



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

MARICÉLIA MOREIRA DOS SANTOS

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Dalbergia nigra* (VELL.)
ALLEMÃO ex BENTH**

JERÔNIMO MONTEIRO - ES

2019

MARICÉLIA MOREIRA DOS SANTOS

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Dalbergia nigra* (VELL.)
ALLEMÃO ex BENTH**

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: Rodrigo Sobreira Alexandre.
Coorientadores: José Carlos Lopes e Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

JERÔNIMO MONTEIRO - ES

2019

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

S237g Santos, Maricélia Moreira dos, 1993-
Germinação e morfogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. / Maricélia Moreira dos Santos. - 2019.
50 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.
Coorientadores: José Carlos Lopes, Marcos Vinicius Winckler Caldeira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Jacarandá. 2. Plantas - Propagação. 3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 4. Plantas - Reguladores. I. Alexandre, Rodrigo Sobreira. II. Lopes, José Carlos. III. Caldeira, Marcos Vinicius Winckler. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.
V. Título.

CDU: 630

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Dalbergia nigra* (VELL.)
ALLEMÃO ex BENTH**

Maricélia Moreira dos Santos

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 28 de fevereiro de 2019.

Virginia Carvalho

Profª. Drª. Virginia Silva Carvalho (Examinadora externa)
Universidade Estadual do Norte Fluminense

[Signature]

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

[Signature]

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

[Signature]

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Raimundo Guedes e Marinilvia Moreira, pois sem seu incessante apoio esse não seria possível.

EPÍGRAFE

“Assim como a semente traça a forma e o destino da árvore, os teus próprios desejos é que te configuram a vida.”

(Emmanuel – Francisco Cândido Xavier)

AGRADECIMENTOS

A Deus, em Sua infinita bondade e misericórdia, por me dar a vida, com todas as vitórias, dificuldades, oportunidades, repleta de espíritos bondosos me auxiliando na evolução no plano espiritual, tentando seguir sempre no caminho do bem e do amor.

Aos meus pais, Raimundo Guedes e Marinilvia Moreira, por me guiarem, apoiarem, aconselharem, incentivarem, enfim, fazerem de tudo e serem tudo para mim, mesmo separados por 2.500 km de distância. Nada é suficiente para expressar o tamanho do meu amor e gratidão a vocês.

Aos meus irmãos, Erick Fábio, Rafael Moreira, Nilvia Neta, sobrinhos, Jhulia Bernardo, Fernanda Santos, Erick Filho, Beatriz Moreira (*in memoriam*), Matheus Moreira e João Pedro, e minha segunda mãe Maria de Lourdes, por todo o amor e zelo comigo em toda a nossa jornada. Vocês compõem a melhor família que eu poderia ter.

À Universidade Federal do Espírito Santo, por proporcionar as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos, em especial ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, com seu corpo docente, técnico e discente, sempre se dispondo a ajudar.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo e à Secretaria da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Estado do Espírito Santo, pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, por todo o apoio, orientação, paciência e tempo a mim dirigido, sempre com extrema dedicação a promover o crescimento profissional de seus orientados e não medindo esforços de qualquer natureza para isso. Muito obrigada por me permitir fazer parte disso, professor!

Aos coorientadores, professor Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira, pelo incentivo e ser um dos maiores responsáveis pela possibilidade de execução dessa pesquisa, e professor Dr. José Carlos Lopes, por seu incentivo e ajuda, se prontificando a auxiliar na construção deste trabalho.

Ao professor Dr. Edilson Romais Schimldt, por todo auxílio na parte estatística, e à professora Dr.^a Virginia Silva Carvalho, por nos transmitir um pouco de seu vasto conhecimento em Cultura de Tecidos Vegetais, além de se disporem a contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais Ana Pirovani, Caroline Araújo, Douglas Fernandes, Gilson Barbosa, Ingridh Simões, Julcinara Baptista, Kelly Nery, Luciano Bestete, Tamiris de Mello, Thuelem Curty, Thuanny Lins e, em especial, Elisa Regina e Luis Filipe Cezario, por todo aprendizado, os ótimos momentos e toda ajuda, sobretudo aos que foram minhas mãos quando não pude. Levo vocês com carinho em meu coração. Sucesso, queridos!

À professora Dr.^a Milene Miranda Praça Fontes e seus orientados no Laboratório de Citogenética do CCAE/UFES, em especial Thammyres Alves, pelos bons momentos e auxílio na realização das análises de toxicidade.

Aos amigos em Macapá, Anderson Almeida, Ary Braga, Breno Silva, Cleyton Wilson, José Maria, Luis Rennan, Pedro Rocha, Rafael Lucas, Robson Borges e Robson Matheus, por sempre me animarem, ouvirem e apoiarem, apesar da distância. O carinho mútuo transcendeu essa barreira!

Aos amigos da UFES, Aline Ramalho, Caio de Moraes, Daiana Souza, Eduardo Araújo, Genilda Amaral, Glícia Nascimento, Guilherme Mores, Julia Moreau, Juliana Arpini, Lhorrayne Gomes, Nayara Franzini, Patrícia Borges e Rodrigo Gorsani, por compartilhar inúmeros momentos de muita ternura. Continuem irradiando amor por onde passarem e que Deus os proteja e ilumine!

Aos queridos André de Jesus, Fábio Lacerda e Elbya Gibson, além de meu irmão de coração Amon Guilherme, por todo choro, discussão, riso, lanche, conversa, videochamada, preocupação, acolhimento, apoio incondicional e carinho. Só tenho a agradecer a vocês por tudo, do fundo do meu coração. Vocês são maravilhosos. Este mundo será pequeno perante vossas conquistas!

A todos os profissionais da saúde que cuidaram de mim em virtude de meu acidente, sobretudo aos funcionários da Santa Casa de Misericórdia de Cachoeiro de Itapemirim, além de meu ortopedista Me. Lorrán Coque Fonseca e minha fisioterapeuta Esp. Luciana Machado Duarte, dois seres iluminados, maravilhosos e dedicados, que se tornaram mais que parceiros queridos nessa jornada, mas também minhas inspirações profissionais. O dia 11 de agosto de 2018 se tornou muito especial para mim, não só pela transformação da minha vida por completo, mas através dele tive a oportunidade e a felicidade de conhecê-los.

E, enfim, a todos que viabilizaram a realização deste trabalho, de forma direta ou indireta, fica registrado aqui os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SANTOS, Maricélia Moreira dos. **Germinação e morfogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientadores: José Carlos Lopes e Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

A Floresta Atlântica é um bioma de grande importância que sofre com ações humanas, o que pode levar a extinção de espécies endêmicas de grande valor econômico e ecológico, como o jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.). Visando auxiliar na multiplicação dessa espécie notável, objetivou-se estudar a germinação e a organogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* utilizando-se explantes juvenis e fitorreguladores, de forma a contribuir com a conservação da espécie. Para a desinfestação e germinação *in vitro* das sementes de *Dalbergia nigra*, foram realizados dois experimentos: 1. Diferentes tempos de imersão (0; 5; 10; 15; 20 e 25 minutos) em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial (2,0-2,5% de cloro ativo), realizado em delineamento inteiramente casualizado, em que os tempos de imersão no NaClO consistem nos tratamentos, com quatro repetições de 25 sementes cada, e 2. Diferentes agentes desinfestantes, sendo esses NaClO comercial, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), fungicida Captan SC e bactericida Kasumin, realizado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições de 10 sementes cada. Foi utilizado o meio de cultura Woody Plant Medium - WPM nos experimentos de germinação e desinfestação. Para a análise da toxicidade do NaClO em *Lactuca sativa* L., foram utilizadas cinco concentrações de NaClO (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%), solução de glifosato (controle positivo) e água destilada (controle negativo), realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de 25 sementes cada. Para a cauligênese *in vitro* de explantes juvenis de *Dalbergia nigra*, as plântulas crescidas *in vitro* foram segmentadas em três explantes de 1 cm cada: ápice caulinar, nó cotiledonar e raiz. Os explantes foram inseridos em meio de cultura WPM suplementado com quatro concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0; 4,44; 8,88 e 13,32 µM), sendo realizado em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 3x4 (explantes x BAP), com quatro repetições de cinco explantes por tratamento. Para a rizogênese *in vitro* de explantes juvenis de *Dalbergia nigra*,

segmentos de nó cotiledonar de plântulas normais crescidas *in vitro* foram inseridos em tubos de ensaio com meio de cultura WPM com quatro concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) (0; 4,92; 9,84 e 14,76 μM), sendo conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco explantes por tratamento. Para a maior desinfestação e menores efeitos danosos às plântulas, recomenda-se que as sementes de jacarandá da Bahia sejam submetidas ao tratamento com álcool 70% por um minuto e ao NaClO por 15 minutos. As concentrações de BAP testadas nos explantes juvenis não foram satisfatórias para a cauligênese. Recomenda-se a concentração de 4,92 μM de AIB por contribuir no crescimento e desenvolvimento radicular sem prejudicar de forma severa o desenvolvimento das brotações.

Palavras-chave: Jacarandá da Bahia, Cultivo *in vitro*, Explantes juvenis, Fitorreguladores.

ABSTRACT

SANTOS, Maricélia Moreira dos. **Germination and morphogenesis *in vitro* of *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.** 2019. Dissertation (Masters in Forest Sciences) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Adviser: Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisers: José Carlos Lopes and Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

The Atlantic Forest is a biome of great importance that suffers from human actions, which can lead to the extinction of endemic species of great economic and ecological value, such as the Brazilian rosewood (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.). In order to aid in the multiplication of this remarkable species, this work aimed to study the *in vitro* germination and organogenesis of *Dalbergia nigra* using juvenile explants and phytohormones, in order to contribute to the conservation of the species. For disinfection and *in vitro* germination of *Dalbergia nigra* seeds, two experiments were carried out: 1. Different immersion times (0; 5; 10; 15; 20 and 25 minutes) in commercial sodium hypochlorite (NaOCl) (2.0-2.5% active chlorine), in a completely randomized design, where the NaOCl immersion times are the treatments, with four replicates of 25 seeds each, and 2. Different disinfectant agents, which were commercial NaOCl, hydrogen peroxide (H₂O₂), fungicide Captan SC and bactericidal Kasumin, performed in a completely randomized design, with seven treatments and four replicates of 10 seeds each. Woody Plant Medium - WPM was used in the germination and disinfection experiments. For the analysis of NaOCl toxicity in *Lactuca sativa* L., it was used five concentrations of NaOCl (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%), glyphosate solution (positive control) and distilled water (negative control), carried out in a completely randomized design, with five replicates of 25 seeds each. For *in vitro* cauligenesis of juvenile *Dalbergia nigra* explants, the seedlings grown *in vitro* were segmented into three explants of 1 cm each: caulinar apex, cotyledonary node and root. The explants were inserted in WPM medium supplemented with four concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) (0, 4.44, 8.88 and 13.32 µM), and were performed in a completely randomized design with a factorial 3x4 (explants x BAP), with four replicates of five explants per treatment. For *in vitro* rhizogenesis of *Dalbergia nigra* juvenile explants, cotyledonary node segments of normal *in vitro* grown seedlings were inserted into WPM culture medium with four concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) (0, 4.92, 9.84 and 14.76 µM), being conducted in a

completely randomized design, with four replicates of five explants per treatment. For greater disinfection and less damaging effects to the seedlings, it is recommended that Brazilian rosewood seeds be treated with 70% alcohol for one minute and NaOCl for 15 minutes. The concentrations of BAP tested in juvenile explants were not satisfactory for cauligenesis. The concentration of 4.92 μM of IBA is recommended because it contributes to growth and root development without severely harming the development of shoots.

