

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ESTABELECIMENTO DE SISTEMAS DE REGENERAÇÃO *IN*
***VITRO* DE FLAMBOYANT [*Delonix regia* (Bojer ex Hook)**
Raf.]

Andrey de Oliveira Costa
Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto
Prof^a. Dr^a. Danielle Fabíola Pereira da Silva

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Abril – 2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:


Nome completo do autor: Andrey de Oliveira Costa

Título do trabalho: ESTABELECIMENTO DE SISTEMAS DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE FLAMBOYANT [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]

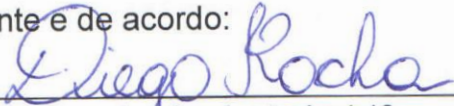
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 02 / 05 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**ESTABELECIMENTO DE SISTEMAS DE
REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE FLAMBOYANT [*Delonix*
regia (Bojer ex Hook) Raf.]**

Andrey de Oliveira Costa

Orientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto
Profa. Dra. Danielle Fabíola Pereira da Silva

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Goiás – Regional Jataí, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Produção Vegetal)

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Abril – 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa, Andrey De Oliveira

Estabelecimento de sistemas de regeneração in vitro de flamboyant [Delonix regia (Bojer ex Hook) Raf.] [manuscrito] / Andrey De Oliveira Costa. - 2019.

8, 82 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha; co-orientador Dr. Antônio Paulino da Costa Netto; co-orientador Dr. Danielle Fabíola Pereira da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Jataí, 2019.

Bibliografia.

Inclui fotografias, gráfico.

1. Micropropagação. 2. Organogênese in vitro. 3. Embriogênese somática. 4. Fabaceae. 5. Royal Poinciana. I. Rocha, Diego Ismael, orient. II. Título.

CDU 632



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANDREY DE OLIVEIRA COSTA. Ao quinto dia do mês de abril do ano de dois mil e dezanove (05/04/2019), às 14:00 horas, reuniu-se no prédio da Pós-graduação da Regional Jataí da UFG, a banca examinadora, composta pelos Professores Doutores: Diego Ismael Rocha (Orientador), Givanildo Zildo da Silva (Membro Interno) e Leandro Silva de Oliveira (Membro Externo) para, sob a presidência do primeiro, procederem na forma da resolução vigente a Defesa de Dissertação” do discente ANDREY DE OLIVEIRA COSTA, do Programa de Pós-graduação em AGRONOMIA, curso de Mestrado, área de concentração em Produção Vegetal. A Prova oral versou sobre o tema de sua dissertação com o título: “Estabelecimento de sistemas de regeneração *in vitro* DE flamboyant [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]”. A sessão foi aberta pelo Presidente da banca examinadora, Prof. Dr. Diego Ismael Rocha, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, entre 30 e 45 minutos procedeu a apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o examinando, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo em vista a Resolução nº.1143/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Agronomia, a Comissão Examinadora emitiu seu parecer sobre a defesa realizada pelo discente, considerando-o: (X) APROVADO () REPROVADO por unanimidade, para fins da obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA pela Universidade Federal de Goiás. Lembrando que o encerramento deste processo avaliativo se dará após a entrega da versão definitiva da dissertação com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, em um prazo máximo de 30 dias, bem como a entrega do artigo científico ou comprovante de submissão do mesmo em periódico nacional e, ou, internacional. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16:36 horas, o Prof. Dr. Diego Ismael Rocha, Presidente da banca examinadora encerrou a sessão, e para constar, lavrou-se a ATA, assinada em duas vias de igual teor.

Prof. Dr. Diego Ismael Rocha
Presidente da Banca

Prof. Dr. Givanildo Zildo da Silva
Membro Interno da Banca

Prof. Dr. Leandro Silva de Oliveira
Membro Externo da Banca

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDREY DE OLIVEIRA COSTA – Filho de Lívio de Assis Costa e Valéria Leite Oliveira Costa, nascido na capital de Goiás, Goiânia, em 10 de abril de 1990. Em 2010 ingressou na Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, onde obteve o título de Engenheiro Florestal em 2016. Em julho desse mesmo ano trabalhou com avaliação e análise fitossanitária de florestas, monitoramento de incêndios, controle integrado de pragas e controle de qualidade silvicultural, em Três Lagoas no Mato Grosso do Sul. Em março de 2017 iniciou o mestrado, no curso de Pós-Graduação em Agronomia na Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí. Em 2019 submeteu a dissertação intitulada 'Estabelecimento de sistemas de regeneração *in vitro* de flamboyant [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]' para apreciação e defesa.

Ao meus pais e irmãos,

Lívio de Assis, Valéria Leite, Letícia de Oliveira, Alexandre de Oliveira

Ao meus amigos e conselheiros,

Pedro Henrique Franco e Diego Ismael Rocha,

dedico

AGRACEDIMENTOS

Agradeço primeiramente ao senhor JESUS por me mostrar, guiar, proteger e abençoar durante toda minha vida e nesses dois anos, nos bons e difíceis momentos.

Aos meus queridos pais, que sempre acreditaram e ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional. Sem vocês, eu não teria conseguido.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí por fornecer as condições para o meu aperfeiçoamento, melhoria e qualificação profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Ismael Rocha, por todos os conselhos, orientação, confiança, conhecimento compartilhado, amizade e paciência ao longo desses anos de convivência e trabalho, será sempre um grande amigo.

Á meu Coorientador Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto, pelos conhecimentos repassados, orientações e apoio.

Ao Prof. Dr. Givanildo Zildo da Silva e Prof. Dra. Danielle Fabíola Pereira da Silva pela ajuda, ensinamentos e apoio na pesquisa.

Á todos os professores do programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG/Jataí, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Á todos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, especialmente, Isabella, Cássio, Mirelle, Victor, Karmine e Reiner.

Á Iazara pela amizade, apoio e auxílio e conhecimentos práticos, durante a implantação, condução e avaliação dos experimentos.

