proteica, já que o calor em altas temperaturas acelera a sua desnaturação, o que leva a perda da capacidade de desempenhar diversas funções no interior da semente (MARCOS FILHO, 2015). Durante o processo germinativo nas primeiras horas de embebição, o primeiro evento bioquímico que ocorre nas sementes sob estresse, seja ele térmico ou hídrico é o dano na síntese de proteínas (ABDUL-BAKI, 1980).

Os ácidos graxos, unidade básica dos lipídios, é uma molécula orgânica com alto potencial de liberação de energia na sua oxidação (SOMERVILLE et al., 2000). O dano da oxidação causado por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) são as principais causas de deterioração das sementes. A peroxidação lipídica induz a formação de malonodialdeído (MDA) e promove desequilíbrios fisiológicos nas sementes e conseqüentemente a lixiviação de eletrólitos das membranas. O aumento da concentração de ROS induz os ácidos graxos insaturados de cadeia longa a se decomporem em cadeias menores, acarretando a modificação e perda de integridade das membranas (OENEL et al., 2017; EBONE et al., 2019; ZHANG et al., 2021).

Os compostos fenólicos apresentam funções variadas na planta, podendo atuar na proteção contra patógenos/doenças, predadores, plantas competidoras ou estresses por temperatura, água e luz UV (ARIMURA; MAFFEI, 2016; MAEDA, 2019). Nas sementes os fenóis, a exemplo dos flavonóis, exercem um papel crucial na sua proteção a estresses bióticos e abióticos e no desenvolvimento e germinação. Esses compostos atuam extinguindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros radicais livres através do seu sequestro e neutralização (KUMAR; PANDEY, 2013; NAKABAYASHI et al., 2014).

3.3 Cultura tecidos vegetais

3.3.1 A técnica

A cultura de tecidos vegetais é o termo utilizada para designar todas as técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos, em condições assépticas e em ambiente controlado. Esta tem como fundamento a totipotencialidade celular, que consiste na capacidade de uma única célula vegetal sob estímulos apropriados formar um novo

indivíduo multicelular (TORRES et al., 1998; TERMIGNONI, 2005). A indução morfogênica necessita da obtenção de explantes livres de contaminação, na qual o estabelecimento de explantes é fundamental e a semente é utilizada como fonte de obtenção de explantes juvenis, sendo que a germinação *in vitro* permite reproduzir grande número de mudas de alta qualidade e com tempo reduzido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SILVA et al., 2017).

O cultivo *in vitro* pode ser dividido em duas vias, a organogênese e a embriogênese somática. A organogênese consiste na formação de raiz e/ou brotos pela indução com reguladores de crescimento, à diferenciação a partir do explante inicial. Esta pode ser dividida em direta e indireta, em que a direta o explante é induzido e há o desenvolvimento direto sem a formação de calos (massa de células com crescimento desordenado) nos tecidos, enquanto a indireta, primeiro ocorre o crescimento de calos e posteriormente a formação e desenvolvimento de brotos e/ou raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PERES, 2002; ALVES et al., 2004; LUCIANI et al., 2006).

A embriogênese somática pode ser explicada pela formação e desenvolvimento de embriões sem que ocorra a fusão de gametas feminino e masculino. Esta também pode ser dividida em direta e indireta, sendo que na direta há a formação de embriões somáticos diretamente das células, e na indireta ocorre a crescimento de calos anteriormente e posterior desenvolvimento de embriões (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PAIS et al., 2019).

3.2.2. Organogênese no gênero *Dalbergia*

As sementes de *Dalbergia nigra* sofrem ataque de larvas do broqueador *Troezon champion* e isso pode se tornar um empecilho na sua propagação seminífera (SANTOS et al., 1992). A propagação vegetativa através da técnica do cultivo *in vitro* permite a produção em massa em condições assépticas, sendo uma boa alternativa para espécies de elevado interesse econômico e em risco de extinção. Segmentos nodais de *Dalbergia latifolia* Roxb. foram submetidos a indução de calos para propagação assexual em massa de árvores de jacarandá elite tendo em vista a baixa viabilidade das sementes. Foram testadas várias combinações de reguladores de crescimento, em que as mais satisfatórias na indução de brotações axilares foram

BAP ($0,1-5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e ANA ou AIA ($0,01-0,5 \text{ mg L}^{-1}$), entretanto, em algumas combinações houve 80-100% de brotação e, consistentemente sendo o meio MSI (MS força total suplementado com BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) + ANA ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) + glutamina (750 mg L^{-1}) + 14% de sacarose) o mais adequado apresentando 100% de brotação (SWAMY et al., 1992).

Outras fontes de explante são utilizadas para a organogênese indireta, como os foliares e radiculares de *Dalbergia nigra*, no qual todos os tratamentos utilizando os folíolos em meio WPM apresentaram calos mononodular, destacando-se a utilização das concentrações de 5 e 10 μM de 2,4-D combinadas com 10 μM de BAP na qual formaram 90% de calos mononodular. No entanto, quando os explantes folíolos foram subcultivados em meio MS nas concentrações 1 e 10 μM de AIA combinado com 10 μM de BAP houve 80 e 100% de calos mononodular. Este tipo de calo é antecessor a organogênese indireta de *Dalbergia nigra* (SARTOR et al., 2014).

Em segmentos de epicótilo de plântulas de *Dalbergia nigra*, utilizando tecido jovem, sem lignificação, mais propensos a desdiferenciação celular, verificaram que utilizando a combinação 0,009 μM de ANA e 2,5 μM de TDZ houve maior porcentagem de formação de calos (59,82%) e maior porcentagem de área do explante coberto por calo (76,79%) (DAVIS, 2017). No entanto, após 45 dias em meio de regeneração, sob as concentrações 1,1 μM de BAP e 0,68 μM de ANA; e 2,46 μM de BAP e 0,04 μM de ANA apresentaram maior porcentagem de calos com formação de gemas com 78,57%, em ambos. Apesar da alta formação de gemas, a regeneração de brotos foi baixa apresentando um broto por calo, enquanto os explantes que foram submetidos à combinação 0,009 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ na fase de formação de gemas, apresentaram menor porcentagem (60,71% e 64,29%, respectivamente) de calos. Contudo, houve maior regeneração de brotos apresentando quatro e sete brotos nas concentrações testadas para a regeneração de brotos.

A presença de BAP (8,88 μM) no meio de cultura foi benéfica à formação calogênica em *Dalbergia nigra*, no entanto a maioria dos calos apresentava-se compactos, o que inviabiliza a organogênese indireta (SANTOS, 2019). Quando se utilizou AIB foi possível obter um bom enraizamento nas concentrações de 4,92 e 9,84 μM sendo que na última foi possível obter crescimento radicular sem prejudicar de forma severa o desenvolvimento de brotações.

4. REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigor. **HortScience**, v.15, n. 6, p. 765-771, 1980.
- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- ARIMURA, G. I.; MAFFEI, M. (Ed.). **Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions**. CRC press, 2016.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer, New York. 2013. 408 p.
- BRAZ, M. S. S. et al. Morphologic characterization of fruits, seeds and seedlings of Jacaranda Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth) Leguminosae-Papilionoideae. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 67-71, 2009.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. **Mobilização de reservas**. In: FERREIRA, A. G; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicada. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, função e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. especial, p. 137-162, 2000.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5ed. Jaboticabal: Funep, 2012, 590 p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 1, 2003.1039 p.

CAVIEDES, J.; IBARRA, J. T. Influence of anthropogenic disturbances on stand structural complexity in Andean temperate forests: implications for managing key habitat for biodiversity. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169450, 2017.

CNCFlora. **Centro Nacional de Conservação da Flora**, 2013. Disponível em: www.cncflora.jbrj.gov.br. Acesso em: 01 de fevereiro de 2021.

CORTE, V. B. et al. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 941-949, 2006.

DAVIS, A. C. S. **Indução da organogênese a partir de segmentos de epicótilo de jacarandá-da-bahia**. 2017. 40f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal). UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, Seropédica, RJ, 2017.

VIDIGAL, D. S. et al. Galactinol as marker for seed longevity. **Plant Science**, v. 246, p. 112-118, 2016.

DÜRR, C. et al. Ranges of critical temperature and water potential values for the germination of species worldwide: contribution to a seed trait database. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 200, p. 222-232, 2015.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 145, p. 34-42, 2019.

FUJIKURA, Y.; KARSSSEN, C. M. Molecular studies on osmoprimed seeds of cauliflower: a partial amino acid sequence of a vigour-related protein and osmopriming-enhanced expression of putative aspartic protease. **Seed Science Research**, v. 5, n. 3, p. 177-181, 1995.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - The technology. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GONCALVES, E. O. et al. Crescimento de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr. All. ex Benth)) sob diferentes doses de NPK. **Cerne**, v. 20, n. 3, p. 493-500, 2014.

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

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, ID 162750, p. 1-16, 2013.

LEHNER, A. et al. Alterações em carboidratos solúveis, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes no embrião durante o envelhecimento em grãos de trigo. **Journal Cereal Science**, v. 47, p. 555-565, 2008.

LIIRA, J.; SEPP, T.; PARREST, O. The forest structure and ecosystem quality in conditions of anthropogenic disturbance along productivity gradient. **Forest Ecology and Management**, v. 250, n. 1-2, p. 34-46, 2007.

LINEBERGER, R. D. The many dimensions of plant tissue culture research. **Texas A&M University, College Station, TX**, v. 77843, p. 14-15, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 7. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, v. 1, 2016, 384 p.

LUCIANI, G. F. et al. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 87, n. 2, p. 139-143, 2006.

MAEDA, H. A. Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 881-889, 2019.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2015, 560p.

MARINI, P. M. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 722-730, 2012.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 2013. 749-818 pp.

MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. de L. e; SILVA, L. J. da. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 115-125, 2015.

MENDES, C. E. et al. Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1787-1793, 2012.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial da flora brasileira ameaçada de extinção**, 2014. < <http://www.ibama.gov.br/flora>>.

NAKABAYASHI, R. et al. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. **The Plant Journal**, v. 77, n. 3, p. 367-379, 2014.

OENEL, A. et al. Enzymatic and non-enzymatic mechanisms contribute to lipid oxidation during seed aging. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 5, p. 925-933, 2017.

PAIS, M. S. Somatic embryogenesis induction in woody species: The future after OMICs data assessment. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1 p. 240-258, 2019.

PAULA, J. E.; ALVES, J. L. H. **Madeiras nativas**: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção, uso. Fundação Mokiti Okada, Brasília, 1997, 541 pp.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 44-48, 2002.

ROLIM, S. G.; CHIARELLO, A. G. Slow death of Atlantic forest trees in cocoa agroforestry in southeastern Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 13, n. 14, p. 2679-2694, 2004.

SANTOS, G. P. N et al. Danos por *Troezon championi* Lima, 1935 (Coleoptera: Curculionidae), em sementes de jacarandá caviúna (*Dalbergia nigra*) (Leguminosae). **Científica**, v. 20, p. 157-163, 1992.