Keywords: Brazilian rosewood, *In vitro* culture, Juvenile explants, Phyto regulators.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	Aspectos gerais de <i>Dalbergia nigra</i>	16
3.2	Propagação vegetativa <i>in vitro</i>	17
3.2.1	Explante.....	18
3.2.2	Desinfestação dos explantes.....	18
3.2.3	Meio nutritivo.....	19
3.2.4	Multiplicação dos explantes.....	21
3.3	Propagação vegetativa <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia</i> spp.....	22
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Desinfestação e germinação de sementes <i>in vitro</i> de <i>Dalbergia nigra</i>	24
4.1.1	Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> com diferentes tempos de imersão no NaClO.....	24
4.1.2	Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> com diferentes agentes desinfestantes.....	25
4.2	Toxicidade do NaClO em <i>Lactuca sativa</i> L.....	26
4.3	Cauligênese <i>in vitro</i> de explantes juvenis de <i>Dalbergia nigra</i>	27
4.4	Rizogênese <i>in vitro</i> de explantes juvenis de <i>Dalbergia nigra</i>	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i>	29
5.1.1	Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> com diferentes tempos de imersão no NaClO.....	29
5.1.2	Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Dalbergia nigra</i> com diferentes agentes desinfestantes.....	31
5.2	Toxicidade do NaClO em <i>Lactuca sativa</i> L.....	34
5.3	Cauligênese <i>in vitro</i> de explantes juvenis de <i>Dalbergia nigra</i>	36
5.4	Rizogênese <i>in vitro</i> de explantes juvenis de <i>Dalbergia nigra</i>	39
6	CONCLUSÕES.....	42
7	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é um bioma de grande importância devido a seu alto índice de biodiversidade e endemismo, mas que sofre com a pressão da urbanização, pois nele se encontram as maiores cidades do país, que concentram 70% da população brasileira (IBAMA, 2015).

O desmatamento pela expansão da agropecuária e catástrofes ambientais, como o rompimento das barragens de Fundão, em Mariana/MG em 2015, e na Mina Córrego do Feijão, em Brumadinho/MG em 2019, comprometem os já fragmentados e desconexos remanescentes de vegetação natural deste bioma, reduzindo-o a 12,4% da sua cobertura original, sendo classificado como um dos 25 *hotspots* de biodiversidade mundiais (MYERS, 2003; NASCIMENTO et al., 2005; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2018).

Algumas espécies endêmicas, sensíveis a alterações, e de grande valor econômico e ecológico encontram-se vulneráveis à extinção em consequência dessas perturbações, como a *Euterpe edulis* Mart. (palmito-juçara), a *Melanoxylon brauna* Schott. (braúna) e a *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (jacarandá da bahia) (BRASIL, 2014).

O jacarandá da Bahia (Leguminosae - Faboideae) é uma árvore bastante apreciada por ser matéria-prima de alta qualidade para a produção de móveis de luxo e instrumentos musicais, além de sua boa adaptação em terrenos de baixa fertilidade e situações de déficit hídrico, podendo ser usada para recuperação ambiental (GONÇALVES et al., 2014; MATOS; BORGES; SILVA, 2015).

O jacarandá da Bahia sofre com a exploração indiscriminada por sua madeira nobre e apresenta dificuldade propagativa, pois besouros curculionídeos da espécie *Troezon championi* (Lima) deposita seus ovos nas sementes, posteriormente consumidas pelas larvas, e suas plântulas são bastante apreciadas pelo roedor tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*) (SANTOS et al., 1992; CARVALHO, 2003).

Visando a mitigar o processo de extinção e auxiliar na multiplicação dessa espécie notável, tem-se a propagação *in vitro* como alternativa, pois pelo alto controle das condições ambientais, nutricionais e de agentes patogênicos, mudas advindas dessa técnica possuem alta qualidade fitossanitária e uniformidade na produção em tempo reduzido (REGUEIRA et al., 2018; SILVESTRI et al., 2018).

Diante dos grandes benefícios da propagação *in vitro* e a necessidade de estudos mais detalhados sobre o comportamento do jacarandá da bahia nessa

condição, objetivou-se estudar a germinação e a organogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. utilizando-se explantes juvenis e fitorreguladores e, assim, poder contribuir com a conservação da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a germinação e a organogênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. utilizando-se explantes juvenis e fitorreguladores.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Desinfestar e germinar *in vitro* sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.;
- ✓ Multiplicar *in vitro* explantes provenientes de plântulas de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. obtidas do processo de germinação *in vitro*;
- ✓ Enraizar *in vitro* brotações provenientes do processo de multiplicação *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais de *Dalbergia nigra*

O jacarandá da Bahia ou jacarandá caviúna (*Dalbergia nigra* (Vellozo) Allemão ex Bentham) é uma árvore leguminosa (Faboideae), com características de espécie secundária e se distribui na Floresta Atlântica dos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo considerada endêmica dessa região, que é classificada como um dos 25 *hotspots* de biodiversidade mundiais (CARVALHO, 2003; MYERS, 2003).

A *Dalbergia nigra* possui altura média entre 15 e 25 metros, tronco tortuoso a irregular, folhas compostas, alternadas, parimpenadas, contendo de 10 a 20 folíolos glabrescentes e floresce e frutifica em intervalos de 2 a 3 anos, em geral nos meses de agosto e setembro (RÊGO; POSSAMAI, 2003; LORENZI, 2016).

O fruto é um legume do tipo sâmara, oblongo, indeiscente, seco, de coloração castanha, rugoso e brilhoso, contendo de uma a duas sementes, cuja dispersão se dá pelo vento (anemocoria), e as sementes são oblongas, lisas, com coloração castanha, hilo bem demarcado, achatadas e pequenas, variando de 7,0 a 10,0 mm de comprimento por 5,9 a 8,8 mm de largura (BRAZ et al., 2009).

As sementes de jacarandá da Bahia são constantemente atacadas por besouros curculionídeos da espécie *Troezon championi* (Lima), que deposita seus ovos nelas e, posteriormente, são consumidas pelas larvas, e suas plântulas são bastante apreciadas pelo roedor tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*) (SANTOS et al., 1992; CARVALHO, 2003).

A madeira do jacarandá da Bahia possui densidade média de 0,85 g cm³, com cerne pardo-escuro arroxeadado e listras pretas, características bastante apreciadas pela indústria moveleira, de peças artesanais e de confecção de instrumentos musicais há mais de 300 anos e que, somados à exploração indiscriminada da espécie e fragmentação de seu habitat, a levou à condição de vulnerabilidade a extinção (MILLER; WIEMANN, 2006; BRASIL, 2014).

O jacarandá da Bahia é uma planta rústica, de grande importância, adaptada a condições de baixa fertilidade do solo e situações de déficit hídrico, além de ser uma leguminosa fixadora de N₂, apresentando grande potencial para recuperação de

áreas degradadas (DIAS et al., 2006; GONÇALVES et al., 2014; MATOS; BORGES; SILVA, 2015).

3.2 Propagação vegetativa *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas cuja premissa é a cultura de parte de alguma estrutura da planta (célula, órgão ou tecido), denominado explante, em um meio nutritivo adequado, sendo esse processo realizado em condições assépticas e controladas (KIELSE et al., 2009).

Com o rápido avançar da cultura de tecidos vegetais, é possível observar diversas aplicações, como a limpeza clonal, produção de variantes somaclonais, quebra de barreira de incompatibilidade genética, produção de plantas transgênicas, conservação de material genético e a propagação vegetativa *in vitro* (ALI et al., 2012).

A propagação vegetativa *in vitro* é uma técnica de multiplicação assexuada e vem sendo bastante utilizada nas últimas décadas, especialmente nos plantios de *Eucalyptus* sp., apresentando vantagens como a conservação de germoplasma, desenvolvimento de sementes sintéticas, diminuição no tempo e uniformidade de produção de mudas, entre outras (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013; REGUEIRA et al., 2018).

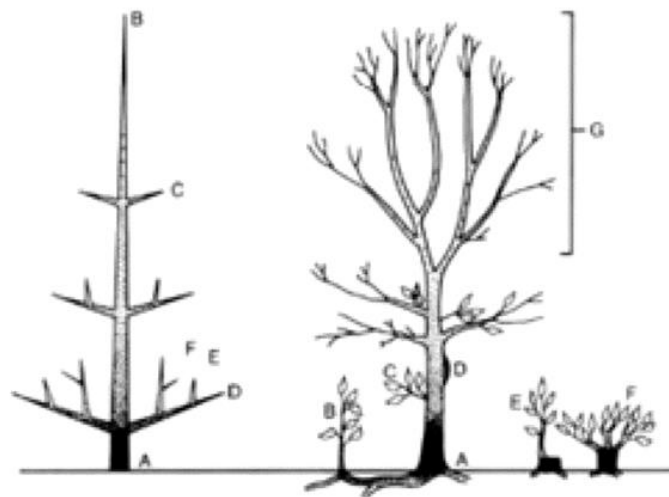
A necessidade de altos investimentos, treinamento especializado, constante risco de contaminação por microrganismos, além da necessidade de desenvolver um protocolo específico para cada espécie, faz com que a propagação vegetativa *in vitro* ainda seja pouco utilizada em espécies lenhosas, mesmo sendo uma alternativa para a superação de dificuldades na propagação seminal (XIAO; NIU; KOZAI, 2011; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

A propagação vegetativa *in vitro* divide-se em cinco estádios de desenvolvimento: seleção e preparação da planta-matriz; estabelecimento do explante em cultura asséptica; multiplicação do explante (formação de embriões ou brotações e posterior enraizamento); aclimatização das novas plantas (cultivo *ex vitro* em ambiente controlado); e transferência para as condições de cultivo adequadas a cultura em questão (GEORGE; DEBERGH, 2008).

3.2.1 Explante

O explante é alguma parte da planta (célula, órgão ou tecido), seja ela adulta ou jovem, seccionada para o cultivo em meio nutritivo, em condições assépticas e ambiente controlado, cuja escolha é influenciada por diversos fatores, principalmente em relação a sua idade ontogenética (ciclófise) ou posição em que o explante é colhido (topófise) (Figura 1) (XAVIER; COMÉRIO, 1996; CID; TEIXEIRA, 2015).

Figura 1. Gradientes de juvenilidade-maturidade que se inicia quase na base da árvore. Esquerda: o gradiente do estado juvenil em $A > F > E > D > C > B$. Direita: o gradiente do estado juvenil em $A > G$; B: broto originário de raízes adventícias; C: brotos epicórmicos; D: esferoblastos (adventícias); E - F: brotação de touças, onde B - F: representam brotações juvenis. Fonte: Higashi; Silveira; Gonçalves (2000).



Tecidos meristemáticos e tecidos mais jovens são preferíveis por responderem melhor na propagação vegetativa *in vitro*, uma vez que apresentam células com menor grau de diferenciação, podendo assim ser mais facilmente induzidas à morfogênese e produção de um novo indivíduo (SOUZA et al., 2011; PASQUAL et al., 2012).

3.2.2 Desinfestação dos explantes

A contaminação dos explantes é um dos maiores desafios do cultivo *in vitro*, pois sua erradicação é difícil e a condição nutricional do meio de cultura e do ambiente é favorável também ao crescimento de colônias de microrganismos que,

além de competirem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, podem ser patógenos ou excretarem substâncias tóxicas, e que acabam interferindo no desenvolvimento dos explantes, podendo levá-los à morte (OYEBANJI et al., 2009; COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA; OTONI, 2012).

Além dos microrganismos, o próprio processo de desinfestação pode ser prejudicial ao explante, pois, dependendo do agente desinfestante utilizado, é possível que este seja tóxico, a exemplo de alguns fungicidas, sendo necessárias avaliações de fitotoxidez (PASQUAL et al., 2012). Em geral, utiliza-se o álcool 70% e o hipoclorito de sódio (NaClO) ou hipoclorito de cálcio (Ca(OCl)₂), mas outros agentes desinfestantes também são recorrentes como o cloreto de mercúrio (HgCl₂), o ácido clorídrico (HCl) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A desinfestação atinge somente a parte externa do explante, podendo alguns microrganismos estar dentro do tecido e somente se manifestarem quando esse for disposto em meio de cultura, prejudicando a produção (COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA; OTONI, 2012).