Á Dra. Mariana Machado pela disponibilidade, conselhos, conhecimento e ajuda em todos os momentos que necessitei, muito obrigado.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Agronomia, em especial a Raissa e Ciro pela amizade, conselhos e apoio

Á todos os meus familiares, melhores amigos e colegas que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, de longe ou perto.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

| | Pagina |
|--|--------|
| ESTABELECIMENTO DE SISTEMAS DE REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE FLAMBOYANT [<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook) Raf.]..... | i |
| RESUMO | i |
| ABSTRACT..... | i |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 1 |
| 1.1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 1 |
| 1.2.1. A importância dos métodos de propagação e melhoramento para espécies lenhosas da família Fabaceae. | 4 |
| 1.2.2. Tipo de explante e protocolo de desinfestação de sementes de espécies lenhosas..... | 5 |
| 1.2.3. Meio de cultura | 7 |
| 1.2.4. Reguladores de Crescimento..... | 8 |
| 1.2.5. Organogênese <i>in vitro</i> | 8 |
| 1.2.6. Embriogênese somática | 9 |
| 1.2.7. Aclimatação e Enraizamento | 10 |
| 1.2.8. Transformação genética | 11 |
| 1.3. PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES | 12 |
| 1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 18 |
| CAPÍTULO 2 - INDUÇÃO DE MULTIBROTAÇÕES E ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE ÁPICES CAULINARES E COTILÉDONES DE FLAMBOYANT | 26 |
| RESUMO | 26 |
| ABSTRACT..... | 27 |
| 2.1. INTRODUÇÃO..... | 28 |
| 2.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 2.2.1. Material Vegetal..... | 30 |
| 2.2.2. Germinação <i>in vitro</i> e obtenção de explantes..... | 30 |
| 2.2.3. Indução de multibrotações e organogênese <i>in vitro</i> | 30 |
| 2.2.4. Parâmetros morfométricos..... | 31 |
| 2.2.5. Análise histológica | 32 |
| 2.3. RESULTADOS..... | 33 |
| 2.3.1. Indução de multibrotações a partir de ápices caulinares de <i>D. regia</i> ... | 33 |

| | | |
|---|---|----|
| 2.3.2. | Citocininas afetam a largura e espessura foliolular de vitroplantas de <i>D. regia</i> . | 34 |
| 2.3.3. | Organogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes cotiledonares | 36 |
| 2.3.4. | Citocininas influenciam na proliferação celular e formação de gemas em cotilédones de vitroplantas de <i>D. regia</i> . | 38 |
| 2.4. | DISCUSSÃO | 39 |
| 2.5. | CONCLUSÕES | 42 |
| 2.6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |
| CAPÍTULO 3 - 6-BENZILADENINA E CINETINA INDUZEM DIFERENTES RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS EM SEGMENTOS COTILEDONARES DE FLAMBOYANT | | |
| | RESUMO | 47 |
| | ABSTRACT | 48 |
| 3.1. | INTRODUÇÃO | 49 |
| 3.2. | MATERIAIS E MÉTODOS | 50 |
| 3.2.1. | Material Vegetal | 50 |
| 3.2.2. | Obtenção dos explantes e indução da organogênese <i>in vitro</i> | 50 |
| 3.2.3. | Parâmetros morfogênicos | 51 |
| 3.3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 3.4. | CONCLUSÕES | 55 |
| 3.5. | REFERÊNCIAS | 56 |
| CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE COTILÉDONES DE <i>Delonix regia</i> (BOJER EX HOOK) RAF. EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO | | |
| | RESUMO | 58 |
| | ABSTRACT | 59 |
| 4.1. | INTRODUÇÃO | 60 |
| 4.2. | MATERIAL E MÉTODOS | 61 |
| 4.2.1. | Material vegetal e obtenção dos explantes | 61 |
| 4.2.2. | Indução de embriogênese somática | 62 |
| 4.2.3. | Ganho de massa | 63 |
| 4.2.4. | Análise histológica | 63 |
| 4.2.5. | Análises Bioquímicas | 64 |
| 4.2.6. | Quantificação de Carboidratos totais | 64 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.2.7. | Quantificação de lipídeos totais | 64 |
| 4.2.8. | Quantificação de proteínas | 65 |
| 4.3. | RESULTADOS..... | 65 |
| 4.3.1. | Desenvolvimento das respostas morfogénicas..... | 65 |
| 4.3.2. | GAs não induzem respostas morfogénicas em cotilédones maduros de <i>D. regia</i> | 67 |
| 4.3.3. | Caracterização estrutural..... | 67 |
| 4.3.4. | Análises bioquímicas | 70 |
| 4.4. | DISCUSSÃO | 72 |
| 4.5. | CONCLUSÕES | 75 |
| 4.6. | CONSIDERAÇÕES GERAIS | 75 |
| 4.7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 77 |

ESTABELECIMENTO DE SISTEMAS DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE FLAMBOYANT [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]

RESUMO – Protocolos de embriogênese somática e organogênese *in vitro* têm sido estabelecidos para diversas espécies lenhosas a fim de possibilitar a propagação e entender os processos morfofisiológicos das mesmas. *Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf, popularmente conhecida como flamboyant, é uma espécie arbórea da família Fabaceae utilizada na arborização e paisagismo urbano. O presente trabalho objetivou estabelecer sistemas de regeneração para *D. regia* e investigar os aspectos morfofisiológicos envolvidos nesses processos. Foram conduzidos experimentos com duas fontes de explantes: ápices caulinares e cotilédones cultivados em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA), para a indução de multibrotações e organogênese *in vitro*, respectivamente. Ao final do experimento observou-se que a concentração de 2 mg.L⁻¹ de BA induziu a maior porcentagem de respostas morfogenéticas, Além disso usou-se cinetina (KIN) ou BA em cotilédones a fim de comparar a responsividade das mesmas, com as melhores respostas sendo obtida também com 2 mg.L⁻¹ de 6-benziladenina (BA). Afim de avaliar o potencial de segmentos cotiledonares em induzir respostas morfogenéticas avaliou-se, também, caracteres bioquímicos, anatômicos e fisiológicos de embriões zigóticos imaturos (EZI), cotilédones maduros (CM) e de cotilédones derivados de plântulas (CP), quando cultivados em meio MS com alta razão de auxina / citocinina. Os cotilédones apresentaram respostas morfogenéticas diferentes após o período de indução. EZI e CP induziram a formação de calos embriogênicos, CM não apresentaram nenhuma resposta morfogenética. Alterações estruturais, e a dinâmica de mobilização de reservas dos diferentes explantes avaliados foram caracterizadas. Apesar de vitroplantas não terem sido obtidas ao final, acredita-se que o estudo poderá contribuir para o estabelecimento de sistemas de regeneração e micropropagação de espécies de leguminosas lenhosas.

Palavras-chave: Micropropagação, organogênese *in vitro*, embriogênese somática, Fabaceae, Royal Poinciana

ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* REGENERATION SYSTEMS OF FLAMBOYANT [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]

ABSTRACT - Protocols of somatic embryogenesis and organogenesis *in vitro* have been determined for several species of plants and can be propagated and understood as morphophysiological processes of the same. *Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf, popularly known as flamboyant, is a tree species of the Fabaceae family in afforestation and urban landscaping. The present work aimed to establish regeneration systems to investigate the morphophysiological aspects and processes. Experiments were carried out with two sources of explants: proteins and diets grown in Murashige and Skoog (MS) medium, with different concentrations of 6-benzyladenine (BA), for induction of multibricks and organogenesis *in vitro*, respectively. At the end of the experiment the concentration of 2 mg.L⁻¹ of BA induced a higher rate of morphogenic responses. In addition, kinetin (KIN) or BA was used in cotyledons in order to compare their responsibility, with such as 6-benzyladenine (BA). After all, the potential of cotyledonary segments to induce morphogenetic, bioenergetic, anatomical and physiological responses of immature zygotic embryos (EZI), mature cotyledons (CM) and cotyledons derived from seedlings (CP), when grown in MS with a high ratio of auxin / cytokinin. Cotyledons are new morphogenetic variables after the induction period. EZI and CP induced a formation of embryogenic calli, CM leaving no morphogenetic response. Changes raised, and a dynamics of mobilization of reserves of different explanations were characterized. Although it was not compatible with the final efficiency, it believes that the study can contribute to the creation of regeneration and micropropagation systems for woody leguminous species.