SANTOS, M. S. **Germinação e morfogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.** 2019. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Espírito Santo, ES, 2019.

SARASAN, V. et al. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 3, p. 206-214, 2006.

SARTOR, F. R. et al. Morfogênese *in vitro* em explantes foliares e radiculares de Jacarandá da Bahia. **Agrotecnologia**, v. 5, n. 2, p. 82-93, 2014.

SENGUPTA, S. et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 656-667, 2015.

SILVA, G. P. et al. Biochemical and physiological changes in *Dipteryx alata* Vog. seeds during germination and accelerated aging. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 84-92, 2020.

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

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues culture *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-140, 1957.

SOMERVILLE, C. et al. **Biochemistry and molecular biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. p. 456-527, 2000.

SWAMY, B. V. R.; HIMABINDU, K.; SITA, G. L. *In vitro* micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 3, p. 126-131, 1992.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TEIMORI, H. et al. Effect of seed aging and water potential on seed germination and biochemical indices of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) at different temperatures. **Iranian Journal of Seed Research**, v. 5, n. 2, p. 105-128, 2019.

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

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977, p. 224 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, Embrapa-CNPQ, v.1, 1998. 509 p.

ZHANG, K. et al. Deterioration of orthodox seeds during ageing: influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p.475-485, 2021.

CAPÍTULO I: Qualidade fisiológica e bioquímica em sementes de *Dalbergia nigra* sob estresse térmico *in vitro*

RESUMO

O jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth) é uma árvore endêmica de um hotspot de biodiversidade Neotropical e de grande interesse ecológico e econômico. Diante da ameaça de extinção devido à superexploração da madeira e às mudanças climáticas, com o presente estudo objetivou-se analisar a qualidade fisiológica e bioquímica de sementes de *D. nigra* submetidas a estresse térmico *in vitro*. As sementes foram semeadas em tubo de ensaio contendo meio WPM, mantidas em demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 45 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo posteriormente mantidas por 30 dias em BOD regulada à 25 °C. As análises fisiológicas de umidade, condutividade elétrica, germinação (%), índice de velocidade de germinação, plântulas normais e anormais (%), comprimento de parte aérea, comprimento da raiz, comprimento do hipocótilo, diâmetro do coleto, massa seca de parte aérea e raiz e índice de qualidade de Dickson resultaram em queda na germinação e vigor com as horas de estresse térmico, apresentando decréscimo de 95 para 0%, com 0 e 96 horas respectivamente. Houve redução no conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas. O vigor e a qualidade das mudas são influenciados negativamente pela exposição ao estresse térmico a 45 °C.

Palavras-chave: estresse abiótico; germinação *in vitro*; jacarandá da Bahia; cultura de tecidos.

ABSTRACT

The jacaranda from Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth) is an endemic tree of a Neotropical biodiversity hotspot and of great ecological and economic interest. Faced with the threat of extinction due to overexploitation of wood and climate change, the present study aimed to analyze the physiological and biochemical quality of *D. nigra* seeds subjected to heat stress *in vitro*. The seeds were sown in a test tube containing WPM medium, maintained in biochemical oxygen demand (BOD) at 45 °C for 0, 24, 48, 72 and 96 h, and subsequently kept for 30 days

in BOD regulated at 25 °C . Physiological analyzes of humidity, electrical conductivity, germination (%), germination speed index, normal and abnormal seedlings (%), shoot length, root length, hypocotyl length, collar diameter, shoot dry mass and Dickson's root and quality index resulted in a drop in germination and vigor with the hours of thermal stress, showing a decrease from 95 to 0%, with 0 and 96 hours respectively. Along with this result, there was a reduction in the content of carbohydrates, lipids and proteins. Therefore, the vigor and quality of the seedlings are negatively influenced by exposure to thermal stress at 45 °C.

Keywords: abiotic stress, *in vitro* germination, jacaranda of Bahia, tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

A intensa exploração madeireira de espécies nativas aliada à falta de plantios pode levar ao risco de extinção. A espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth possui madeira de alta qualidade para a construção de móveis de luxo e instrumentos musicais, que devido a sua exploração, o seu comércio está proibido desde a década de 1990 e está listada como vulnerável à extinção desde 1998 (RIBEIRO et al., 2005; CITES, 2008; IUCN, 2013; BRASIL, 2014; BRANDES et al., 2020). É endêmica da Floresta Atlântica, um hotspot neotropical, e conhecida popularmente como jacarandá da Bahia ou jacarandá caviúna (LORENZI, 2016).

A sua propagação ocorre principalmente via seminífera, sendo afetada negativamente pela quantidade e qualidade de sementes viáveis obtidas, devido à severidade do ataque do besouro broqueador *Troezon championi* (Lima) (SANTOS et al., 1992). A germinação de *D. nigra* é do tipo faneroepigeal, os cotilédones apresentam função de reserva e sofrem rápida abscisão do hipocótilo (ANDRADE et al., 2006), apresentando aproximadamente 92% de germinação durante o período de 10 dias, e para a obtenção do padrão trifásico de embebição nesta temperatura, foram necessárias 24 horas para a fase I, 108 h para a fase II e, 132 h, para as sementes atingirem a fase III (MATOS et al., 2015).

Fatores abióticos podem afetar a qualidade fisiológica das sementes, incluindo as alterações climáticas e toda a problemática de aumento de temperatura. Isso pode alterar o comportamento da germinação de espécies no ambiente natural, o que torna de extrema importância estudos envolvendo os efeitos do estresse térmico na

germinação de sementes, sobretudo, em espécies que estão em risco de extinção. Portanto, o cultivo *in vitro* auxilia na multiplicação e resgate de material vegetal de espécies que se encontram em risco de extinção e de difícil propagação (SARASAN et al., 2006). Mudanças desta espécie podem ser utilizadas para a recuperação de áreas degradadas, pois apresentam alta regeneração e boa adaptabilidade a terrenos de baixa fertilidade (CARVALHO, 2003). No entanto, essas áreas são caracterizadas por algum grau de perturbação a sua integridade seja física, química ou biológica, assim, pode haver alterações na temperatura do solo e do ambiente, e desta forma, afetar a germinação de espécies que apresentam distribuição natural.

A temperatura afeta a qualidade fisiológica da maioria das sementes, incluindo as de *D. nigra*, influenciando diretamente a germinação, acelerando ou desacelerando o metabolismo da semente, e até inibindo processos enzimáticos (MATOS et al., 2015). Também pode influenciar a taxa de embebição, alterando a velocidade das reações químicas que promovem a mobilização de reservas e a síntese de compostos necessários ao crescimento das mudas (BEWLEY et al., 2013).

O estudo da bioquímica das sementes permite obter informações importantes sobre a fisiologia e seu vigor (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Durante os processos germinativos os carboidratos, lipídios e proteínas são mobilizados para a produção de energia e formação de novas células e tecidos. Após o catabolismo, os lipídios e proteínas têm como produto final os ácidos graxos e aminoácidos, respectivamente, enquanto os carboidratos e amido são convertidos em açúcares menores, como maltose, glicose e sacarose. A mobilização de reservas pode variar de acordo com o regime térmico (BEWLEY et al., 2013; TESFAY et al., 2016; SILVA et al., 2020).

Para entender o desempenho das plantas sob condições de estresse térmico, é necessário investigar suas respostas a temperaturas acima da faixa ideal, que em sementes de *Dalbergia nigra* é 25 °C (MATOS et al., 2015). Desta forma, objetivou-se analisar a qualidade fisiológica e bioquímica de sementes de *D. nigra* submetidas a estresse térmico *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de *Dalbergia nigra* provenientes de árvores matrizes produtoras de sementes (20°46'14"S, 42°51'40"W), situadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, adquiridas via Sociedade de Investigações Florestais (SIF), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As sementes foram mantidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, em ambiente com temperatura e umidade controladas de 4 °C e 8,30%, respectivamente, até o início do experimento. As sementes foram lavadas com solução de detergente neutro, e em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas com álcool 70% (Audax®) por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) (Qboa®) 2,5% por 15 minutos, e tríplice lavagem em água destilada autoclavada após cada etapa. Posteriormente, foram semeadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura autoclavado, composto por 2,41 g L⁻¹ WPM - Woody Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,7 ± 0,2. Os tubos foram vedados com filme plástico do tipo PVC e mantidos em câmaras de germinação do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Eletrolab®) regulada a 45 °C, fotoperíodo 8/16 h e irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹ por meio de lâmpada LED (Empalux®) separados em três lotes contendo quatro repetições de 10 sementes, que foram tratadas por diferentes horas de estresse térmico à 45 °C (0; 24; 48; 72 e 96 h). Antes e após cada período de estresse as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água pelo método da estufa a 105 ± 3 °C até peso constante, com resultados expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

As sementes do primeiro lote foram retiradas dos tubos, pesadas em balança de precisão (0,0001 g), colocadas em copos plásticos contendo 50 mL de água destilada e mantidas durante 24 horas a uma temperatura de 25 °C. Posteriormente, procedeu-se a leitura da condutividade elétrica (CE) em condutivímetro GEHAKA® (CG2000), sendo os valores expressos em μS cm⁻¹ g⁻¹ de semente.

As sementes do segundo lote foram mantidas em tubos na BOD regulada a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro. As variáveis analisadas foram: porcentagem de germinação (sendo diariamente computada, sementes com protrusão da raiz primária igual ou maior que 2 mm sendo contada até 30º dia); o índice de velocidade

de germinação foi determinado juntamente com a germinação. O IVG foi calculado somando o número de sementes germinadas no dia, dividido pelo número de dias entre a semeadura e a germinação (IVG; MAGUIRE, 1962); plântulas normais e anormais (%; BRASIL, 2009), onde a porcentagem de mudas normais foi calculada considerando mudas com todas as estruturas formadas (raiz, hipocótilo e cotilédones); comprimento da parte aérea, raiz e hipocótilo (cm); diâmetro do coleto (mm), com paquímetro digital; massa seca da parte aérea e da raiz (mg) em estufa a 70 °C até massa constante; e índice de qualidade de Dickson (IQD; DICKSON et al., 1960). O terceiro lote foi usado para extração e análises bioquímicas. As sementes foram secas em estufa a 45 °C por 48 h, trituradas e analisadas usando 0,250 g de amostra por repetição. As variáveis analisadas foram: carboidratos totais (%), lipídios totais (%), fenóis totais (%), proteínas totais (%), amido (%) e fibras (%). A extração foi adaptada de Bligh; Dyer (1959) utilizando etanol (98; 80 e 50%), clorofórmio e água, resultando em uma fase sólida e duas fases líquidas.