Uma das técnicas para obter explantes com menor nível de contaminação é a germinação *in vitro* de sementes de plantas saudáveis, pois apresentam menor risco de contaminação endógena pela qualidade fitossanitária da planta matriz, somado ao fato de produzir tecidos juvenis, preferíveis na propagação *in vitro* quando comparado a explantes de plantas adultas, pela resposta mais eficiente quando dispostos em meio nutritivo adequado (SOUZA et al., 2011; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

3.2.3 Meio nutritivo

Diversos fatores passíveis de controle podem influenciar positiva ou negativamente o sucesso da propagação vegetativa *in vitro*, como a temperatura, umidade relativa, fotoperíodo, irradiância e qualidade espectral da sala de crescimento, a desinfestação do explante, mas o fator determinante para o bom desenvolvimento do explante é o meio nutritivo em que se encontra (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010).

O meio de cultura tem a importante função de fornecer ao explante as substâncias necessárias para que um novo indivíduo seja desenvolvido (CALDAS;

HARIDASAN; FERREIRA, 1998; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Essas necessidades variam de espécie para espécie, mas, em geral, o Woody Plant Medium - WPM (Quadro 1) tem mostrado resultados mais satisfatórios no cultivo *in vitro* de plantas lenhosas quando comparado a outros mais tradicionais, como o Murashige & Skoog - MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962; LLOYD; McCOWN, 1980; SANTOS-SEREJO et al., 2006; ROSSI; SARTORETTO, 2014).

Quadro 1. Composição do meio de cultura Woody Plant Medium - WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) (Sigma-Aldrich®)

	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
Macroelementos	Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	400
	Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	72,5
	Nitrato de cálcio monohidratado (Ca(NO ₃) ₂)	386,34
	Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	180,69
	Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	170
	Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	990
Microelementos	Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6,2
	Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,025
	Sal dissódico di-hidratado do ácido etilenodiaminotetracético (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O)	37,3
	Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8
	Sulfato de manganês monohidratado (MnSO ₄ .H ₂ O)	22,3
	Ácido molibdico (sal de sódio) (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,213
	Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6
Vitaminas	Mio-Inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	100
	Ácido nicotínico (ácido livre) (C ₆ H ₅ NO ₂)	0,5
	Piridoxina HCl (C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl)	0,5
	Cloridrato de tiamina (C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS.HCl)	1
Aminoácido	Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	2

O meio WPM possui essa melhor adaptação por ter sido desenvolvido para espécies lenhosas, possuindo macronutrientes menos concentrados em relação ao MS (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MELO et al., 1999). Deve-se atentar não somente à composição do meio de cultura, mas a outros compostos e suas concentrações, tais como o agente geleificante, a sacarose, fonte de carboidrato para o explante, e os reguladores de crescimento, muitas vezes responsáveis pelo sucesso na multiplicação dos propágulos (NERY et al., 2008; CHAGAS et al., 2009; PINHAL et al., 2011).

3.2.4 Multiplicação dos explantes

A propagação vegetativa *in vitro* pode ser conduzida de diversas formas, variando pelo tipo de explante usado até o objetivo a ser alcançado, destacando-se que nem sempre os tecidos são responsivos aos estímulos dos reguladores de crescimento, independente da concentração imposta, e que o excesso destes pode até inibir a formação dos tecidos desejados, sendo necessário um equilíbrio na interação de auxina e citocinina (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004; LEMOS, 2015).

As formas mais difundidas de propagação vegetativa *in vitro* são a proliferação de gemas axilares, especialmente com espécies lenhosas, a embriogênese somática e a proliferação de gemas adventícias por meio da organogênese (GOMES; CANHOTO, 2003; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A embriogênese somática consiste na formação de embriões a partir de células haploides (somáticas), sem fusão gametofítica, mas semelhantes aos embriões zigóticos, dando origem a uma planta normal (PINHAL et al., 2011; ZIMMERMANN, 2015).

A organogênese é um processo natural do desenvolvimento vegetal, em que há a formação associada de estruturas funcionalmente organizadas (parte aérea e raízes), mas que pode ser induzida em tecidos não meristemáticos, de forma direta (sem proliferação de calos) ou indireta (com proliferação de calos ou cultura de células em suspensão), podendo ser dividida em cauligênese e rizogênese (SOARES et al., 2007; LEMOS, 2015; TAIZ et al., 2017).

3.2.4.1 Cauligênese

A indução de novas gemas e brotos a partir de um explante pela organogênese, seja ela direta ou indireta, é denominada cauligênese (LEMOS, 2015). As citocininas, naturalmente sintetizadas localmente no nó ou nas raízes e transportadas para a parte aérea pelo xilema, desempenham papel importante nessa indução, agindo diretamente na quebra da dormência apical das gemas axilares por impedir a biossíntese do hormônio estrigolactona que, junto com as auxinas, atua na dominância apical do caule (TAIZ et al., 2017).

Existem diversos tipos de citocininas sintéticas, como o tidiazuron (TDZ), cinetina (CIN), 2-isopenteniladenina (2iP), porém a mais difundida por apresentar custo reduzido e resultados mais satisfatórios, por ser derivada de adenina e os tecidos vegetais metabolizarem mais rapidamente hormônios naturais, é a 6-benzilaminopurina (BAP) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3.2.4.2 Rizogênese

A indução de raízes a partir de um explante pela organogênese, seja ela direta ou indireta, é denominada rizogênese (LEMOS, 2015). Os principais hormônios envolvidos nessa indução são as auxinas, por formar um complexo que direciona o RNA a ativar enzimas, que resultam nos primórdios das raízes laterais nas plantas (HARTMANN et al., 2010).

A auxina sintética mais utilizada na propagação vegetativa *in vitro* é o ácido indol-3-butírico (AIB), por ser mais responsivo na promoção de raízes, quimicamente mais estável, possui maior aderência aos tecidos vegetais, se associando rapidamente com o ácido indol-3-acético (AIA) existente, sofrer menor degradação pela luz, além de ser menos fitotóxico (FOCHESATO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2009; LEMOS, 2015; TAIZ et al., 2017).

3.3 Propagação vegetativa *in vitro* de *Dalbergia* spp.

Os estudos sobre a propagação vegetativa *in vitro* de espécies do gênero *Dalbergia* começaram na década de 1980, com trabalhos importantes como o de Datta, Datta e Pramanik (1983). Os autores utilizaram explantes juvenis (plântulas provenientes de germinação *in vitro*) e adultos (segmentos nodais de árvores de 30 anos) de *Dalbergia sissoo* Roxb., sendo os juvenis não tão bem responsivos como os adultos. Diferentes tipos e concentrações de auxinas e citocininas foram utilizados e o melhor resultado foi a combinação de AIA (2,85 μM) e CIN (4,65 μM) em meio de cultura MS, com 100% dos brotos enraizados.

Outro trabalho pioneiro com o gênero foi o de Rao (1986), com *Dalbergia latifolia* Roxb., utilizando-se segmentos nodais de plantas adultas de 5-6 anos como

explantes. A melhor combinação de reguladores de crescimento analisada para a organogênese indireta nesse estudo foi de 22,20 μM de BAP e 2,68 μM de ácido 1-naftalenoacético (ANA), obtendo 40-46 brotos por explante num período de 15-21 dias.

A ação de agentes antioxidantes e desinfestantes em sementes de *Dalbergia nigra in vitro* com a presença ou ausência do tegumento, verificou-se na germinação, maiores respostas (73%), quando houve embebição em água por 8 horas, sem tegumento (MELLO, 1996). Este autor recomenda o peróxido de hidrogênio 40% para desinfestação, pois com ele houve maior germinação e menor oxidação do meio de cultura. Para a multiplicação, o nó cotiledonar em meio de cultura MS suplementado com 2,0 μM de BAP emitiu a maior média de brotações (2,7). Obteve-se melhor enraizamento das brotações (93,3%), quando se utilizou meio de cultura MS com metade da concentração total de sais suplementado com 4,0 μM de ANA.

Como um dos obstáculos da propagação *in vitro* é a oxidação dos explantes, Sartor et al. (2013) avaliaram a presença e ausência de complexantes (PVP) e antioxidantes (carvão ativado) em dois tipos de meio de cultura (MS e WPM), além de concentrações de BAP. Como explantes, utilizaram-se meristemas apicais e gemas axilares de plântulas de *Dalbergia nigra*. Não se obteve diferença significativa entre os meios de cultura e na diminuição da oxidação, nem com presença ou ausência de complexantes e antioxidantes.

Em outro estudo, Sartor et al. (2014) analisaram as respostas calogênicas induzidas em explantes de folíolos e raízes de *Dalbergia nigra* em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações dos reguladores de crescimento AIA (1; 5 e 10 μM), ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (1; 5 e 10 μM) e BAP (10 μM). Os autores observaram que explantes foliares em meio de cultura MS contendo 1 μM de AIA e 10 μM de BAP obteve a resposta de calos friáveis mais significativa, sendo recomendada para formação de novos brotos via organogênese indireta.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Universidade Federal do Espírito Santo, no município de Jerônimo Monteiro, Espírito Santo.

Foram utilizadas sementes maduras de *Dalbergia 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).

À exceção do experimento de toxicidade do NaClO em *Lactuca sativa* L., os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por lâmpadas de LED branca, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 27 ± 2 °C.

4.1 Desinfestação e germinação de sementes *in vitro* de *Dalbergia nigra*

4.1.1 Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra* com diferentes tempos de imersão no NaClO

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes cada. Em câmara de fluxo laminar, todas as sementes foram imersas em álcool 70% por um minuto e em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial (2,0-2,5% de cloro ativo) (Candura[®]) em tempos variados (0; 5; 10; 15; 20 e 25 minutos). Após a imersão das sementes em cada agente desinfestante, foi feita a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada durante 30 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm.

Foi disposta uma semente por tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD; McCOWN, 1980) (Sigma-Aldrich[®]), suplementado com 3% de sacarose (Dinâmica[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®]), com pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$ e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]), esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm.

Após 30 dias foram analisados: contaminação (%), germinação (%), sementes não germinadas (%), índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação (dias), plântulas normais (%), plântulas anormais (%), comprimento total (cm), número de folhas, diâmetro do colo (mm), e matéria seca total (mg). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias inicialmente comparadas por meio de regressão ($p < 0,05$), utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

4.1.2 Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra* com diferentes agentes desinfestantes

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições de 10 sementes cada. Em câmara de fluxo laminar, as sementes de cada tratamento foram imersas em álcool 70° por um minuto, seguido pela imersão nos agentes desinfestantes (Tabela 1), e, nos tratamentos com ausência de resíduo, realizou-se a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Os tratamentos foram constituídos de diferentes combinações de agentes desinfestantes: NaClO comercial (2,0-2,5% de cloro ativo) (Candura[®]), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Alphatec[®]), fungicida Captan SC (Adama[®]) e bactericida Kasumin (Arysta LifeScience[®]).

Quadro 2. Agentes desinfestantes, concentrações e tempos de imersão de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.

Tratamentos	Concentrações	Imersão (min)	Resíduo
NaClO	2,5%	15	ausência
Captan + Kasumin	2,5% + 1 mL L ⁻¹	5 + 10	ausência
Captan + Kasumin	2,5% + 1 mL L ⁻¹	5 + 10	presença
H ₂ O ₂	10% v/v	5	ausência
H ₂ O ₂	20% v/v	5	ausência
NaClO + H ₂ O ₂	2,5% + 10% v/v	15 + 5	ausência
NaClO + H ₂ O ₂	2,5% + 20% v/v	15 + 5	ausência

Para o estabelecimento, foi disposta uma semente por tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica[®]), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®]), com pH ajustado a 5,7 ± 0,1 e solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]), autoclavado durante 20 minutos à uma temperatura de 121 °C com pressão de 1 atm.