Keywords: Micropropagation, organogenesis *in vitro*, somatic embryogenesis, Fabaceae, Royal Poinciana

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

Técnicas de cultura de tecidos têm sido alternativamente aplicadas na propagação de espécies arbóreas que, em geral, apresentam dificuldades de se propagarem por métodos convencionais (seminais) tornando-se uma atividade usual e de relevância em viveiros comerciais e biofábricas (DIAS et al., 2012; OLIVEIRA, 2013).

O estabelecimento de sistemas de regeneração *in vitro* para espécies lenhosas pode ser aplicado de forma útil para a micropropagação, conservação *ex situ*, reflorestamento, bioprospecção e para o melhoramento genético de diversas espécies vegetais (SOBROSA & CORDER, 2003). A regeneração é um processo fisiológico que se refere à capacidade de uma célula regenerar novos tecidos, órgãos ou todo o indivíduo, podendo ser *in vitro* ou *in vivo* (SUGIMOTO, 2015). Dentre os tipos de regeneração *in vitro*, os sistemas baseados na organogênese *in vitro* e na embriogênese somática são amplamente utilizados (ROCHA et al., 2018).

Em ambos os casos, a indução de organogênese *in vitro* ou embriogênese somática dependem, principalmente, de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura e da fonte de explante. A sinalização molecular dos reguladores de crescimento adicionados no meio de cultura inicia o processo de regeneração que pode ocorrer a partir de dois mecanismos celulares distintos: (i) Através da reativação de células do corpo vegetal relativamente e indiferenciadas ou; (ii) através da reprogramação de células somáticas diferenciadas (IKEUCHI et al., 2016).

A família Fabaceae, além de fornecer alimentos, forragens ricas em proteínas e vitaminas, também inclui espécies ornamentais (*Delonix regia*, *Gulmohar*; *Cassia fistula*, *Amaltas*), madeira de alta qualidade (*Albizzia lebbeck*, *Dalbergia sissoo*; *Robinia pseudoacacia* e *Hardwickia binata*) e importantes árvores medicinais (*Swartzia madagascariensis* e *Mimosa tenuiflora*). Devido à nodulação / associação com espécies de *Rhizobio* e consequente potencial de fixação de nitrogênio, leguminosas arbóreas são plantadas como adubo verde ou como componente do

sistema de cultivo em aléias (ANONYMOUS, 1986). Nos trópicos e subtropicais essas espécies são usadas para reflorestamento e recuperação do solo devido a facilidade de adaptação, mesmo em condições de áreas degradadas e de terras inativas (ANONYMOUS, 1986).

Delonix regia, popularmente conhecida como flamboyant, é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae. Originária da Ilha de Madagascar, esta espécie foi introduzida no Brasil no início do século XIX, onde se adaptou as condições edafoclimáticas do país. A espécie é conhecida por apresentar floração atraente e vistosa com tonalidades que variam desde alaranjando-claro até vermelho-sanguíneo (SILVA, 2009).

A produção de mudas de flamboyant é realizada, principalmente, por sementes, sendo necessário um período de 5 a 7 anos para que a planta atinja a sua maturidade reprodutiva (STEBBINS, 1999). Contudo, esse método de propagação, bem como, o enraizamento de estacas de flamboyant tem apresentado diversas limitações tornando esses sistemas de propagação ineficientes (MYERS & VENDRAME, 2004). As sementes dessa espécie apresentam dormência causada pela impermeabilidade do tegumento à água e ao oxigênio (dormência física). Esta característica dificulta a germinação e a uniformidade da produção de plântulas dessa espécie (COSSA, 2009) favorecendo a utilização de outras vias para facilitar a propagação. Contudo, poucos trabalhos relataram sobre o comportamento *in vitro* de flamboyant.

No presente trabalho, o objetivo foi avaliar o potencial morfogenético de explantes de *D. regia* e estabelecer um sistema de regeneração *in vitro* para essa espécie. A dissertação foi dividida em três capítulos. No capítulo 1, intitulado 'Indução de multibrotações e organogênese *in vitro* a partir de ápices caulinares e cotilédones de flamboyant' é reportado a formação de gemas adventícias a partir de ápices e segmentos cotiledonares quando cultivados em meio contendo citocinina. No capítulo 2, denominado "6-benziladenina e cinetina induzem diferentes respostas morfogenéticas em segmentos cotiledonares de flamboyant" investigou as diferenças de indução de respostas morfogenéticas em cotilédones de dois tipos de citocininas em meio de cultura

No capítulo 3, intitulado 'Determinação do potencial embriogênico de cotilédones de *Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf. em diferentes estádios de desenvolvimento',

evidenciou-se as diferentes respostas morfogênicas obtidas a partir do cultivo de um mesmo órgão (cotilédone) coletado em diferentes estádios de desenvolvimento.

Acreditamos que os resultados obtidos a partir desse estudo poderão contribuir para a otimização do processo de micropropagação dessa espécie, como estabelecimento de novos protocolos atualizados, facilitação de programas de melhoramento, bem como, para o desenvolvimento de programas de conservação de germoplasma e bioprospecção de flamboyant e de outras espécies da família.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1. A importância dos métodos de propagação e melhoramento para espécies lenhosas da família Fabaceae.

O desenvolvimento da sociedade, aumento da poluição e a demanda por produtos madeireiros e não madeireiros impulsionou o desenvolvimento e a tecnização de procedimentos silviculturais garantindo, assim, produtos e subprodutos florestais que atendam os anseios da população. Com a evolução da tecnologia de propagação e melhoramento de plantas, conseguimos resolver muitos desses problemas (TIMMIS, 1998). A tecnização das práticas silviculturais têm sido, em parte, alcançadas devido ao estabelecimento e constante aperfeiçoamento de técnicas biotecnológicas, como a micropropagação, transformação genética e reprodução assistida por marcadores moleculares, por exemplo, garantindo resultados que são ferramentas para melhorar geneticamente plantas lenhosas (MERKLE & DEAN, 2000; LELU-WALTER et al., 2013).