Os carboidratos solúveis totais foram quantificados pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), baseando-se em uma curva padrão de glicose. Da fase hidrofítica, 10 µL foram adicionados em microtubo contendo 490 µL de etanol 80% e 1000 µL de antrona 0,2%, incubados a 90 °C por 10 min e as leituras feitas em espectrofotômetro a 620 nm, utilizando-se três replicatas. Os lipídios totais foram determinados pelo método gravimétrico, utilizando-se a fase hidrofóbica (BLIGH; DYER, 1959), que foi transferida para microtubos, evaporada e estufa de convecção a 60 °C até peso constante (48 h) e determinados em balança analítica (0.0001 g), com três replicatas. A determinação dos fenóis solúveis totais foi realizada pelo método de Folin Ciocalteu 10%, com modificações (SWAIN; HILLS, 1959) e a concentração de fenóis totais foi determinada através da curva usando ácido tânico como padrão (SWAIN; HILLS, 1959). Para isso, 10 µL do extrato de fase hidrofílica, 190 µL de etanol 80%, 800 µL de carbonato de sódio 4% e 1000 µL do reagente Folin-Ciocalteu foram adicionados em um microtubo. Após 30 minutos no escuro, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 760 nm. As proteínas totais foram extraídas do pellet resultante da extração, utilizando o reagente KOH 0,2 M e posteriormente incubado a 80 °C por uma hora e meia, seguido de centrifugação à 10.000 rpm durante 10 min, resultando no extrato de proteínas. A quantificação foi mediante a curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) e as leituras foram

feitas em espectrofotômetro à 595 nm (BRADFORD, 1976; WANI et al., 2008). O pellet resultante da extração das proteínas foi digerido com a HCl 3%, incubado a 75 °C por 3 horas e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, para a determinação da concentração de amido, que foi realizada pelo método antrônico, no sobrenadante retirado. A quantificação do amido foi feita pelo método de McCready et al. (1950) e a leitura das amostras feita, em espectrofotômetro no comprimento de ondas de 620 nm. O pellet resultante da extração do amido foi seco em estufa a 60 °C até peso constante, e posteriormente a massa seca foi determinada em balança analítica (0.0001 g) para determinação da concentração das fibras.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos (0; 24; 48; 72 e 96 h) e quatro repetições de 10 sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância, regressão e correlação de Pearson, utilizando-se o software estatístico R (R CORE TEAM, 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento do número de horas de estresse térmico (45 °C) resultou em uma maior umidade e condutividade elétrica (CE) nas sementes de *D. nigra* (Figura 1). Na ausência de estresse térmico (0 h), as sementes de *D. nigra* apresentaram umidade de 7,60%, que aumentou linearmente para 45,27% após 96 h (Figura 1a). O tempo resultou em um aumento na CE (Figura 1b). A liberação de íons e metabólitos durante o período inicial de embebição das sementes é indicativa de uma perda da integridade da membrana celular, resultando na diminuição ou perda da viabilidade das sementes (QIN et al., 2011; BEWLEY et al., 2013). Em *Triticum aestivum* L., as sementes expostas a temperaturas de 40; 45; 50; 55 e 60 °C e 90% de umidade relativa por 0; 2; 4; 6 e 8 d, exibiram aumento de CE e taxa de germinação reduzida (QIN et al., 2011).

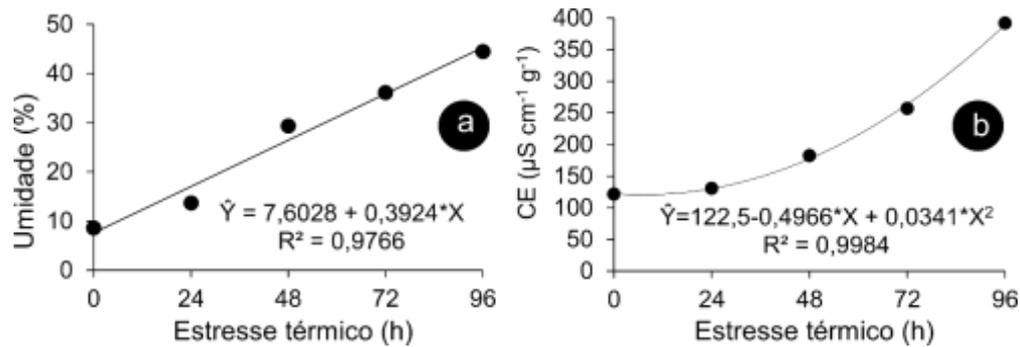


Figura 1. Umidade e condutividade elétrica em sementes de *Dalbergia nigra in vitro* sob estresse térmico à 45 °C. (a) umidade; (b) condutividade elétrica (CE) ($p < 0,05$).

Fonte: a autora.

Temperaturas mais elevadas favorecem o aumento do teor de umidade devido à maior atividade metabólica e microbiana, que provoca rápida deterioração bioquímica e fisiológica das sementes e prejudica a germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; OLIVEIRA et al., 2020). Nesse trabalho, a temperatura elevada e a umidade relativa podem ter contribuído para o aumento da atividade respiratória e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Isso, por sua vez, pode ter desencadeado reações não enzimáticas, como a peroxidação lipídica, e reduzindo a atividade de enzimas de remoção de peróxidos, como superóxido dismutase, catalase e peroxidases. No geral, isso pode diminuir a germinação, a viabilidade da semente e o vigor (QIN et al., 2011; SILVA et al., 2020). O aumento da peroxidação lipídica, mediado por radicais livres e peróxidos, tem sido sugerido como uma possível razão para a perda de viabilidade em sementes de *Melanoxylon brauna* embebidas a 45 °C (SANTOS et al., 2017). Além disso, a perda da atividade enzimática devido ao ataque radical, aumento na peroxidação lipídica e produção reduzida de proteínas solúveis promovem a degradação celular e dos tecidos e comprometem a viabilidade da semente (HSU et al., 2003).

As mudanças acima foram acompanhadas por uma queda drástica na germinação e no IVG, até a morte das sementes (Figuras 2a, b). Sementes controle não submetidas ao estresse térmico apresentaram máxima germinação, vigor, alta porcentagem de plântulas normais (99,7%) e apenas 0,93% de plântulas anormais (Figuras 2a-d). Com o aumento das horas de estresse térmico, a germinação das sementes foi significativamente afetada, diminuindo em 23,10% quando as sementes foram mantidas por 24 h a 45 °C e 50% após 48 h. O estresse térmico a 45 °C por 48

h reduziu a porcentagem de plântulas normais para 63,21% e aumentou a de mudas anormais para 36,79%. Com 96 horas de estresse por temperatura, as sementes morreram e, portanto, não foram convertidas em plântulas normais e anormais (Figuras 2a, c, d).

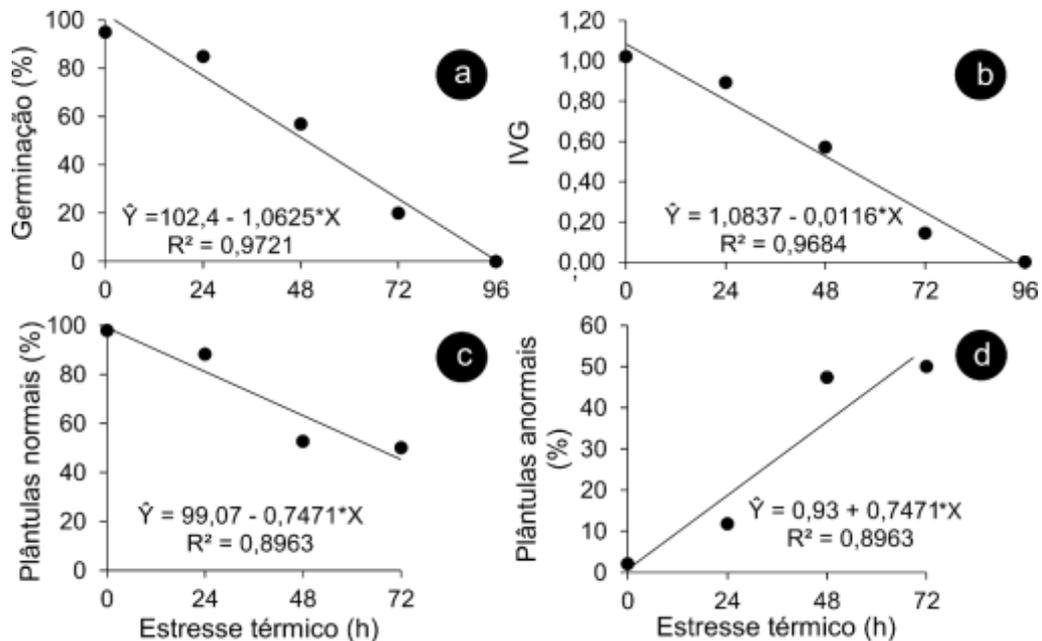


Figura 2. Germinação e viabilidade de sementes de *Dalbergia nigra in vitro* submetidas a estresse térmico a 45 °C. (a) germinação (%); (b) índice de velocidade de germinação (IVG); (c) plântulas normais (%); (d) plântulas anormais (%) ($p < 0,05$). Fonte: a autora.

Os resultados obtidos de porcentagem de plântulas normais e anormais diferem do encontrado por Matos et al. (2015), que observaram a perda completa da viabilidade das sementes após 24 h a 45 °C. O estresse, seja por temperaturas acima ou abaixo da faixa ideal, altera a homeostase celular, muitas vezes inibe a germinação e retarda gravemente o crescimento da muda (THAKUR et al., 2010; SZABADOS et al., 2011). Além disso, o aquecimento global reflete na temperatura do solo, o que pode afetar negativamente os processos fenológicos e fisiológicos das sementes, Ooi et al. (2012) descrevem que para cada 1 °C de aumento na temperatura do ar, a temperatura do solo aumenta 1,5 °C mostrando que as mudanças climáticas afetam diretamente o desenvolvimento das espécies.

Isso se deve principalmente aos danos causados ao sistema de biomembranas da semente (BEWLEY et al., 2013). As altas temperaturas levam ao aumento da

permeabilidade da membrana, danos ao embrião, comprometimento do crescimento e desenvolvimento embrionário e pode impedir o estabelecimento de mudas (SANTOS et al., 2004; MATHEUS; LOPES, 2009).

O estresse térmico teve um impacto negativo no crescimento das mudas (Figuras 3a-f) e, conseqüentemente, reduziu drasticamente o IQD de 0,04364 em 0 h para 0,0076 em 72 h (Figura 3g). Esses dados confirmaram que o estresse térmico afetou negativamente a qualidade das mudas de *D. nigra*.