Após 30 dias foram analisados: contaminação (%), germinação (%), sementes não germinadas (%), índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação (dias), plântulas normais (%), plântulas anormais (%), comprimento de parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), matéria seca de parte aérea (mg), matéria seca de raiz (mg) e matéria seca total (mg). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2016).

4.2 Toxicidade do NaClO em *Lactuca sativa* L.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em que cinco concentrações de NaClO (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%), solução do herbicida glifosato (controle positivo) e água destilada (controle negativo) consistiram nos tratamentos, com cinco repetições de 25 sementes cada. Foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) da cultivar Manteiga (Feltrin Sementes[®]) para o teste de toxicidade.

As sementes foram dispostas em placas de Petri com papel Germitest[®], umedecido com 2,5 mL com solução de cada tratamento, que foram mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 27 ± 2 °C. A germinação foi contabilizada no espaço de oito em oito horas durante 48 horas.

Após 48 horas, foi analisado o índice de velocidade de germinação e aferido o comprimento de raiz (cm) com paquímetro digital. Foram selecionadas aleatoriamente dez plântulas de cada tratamento para a fixação em solução de metanol e ácido acético (3:1), posteriormente acondicionadas em freezer. Após 120 horas, foi aferido o comprimento de parte aérea (cm) das plântulas continuadas nas placas de Petri com paquímetro digital.

Para a determinação do índice mitótico, empregou-se a técnica de esmagamento (GUERRA; SOUZA, 2002), sendo que, em temperatura ambiente, as plântulas fixadas foram submetidas à tríplice lavagem com água destilada (10 minutos cada lavagem), imersas em solução de HCl 5N por 18 minutos e novamente em água destilada por 10 minutos.

Em lâmina para microscopia, foi retirada a coifa para a obtenção do meristema apical, adicionando-se orceína acética a 2%, cobrindo com lamínula e

pressionando o material. As lâminas foram observadas em microscópio com lente objetiva (Nikon® BE Plan 40x /0.65). Foram contabilizadas por observação de 1000 células por tratamento, contabilizando as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase, células em divisão, o índice mitótico (%) e alterações cromossômicas (%).

O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observadas, multiplicando por 100. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$), utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

4.3 Cauligênese *in vitro* de explantes juvenis de *Dalbergia nigra*

Plântulas crescidas *in vitro* foram segmentadas em três explantes de 1 cm cada: ápice caulinar, nó cotiledonar e raiz. Os explantes foram inseridos em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com 3% de sacarose (Dinâmica®), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®), com pH ajustado a 5,7±0,1 e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®), com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich®) (0; 4,44; 8,88 e 13,32 µM). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 3x4 (explantes x BAP), com quatro repetições de cinco explantes por tratamento.

Após 30 dias de cultivo foram analisados: número de brotos, número de folhas, altura de brotos (cm), matéria seca de brotos (mg), matéria seca de calos (mg) e matéria seca total (mg). Os dados foram submetidos à análise de variância e a interação foi analisada por meio de regressão ($p < 0,05$), as médias referentes aos tipos de explantes comparadas por teste de Tukey ($p < 0,05$) e as concentrações de BAP por meio de regressão ($p < 0,05$), utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

4.4 Rizogênese *in vitro* de explantes juvenis de *Dalbergia nigra*

Segmentos de nó cotiledonar de plântulas normais crescidas *in vitro* foram inseridos em tubos de ensaio com meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980)

suplementado com 3% de sacarose (Dinâmica[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®]), com pH ajustado a 5,7±0,1 e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]), com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) (Vetec[®]) (0; 4,92; 9,84 e 14,76 µM). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em que os tratamentos foram as concentrações de AIB (0; 4,92; 9,84 e 14,76 µM), com quatro repetições de cinco explantes por tratamento.

Após 30 dias de cultivo foram analisados: número de folhas, comprimento de brotos (cm), número de raízes, comprimento de raiz (cm), matéria seca de brotos (mg), matéria seca de raízes (mg), matéria seca de calos (mg) e matéria seca total (mg). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio de regressão (p<0,05), utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

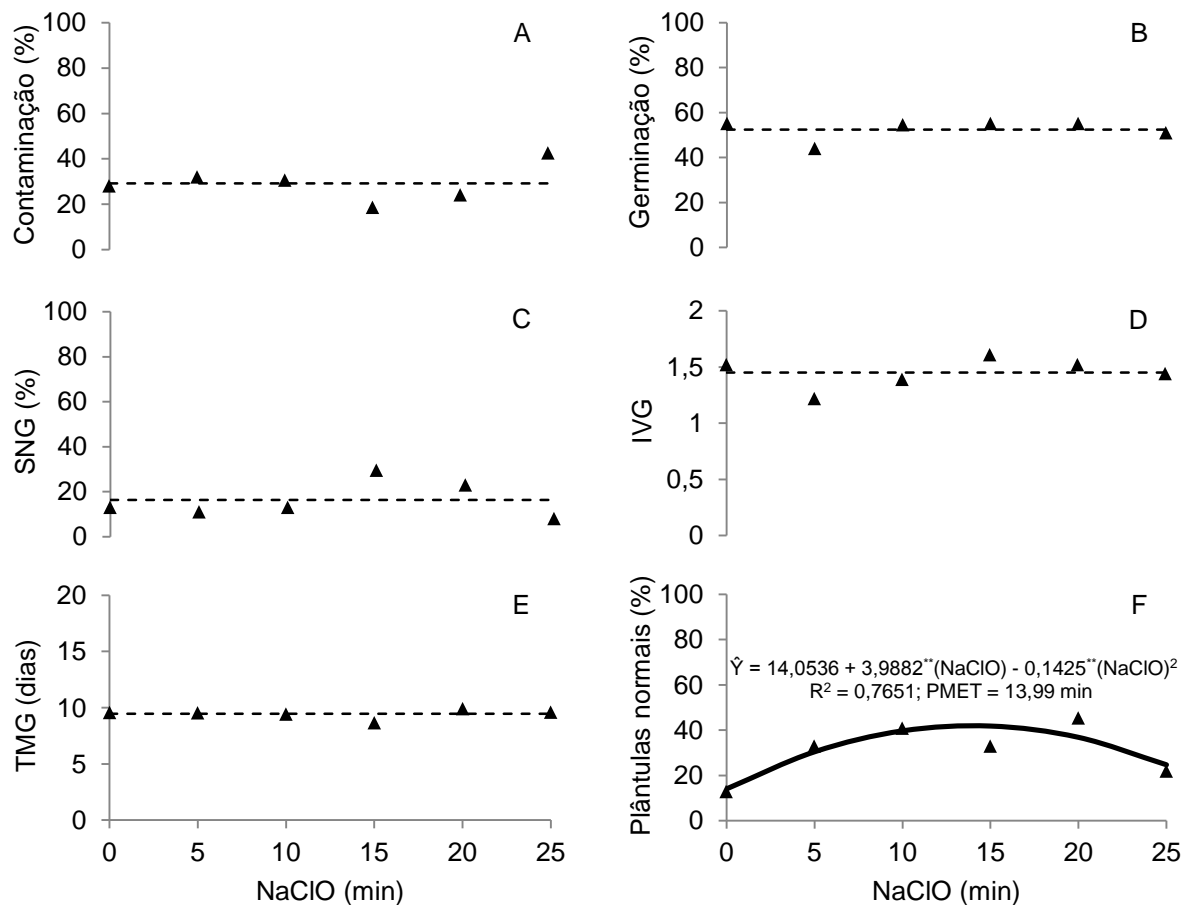
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra*

5.1.1 Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra* com diferentes tempos de imersão no NaClO

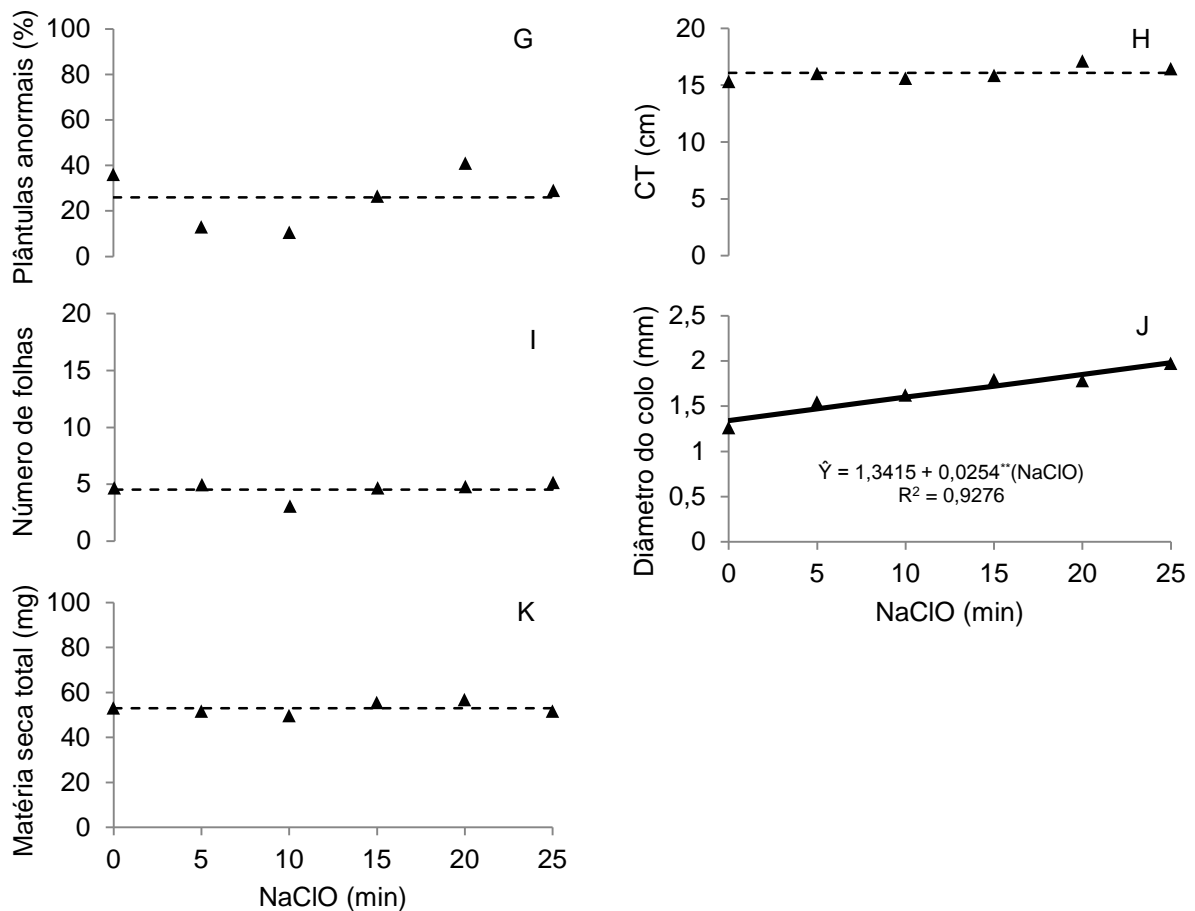
Houve diferença significativa, em nível de 5% de probabilidade, para as variáveis contaminação, sementes não germinadas, plântulas normais, plântulas anormais e diâmetro do colo (Figura 2).