A propagação da maioria das espécies florestais é realizada via seminal, devido à ausência de informações silviculturais das mesmas (DIAS et al., 2012). Porém, a propagação seminal de espécies florestais, em geral, apresenta baixa porcentagem de germinação, que muitas vezes é decorrente da dormência das sementes (FERRARI et al., 2004), além das dificuldades de obtenção e coleta de sementes que consigam atender a demanda de produção de mudas (DEBNATH, 2004).

A micropropagação *in vitro* é uma alternativa que pode ser empregada, em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais, pois ela consegue oferecer a possibilidade de propagação de genótipos florestais selecionados, além de possibilitarem a limpeza clonal conseguindo plantas livres de vírus por meio de ápices caulinares e meristemas, produzindo assim, mudas com elevada qualidade fitossanitária (WENDLING et al., 2006).

A família Fabaceae é atualmente considerada a terceira maior família de Angiospermas, apresenta aproximadamente 727 gêneros e 19.327 espécies no mundo (LEWIS et al., 2005), superada apenas pelas famílias Asteraceae e Orchidaceae. No Brasil é a família com maior número de espécies e também uma das

principais, do ponto de vista econômico, apresentando tanto espécies herbáceas quanto arbóreas utilizadas em indústrias agroquímicas, alimentícia, cosmética, farmacêutica, ornamental e medicinal (SILVIA, 2011). Diante do potencial econômico da família Fabaceae, sistemas de micropropagação têm sido estabelecidos para diversas espécies da família, por exemplo: *Robinia pseudoacacia* (ARRILLAGA et al. 1994); *G. monosperma* (RUFFONI et al., 1994); *Sesbania rostrata* (HANOWER et al. 1986); *Cercis canadensis* (TRIGIANO et al., 1988; BUCKLEY & TRIGIANO, 1994).

Uma delas de grande destaque é o *Delonix regia* (Flamboyant), que possui além de diversas utilidades de paisagísticas e ornamentais, também é relatada com fonte de agentes medicinais. É utilizada como diurético, vermícida e adstringente dentre outros (MANIRUZZAMAN, 2010; LAWAL et al., 2015). Investigações fitoquímicas prévias de *D. regia* revelaram ocorrências de auroxantina que tem ação antioxidante tem coloração e a origem da coloração amarelo-laranja (CARRIE, 2001),

A regeneração de plantas inteiras a partir de tecidos somáticos é essencial para tais estudos de transformação genética e bioprospecção. A regeneração de gemas adventícias é o melhor sistema para obter facilmente indivíduos transgênicos e um passo fundamental na aplicação de técnicas de engenharia genética para melhoramento de plantas. Porém, a recalcitrância *in vitro* de espécies leguminosas foi evidenciada por diversos autores (SOMERA et al., 2003; POPELKA et al., 2006) que também reportaram a dificuldade de se conseguir estabelecer sistemas de regeneração eficientes para esse grupo de plantas.

1.2.2. Tipo de explante e protocolo de desinfestação de sementes de espécies lenhosas

Diversos tipos de explantes podem ser utilizados, desde a folha a raiz para iniciar a micropropagação *in vitro*. Porém, alguns critérios devem ser estabelecidos na escolha desses explantes, como por exemplo o nível de diferenciação e a finalidade (WENDLING et al., 2006).

As plantas lenhosas, entre elas a maioria das frutíferas por exemplo, sofrem mudanças morfológicas e fisiológicas consideráveis durante a sua mudança da fase juvenil para a fase adulta. De acordo com Wendling & Xavier (2001), em espécies

lenhosas a maturação é um assunto de extrema importância por causar, principalmente, variações na capacidade de propagação vegetativa com foco ao potencial de clonagem. Na cultura de tecidos a consequência mais significativa é o declínio da competência da organogênese e outros processos de regeneração devido à utilização de explantes maduros (HUANG et al. 1990).

Outra característica das espécies lenhosas e muito comum em leguminosas arbóreas é que explantes provenientes das plantas adultas tem baixa capacidade morfogenética (TRIGIANO et al., 1992). Outro ponto importante, mencionado por Jha et al. (2004) para espécies da família Fabaceae, é a recalcitrância *in vitro*, ou seja, quando a planta tem uma falta de apetência / predisposição para regeneração *in vitro*, dificultando a micropropagação dessas espécies, independentemente do tipo de explante. A indução *in vitro* de gemas adventícias tem sido alcançada para algumas espécies arbóreas tropicais (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). Em *Olea europaea*, por exemplo, o estabelecimento e a multiplicação de brotos, a partir de segmentos nodais, ocorreram com o uso de zeatina (ZEA) adicionada ao meio de cultura WPM (DONINI et al., 2008).

Em plantas lenhosas, a utilização de tecidos (explantes) que são obtidos de plantas adultas apresentam vantagem, pois eles permitem que haja a multiplicação de genótipos conhecidos (BHOJWANI; RAZDAN, 1983). Porém, esses explantes apresentam certas dificuldades para que se estabeleçam *in vitro*, pois podem apresentar agentes endofíticos difíceis de eliminar e que se proliferam em contato com o meio de cultura. Alguns estudos envolvendo *Cassia angustifolia*, espécie leguminosa lenhosa, foi evidenciado que cotilédones (tecidos embrionários) retirados de sementes imaturas, quando cultivadas em meios suplementados com 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido 1-naftalenoacético (ANA) sozinhos ou em combinação com citocininas desenvolvia competência para formar embriões somáticos, passíveis de formar um indivíduo completo. Porém, cotilédones retirados de sementes completamente maduras não tiveram essa capacidade. Possivelmente, alguns sinais específicos durante o estágio inicial do cotilédone embrionário podem ter desaparecido posteriormente, à medida que ele amadureceu (DURE, 1985; STERK; de VRIES, 1993).

Após a escolha dos explantes, a desinfestação dos mesmos constitui um passo vital para o sucesso do estabelecimento *in vitro*. Muitos trabalhos realizados com

espécies de Fabaceae reportam o uso de álcool a 70% por 1 min e solução aquosa de cloreto de mercúrio 0,1% (w / v) durante 10-20 min para desinfestação (JAIWAL; GULATI, 1991; SHARMA et al., 2017). Com *Leucena* (RASTOGI, 2008) a desinfestação ocorreu diretamente nos segmentos nodais (explante), onde foram cuidadosamente lavados e depois tratados com álcool absoluto por 5 segundos, hipoclorito de sódio 1% (v / v) por 15 min e, por fim, cloreto de mercúrio por 5 min a 0,5% (m / v). Assim sendo, muitos dos trabalhos envolvendo a desinfestação de leguminosas lenhosas não enfrentam grandes contaminações.