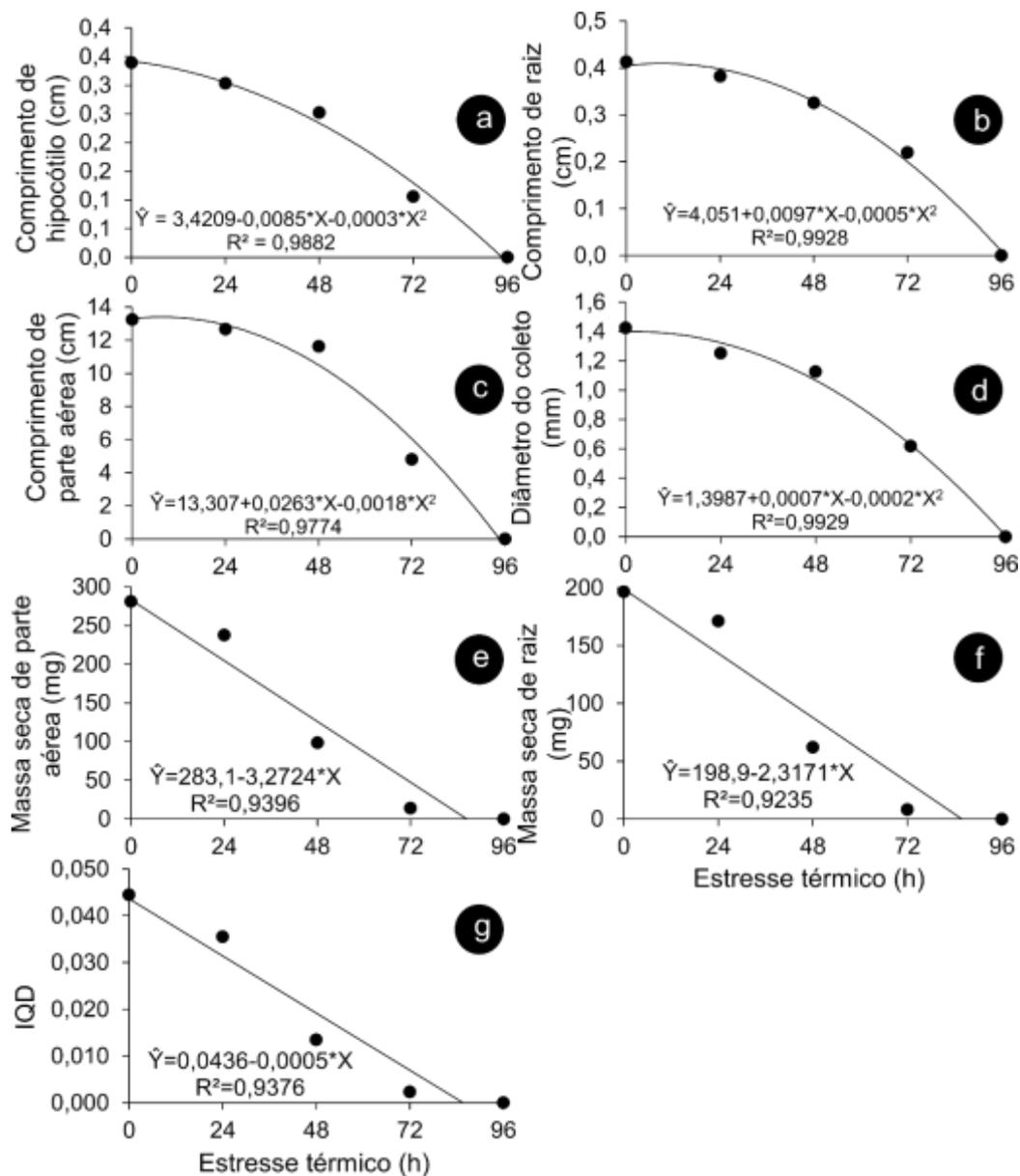


Figura 3. Variáveis de crescimento e qualidade de mudas, formadas a partir de sementes de *Dalbergia nigra in vitro* sob estresse térmico à 45 °C. (a) comprimento do hipocótilo (cm); (b) comprimento da raiz (cm); (c) comprimento da muda (cm); (d)

diâmetro do coleto (mm); (e) massa seca da parte aérea (mg); (f) massa seca da raiz (mg); (g) índice de qualidade de Dickson (DQI) ($p < 0,05$).

Fonte: a autora.

O IQD avalia a qualidade das mudas por meio das variáveis de crescimento, como comprimento de parte aérea, comprimento da raiz e diâmetro do coleto. Valores altos de IQD correspondem a uma qualidade superior. Portanto, o IQD e a massa seca são extremamente importantes na classificação da capacidade das mudas, especialmente em espécies arbóreas, objetivando atingir o máximo desenvolvimento e sobrevivência em condições de campo adversas (ELOY et al., 2013; TSAKALDIMI et al., 2013). O baixo IQD pode ser justificado pela redução da capacidade das mudas de remoção de radicais de oxigênio, favorecendo assim, o acúmulo de ERO, como observado em sementes envelhecidas de *Oriza sativa* L. que ocorreu a diminuição da enzima superóxido dismutase em resposta ao estresse causado pelo envelhecimento (WANG et al., 2009).

A análise bioquímica revelou uma diminuição de 31,86% nos lipídios totais quando as sementes de *D. nigra* foram expostas ao estresse térmico por 96 h (Figura 4a). O estresse térmico prolongado levou a uma diminuição gradual dos carboidratos totais e proteínas totais (Figuras 4b, d, respectivamente). Os compostos fenólicos totais aumentaram até o ponto máximo em 67,09 h e então, diminuíram drasticamente (Figura 4c). Nas sementes mais vigorosas, com IVG de aproximadamente 1,02 (Figura 2b), o acúmulo de amido foi moderadamente maior (0,6920%) do que nos demais, embora os valores em 0 e 96 h fossem quase idênticos (Figura 4e). A porcentagem de fibras aumentou com o estresse térmico para cerca de 65% em 96 h (Figura 4f).

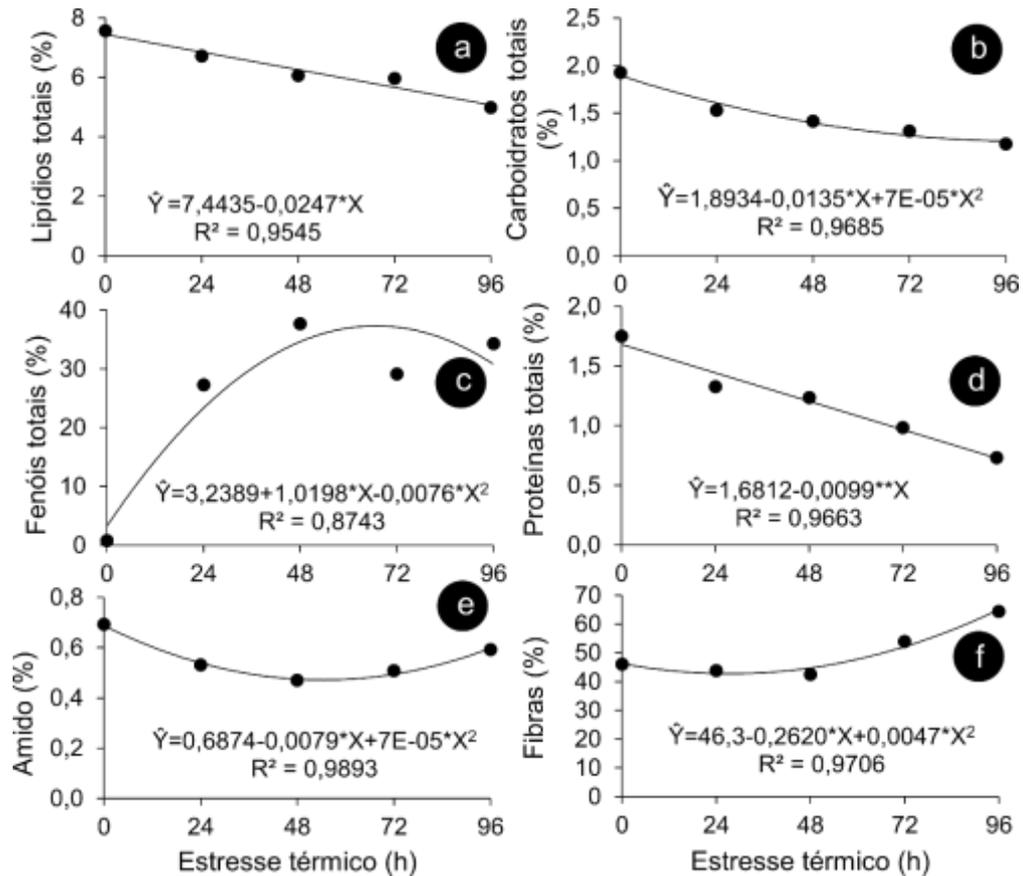


Figura 4. Variáveis bioquímicas de sementes de *Dalbergia nigra* *in vitro* sob estresse térmico à 45 °C. (a) lipídios totais (%); (b) carboidratos totais (%); (c) fenol total (%); (d) proteínas totais (%); (e) amido total (%); (f) fibras totais (%) ($p < 0,05$).

Fonte: a autora.

Sementes de *D. nigra* estressadas termicamente apresentaram redução no teor de lipídios (Figura 4a). Resultado principalmente da peroxidação lipídica, pela qual polissacarídeos insaturados e ácidos oleicos passam por oxidação para produzir hidroperóxidos lipídicos, ácidos oleicos oxigenados e ERO. Juntas, essas formas oxidadas podem contribuir para a morte da semente (MURTHY et al., 2003; KRANNER et al., 2010). A perda concomitante de carboidratos pode levar ao uso de lipídios como fonte de energia e, portanto, à sua diminuição no geral. Ao mesmo tempo, a peroxidação lipídica pode simplesmente impedir a detecção de lipídios, pois estes foram extraídos da fase hidrofóbica. Os lipídios oxidados são provavelmente mais hidrofílicos.

O aumento observado nos compostos fenólicos totais pode estar relacionado a uma maior atividade antioxidante em sementes de *D. nigra* em resposta à presença

de radicais livres. Essa resposta favoreceria um redirecionamento do metabolismo para a germinação em vez da morte celular. O acúmulo de diversos compostos fenólicos orgânicos, como antocianinas e flavonóides, normalmente presentes nas sementes, indica atividade antioxidante e, conseqüentemente, proteção dos tecidos celulares (CORSO et al., 2020).

A exposição prolongada ao estresse térmico a 45 °C levou a uma diminuição no teor de amido, embora um leve aumento tenha sido observado após 72 h. Esse aumento pode ser explicado pela diminuição progressiva da germinação e diminuição da necessidade de consumir reservas de amido para fornecer a energia necessária (HENNING et al., 2010). Alternativamente, o aumento na umidade pode fazer com que as moléculas de amido se tornem organizadas em estruturas mais ordenadas e menos acessíveis (WANG et al., 2020).

Celulose, hemicelulose e lignina são fibras insolúveis encontradas principalmente no tegumento da semente (parede celular) e em pequenas quantidades no embrião e no endosperma. No presente estudo, o aumento no conteúdo de fibra pode ser explicado pela degradação da parede celular durante o estresse térmico (LORENZ; D'APPOLONIA, 1980, CHAVAN; KADAN, 1989, KOUADRI; SATHA, 2018).