Figura 2. (A) Contaminação (%), (B) germinação (%), (C) sementes não germinadas (%), (D) índice de velocidade de germinação (IVG), (E) tempo médio de germinação (TMG) (dias), (F) plântulas normais (%), (G) plântulas anormais (%), (H) comprimento total (CT) (cm), (I) número de folhas, (J) diâmetro do colo (mm) e (K) matéria seca total (mg) de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. após diferentes tempos de imersão de sementes em NaClO. *Significativo em nível de 5% de probabilidade. Obs.: PMET. Ponto de máxima eficiência técnica.



continua

continuação



A menor contaminação das sementes foi observada ao utilizar na desinfestação NaClO por 15 minutos. Verifica-se que o tempo de aproximadamente 14 minutos em NaClO foi o que permitiu atingir o maior percentual de plântulas normais, que foi de 41,95% (Figura 1.F). As sementes não germinadas apresentaram características de dormência e deterioração.

A contaminação observada foi 100% bacteriana, o tipo mais comum e problemático de contaminação, porque grande parte dos microrganismos encontra-se dentro dos explantes, o que dificulta sua eliminação (PASQUAL et al., 2012). Portanto, há necessidade de estudos utilizando outros agentes desinfestantes que atinjam uma maior variedade de microrganismos, de modo a possibilitar menor contaminação da semente, permitindo que a mesma expresse todo o seu potencial na formação de plântulas normais.

A média de germinação foi de 52,42% com a utilização de NaClO, similar ao observado por Mello (1996), em *Dalbergia nigra* com 55% de germinação utilizando-se como agente desinfestante *in vitro* o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Entretanto, quando comparado com o trabalho de Andrade et al. (2006), na condição *ex vitro*,

em que as sementes de *Dalbergia nigra* foram semeadas nos substratos rolo de papel, sobre papel e sobre vermiculita, e a germinação foi de 75,67%, esses valores são considerados baixos.

O NaClO adsorve na superfície da semente e mesmo após várias lavagens com água, o resíduo é suficiente para provocar reações com compostos orgânicos. Com o aumento do tempo de exposição ao produto, há mais resíduo adsorvido na semente, que reage com aminoácidos, gerando alta concentração de cloreto de amônio (NH_4CL) e dióxido de carbono (CO_2) no tubo de ensaio, além da hidrólise do NaClO produzir ácido hipocloroso (HClO), composto tóxico que leva a alterações celulares, fotossintéticas, entre outras, refletindo negativamente no desenvolvimento da plântula, observado no percentual de plântulas anormais nos tempos de 15; 20 e 25 minutos (ABDUL-BAKI, 1974; KANEKO; MOROHASHI, 2003; ANDRADE; ARAGÃO; FURLAN, 2009; GAMAGE et al., 2018).

5.1.2 Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Dalbergia nigra* com diferentes agentes desinfestantes

Com a finalidade de potencializar o número de plântulas normais e diminuir a alta porcentagem de contaminação, realizou-se o experimento II de desinfestação com a inclusão dos agentes desinfestantes peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Alphatec[®]), o fungicida Captan SC (Adama[®]) e o bactericida Kasumin (Arysta LifeScience[®]). Foi selecionado o tempo de 15 minutos de imersão no NaClO como um dos tratamentos do segundo experimento de desinfestação, por apresentar menor porcentagem de contaminação no experimento de desinfestação.

Houve diferença significativa, em nível de 5% de probabilidade, para as variáveis contaminação, comprimento da parte aérea, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e matéria seca total (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos de desinfestação sobre a germinação, vigor e crescimento *in vitro* de plântulas de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.

TRAT	CONT (%)	GER (%)	SNG (%)	IVG	TMG (dias)	PN (%)
T1	7,5 b ⁽¹⁾	87,5 ^{ns}	12,5 ^{ns}	1,095 ^{ns}	10,3 ^{ns}	75,0 ^{ns}
T2	15,0 b	72,5	27,5	0,932	10,8	65,0
T3	30,0 a	70,0	30,0	0,815	9,2	47,5
T4	20,0 a	87,5	12,5	0,870	11,1	72,5
T5	25,0 a	70,0	30,0	0,842	10,2	67,5
T6	12,5 b	75,0	25,0	0,985	10,3	65,0
T7	12,5 b	82,5	17,5	1,220	8,9	70,0

TRAT	PA (%)	CPA (cm)	CR (cm)	MSPA (mg)	MSR (mg)	MST (mg)
T1	12,5 ^{ns}	6,63 b	2,93 ^{ns}	8,04 a	31,45 a	39,49 a
T2	7,5	7,27 a	3,57	8,61 a	27,40 a	36,02 a
T3	22,5	8,33 a	4,12	8,78 a	30,94 a	39,72 a
T4	15,0	5,85 b	3,15	5,48 b	20,67 b	26,16 b
T5	2,5	6,54 b	3,18	4,87 b	30,54 a	35,42 a
T6	10,0	6,86 b	2,99	6,16 b	31,60 a	37,76 a
T7	12,5	7,95 b	4,54	8,44 a	29,65 a	38,09 a

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo. Abreviações: TRAT. Tratamentos (T1. Álcool 70° 1 min + NaClO 2,5% 15 min; T2. Álcool 70° 1 min + Captan® 0,5% 5 min + Kasumin® 1 mL L⁻¹ 10 min sem resíduo; T3. Álcool 70° 1 min + Captan® 0,5% 5 min + Kasumin® 1 mL L⁻¹ 10 min com resíduo; T4. Álcool 70° 1 min + H₂O₂ 10% 5 min; T5. Álcool 70° 1 min + H₂O₂ 20% 5 min; T6. Álcool 70° 1 min + NaClO 2,5% 15 min + H₂O₂ 10% 5 min; T7. Álcool 70° 1 min + NaClO 2,5% 15 min + H₂O₂ 20% 5 min); CONT. Contaminação (%); GER. Germinação (%); SNG. Sementes não germinadas (%); IVG. Índice de velocidade de germinação; TMG. Tempo médio de germinação (dias); PN. Plântulas normais (%); PA. Plântulas anormais (%); CPA. Comprimento de parte aérea (cm); CR. Comprimento de raiz (cm); MSPA. Matéria seca da parte aérea (mg); MSR. Matéria seca de raiz (mg); MST. Matéria seca total (mg).

Os tratamentos T1, T2, T6 e T7 alcançaram menores porcentagens de contaminação, não diferindo estatisticamente entre si. O T1, além de estar no grupo dos tratamentos com menor contaminação, apresentou plântulas com matéria seca de parte aérea, de raiz e total superiores, estatisticamente (Tabela 1). Essas são variáveis importantes, pois demonstram o bom crescimento dessas plântulas *in vitro*, condição necessária para obter resultados promissores no processo de aclimatização, especialmente no que se refere ao desenvolvimento radicular (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

Outro ponto a destacar é que somente o T1 apresentou valores superiores de matéria seca de parte aérea e inferiores de comprimento de parte aérea, sugerindo que as plântulas desse tratamento produziram crescimento radial e/ou folhas mais desenvolvidas que os outros tratamentos. Essa característica pode ser benéfica na aclimatização, pois evidencia maior rusticidade da plântula, que sofre com a perda de água, alterações na umidade relativa, temperatura e intensidade luminosa (SOUZA; COSTA; SILVA NETO, 2006; GEORGE; DEBERGH, 2008; ROCHA et al., 2008).

Muito se discute acerca do processo de desinfestação de explantes para a propagação *in vitro*. Com o gênero *Dalbergia* encontram-se trabalhos com a desinfestação de diversos explantes utilizando-se diferentes produtos, como o hipoclorito de sódio (MELLO, 1996; ALI et al., 2012), fungicidas (MELLO, 1996; VIBHA et al., 2014), ácido clorídrico (REHMAN et al., 2012) e, o mais comum, o cloreto de mercúrio (RAO, 1986; SITA; CHATTOPADHYAY; TEJEVATHI, 1986; RAI; CHANDRA, 1989; PRADHAN et al., 1998; PRADHAN; PATTNAIK; CHAND, 1998; SREEDEVI; PULLAIAH, 1999; PATTNAIK et al., 2000; SINGH et al., 2002; THIRUNAVOUKKARASU et al., 2010; BOGA; RAM; REDDY, 2012; VIBHA et al., 2014).

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) é um composto bastante solúvel em solventes orgânicos e altamente permeável nas membranas biológicas, mas extremamente nocivo por ser um agente neurotóxico, além de desencadear uma distribuição anormal dos cromossomos, que pode levar a doenças graves, muitas vezes hereditárias, não se recomendando a utilização desse produto como agente desinfestante (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007; BUENO et al., 2011).

O hipoclorito de sódio, similarmente, apresenta alta permeabilidade nas membranas biológicas, devido ao cloro, inibindo a proliferação de microrganismos, que somado ao baixo custo do produto, é bastante difundido na propagação *in vitro* (DONINI et al., 2005; OYEBANJI et al., 2009).

Recomenda-se para a desinfestação de sementes de *Dalbergia nigra* a imersão em álcool 70% por um minuto e em NaClO por 15 minutos. Contudo, houve a necessidade de analisar o nível de fitotoxicidade e citotoxicidade do NaClO em plantas, para observar possíveis alterações na germinação e proliferação celular (CHAROENYING; TEERARAK; LAOSINWATTAN, 2010).

5.2 Toxicidade do NaClO em *Lactuca sativa* L.

As sementes de *Lactuca sativa* L. são utilizadas para bioensaios por serem altamente sensíveis às condições do meio, muito por possuírem baixo tecido de reserva, fazendo com que absorvam com facilidade os compostos a que são submetidas (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; RODRIGUES et al., 2013). Somente no tratamento com a concentração mais baixa de NaClO (0,1%) houve germinação (Tabela 2), o que evidencia a fitotoxidez do produto.

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

Tratamentos	[] (%)	G (%)	IVG	CR (cm)	CPA (cm)
NaClO (%)	0,1	84	0,96	3,99 b	1,46 b
	0,5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	1,5	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
Água	-	98,4 a ⁽¹⁾	1,42 a	8,69 a	4,63 a
Glifosato	0,01	97,6 b	1,38 b	4,25 b	1,37 b
Tratamentos	[] (%)	I	P	M	A
NaClO (%)	0,1	954	21,2	14,2 a	9,4
	0,5	0	0 b	0 b	0 b
	1	0	0 b	0 b	0 b
	1,5	0	0 b	0 b	0 b
	2	0	0 b	0 b	0 b
Água	-	918 a	32 a	22 a	23,2 a
Glifosato	0,01	996 b	2,4 b	0,6 b	1,0 b
Tratamentos	[] (%)	T	CD	IM (%)	AC (%)
NaClO (%)	0,1	1,2	46	4,6	7,2
	0,5	0 b	0 b	0 b	0 ab
	1	0 b	0 b	0 b	0 ab
	1,5	0 b	0 b	0 b	0 ab
	2	0 b	0 b	0 b	0 ab
Água	-	3,8 a	81 a	8,11 a	0,6 a
Glifosato	0,01	0 b	4 b	0,4 b	0,4 b

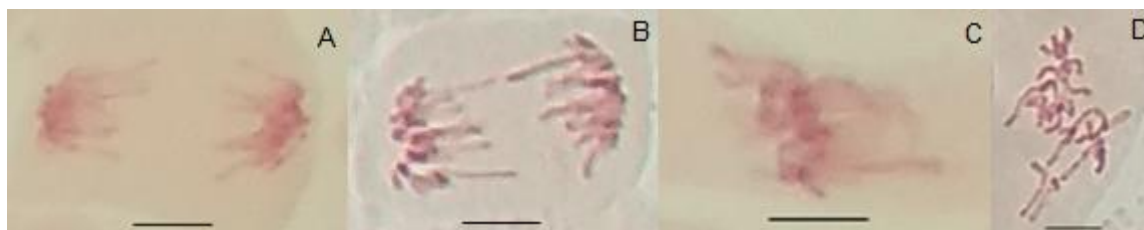
⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras indicam semelhança significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Legenda: []. Concentração (%). Obs.: NaClO. Hipoclorito de sódio; G. Germinação (%); IVG. Índice de velocidade de germinação; CR. Comprimento de raiz (cm); CPA. Comprimento de parte aérea (cm); I. Células em interfase; P. Células em prófase; M. Células em metáfase; A. Células em anáfase; T. Células em telófase; CD. Células em divisão; IM. Índice mitótico (%). AC. Alterações cromossômicas (%).