1.2.3. Meio de cultura

Os meios de cultura são as principais fontes de nutrientes para o desenvolvimento dos tecidos, além das fontes de azoto orgânico, ácidos orgânicos e substâncias complexas (hidrolisados de proteínas, extratos de leveduras de malta), que podem ser importantes em determinadas culturas, mas são opcionais, garantindo então que a regeneração prossiga de forma completa, com as condições necessárias para as respostas morfogênicas se desenvolverem e formarem novos indivíduos durante o processo (CALDAS et al., 1990), tendo grande influência nas respostas morfofisiológicas dos explantes selecionados (Almeida et al., 2012).

Durante o cultivo *in vitro*, os componentes que constituem os meios de cultura, não possuem efeitos exclusivamente nutritivos, mas também, configuram importantes agentes atuantes no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1993). Na germinação *in vitro*, por exemplo, a concentração desses sais e nutrientes no meio de cultura deve influenciar na passagem de água durante a fase inicial de embebição da semente.

Os meios de cultura mais conhecidos e utilizados são as formulações MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), muito utilizados para espécies ornamentais, herbáceas e florestais, principalmente nativas, como por exemplo *Peltophorum dubium* (BASSAN et al. 2006), *Cedrela fissilis* (AMARAI, 2006), *Cabralea canjerana* (ROCHA et al., 2007), *Hancornia speciosa* (LÉDO et al., 2007), *Ocotea porosa* (PELEGRINI et al., 2011), *Schizolobium parayba* var. *amazonicum* (REIS et al., 2009) e *Cassia angustifolia* (SIDDIQUE et al., 2012). Porém, o meio WPM (*woody plant*

médium; LLOYD E MCCOWN, 1981) é o principal meio estabelecido para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (OLIVEIRA et al., 2013), embora a maioria dos trabalhos com espécies da família Fabaceae utilizaram o meio MS como principal forma de fornecimento de nutrientes e desenvolvimento dos explantes (TRIGIANO, 2013).

1.2.4. Reguladores de Crescimento

A composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de regeneração *in vitro*. De acordo com Grattapaglia & Machado (1990), dentre os fatores que influenciam na regeneração de culturas *in vitro*, a concentração dos reguladores de crescimento supridos ao meio de cultura e os produzidos pela planta, são os principais responsáveis por estímulos de respostas para a diferenciação, crescimento, multiplicação e alongamento celular.

Na cultura de tecidos, por exemplo, os reguladores de crescimento, especialmente as auxinas e citocininas, desempenham um papel muito importante. As auxinas são utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos, divisão celular (formação de calo), formação de raízes e a indução de embriogênese somática; já as citocininas são muito utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (PIERIK, 1990; EINSERT, 1991; GEORGE, 1993).

Hoje em dia existe um número grande de meios de cultura (MS, WPM) com diferentes composições de sais basais utilizados para induzir e manter a embriogênese e organogênese de culturas de espécies lenhosas. A maioria das espécies da família Fabaceae requerer de alguma forma auxina, geralmente 2,4-D isoladamente ou em combinação com uma citocinina, por exemplo, para iniciar a via de indução organogênica (TRIGIANO, 2013).

1.2.5. Organogênese *in vitro*

A organogênese *in vitro* refere-se à formação de estruturas monopolares, isto é, de meristemas caulinares ou radiculares a partir de explantes cultivados *in vitro* (DUCLERCQ et al., 2011). Esse processo pode ocorrer diretamente, através do tecido do explante, apresentando alta fidelidade genética; ou por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo, sendo o calo uma proliferação de células. (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Poucos trabalhos foram desenvolvidos utilizando técnicas de organogênese em leguminosas arbóreas através de explantes e cultivo de calos (ver Tabela 1). Para a indução de novos órgãos como, por exemplo, em *Albizia lebbek* que não usou nenhum fitorregulador somente meio MS (UPADHYAYA & CHANDRA, 1983). Em *Prosopis cineraria* os melhores resultados foram obtidos em meio suplementado com 5,0 mg.L⁻¹ de BA (6-Benziladenina, uma citocinina que causa divisão celular, muito utilizada para formação de parte aérea) para formação de gemas (GOYAL & ARYA, 1981). Em *Sesbania sesban* e *S.grandiflora* foi recomendado suplementação de 0.3 mg.L⁻¹ de ANA (Ácido 1-naftalenoacético uma auxina, muito utilizada para indução do enraizamento) + 0.1 mg.L⁻¹ de BA + 0,05 mg.L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico, utilizado para alongamento dos entrenós, maturação de frutos, dentre outros) (KHATTAR; MOHAN RAM, 1982; 1983).

Quoirin & Marguerite (2003) mencionou sucesso na regeneração, via organogênese, de *Acacia albidia*, *A. auriculiformis*, *A. mangium* and *A. sinuata* (ABBE & DUHOUX, 1994; GASSAMA-DIA & DUHOUX, 1992). O processo de regeneração para *Acacia albidia* foi singular, sendo alcançados somente com gemas adventícias formadas a partir de raízes na presença de BA e espermidina. Nas outras espécies citadas, as respostas organogênicas ocorreram a partir de hipocótilos, cotilédones, seguimentos nodais, partes de embriões maduros. Porém a maioria dos trabalhos não obtiveram sucesso completo na conversão das gemas em plântulas.

1.2.6. Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos originando uma nova planta sem que ocorra a fusão de gametas (PINHAL et al., 2011). A

embriogênese somática é uma técnica de extrema importância na pesquisa biológica, possibilitando que estudos sobre o desenvolvimento fisiológico, resistência a doenças e pragas, sobre o genoma, metabolismo, proteômica, epigenético e outras áreas da pesquisa. (PARK & BONGA, 2010).

Todo o processo pode ocorrer em vários tipos de explantes, como embriões imaturos ou maduros, obtidos a partir da semente, brotos, folhas, (TORIBIO et al., 2004; NAWROT-CHORABIK, 2012) ou ápices caulinares (SAN-JOSÉ et al., 2010). Esse processo é regido por balanço de citocininas e auxinas, e alguns explantes podem formar tecidos específicos como por exemplo cotilédones (tecidos embriogênicos).

Alguns estudos relacionados com embriogênese somática em espécies da família Fabaceae como por exemplo *Albizzia lebbeck* (GHARYAL & MAHESHWARI, 1981), *Acacia koa* (SKOLMEN, 1986), *Albizia richardiana* (TOMARE GUPTA, 1988), *Cercis canadensis* (TRIGIANO et al., 1988; GENEVE & KESTER, 1990), *Robinia pseudoacácia* (MERKLE & WIECKO, 1989), *Genista monosperma cv. Rabassina* (CURIR et al., 1990) e *Cladrastis lutea* (WEAVER & TRIGIANO, 1991) (ver Tabela 1), obtiveram respostas embriogênicas apenas a partir de explantes juvenis (tecidos jovens). Contudo, nenhuma destas espécies produziram embriões somáticos em grande frequência. *Calliandra tweedii* (Topete-de-Cardéal) foi uma das únicas espécies que apresentaram a capacidade de produzir embriões somáticos com explantes de plantas mais velhas e conseguir convertê-las a plântulas em solo (KUMAR et al., 2002).