O comprimento da parte aérea, da raiz e do hipocótilo, bem como a germinação, mostraram correlação negativa muito forte com a CE (-0,94; -0,92; -0,95 e -0,95, respectivamente), em que um aumento na CE resultou em diminuição dessas variáveis (Figura 5). Segundo Shimakura e Ribeiro Júnior (2012), a correlação independente do sinal pode ser considerada muito fraca (0,00 a 0,19), fraca (0,20 a 0,39), moderada (0,40 a 0,69), forte (0,70 a 0,89) e muito forte (0,90 a 1,00). Logo, a umidade apresentou correlação negativa muito forte com o conteúdo total de lipídios, carboidratos e proteínas nas sementes; enquanto o IQD exibiu correlação positiva muito forte com essas variáveis (Figura 5). A exposição das sementes a 45 °C levou à diminuição dos compostos de reserva e, portanto, da qualidade das mudas produzidas. A germinação diminuiu progressivamente junto com o conteúdo de lipídios, carboidratos e proteínas, apontando para uma forte correlação positiva entre essas variáveis (Figura 5).

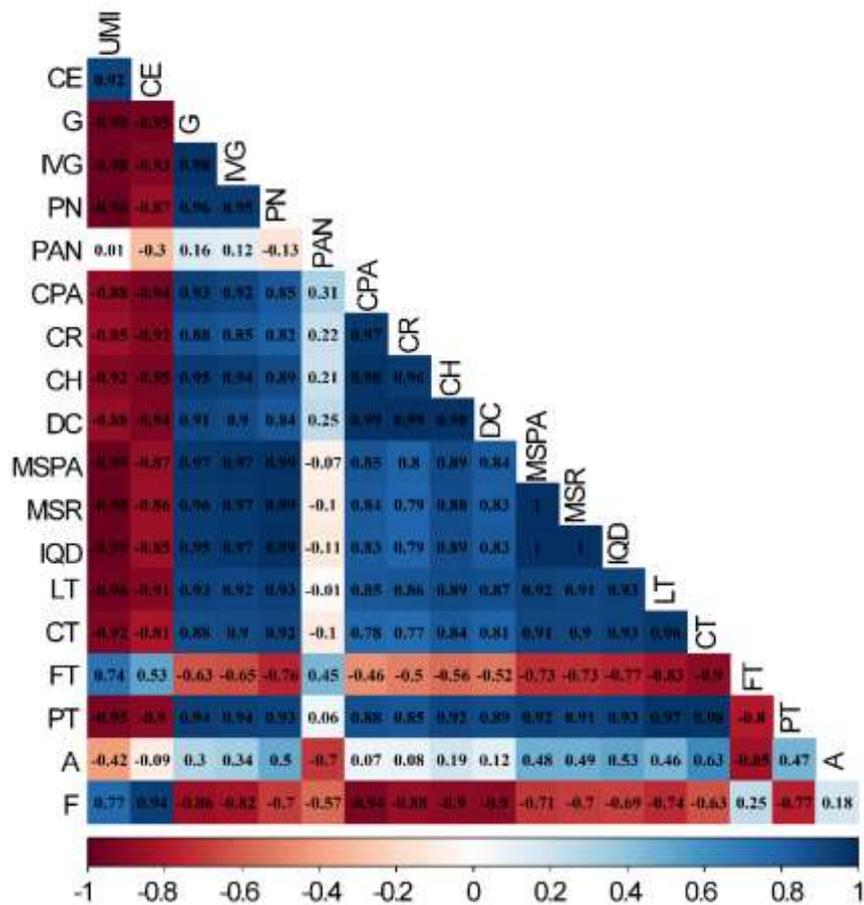


Figura 5. Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis fisiológicas/morfológicas e bioquímicas em sementes de *D. nigra* submetidas ao estresse térmico a 45 °C. UMI, umidade (%); CE, condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$); G, germinação (%); IVG, índice de velocidade de germinação; PN, plântulas normais (%); PA, plântulas anormais (%); CPA, comprimento de parte aérea (cm); CR, comprimento da raiz (cm); CH, comprimento do hipocótilo (cm); DC, diâmetro do coleto (mm); MSPA, massa seca da parte aérea (mg); MSR, massa seca da raiz (mg); IQD, índice de qualidade de Dickson; LT, lipídios totais (%); CT, carboidratos totais (%); FT, fenol total (%); PT, proteínas totais (%); A, amido (%); F, fibras (%).

Fonte: a autora.

O nível de carboidratos e proteínas apresentou correlação positiva com a qualidade das sementes. Ambos os tipos de compostos diminuíram após 96 h de exposição ao estresse térmico, o que pode estar associado a alterações nas reservas de sementes e desnaturação de proteínas. As ERO causam carbonilação de proteínas, um processo que aumenta com a idade das células e dos tecidos, e reduz

a quantidade total de proteínas devido à sua degradação aumentada pelo sistema ubiquitina/proteassoma e isso pode contribuir para suas quantidades totais mais baixas (LOZANO-ISLA et al., 2018; NIGAM et al., 2019). Os carboidratos armazenam e fornecem energia para a germinação das sementes. A disponibilidade limitada de substratos para a respiração das sementes em condições de alta temperatura e umidade promoveu o uso das reservas disponíveis para reativar o metabolismo até a protrusão da raiz primária. Como os carboidratos contribuem para a manutenção do estado vítreo dentro das células e atenuam os efeitos da deterioração, eles são um bom indicador da viabilidade da semente. Portanto, menor teor de carboidratos indica menor qualidade da semente (LEHNER et al., 2008).

Para permanecer viável, germinar e se desenvolver sob condições de estresse térmico, as sementes requerem energia por meio do consumo acelerado de compostos metabólicos. Este estudo evidencia que a exposição prolongada de sementes de *D. nigra* ao estresse térmico leva a um aumento na CE, perda de íons, açúcares e metabólitos, o que altera a integridade das membranas celulares e a capacidade das sementes de restabelecer a homeostase intracelular, levando as sementes à morte (WANG et al., 2009). O mesmo ocorre após mudanças na absorção de água, que também é afetada negativamente por temperaturas abaixo ou acima do ideal (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; BEWLEY et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

O estresse térmico reduz a qualidade das sementes de *D. nigra*, diminuindo a capacidade de germinação, quando as sementes são submetidas a 45 °C por períodos superiores a 72 h. Simultaneamente ocorre redução no teor de lipídios, carboidratos e proteínas dos cotilédones, comprometendo a qualidade das mudas.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. C. S. D. et al. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 517-523, 2006.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds**: physiology of development germination and dormancy. New York: Springer, 392 p., 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDES, A. F. N. et al. Endangered species account for 10% of Brazil's documented timber trade. **Journal for Nature Conservation**, v. 55, p. 125821-12587, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399p., 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.º 443, de 14 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Seção 01, p. 121, 2014.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 590 p., 2012.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 1, 2003.1039 p.

CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Nutritional improvement of cereals by sprouting. **Critical Reviews in Food Science and Technology**, v. 28, n. 5, p. 401-437, 1989.

CORSO, M. et al. Compostos fenólicos especializados em sementes: estruturas, funções e regulamentos. **Plant Science**, v. 296, p. 110471, 2020.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, n. 1, p. 10-13, 1960.

ELOY, E. et al. Avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis* utilizando parâmetros morfológicos. **Floresta**, v. 43, n. 3, p. 373-384, 2013.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: Do básico ao aplicado. Brazil: Artmed, 2004. 323 p.

HENNING, F. A. et al. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 727-734, 2010.

HSU, C. C. et al. Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter melon seeds and effects of priming and hot water soaking treatments. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 3, p. 201-212, 2003.

IUCN, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. **The IUCN red list of threatened species**, 2013.

KOUADRI, I.; SATHA, H. Extraction and characterization of cellulose and cellulose nanofibers from *Citrullus colocynthis* seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 787-796, 2018.

KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

LEHNER, A. et al. Alterações em carboidratos solúveis, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes no embrião durante o envelhecimento em grãos de trigo. **Journal Cereal Science**, v. 47, p. 555-565, 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society**, v. 30, n. 5, p. 421-427, 1980.

LORENZ, K.; D'APPOLONIA, B. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 353-385, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, v.1, 2016. 384 p.

LOZANO-ISLA, F. et al. Effects of seed storage time and salt stress on the germination of *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 118, n. 4, p. 214-224, 2018.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.

MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Temperaturas cardinais para a germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 115-122, 2009.

MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. de L. e; SILVA, L. J. da. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 115-125, 2015.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 384, p. 1057-1067, 2003.

NIGAM, M. et al. Accelerated ageing induces physiological and biochemical changes in tomato seeds involving MAPK pathways. **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 20-28, 2019.

OLIVEIRA, A. M. S. et al. Accelerated aging for evaluation of vigor in *Brachiaria brizantha* 'Xaraés' seeds. **Journal of Seed Science**, v. 42, e202042006, 2020.

OOI, M. K. J.; AULD, T. D.; DENHAM, A. J. Projected soil temperature increase and seed dormancy response along an altitudinal gradient: implications for seed bank persistence under climate change. **Plant Soil**, v. 353, n. 1-2, p. 289-303, 2012.

QIN, P. et al. Effects of accelerated aging on physiological and biochemical characteristics of waxy and non-waxy wheat seeds. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 18, n. 2, p. 7-12, 2011.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

RIBEIRO, R. A. et al. Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Annals of Botany**, v. 95, n. 7, p. 1171-1177, 2005.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SANTOS, G. P. N et al. Danos por *Troezon championi* Lima, 1935 (Coleoptera: Curculionidae), em sementes de jacarandá caviúna (*Dalbergia nigra*) (Leguminosae). **Científica**, v. 20, p. 157-163, 1992.

SANTOS, M. M. et al. Germination of seeds of *Melanoxylon brauna* Schott. under heat stress: production of reactive oxygen species and antioxidant activity. **Forests**, v. 8, p. 405-418, 2017.

SARASAN, V. et al. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 3, p. 206-214, 2006.

SHARMA, S. N. et al. Gene expression patterns regulating the seed metabolism in relation to deterioration/ageing of primed mung bean (*Vigna radiata* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, p. 40-49, 2018.

SHIMAKURA, S. E.; RIBEIRO JÚNIOR, P. J. **Estatística descritiva**: interpretação do coeficiente de correlação. Departamento e Estatística da UFPR, 2012. Disponível em: <http://leg.ufpr.br/~paulojus/CE003/ce003/node8.html> .

SILVA, G. P. et al. Biochemical and physiological changes in *Dipteryx alata* Vog. seeds during germination and accelerated aging. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 84-92, 2020.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 63-68, 1959.

SZABADOS, L. et al. Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. **Advances in Botanical Research**, v. 57, p. 106-133, 2011.

TESFAY, S. Z.; MODI, A. T.; MOHAMMED, F. The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 190-196, 2016.

THAKUR, P. et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 429-443, 2010.