No comprimento de raiz e de parte aérea, a concentração de 0,1% de NaClO foi similar à testemunha glifosato. O glifosato é um herbicida sistêmico, usado como controle positivo em ensaios de fitotoxicidade e citotoxicidade, por agir diretamente sobre as raízes, de forma negativa e prolongada, além de apresentar genotoxicidade (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; RODRIGUES et al., 2013).

O NaClO retarda o processo de divisão celular, não chegando a ser tão nocivo quanto ao glifosato, cujo mecanismo de ação em plantas está relacionado com a enzima enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), interferindo na síntese do corismato, precursor imediato dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, e nos seres humanos tem tendência crescente de correlação com várias doenças degenerativas, especialmente com o aumento do autismo em crianças (NEVISON, 2014).

Entretanto, com o NaClO, há diminuição de células em divisão e no índice mitótico e gera efeitos clastogênico (ponte anafásica e quebra cromossômica) e aneugênico (perda e atraso na formação de cromossomos) nas células (Figura 3), o que explica os resultados inferiores nas variáveis germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de raiz e parte aérea (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010).

Figura 3. Células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* L. expostas ao NaClO 0,1% em (A) anáfase normal, com (B) ponte anafásica, em (C) metáfase normal e com (D) quebra cromossômica na metáfase com cromossomos isolados. Escala: 10 μ m.

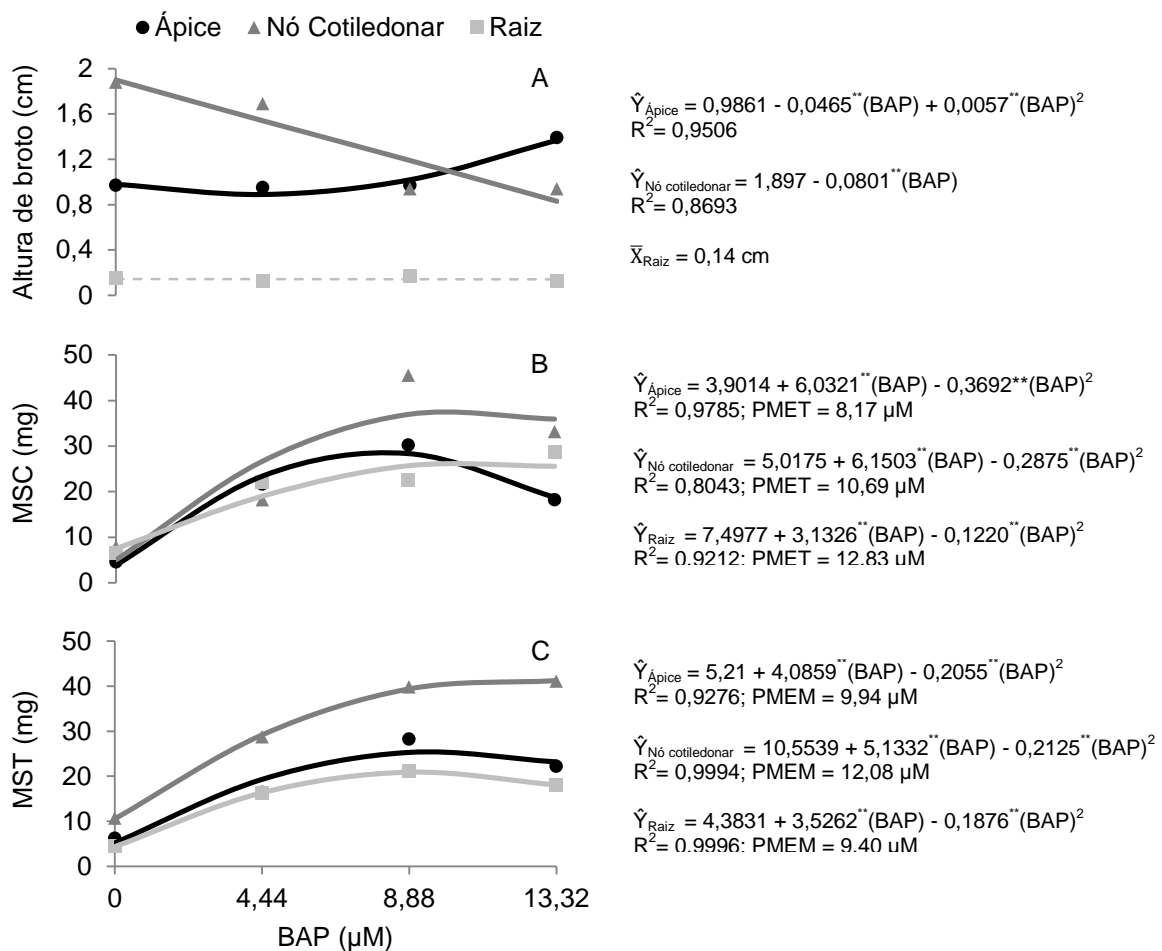


Este fato explica o alto número de plântulas anormais com a espécie *Dalbergia nigra* nos tratamentos com maior tempo de exposição ao NaClO, pois esse produto é de difícil remoção e, apesar dos tratamentos serem expostos à mesma concentração, o contato prolongado das sementes ao produto desencadeou quantidades elevadas de alterações celulares, o que reforça a necessidade da busca por um protocolo de desinfestação mais efetivo, porém, com menores efeitos danosos ao explante, como observado no presente estudo expondo as sementes de *Dalbergia nigra* por 15 minutos ao NaClO.

5.3 Cauligênese *in vitro* de explantes juvenis de *Dalbergia nigra*

Na interação entre o tipo de explante e a concentração de BAP no meio de cultura, houve diferença significativa, em nível de 5% de probabilidade, para as variáveis altura de broto, matéria seca de calo e matéria seca total (Figura 4).

Figura 4. (A) Altura de brotos, (B) matéria seca de calo e (C) matéria seca total de explantes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. **Significativo em nível de 5% de probabilidade. Abreviação: PMET. Ponto de máxima eficiência técnica.



É possível notar que houve um crescimento no alongamento do explante ápice em concentrações mais altas de BAP, todavia é importante observar que esse possui número de brotações baixo quando comparado ao explante nó cotiledonar, que tem uma tendência decrescente na altura dos brotos com a inserção de BAP no meio de cultura.

Isso pode ser explicado pelo alto nível de auxina no ápice, região de síntese desse hormônio determinante na dominância apical, e, com a aplicação de citocinina

exógena, há um maior equilíbrio pelo balanço hormonal. O explante nó cotiledonar, por estar situado próximo da zona de transição caule/raiz, apresenta maior equilíbrio entre os hormônios naturalmente e a aplicação de quantidades elevadas de reguladores de crescimento interfere negativamente.

No presente estudo, observou-se que a concentração de 8,88 μM de BAP é benéfica para a formação calogênica (Figura 4.B) em todos os explantes. Há a possibilidade de organogênese indireta, entretanto é necessário verificar o tipo de calo desenvolvido. Nos explantes analisados, os calos em sua maioria eram compactos, inviabilizando a organogênese indireta.

O explante nó cotiledonar apresentou valores superiores em todas as variáveis, obtendo maior sucesso em relação a outros explantes (Tabela 3), corroborando com os resultados de Mello (1996), além de outras espécies do gênero, como a *Dalbergia sissoo* Roxb., a *Dalbergia latifolia* Roxb. e a *Dalbergia paniculata* Roxb (PRADHAN et al., 1998; PRADHAN; PATTNAIK; CHAND, 1998; SREEDEVI; PULLAIAH, 1999).

Tabela 3. Explantes juvenis na cauligênese *in vitro* de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.

Explantes	NB	NF	AB (cm)	MSPA (mg)	MSC (mg)	MST (mg)
Apical	1,16 b ⁽¹⁾	0,29 ab	1,07 b	3,49 a	18,60 b	18,24 b
Nó cotiledonar	2,48 a	0,44 a	1,36 a	2,80 a	26,14 a	30,08 a
Raiz	0,28 c	0,26 b	0,15 c	0,63 b	19,97 b	15,23 b

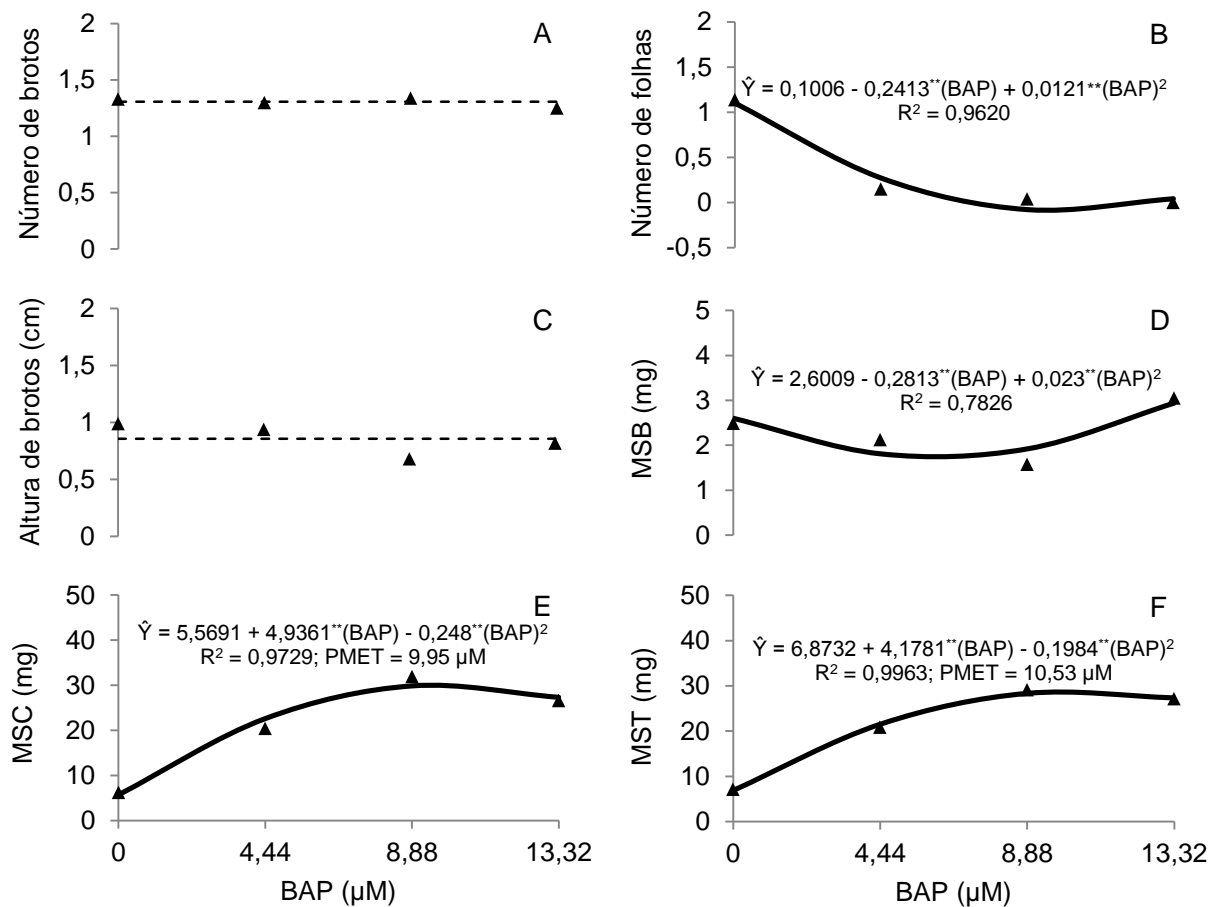
⁽¹⁾Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Abreviações: NB. Número de brotos; NF. Número de folhas; AB. Altura de broto (cm); MSPA. Matéria seca de parte aérea (mg); MSC. Matéria seca de calo (mg); MST. Matéria seca total (mg).