1.2.7. Aclimação e Enraizamento

Dentre os fatores de maior dificuldade no processo de micropropagação de espécies lenhosas, destaca-se a rizogênese. Esse processo consiste no desenvolvimento de raízes adventícias nas partes aéreas recém-formadas a partir dos explantes (segumentos nodais, cotilédones, hipocótilos, epicótilos, folhas), possibilitando o transplântio para o ambiente *ex vitro* (SOUZA & PEREIRA, 2007).

O enraizamento de espécies lenhosas vem obtendo dificuldades devido, especialmente, à maturidade dos tecidos utilizados *in vitro*, sendo dependente dos

níveis de auxina, citocinina e outros reguladores de crescimento para que se tenha sucesso neste ponto (ASSIS & TEIXEIRA, 1999). Alguns trabalhos já relatam a existência de níveis endógenos de fitohormônios, o que faz o processo de micropropagação trabalhar com níveis relativamente baixos e dificultando respostas morfogênicas em maiores escalas.

Silva et al. (2014), trabalhando com *Acacia auriculiformis* (Fabaceae), para fins medicinais, conseguiu brotações saudáveis e alongadas (cerca de 3-4 cm de comprimento) onde foram excisados e cultivados em meio MS de meia força suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de AIA (Ácido indolacético, uma auxina) para o enraizamento. Após isso retiraram do meio e transferiram para casa de vegetação para aclimação envoltas por sacos de polietileno e foram regadas todos os dias alternados durante as primeiras 2 semanas seguidas por uma vez por semana. Depois os sacos de polietileno foram abertos após 2 semanas para que as plantas foram expostas diretamente ao clima externo para aclimação em condições de campo. Após 8 semanas, plantas aclimatadas foram transferidas para o solo (campo) em condições naturais.

Rahmani (2016) investigando a formação de novos indivíduos de *Albizia julibrissin* (Fabaceae) através da cultura de protoplastos constatou que, em média, 61% de formação de raízes adventícias foi observado para brotos derivados de protoplastos de folhas após de 4-5 semanas de cultura. As gemas enraizadas foram então aclimatadas e mais de 60% das plantas apresentaram crescimento e desenvolvimento normais após 5 semanas após o transplante para o solo.

Pradhan (1998) estudou a capacidade de enraizamento no processo final de regeneração de *Dalbergia sissoo* e constatou que as plantas enraizadas foram aclimatadas com sucesso em uma câmara de crescimento conseguindo em torno de 68% de sobrevivência. Contudo, somente 8% das plantas transferidas diretamente para o solo sobreviveram.

1.2.8. Transformação genética

As técnicas de transformação genética podem ser definidas como a mudança genética permanente em uma célula após alguma incorporação de DNA externo. A

transformação genética de plantas contribui para que as pesquisas biológicas e moleculares de plantas tenham sucesso. A engenharia genética comercial e melhoramento molecular tem grande interesse manipular espécies de árvores florestais à nível celular e molecular garantindo avanços nos programas de melhoramento de espécies florestais comerciais e melhores características nos seus subprodutos para o mercado comercial (KHURANA et al., 2003).

As técnicas mais usadas comumente são os cultivos mediados por *Agrobacterium*, e a transferência direta de genes por bombardeamento de partículas. A transferência gênica mediada por *Agrobacterium* revolucionou ainda mais a biotecnologia vegetal. Permitindo a introdução em culturas, características específicas que são de interesse para a agricultura e indústrias (ANGENON et al., 1992). Poucos estudos relatam transformações genéticas com leguminosas lenhosas, sendo estas de grande importância devido sua ampla gama de características de interesse medicinal comercial e ornamental.

Khurana & Khurana (2000), relatam após sucessos com a regeneração de *Albizia lebbbeck* (Fabaceae) a expressão transitória do gene GUS pelo bombardeamento de partículas. O gene reportado codifica uma enzima que pode ser localizada histoquimicamente *in vivo* fornecendo informações qualitativas e quantitativas. (KHURANA et al., 2003). Outro exemplo é o trabalho de Teixeira et al. (2018) onde constatam que calos foram transformados com um gene *HIGROMICINA-FOSFOTRANSFERASE* (hpt) (marcador selecionável) em *P. marsupium*.

1.3. PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES

Apesar da família Fabaceae constituir um dos principais grupos de plantas, o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para leguminosas lenhosas ainda é escasso. O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos pode auxiliar na otimização de programas de melhoramento genético e bioprospecção dessas espécies possibilitando que as mesmas que possam ser multiplicadas e melhor exploradas nos seus mais diversos aspectos ecológicos e econômicos.

Tabela 1: Protocolos estabelecidos para espécies da família Fabaceae por ordem de referência pesquisadas, e seus respectivas condições de fitohormônios utilizados

| Nº | Espécie | Via de Indutiva | Condição | Melhor Tratamento | Explante | Referência |
|----|--|------------------------------------|--|--|----------------------------------|-----------------------|
| 1 | <i>Dalbergia sissoo</i> (Jacarandá) | Multibrotação | Concentrações de citocininas para brotação: BA, KIN, 2iP, TDZ isoladas, e de auxinas para enraizamento: IAA, IBA, IPA e associadas (IAA+IBA+IPA) | Meio MS + 2.2 µM BA + 0.1 µM NAA | Segmentos nodais | Pradhan et al. (1998) |
| 2 | <i>Pongamia pinnata</i> (Arvore do Petróleo) | Organogênese direta | BA e KIN (1, 3, 5 e 7 mg. L ⁻¹) e associados entre eles com baixas (0,5 e 1,0) e altas concentrações (3,0 e 5,0) além de BA e NAA | Maior formação de calos com 0,5 a 1,0 com BA e NAA, BA sozinho produziu mais gemas de todos os tratamentos | Segmentos nodais e epicótilos | Rangan et al (2012) |
| 3 | <i>Inga vera Willd</i> (Inga do brejo) | Calogênese | 0; 4,5; 9; 22 e 44µM de 2,4-D. | 4,5 µM de 2,4-D | Botões florais | Stein et al. (2007) |
| 4 | <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.). (Leucena) | Organogênese e Embriogênese | 10, 15 µM de BA e 2.5, 4.0, 5.0 de IBA. Outros fitohormônios foram utilizados como 2,4D + BA para formação de células somáticas; IAA e NAA associados com citocininas para formação de brotos. | Melhor formação de gemas e alongamento em 20.9 µM de BA + 5.37 µM de NAA; enraizamento em 14.76 µM de IBA + 0.23 µM de KIN; maior quantidade de embriões somáticos com 15,0 e 5,0 µM (2,4D e BA) | Segmento nodal, nó cotiledonares | Rastogi et al. (2008) |