TSAKALDIMI, M.; GANATSAS, P.; JACOBS, D. F. Prediction of planted seedling survival of five Mediterranean species based on initial seedling morphology. **New Forests**, v. 44, n. 3, p. 327-339, 2013.

WANG, G. et al. The effect of high-voltage electrostatic field (HVEF) on aged rice (*Oryza sativa* L.) seeds vigor and lipid peroxidation of seedlings. **Journal of Electrostatics**, v. 67, n. 5, p. 759-764, 2009.

WANG, H. et al. Insights into the hierarchical structure and digestibility of starch in heat-moisture treated adlay seeds. **Food Chemistry**, v. 318, p. 126489, 2020.

WANI, A. A. et al. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1514-1520, 2008.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

CAPÍTULO II: Morfogênese *in vitro* de explantes hipo e epicotiledonares de *Dalbergia nigra*, induzidos por combinações citocinínicas

RESUMO

Dalbergia nigra Vell. All. ex. Benth encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção devido à sua acentuada exploração madeireira, sendo importante a busca por protocolos eficientes de propagação. Neste contexto, objetivou-se estudar diferentes tipos de explantes e combinações citocinínicas na morfogênese *in vitro* de *D. nigra*. As plântulas foram seccionadas em dois tipos de explantes, o nó cotiledonar e nó com duas gemas axilares e cultivados em meio de cultura com diferentes combinações de BAP + TDZ (2,22 + 0 μ M; 2,22 + 0,002 μ M; 2,22 + 0,004 μ M; 4,44 + 0 μ M; 4,44 + 0,002 μ M; 4,44 + 0,004 μ M). O BAP (2.22 μ M) proporcionou alto fator de multiplicação, comprimento e massa seca de brotos, número, comprimento e massa seca de raiz, quando associada ao explante nó cotiledonar. O BAP associado ao TDZ interfere negativamente na rizogênese, principalmente quando há elevação das concentrações de ambas as fontes citocinínicas. O explante nó cotiledonar apresenta maior atividade morfogenética se comparado ao segmento nodal com duas gemas.

Palavras-chave: jacarandá-da-Bahia, cultivo *in vitro*, explantes juvenis, fitorreguladores.

ABSTRACT

Dalbergia nigra Vell. All. ex. Benth is on the list of endangered species due to large-scale logging, highlighting the need to search for efficient propagation protocols. In this context, this study aimed to assess different types of explants and cytokinin combinations on the *in vitro* morphogenesis of *D. nigra*. The seedlings were sectioned into two types of explant: the cotyledonary node and the node with two axillary buds, and grown in a culture medium with different combinations of BAP + TDZ (2.22 + 0 μ M; 2.22 + 0.002 μ M; 2.22 + 0.004 μ M; 4.44 + 0 μ M; 4.44 + 0.002 μ M; 4.44 + 0.004 μ M). BAP (2.22 μ M) provided a high multiplication factor, shoot length and dry mass, and root length and dry mass when associated with the cotyledonary node explant. BAP associated with TDZ negatively affects rhizogenesis, especially when there is an

increased concentration of both cytokinin sources. The cotyledonary node explant shows higher morphogenetic activity than the nodal segment with two buds.

Keywords: jacaranda da Bahia, *in vitro* cultivation, juvenile explants, phytohormones.

1. INTRODUÇÃO

O desmatamento, a exploração indiscriminada, a falta de replantios e de estudos voltados à conservação, são fatores que contribuem para a extinção de espécies florestais importantes dentro dos biomas. O hotspot neotropical Floresta Atlântica engloba inúmeras espécies arbóreas endêmicas que se encontram ameaçadas de extinção devido a superexploração de seus recursos madeireiros, a exemplo da espécie *Dalbergia nigra* Vell. All. ex. Benth (Leguminosae-Fabaceae). Esta espécie possui propriedades madeireiras de elevado valor comercial e uso mundial, é muito utilizada na fabricação de móveis e na construção civil (REIS et al., 2012; MARTINELLI; MORAES, 2013; MMA, 2014; LORENZI, 2016).

Espécies ameaçadas de extinção requerem atenção especial, principalmente quanto a sua propagação de modo a investigar técnicas que podem ser vantajosas como a cultura de tecidos vegetais, na qual permite a produção de mudas em larga escala e que estas apresentem qualidade fitossanitária superior. É considerada uma técnica viável para espécies com dificuldades na propagação convencional seminífera, no qual as sementes de *D. nigra* são susceptíveis ao ataque de larvas do broqueador *Troezon champion* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO, 2003; ARAGÃO et al., 2017).

A organogênese é uma via da cultura de tecidos vegetais que consiste na indução de células e tecidos, culminando no surgimento de órgãos adventícios monopolar, isto é, primórdio caulinar ou radicular. Essa morfogênese pode ser direta onde o nível de reprogramação celular é muito menor, diferentemente da indireta, que é acometida de inúmeras diferenciações celulares, com a ativação do metabolismo fisiológico e expressão gênica, no qual a formação do novo órgão é precedida pelo processo calogênico. O controle dessa via é condicionado pelo balanço interno hormonal, e pelo uso de reguladores no meio de cultura na fase de indução e

aquisição de competência (DUCLERCQ et al., 2011; MOHEBALIPOUR et al., 2012; ARAGÃO et al., 2016).

O crescimento e a morfogênese *in vitro* é dependente das propriedades do explante, sua escolha apropriada irá envolver a otimização das condições dos meios de cultura e fatores de equilíbrio que regulam a morfogênese, como a correlação entre as concentrações de hormônios medidas em um tecido e sua resposta, resultando em uma multiplicação bem-sucedida (BONGA, 2017; ISAH, 2020).

Os reguladores de crescimento mais utilizados na fase de indução da organogênese são as citocininas e as auxinas (BIELACH et al., 2012). As citocininas são responsáveis por induzir a formação de parte aérea, gemas adventícias e, por meio da quebra da dominância apical, estimulam as brotações laterais (POZO et al., 2005). Essas podem ser divididas em: as derivadas da adenina, a exemplo do 6-benzilaminopurina - BAP, e as derivadas das feniluréias, como o thidiazuron - TDZ (FLORES et al., 2009). O BAP é uma das mais utilizadas, já que os tecidos vegetais a metabolizam mais eficientemente do que outros reguladores sintéticos e pela sua capacidade em promover a produção de hormônios naturais na planta (ABBASI et al., 2013). Já o TDZ apresenta efeito indireto, atuando na inibição da enzima oxidase/desidrogenase que degrada as citocininas, resultando na elevação da concentração endógena (HARE; VAN STADEN, 1994).

No contexto da busca por um protocolo de propagação eficiente de uma espécie ameaçada, objetivou-se analisar diferentes tipos de explantes e combinações citocinínicas na morfogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes maduras de *D. nigra* colhidas em matrizes situadas no município de Viçosa, Minas Gerais (20°45'35.1" S, 42°52'06.1" W), adquiridas junto à Sociedade de Investigações Florestais (SIF), Universidade Federal de Viçosa (UFV), via comercialização, sendo a SIF registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

As sementes foram desinfestadas por meio da imersão em álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% por 15 minutos, seguido de tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. As sementes foram colocadas nos tubos de ensaio

contendo 10 mL de meio WPM (Woody Plant Medium) (2,41 g L⁻¹) (LLOYD; MCCOW, 1980) (Phytotechnology®), acrescido de sacarose (30 g L⁻¹) (Dinâmica®), mio-inositol (0,1 g L⁻¹) (Sigma®) e ágar (6 g L⁻¹) (Kasvi®), cujo pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e, em seguida, autoclavado (Phoenix Luferco®) por 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias, sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e com irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹, promovido por lâmpadas de LED tubular 20 W.

As plântulas normais foram seccionadas em dois tipos de explantes, o nó cotiledonar e nó com duas gemas axilares. Os explantes foram cultivados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (0,1 g L⁻¹), PVP (1 g L⁻¹) (Synth®), com pH ajustado a 5,7±0,1 e solidificado com ágar (Kasvi®) (6 g L⁻¹), com diferentes combinações de BAP + TDZ (2,22 + 0 μM; 2,22 + 0,002 μM; 2,22 + 0,004 μM; 4,44 + 0 μM; 4,44 + 0,002 μM; 4,44 + 0,004 μM) (Sigma®), autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1 atm.

O experimento foi mantido em sala de crescimento por 60 dias, sob as condições descritas anteriormente. Ao final, avaliou-se número de brotos, número de folhas, comprimento do broto (cm), diâmetro do coleto (mm), número de raiz, comprimento da raiz (cm), massa seca do broto, massa seca da raiz (mg).

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2x6 (explantes x BAP + TDZ), com delineamento inteiramente casualizado (DIC) e quatro repetições, com nove explantes. Os dados foram submetidos a análise de variância, teste de F, teste de médias de Tukey e correlação de Pearson (p<0,05) (CRUZ, 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* de *D. nigra* possibilita a aquisição de fontes de propágulos juvenis por meio de plântulas assépticas, oriundas de sementes, as quais podem ser utilizadas para diferentes fins, a exemplo da organogênese (Figuras 4a-f) contribuindo para a produção de mudas e sua conservação, já que se encontra ameaçada de extinção.

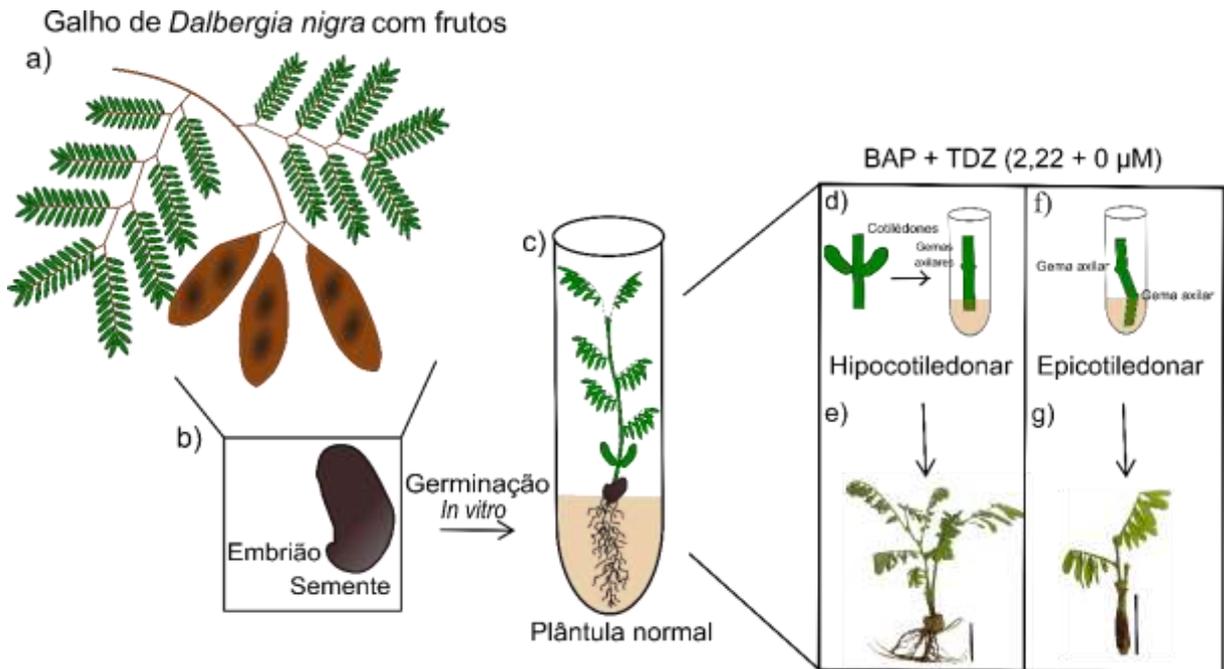


Figura 1. Esquema evidenciando ramo com frutos de *D. nigra* (a), semente (b), germinação *in vitro* em meio WPM com formação de plântula normal (c), secção de explantes (segmentos hipocotiledonares (d, e) e epicotiledonares (e, f)).