No geral, os explantes de plântulas são mais responsivos que os originados de plantas adultas, com certo destaque para o nó cotiledonar, pela eficiência e facilidade deste explante em promover brotos saudáveis e vigorosos devido à natureza proliferativa das gemas axilares sendo bastante usado atualmente na morfogênese de plantas lenhosas (DISTABANJONG; GENEVE, 1997; DANESHVAR-ROYANDEZAGH; KHAWAR; OZCAN, 2009; UGANDHAR et al., 2012; AZIZ et al., 2018; XIONG et al., 2018).

Uma das razões para esse sucesso do nó cotiledonar (2,48 brotos explante⁻¹) é que, além do tecido apresentar alto grau de juvenilidade, há a remoção do ápice caulinar e das raízes, regiões de síntese de auxinas e estrigolactonas, hormônios que controlam a dominância apical da planta (TAIZ et al., 2017). Com isso, as citocininas endógena e exógena (BAP) podem atuar com mais facilidade para a emissão de brotações pelas gemas axilares do nó cotiledonar.

A suplementação do meio de cultura com BAP resultou em diferença significativa, em nível de 5% de probabilidade, para as variáveis altura de brotos, número de folhas por broto, matéria seca de broto, matéria seca de calo e matéria seca total (Figura 5). A aplicação de BAP nas concentrações utilizadas não foi benéfica para a cauligênese de *Dalbergia nigra*.

Figura 5. (A) Número de brotos, (B) número de folhas por broto, (C) altura de brotos, (D) matéria seca de broto, (E) matéria seca de calo e (F) matéria seca total de explantes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina. **Significativo em nível de 5% de probabilidade. Abreviação: PMET. Ponto de máxima eficiência técnica.

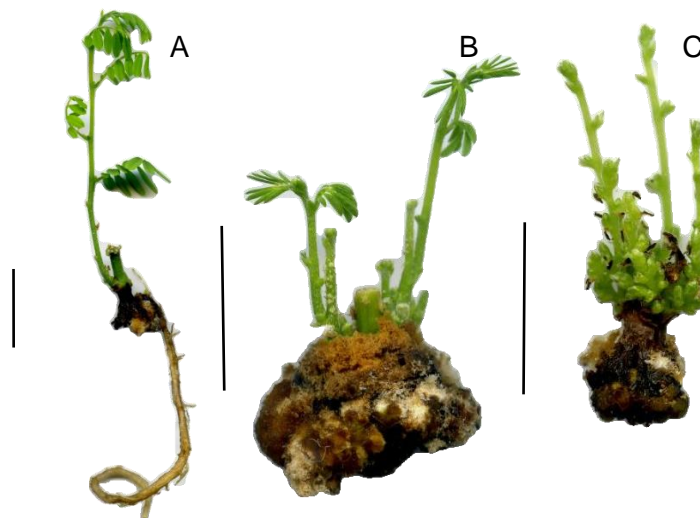


Houve uma queda na matéria seca de brotos, mas com leve aumento na maior concentração de BAP e uma queda significativa no número de folhas (Figura 5.B), evidenciando um baixo desenvolvimento das brotações com o aumento da citocinina exógena. Este comportamento também foi observado para outras espécies do mesmo gênero, *Dalbergia sissoo* Roxb. e *Dalbergia retusa* Hemsl., nas quais em maiores concentrações de BAP houve decréscimo significativo na formação de gemas e no número de brotos por explante (SINGH et al., 2002; CERDAS; GUZMÁN, 2004).

É necessário maiores investigações quanto à suplementação de meios de cultura com citocininas, uma vez que, em excesso, essas podem levar a respostas indesejadas para a cauligênese, como a falta de alongamento das brotações, redução no número de folhas e a vitrificação, além provocar alterações genéticas (NARAYANASWAMY, 1977; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em estudos anteriores com *Dalbergia nigra* observaram que a presença de BAP, associado a auxinas, no meio de cultura estimula a formação de calos, assim como em outras espécies do mesmo gênero, como a *Dalbergia latifolia* Roxb. e a *Dalbergia sissoo* Roxb. (RAI; CHANDRA, 1989; GULATI; JAIWAL, 1996; SARTOR et al., 2014). Isso pode ocorrer devido à citocinina ser promotora de divisão celular e o explante bastante juvenil, e, com a interferência no balanço auxina/citocinina levou à proliferação de calos (Figura 6), compactos ou friáveis (TAIZ et al., 2017).

Figura 6. Explantes de nó cotiledonar de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. após 30 dias de cultivo em meio de cultura com 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações (A) 0, (B) 4,44 e (C) 8,88. Escala: 1 cm.

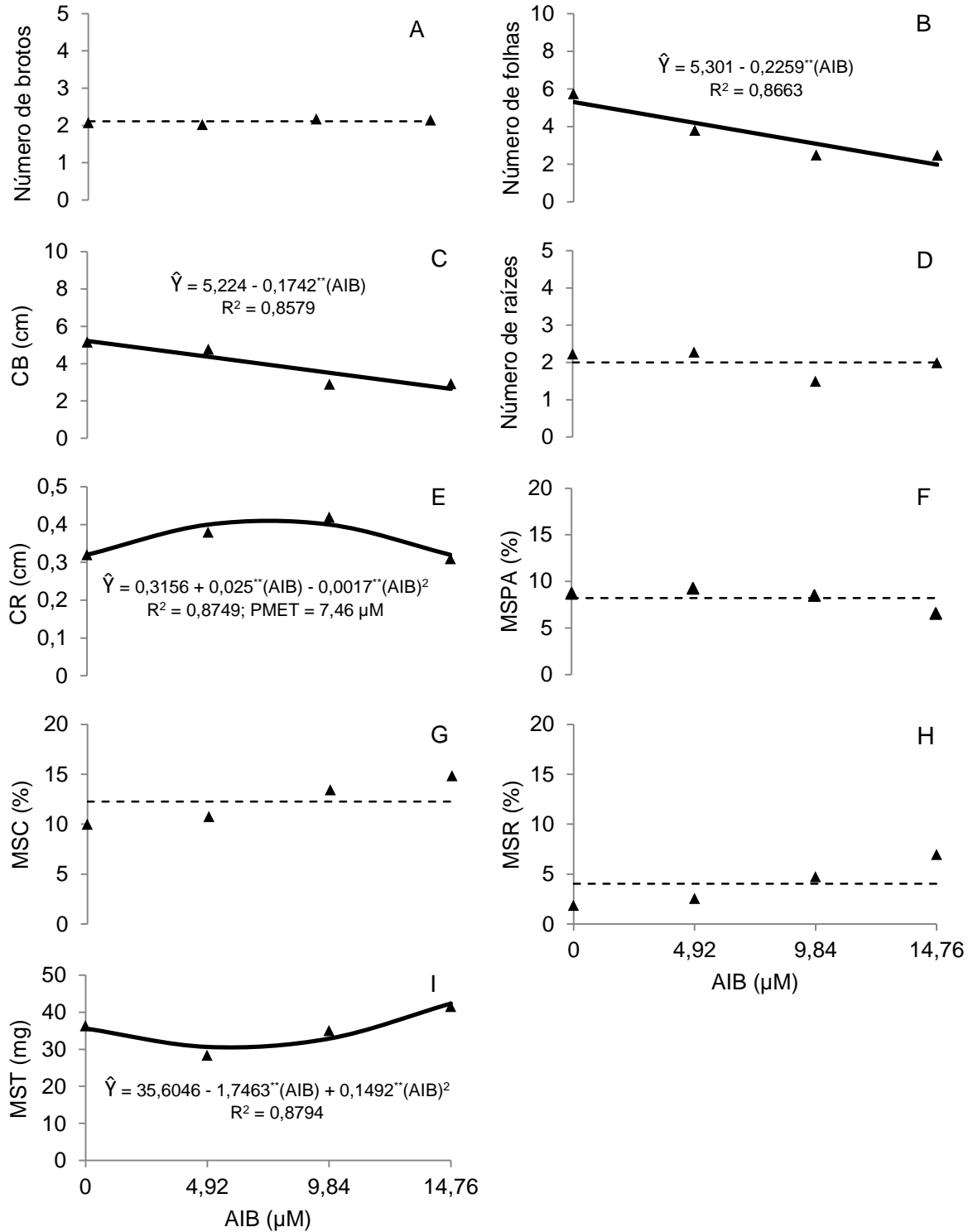


Portanto, as concentrações de BAP testadas nos explantes juvenis da espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. não foram satisfatórias para a cauligênese.

5.4 Rizogênese *in vitro* de explantes juvenis de *Dalbergia nigra*

Houve diferença significativa, em nível de 5% de probabilidade, para as seguintes variáveis: número de folhas, altura de brotos, comprimento de raiz, matéria seca da raiz e matéria seca total (Figura 7).

Figura 7. (A) Número de brotos, (B) número de folhas, (C) comprimento de broto (CB) (cm), (D) número de raízes, (E) comprimento de raiz (CR) (cm), (F) matéria seca de parte aérea (MSPA) (mg), (G) matéria seca de calo (MSC) (mg), (H) matéria seca de raiz (mg) e (I) matéria seca total (D) de brotos de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB). **Significativo em nível de 5% de probabilidade. Abreviação: PMET. Ponto de máxima eficiência técnica.



Nota-se uma queda na qualidade dos brotos com adição de AIB no meio de cultura, o que pode contribuir na aclimatização e depois no campo um crescimento

alométrico, ou seja, o desenvolvimento maior do sistema radicular em relação a parte aérea. Isso se dá devido à perda do controle homeostático pela alta concentração de auxina, que se torna extremamente tóxica para as células, por isso é essencial analisar o balanço auxina/citocinina para atingir o objetivo desejado (TAIZ et al., 2017). Contudo, somente o meio basal não estimula um bom enraizamento dos brotos de *Dalbergia nigra*, observado pelo menor comprimento e matéria seca de raiz estatisticamente inferior aos tratamentos com maior concentração de AIB.

O crescimento radicular foi maior nas concentrações 4,92 e 9,84 μM de AIB, corroborando com dados de Sita e Swamy (1993) para *Dalbergia latifolia* Roxb. É possível observar também que há um maior espessamento das raízes no tratamento com 14,76 μM de AIB, com baixo crescimento e maior matéria seca.

Outros autores também observaram esse comportamento nocivo do excesso de AIB em diferentes explantes de espécies do gênero *Dalbergia*, como em brotações juvenis de plantas adultas e em cotilédones de *Dalbergia sissoo* Roxb. e em gemas axilares de plantas juvenis e adultas de *Dalbergia latifolia* Roxb. (PRADHAN et al., 1998; SINGH et al., 2002; JOSHI et al., 2003; BOGA; RAM; REDDY; 2012).

A concentração de 4,92 μM de AIB determinou crescimento radicular sem prejudicar de forma severa o desenvolvimento das brotações (Figura 7.A, B, C). É possível que o nível auxínico do explante seja alto e, com pequeno estímulo exógeno já é possível obter o resultado esperado.

6 CONCLUSÕES

Para a maior desinfestação e menores efeitos danosos às plântulas, recomenda-se que as sementes sejam submetidas ao tratamento com álcool 70% por um minuto e ao NaClO comercial (2,0-2,5% de cloro ativo) por 15 minutos.

As concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) testadas em meio de cultura com explantes juvenis não são satisfatórias para a cauligênese.

Recomenda-se a concentração de 4,92 μM de ácido indol-3-butírico (AIB) em meio de cultura por contribuir no crescimento e desenvolvimento radicular, sem prejudicar de forma severa o desenvolvimento das brotações.