| | | | | | | |
|---|---|---------------------|--|---|---------------------------|-------------------------|
| 5 | <i>Caesalpinia echinata</i> (Pau-Brasil) | Calogênese | 50 e 100 mg/L de 2,4-D | Foliolos juvenis 5 e 20 mg/L de 2,4-D Foliolos jovens 50 e 100 mg/L de 2,4-D Formam calos | Foliólulos juvenis/jovens | Werner et al (2009) |
| 6 | <i>Acacia mearnsii</i> (acácia-negra) | Organogênese | 2 mg. L ⁻¹ de BAP | 2,0 mg L ⁻¹ de BAP em todos os tipos de meios (B5, MS, SP e WPM), o melhor foi o MS | Segmentos nodais | Disarz, e Corder (2009) |
| 7 | <i>Caesalpinia echinata</i> . (Pau-Brasil) | Calogênese | 20 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 5,0 mg L ⁻¹ de BAP | 5 e 20 mg/L de 2,4-D e, 50 e 100 mg/L de 2,4-D formam calos | Foliólulos juvenis/Jovens | Werner. Et al. (2010) |
| 8 | <i>Erythrina velutina</i> Wild. (Mulungu) | Organogênese | BAP - (0,0; 2,22; 4,44; 6,66; 8,88; 17,76µM) e ANA - (0,0; 1,34; 2,68; 5,37µM) | 17,76µM de BAP+1,34µM de ANA, (no cotiledonar) 4,44µM de BAP+1,34µM de ANA. | Segmentos nodais | Costa et al. (2010) |
| 9 | <i>Bauhinia cheilantha</i> (pata de vaca) | Organogênese | 2,0mg L ⁻¹ de BAP | 2,0mg L ⁻¹ de BAP (BAP>TDZ e KIN), enraizamento com 2,0mg L ⁻¹ de AIB. | Segmentos nodais | Gutiérrez et al. (2011) |

| | | | | | | |
|----|--|----------------------|--|---|---|---------------------------|
| 10 | <i>Amburana acreana</i> (Ducke) A.C. Smith (Cerejeira) | Organogênese | 0,1 mg. L ⁻¹ de ANA + 4,0 mg.L ⁻¹ de BAP | 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA + 4,0 mg.L ⁻¹ de BAP | Segmentos nodais | Junior et al. (2012) |
| 11 | <i>Plathymenia reticulata</i> (Vinhatico) | Organogênese | 0,1; 0,3 e 0,6 mg.L ⁻¹ de BAP combinadas com 0,01 e 0,03 mg.L ⁻¹ de ANA. | 0,6 mg.L ⁻¹ de BAP | Segmentos cotilédonares e segmentos nodais. | Moura et al. (2012) |
| 12 | <i>Acacia mangium</i> and <i>A. mangium</i> x <i>A. auriculiformis</i> (acacia) | Multibrotação | Meio MS para sementes com 4,4 µM BA, 1 tratamendo suplementado com 2,2 µM BA + 0,1 µM NAA | Taxa de multiplicação de 3 a 5 a cada 2 meses de subcultivo e taxa de enraizamento de 80% para tecidos jovens e 70% para maduros | Segmentos nodais | Monteuuis et al. (2012) |
| 13 | <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth. (Sucupira-pr eta) | Organogênese | 1 parte: (0,1, 0,3 e 0,6 mg L ⁻¹ de ANA, com 0,01, 0,03 e 0,06 mg L ⁻¹ de BAP). 2 MS: (0,3 mg L ⁻¹ de BAP e 0,01 mg L ⁻¹ de ANA) | 0,3 mg L ⁻¹ de BAP ao meio de cultura favorecem a emissão de gemas axilares, 0,3 mg L ⁻¹ de ANA e de 0,03 mg L ⁻¹ de BAP | Segmentos cotilédonares e segmentos nodais. | Moura et al. (2012) |
| 14 | <i>Albizia niopoides</i> (farinha-seca) | Organogênese | BAP 0,5; 2,5; 5,0 µM e 0,5 µM ANA | 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA | Segmentos nodais | Rossi e Sortoretto (2013) |

| | | | | | | |
|----|---|-------------------------------|--|---|---|-----------------------|
| 15 | <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth. | Organogênese | 0,0; 4,44; 8,88; 17,76; 26,64; e 35,52 µmol/ L BAP | Ideal 17,76 µmol/ L BAP | Segmentos cotiledonares | Bezerra et al. (2014) |
| 16 | <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. (catingueira) | Organogênese | 1: (BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM) e ANA (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM) 2: (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 µM BAP; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 µM; KIN e TDZ) | 1: 2,0 µM BAP + 4,0 µM ANA. 2: 8,0 µM de BAP + 2,0 µM de TDZ | Segmentos nodais | Silva et al. (2014) |
| 17 | <i>Acacia auriculiformis</i> | Organogênese | 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 de BA e CIN, e posteriormente a melhor com 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 de IAA | 1,0 mg/L de BA + 0,1 mg/L de IAA forneceu melhor comprimento de gemas, 2,0 mg/L de BA + 0,5 mg/L de IAA forneceu maior % de regeneração e quantidade de gemas | Segmentos nodais | Yadav et al (2015) |
| 18 | <i>Albizia julibrissin</i> Durazz (Acacia Nemu) | Cultivo de Protoplasto | 10,8 µM de NAA e 4,4 µM BA para indução de calos organogênicos; combinações entre (1,0; 1,5; 2,0 Pp gfw ⁻¹ para C), (0,3 e 0,5 para M), (0,5 e 1,0 para P) C cellulase onozuka R-10, M macerozyme R-10, P pectolyase são as enzimas | A maior produção de protoplastos liberados dos tecidos no estudo, variou de 0,03 a 7,77 × 10 ⁵ Pp gfw ⁻¹ para folhas e 0,01–6,92 × 10 ⁵ Pp gfw ⁻¹ para calos de hipocótilos | Células de Protoplasto obtidas de: Hipocótilos derivados de calos organogênicos; Folhas de 4 a 5 semanas de idade | Rahmani et al. (2016) |

| | | | | | | |
|----|--|---|---|--|--|----------------------|
| 19 | <i>Acacia leucophloea</i> (Roxb.) Willd. (Ácacia) | Organogênese | Variação de BA (1 a 5 mg/L); Variações iguais de KIN e BA (0,5 com 1 a 5 BA) e vice-versa, e concentrações iguais de 1 a 5 mg/L; 2,0 mg/L de KIN + 0,5 mg/L BA + variações de IAA e NAA (0,05; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 mg/L) | Explantos cotiledonares foram os melhores na micropropagação; BA e KIN com IAA provou ser o melhor pra multiplicação de gemas; IBA induziu enraizamento em 80% das gemas | Hipocótilos (1.0 cm), Cotilédones (1.5 cm) e epicótilos (2,0 cm) | Sharma et al. (2017) |
| 20 | <i>Acacia</i> (REVIEW) | Organogênese direta; Calogênese; Embriogênese Somática; Enraizamento <i>in vitro</i> | Diversas espécies de Acácia com diversos fitohormônios (IAA; IBA; NAA, 2,4D; BA; Zeatin; KIN | - | Diversos tecidos (maduros e imaturos) | Gantait et al (2018) |