Fonte: a autora.

A germinação *in vitro* da espécie *D. nigra* pode variar de 70 a 87%, formando plântulas normais (>70%) com baixas taxas de contaminação e massa seca total variando de 26,16 a 39,72 mg (SANTOS et al., 2020). Foi observado no presente estudo que segmentos de nó cotiledonar das plântulas (60 dias), *in vitro* com BAP (2,22 μM), resultou no maior número e crescimento de brotos e raízes durante a morfogênese (Figura 1d-e), quando comparados aos segmentos nodais com duas gemas, evidenciando inclusive a ausência de raiz neste explante (Figura 1f, g).

O nó cotiledonar também demonstrou ser mais responsivo para a espécie florestal *Toona ciliata*, que apresentou brotações mais alongadas na utilização dos fitorreguladores BAP (0,5 mg L^{-1}) + cinetina (0,5 mg L^{-1}) + ácido 1-naftalenoacético (0,05 mg L^{-1}), que alcançaram 6,67 brotos (SONG et al., 2020). O número de brotações foi semelhante ao encontrado no presente estudo com BAP (2,22 μM) de BAP, cujo fator de multiplicação foi de 5,78 brotos/nó cotiledonar e 6,42 brotos/segmento nodal com duas gemas, totalizando aproximadamente 12 brotos em dois explantes de uma única plântula normal (Figura 2).

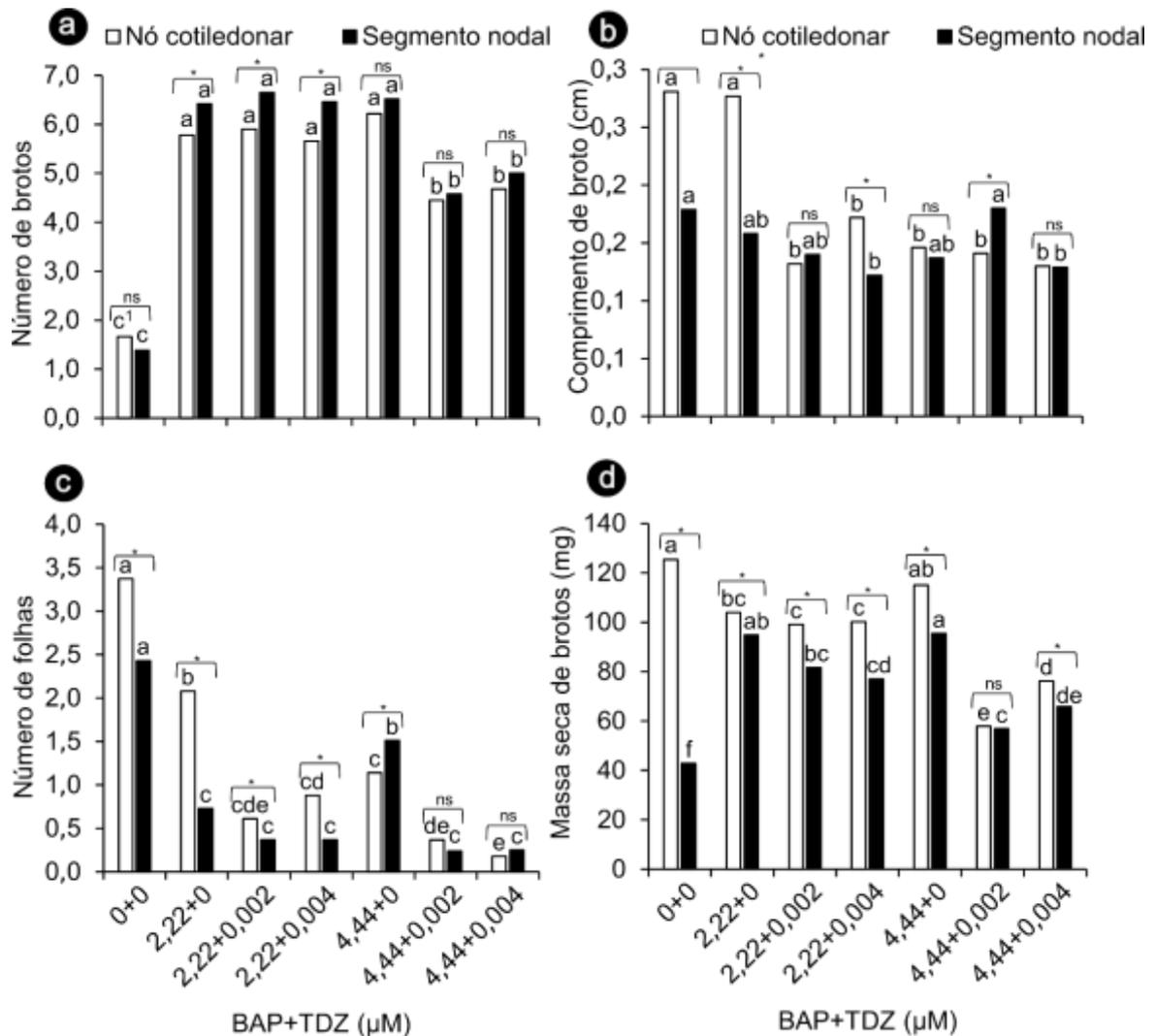


Figura 2. Morfogênese *in vitro* de explantes juvenis de *D. nigra* após tratamentos com combinações entre BAP e TDZ, (a) número de brotações, (b) comprimento de brotos (cm), (c) número de folhas, e (d) massa seca de brotos (mg).

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula entre as combinações citocinínicas dentro de cada explante não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Significativo ($p < 0,05$) e ^{ns}Não significativo pelo teste de F, entre os dois tipos de explantes. Abreviações: BAP. 6-benzilaminopurina; TDZ. [1-fenil-3-[tiadiazol-5-il)-ureia] (Tidiazuron).

Fonte: a autora.

O explante nó cotiledonar, de modo geral promoveu resultados superiores ao segmento nodal com duas gemas, principalmente para as características de comprimento e massa seca de brotos; número, comprimento e massa seca de raiz (Figura 2). Os resultados obtidos com o nó cotiledonar, pode ser explicado pela

influência de substâncias promotoras de organogênese presentes nos cotilédones, uma vez que é um tecido com alta capacidade morfogênica, tornando esse explante mais responsivo aos demais segmentos nodais (BURGER; HACKETT, 1986; VASCONCELOS et al., 2019).

O não fornecimento de citocininas nos explantes testados resultou em reduzido número de brotos (1,66 e 1,38, nó cotiledonar e segmento nodal com duas gemas, respectivamente) (Figura 2a), entretanto com o comprimento do broto superior aos demais tratamentos utilizando o explante nó cotiledonar (2,81 cm) (Figura 2b). Além disto, com a ausência deste regulador de crescimento (RC) obteve maior média de número de raiz (2,40) (Figura 3). Isto sugere uma maior concentração de auxinas nestes tecidos, principalmente considerando que as auxinas promovem o enraizamento e crescimento através da divisão e do alongamento celular (SIMON; PETRÁŠEK, 2011; XIAO; ZHANG, 2020). As citocininas têm, dentre outras, a função de induzir a formação de brotos e como no tratamento não houve fornecimento de citocinina, não houve estímulo induzido à brotação (GU et al., 2018). O BAP (2,22 μM) produziu maior número de brotos, não diferindo no comprimento dos brotos do tratamento controle, e a segunda maior produção de raízes (2,08), no qual os demais tratamentos não alcançaram uma raiz por explante. Isto indica que esta concentração de BAP não foi suficiente para causar um desequilíbrio na relação auxina/citocinina necessária ao crescimento dos brotos e enraizamento, promovendo aumentos no número de brotos. Portanto, o nó cotiledonar em meio MS suplementado com BAP (2,22 μM) foi possível obter produção de brotos e raízes, com comprimentos superiores aos demais tratamentos.

Isto não é observado quando o explante é segmento nodal com duas gemas, mesmo mantendo a concentração de citocinina, ocorre a redução de 42% no comprimento do broto (Figura 2b) e 91% do número de raízes, sugerindo que os segmentos nodais acima do nó cotiledonar possuem a quantidade de auxinas endógenas inferior ao nó cotiledonar.

O número de brotos diminuiu a partir do aumento da concentração de BAP combinado com TDZ, corroborando com o comportamento observado com a espécie *Amburana cearenses*, na qual o aumento da concentração de BAP resultou em declínio da resposta do explante (VASCONCELOS et al., 2019). Uma possível explicação é o efeito fitotóxico resultante da combinação de citocininas exógenas com

as concentrações endógenas. Diversos autores acreditam que o acréscimo na concentração da citocinina pode resultar na diminuição da resposta do explante como número de broto, e além disso, estimular a hiperidricidade e formação de folhas anormais (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998; NICIOLI et al., 2008; PURKAYASTHA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2019).

Nos segmentos nodais é necessário a utilização de BAP para promover a maior massa seca de brotos. Os nós axilares foliares apresentam centros ativos, com o mesmo potencial de brotação que o meristema apical, porém, a retomada da atividade desses centros ocorre da região mais próxima ao nó cotiledonar para a região mais distante (LONG; BARTON, 2000; SILVA et al., 2020). O movimento acrópeto da auxina que é produzida no meristema apical e é transportada até as raízes, resulta em diferentes níveis hormonais ao longo da planta, conseqüentemente, algumas regiões podem necessitar de uma suplementação maior de RC para ativar a atividade morfogênética do tecido (LONG; BARTON, 2000).

O explante nó cotiledonar em meio com BAP (2,22 μM) + TDZ (0,004 μM), resultou em maior diâmetro do calo, quando comparado aos demais tratamentos. No entanto, utilizando segmentos nodais com duas gemas, os maiores resultados de diâmetro do calo foram obtidos com a combinação BAP (2,22 μM) e TDZ (0,002 μM) (Figura 3a).