7 REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A. A. Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed disinfectant in ^{14}C incorporation studies. **Plant Physiology**, v. 53, p. 768-771, 1974.
- ALI, A.; RIZWAN, M.; MAJID, A.; SALEEM, A.; NAVEED, N. H. Effect of media type and explants source on micropropagation of *Dalbergia sissoo*: A tree of medicinal importance. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 9, p. 1742-1751, 2012.
- 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.
- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S.; FERNANDES, M. J.; CRUZ, A. P. M.; CARVALHO, A. S. R. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 517-523, 2006.
- ANDRADE, D. C. C.; ARAGÃO, C. C. V.; FURLAN, C. M. Avaliação da estabilidade físico-química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, utilizada pela FarmaUSCS, e de sua eficácia bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 21, p. 16-25, 2009.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 626-31, 2010.
- AZIZ, N. A.; TAN, B. C.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Efficient micropropagation protocol and genome size estimation of an important cover crop, *Mucuna bracteata* DC. ex Kurz. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 2, p. 267-278, 2018.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2062-2067, 2007.
- BOGA, A.; RAM, B.; REDDY, G. R. S. Effect of benzyl amino purine and gibberellic acid on *in vitro* shoot multiplication and elongation of *Dalbergia latifolia* Roxb.: An important multipurpose tree. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 597-602, 2012.
- 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**, Brasília, 14 dez. 2014. Seção 01, p. 121.
- BRAZ, M. S. S.; SOUZA, V. C.; ANDRADE, L. A.; BRUNO, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. B.; SILVA, J. M. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex. Benth) Leguminosae-Papilionoideae. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 67-71, 2009.
- BUENO, P. C.; RODRIGUES, J. C.; LEMOS, A. F.; MALASPINA, F. G.; MATSUI, C. T.; ROHLFS, D. B. Exposição humana a mercúrio: subsídios para o fortalecimento

das ações de vigilância em saúde. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 443-447, 2011.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. v. 1. 1039 p. (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras).

CERDAS, L. V.; GUZMÁN, L. A. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 52, n. 1, p. 41-46, 2004.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; BETTIOL NETO, J. E. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 231-236, 2009.

CHAROENYING, P.; TEERARAK, M.; LAOSINWATTAN, C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 411-416, 2010.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2015.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2012. p. 17-59.

CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 547-552, 2016.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.

DANESHVAR-ROYANDEZAGH, S.; KHAWAR, K. M.; OZCAN, S. *In vitro* micropropagation of garden thyme (*Thymbra Spicata* L. var. *spicata* L.) collected from Southeastern Turkey using cotyledon node. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 3, p. 1319-1321, 2009.

DATTA, S. K.; DATTA, K.; PRAMANIK, T. *In vitro* clonal multiplication of mature trees of *Dalbergia sissoo* Roxb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 1983.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; CORREIA, M. E. F.; ROCHA, G. P.; MOREIRA, J. F.; RODRIGUES, K. M.; FRANCO, A. A. Árvores fixadoras de nitrogênio e macrofauna do solo em pastagem de híbrido de *Digitaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 1015-1021, 2006.

- DISTABANJONG, K.; GENEVE, R. L. Multiple shoot formation from cotyledonary node segments of Eastern redbud. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, p. 247-254, 1997.
- DOMINI, L. P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A. P.; SOUZA, J. A.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FIGUEIREDO, L. S.; BONFIM, F. P. G.; FERRAZ, E. O.; CASTRO, C. E.; SOUZA, M. F.; MARTINS, E. R. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) em leito com umidade controlada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 33-36, 2009.
- FOCHESATO, M. L.; MARTINS, F. T.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F.; BARROS, I. B. I. Propagação de louro (*Laurus nobilis* L.) por estacas semilenhosas com diferentes quantidades de folhas e tratadas com ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 72-77, 2006.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2016-2017**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; INPE, 2018. 63 p.
- GAMAGE, D.; THOMPSON, M.; SUTHERLAND, M.; HIROTSU, N.; MAKINO, A.; SENEWEERA, S. New sights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. **Plant, Cell & Environment**, v. 41, p. 1233-1246, 2018.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G. J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, n. 3, p. 316-321, 2003.
- GONCALVES, E. O.; PAIVA, H. N.; NEVES, J. C. L.; KLIPPEL, V. H.; CALDEIRA, M. V. W. 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. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 43-76.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: Ed. FUNPEC, 2002. 131 p.

- GULATI, A.; JAIWAL, P. K. Micropropagation of *Dalbergia sissoo* from nodal explants of mature trees. **Biologia Plantarum**, v. 38, n. 2, p. 169-175, 1996.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIS, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. Nova Jersey: Prentice Hall, 2010. 915 p.
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONCALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus***: Princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Piracicaba: IPEF, 2000. v. 192. p. 1-11. (Circular Técnica IPEF)
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Laudo Técnico Preliminar**: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Brasília: MMA, 2015. 74 p.
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNİYAL, D. P. Studies on effect of nutrient media for clonal propagation of superior phenotypes of *Dalbergia sissoo* roxb. through tissue culture. **Silvae Genetica**, v. 52, p. 3-4, 2003.
- KANEKO, K.; MOROHASHI, Y. Effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, v.164, p. 287-292, 2003.
- KIELSE, P.; FRANCO, E. T. H.; PARANHOS, J. T.; LIMA, A. P. S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1098-1104, 2009.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.
- LEMONS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2015. p. 105-130.
- 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.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2016. v.1. 384 p.
- MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. L.; SILVA, L. J. 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.
- MELLO, L. N. C. **Micropropagação de *Dalbergia nigra* (Fr. Allem) a partir de sementes germinadas "*in vitro*"**. 1996. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1996.
- MELO, N. F.; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.

MILLER, R. B.; WIEMANN, M. C. **Separation of *Dalbergia nigra* from *Dalbergia spruceana***. Madison: US Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, 2006. (Research paper FPL-RP-632). 7 p.

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MYERS, N. Biodiversity hotspots revisited. **BioScience**, v. 53, n. 10, p. 916-917, 2003.

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 179-248.

NASCIMENTO, M. C.; SOARES, V. P.; RIBEIRO, C. A. A. S.; SILVA, E. Uso do geoprocessamento na identificação de conflito de uso da terra em áreas de preservação permanente na bacia hidrográfica do rio Alegre, Espírito Santo. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 2, p. 207-220, 2005.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M.; NERY, F. C.; SILVA, D. G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. **Cerne**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2015.

NEVISON, C. D. A comparison of temporal trends in United States autism prevalence to trends in suspected environmental factors. **Environmental Health**, v. 13, n. 73, p. 1-16, 2014.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OYEBANJI, O. B.; NWEKE, O.; ODEBUNMI, O.; GALADIMA, N. B.; IDRIS, M. S.; NNODI, U. N.; AFOLABI, A. S.; OGBADU, G. H. Simple, effective and economical explant- surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 5395-5399, 2009.

PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A. R. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2012. p. 61-161.

PATTNAIK, S.; PRADHAN, C.; NAIK, S. K.; CHAND, P. K. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from hypocotyl-derived cell suspensions of a tree legume, *Dalbergia sissoo* Roxb. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 407-411, 2000.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PRADHAN, C.; PATTNAIK, S.; CHAND, P. K. Rapid *in vitro* propagation of East Indian Rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.) through high frequency shoot proliferation from cotyledonary nodes. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 61-64, 1998.

PRADHAN, C.; PATTNAIK, S.; DWARI, M.; PATTNAIK, S. N.; CHAND, P. K. Efficient plant regeneration from cell suspension-derived callus of East Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 138-142, 1998.

RAI, V. R.; CHANDRA, K. S. J. Micropropagation of indian rosewood by tissue culture. **Annual Botany**, v. 64, p. 43-46, 1989.

RAO, K. S. Plantlets from somatic callus tissue of the East Indian Rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 199-201, 1986.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Vellozo) Leguminosae - Papilionoidae**: produção de mudas. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 3 p. (Série Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 106). 3 p.

REGUEIRA, M.; RIAL, E.; BLANCO, B.; BOGO, B.; ALDREY, A.; CORREA, B.; VARAS, E.; SÁNCHEZ, C.; VIDAL, N. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. **Trees**, v. 32, n. 1, p. 61-71, 2018.

REHMAN, H. M.; RANA, I. A.; IJAZ, S.; MUSTAFA, G.; JOYIA, F. A.; KHAN, I. A.; PIJUT, P. M. In vitro regeneration of *Dalbergia sissoo* Roxb. and the potential for genetic transformation. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 40, n. 2, p. 140-147, 2012.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; PAZIN, M.; MASELLI, B. S.; BEIJO, L. A.; KUMMROW, F. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1099-1108, 2013.

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, p. 45-52, 2014.

SANTOS, G. P. N.; ANJOS, N.; ZANUNCIO, J. C.; RAMOS, M. I. Danos por *Troezon championi* Lima, 1935 (Coleoptera: Curculionidae), em sementes de Jacarandá Caviúna (*Dalbergia nigra*) (Leguminosae). **Científica**, v. 20, p. 157-163, 1992.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa/CNPMF, 2006. p. 79-98.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Morfogênese *in vitro* em explantes foliares e radiculares de jacarandá da Bahia. **Agrotecnologia**, v. 5, n. 2, p. 82-93, 2014.

SILVESTRI, C.; SABBATINI, G.; MARANGELLI, F.; RUGINI, E.; CRISTOFORI, V. Micropropagation and *ex vitro* rooting of wolfberry. **HortScience**, v. 53, n. 10, p. 1494-1499, 2018.

SINGH, A. K.; CHAND, S.; PATTNAIK, S.; CHAND, P. K. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber yielding tree legume. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 203-209, 2002.

SITA, G. L.; SWAMY, B. V. R. Regeneration of plantlets from leaf disc cultures of rosewood: control of leaf abscission and shoot tip necrosis. **Plant Science**, v. 88, p. 107-112, 1993.

SITA, G. L.; CHATTOPADHYAY, S.; TEJEVATHI, D. H. Plant regeneration from shoot callus of rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 266-268, 1986.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA NETO, H. P. Aclimatização. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa/CNPMP, 2006. p. 131-140.

SOUZA, L. S.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.

SREEDEVI, E.; PULLAIAH, T. *In vitro* plantlet regeneration from seedling explants of *Dalbergia paniculata* Roxb. In: KAVIKISHOR, P. B. (Ed.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology: Emerging trends**. Hyderabad: Universities Press, 1999. p. 112-117.

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

THIRUNAVOUKKARASU, M.; PANDA, P. K.; NAYAK, P.; BEHERA, P. R.; SATPATHY, G. B. Effect of media type and explant source on micropropagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. - An important multipurpose forest tree. **International Research Journal of Plant Science**, v. 1, n. 6, p. 155-162, 2010.

UGANDHAR, T.; VENKATESHWARLU, M.; SAMMAILAH, D.; REDDY, K. J. M. Rapid *in vitro* micropropagation of chick pea (*Cicer arietinum* L.) from shoot tip and cotyledonary node explants. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 2, n. 6, p. 1-6, 2012.

VIBHA, J. B.; SHEKHAWAT, N. S.; MEHANDRU, P.; DINESH, R. Rapid multiplication of *Dalbergia sissoo* Roxb.: a timber yielding tree legume through axillary shoot proliferation and *ex vitro* rooting. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, n. 1, p. 81-87, 2014.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal** - Princípios e Técnicas. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2013. 280 p.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

XIONG, H.; SUN, H.; ZOU, F.; FAN, X.; NIU, G.; YUAN, D. Micropropagation of chinquapin (*Castanea henryi*) using axillary shoots and cotyledonary nodes. **HortScience**, v. 53, n. 10, p. 1482-1486, 2018.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2015. p. 69-104.