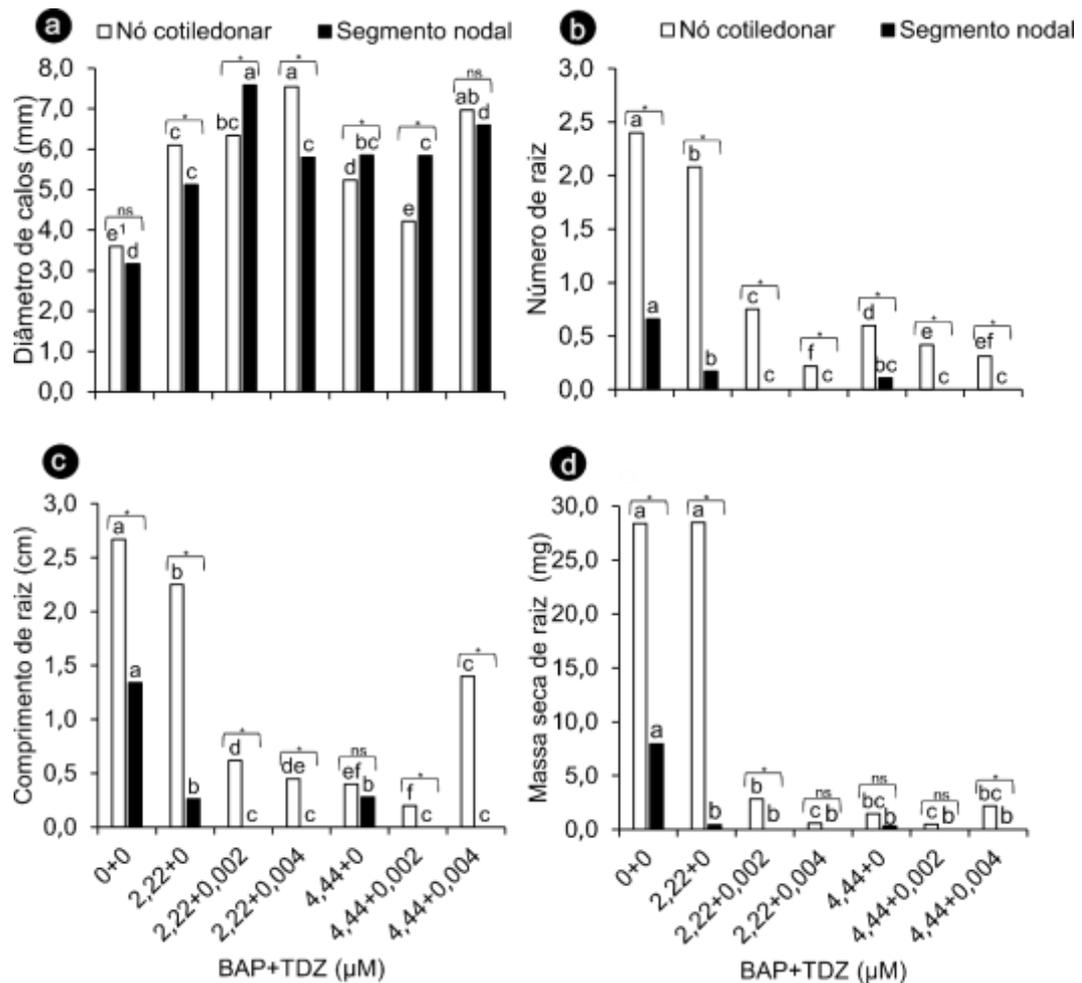


Figura 3. Morfogênese *in vitro* de explantes juvenis de *D. nigra* após tratamentos com combinações entre BAP e TDZ, (a) diâmetro de calos (mm), (b) número de raiz, (c) comprimento de raiz (cm), e (d) massa seca de raiz (mg).

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula entre as combinações citocinínicas dentro de cada explante não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Significativo ($p < 0,05$) e ^{ns}Não significativo pelo teste de F, entre os dois tipos de explantes. Abreviações: BAP. 6-benzilaminopurina; TDZ. [1-fenil-3-[tiadiazol-5-il)-ureia] (Tidiazuron).

Fonte: a autora.

O maior diâmetro do calo resulta em menor número e comprimento de raiz, a exemplo da concentração de 2,22 μM BAP e 0,002 μM TDZ (Figuras 3a, b e c), gerando uma correlação negativa entre as variáveis, em que o aumento de uma resulta na diminuição da outra (Figura 4). Em algumas espécies a formação de calos excessiva podem atuar favorecendo a rizogênese do explante e já em outras, o

resultado pode ser ao contrário, atuando na diminuição da qualidade do sistema radicular formado (afetando a conexão vascular entre planta/raiz) e até na inibição do processo rizogênico (LOPES et al., 2001; ERIG et al., 2004; HARTMANN et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos na análise de correlação das variáveis morfológicas é possível verificar uma correlação positiva entre as variáveis comprimento de brotos (CB) e número de folhas (NF) com todas as variáveis, à exceção com número de brotos (NB) e diâmetro de calos (DC) (Figura 4).

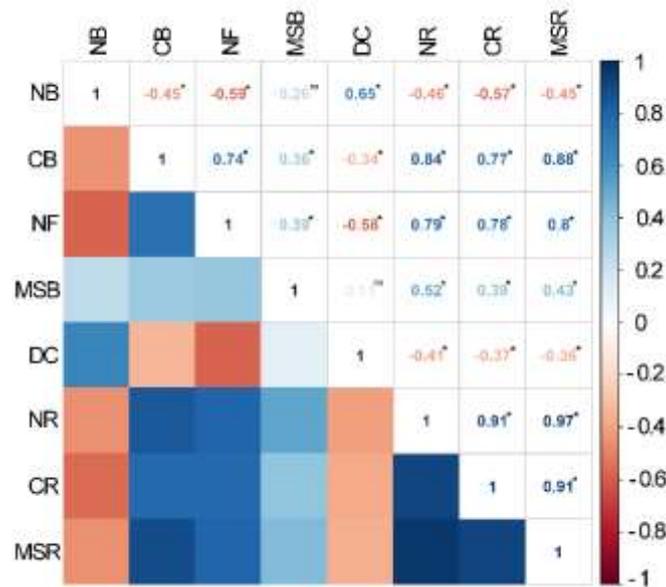


Figura 4. Correlação de Pearson entre as variáveis morfológicas: número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB), número de folhas (NF), massa seca de brotos (MSB), diâmetro de calos (DC), número de raiz (NR), comprimento de raiz (CR) e massa seca de raiz (MSR) ($p < 0,05$).

Fonte: a autora.

O tratamento sem adição de citocinina apresentou resultados superiores em todas as características relacionadas ao sistema radicular, ou seja, número, comprimento e massa seca de raiz, seguido do tratamento com menor concentração citocinínica (2,22 μM BAP). Essa resposta pode ser explicada pela baixa concentração de citocininas no tecido. A diferença entre os tratamentos citados está na relação auxina/citocinina presente no interior da planta, em que com a adição de BAP há alta relação e quando se adiciona 2,22 μM BAP, a relação diminui, reduzindo o número e o comprimento da raiz (Figuras 3b, c). A razão entre auxina/citocinina estabelece a diferenciação do tecido em raiz ou gema/brotos em tecidos cultivados *in vitro*, já que

a alta relação sugere estímulo a formação radicular (SKOOG; MILLER, 1957; TAIZ et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

O nó cotiledonar apresenta maior atividade morfogênética do que o segmento nodal em *D. nigra*. Recomenda-se o BAP (2,22 µM) na morfogênese *in vitro* de explantes juvenis de *D. nigra*. O BAP associado ao TDZ interfere negativamente na rizogênese *in vitro* de explantes juvenis de *D. nigra*, principalmente quando há elevação das concentrações de ambas as fontes citocinínicas.

5. REFERÊNCIAS

ABBASI, N. A. et al. Assessing the response of indigenous loquat cultivar Mardan to phytohormones for *in vitro* shoot proliferation and rooting. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 14, n. 9, p. 774-784, 2013.

ARAGÃO, V. P. M. et al. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 13, n. 2, p. 41-50, 2017.

ARAGÃO, V. P. M. et al. *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 3, p. 611-620, 2016.

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

BONGA, J. M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute, especially for adult conifers? **Trees**, v. 31, n. 3, p. 781-789, 2017.

BURGER, D. W.; HACKETT, W. P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of citrus. **Plant Science**, v. 43, n. 3, p. 229-232, 1986.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 1, 2003. 1039 p.

DUCLERCQ, J. et al. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 11, p. 597-606, 2011.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro Cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 61-68, 2004.

FLORES, R. et al. Benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ) on *in vitro* propagation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.

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, 1998. p. 43-76.

GU, J. et al. Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications. **Plant Science**, v. 274, p. 320-331, 2018.

HARE, P.; VAN STADEN, J. Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 8, p. 1121-1125, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: Principles and practices**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2012. 915 p.

ISAH, T. Nodal segment explant type and preconditioning influence *in vitro* shoot morphogenesis in *Ginkgo biloba* L. **Plant Physiology Reports**, v. 25, n. 1, p. 74-86, 2020.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LONG, J.; BARTON, M. K. Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. **Developmental Biology**, v. 218, n. 2, p. 341-353, 2000.

LOPES, S. C. et al. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora brasileira**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobson Estúdio/Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial da flora brasileira ameaçada de extinção**, 2014. <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>>.

MOHEBALIPOUR, N. et al. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 10, n. 1, p. 280-286, 2012.

NICIOLI, P. M. et al. Adjustment of the process of micropropagation of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 685-689, 2008.

POZO, J. C. D. et al. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, v. 123, n. 2, p. 173-183, 2005.

PURKAYASTHA, J. et al. Rapid in vitro multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 44, n. 5, p. 442-447, 2008.

REIS, B. E. et al. Crescimento e qualidade de mudas de jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.) em resposta à adubação com potássio e enxofre. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 2, p. 389-396, 2012.

SANTOS, M. M. D. et al. Disinfection protocol and in vitro germination of seeds of *Dalbergia nigra*. **Cerne**, v. 26, n. 2, p. 238-246, 2020.

SILVA, E. R. et al. *In vitro* of *Melanoxylon brauna* Schott. morphogenesis: responsiveness of explants to permanent and temporary immersion growth regulators. **Cerne**, v. 26, n. 1, p. 26-36, 2020.

SIMON, S.; PETRÁŠEK, J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 454-460, 2011.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SONG, H. et al. A regeneration system using cotyledons and cotyledonary node explants of *Toona ciliata*. **Journal of Forestry Research**, v. xx, p. 1-8, 2020.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. - Porto Alegre: Artmed, 2017, 858 p.

VASCONCELOS, J. N. C. et al. Stimulation of 6-benzylaminopurine and meta-topolin-induced *in vitro* shoot organogenesis and production of flavonoids of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101408-101416, 2019.

XIAO, G.; ZHANG, Y. Adaptive growth: shaping auxin-mediated root system architecture. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 2, p. 121-123, 2020.