1.4. REFERÊNCIAS

- Anonymous. **Annual Report** AICRP on agroforestry, Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, Mohanpur, West Bengal.: 64-72. 1986.
- ABDI, G., HEDAYAT, M. Induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo and immature seed of royal poinciana (*Delonix regia*). **World Applied Sciences Journal**. [S. l.], v. 13 n. 3. p. 391-395. 2011.
- ARRILLAGA, I., J.J. TOBOLSKI, J. J., MERKLE, S. A. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) **Plant Cell Reports**. [S. l.] v. 13, n. 3, p. 171-175. 1994.
- ALMEIDA, M., ALMEIDA, C. V., GRANER, E. M., & BRONDANI, G. E., & TARAZI, M. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. **Plant Cell Reports**. [S. l.] v. 31, n. 8, p. 1495-1515. 2012.
- ANGENON, G. & MONTAGU, V. M. Transgenic plants: *Agrobacterium* mediated transformation and its application in plant molecular biology research and biotechnology. In: **Biotechnology and Crop Improvement in Asia** (Ed Moss JP). India. [S. l.] p. 181-199. 1992
- ASSIS, T. F., TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: **EMBRAPA**, p.261-296. v. 1. 1999.
- ABEE J. & DUHOUX E. Root culturing of *Faidherbia=Acacia albida* as a source of explants for shoot regeneration. **Plant Cell Tiss Org Culture**. [S. l.], v. 36, n. 2, p. 219-225. 1994
- BEZERRA, R. M. F. ALOUFA, M. A. I., FREIRE, F. A. DE M., SANTOS, D. D DOS. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia Benth.* (Fabaceae) **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.38, n.5, p.771-778, 2014
- BUCKLEY, L.G., TRIGIANO, R.N. Changes in ovule protein profiles associated with somatic embryogenesis in *Cercis canadensis*, **Plant Cell Reports**. [S. l.] v. 14, n. 1, p. 27-30. 1994
- BHOJWANI, S. S. & RAZDAN, M. K. *Plant tissue culture: theory and practice*. Amsterdam: **Elsevier**. [S. l.] v. 9. N. 1. 512p. 1983
- CALDAS, L. S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. abctp., **Embrapa-cnph**, Brasília. v. 1, n. 1, p. 37-70. 1990.
- CARRIE M. *Calendula officinalis*. Herb Information Greenpaper. **The Herb Research Foundation**. Boulder, CO, USA, 2001. Disponível em: <http://www.herbs.org/greenpapers/calendula.html>. Acessado em 21 de mar. de 2019

- COSTA, G. M. NEPOMUCENO, C. F., SANTANA, J. R. F DE. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.5, p.1090-1096, maio, 2010
- COSSA, C. A., SORACE, M. A. da F., LIMA, C. B. de., OSIPI, E. A. F., MANTOAN, L. P., POLÔNIO, V. D., JANANI, J. K. Aspectos da germinação de sementes de *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. Resumos do VI CBA e II CLAA. **Revista Brasileira de Agroecologia** nov. [S. l.] v. 4 n. 2. P. 1-4. 2009.
- CURIR, P., RUFFONI, B., MASSABÒ, F. AND DAMIANO, C. Induction of somatic embryogenesis in *Genista monosperma* Lam. Em: I International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 280 **Acta Hortic.** p. 113–116. 1990.
- DEBNATH, S. C. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Growth Regulation**. Boston, n. 4, v. 3, p. 179-186, 2004.
- DIAS, P. C. OLIVEIRA, L. S. DE O., XAVIER, A., WENDLING, I. estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.
- DISARZ, R. CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.33, n.4, p.599-606, 2009.
- DONINI, L. P., SCHUCH, M. W., RIBEIRO, M. DE F., SOUZA, J. A. DE., SOARES, G. C. (2008). Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. **Ciencia Rural**, V. 38, N. 6, p. 1769-1772. 2008.
- DUCLERCQ, J., SANGWAN-NORREEL, B., CATTEROU, M., SANGWAN, R. S. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends Plant Science**. V. 16 p. 597–606. 2011
- DURE, L. Embryogenesis and gene expression during seed formation. Oxford Survey. **Plant Molecular Cell Biology**. V. 2 p. 179–197. 1985.
- EINSERT, J. W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation I. Berlin: **Springer**. v. 17 n.1. p.190-201. 1991.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. germinação e propagação *in vitro* de cerejeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan.-mar., 2012
- GANTAIT, S., KUNDU, S., DAS, P. K. Acacia: An exclusive survey on *in vitro* propagation. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. [S. l.], V. 17, n. 1, p. 163-177. 2018.
- GASSAMA Y.K. & DUHOUX E. Micropropagation de '*Acacia albida* Del. (Leguminosae) adulte. Bull. LF.A.N. 1986-87; v. 46 p. 314-320. 1994

GENEVE RL & KESTER ST. The initiation of somatic embryos and adventitious roots from developing zygotic embryo explants of *Cercis canadensis* L. cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. [S. I.], V. 22, n.1, p. 71–76, 1990.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture: The Technology. 2nd ed London: **Hardcover**, p. 98-165. 1993.

GHARYAL PK & MAHESHWARI SC. *In vitro* differentiation of somatic embryoids in a leguminous tree — *Albizia lebbeck* L. **Naturwissenschaften** [S. I.] vol. 68, p. 379–380, 1981.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: **ABCTP/EMBRAPA-CNPH**, p.183-260, 1990.

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

GOYAL, Y., ARYA, H. C.: Differentiation of *Prosopis czneraria*, **Curro Science** [S. I.], 50, 468-469. 1981

GUTIÉRREZ, I. E. M., NEPOMUCENO, C. F., LEDO, C. A DA S., SANTANA, J. R. F. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p.260-265, fev, 2011.

HANOWER, J., CAS, G., BOUVET, P. Culture de tissus et de protoplasts de *Sesbania rostrata*, Comp. Rendus de l'Academie des Sci. - Series III. **Science de la Vieira** 303, [S. I.], p. 429-434. 1986.

HUANG, L., CHIU, D., MURASHIGE, T., GUNDY, R., MAHDI, E. L. F. M., NAGAI, K., PLIEGO-ALFARRO, F. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, DF: **ABCTP/Embrapa-CNPH**, 1990.

IKEUCHI M., OGAWA, Y., IWASE, A., SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development** **143**, [S. I.], p. 1442–1451. 2016

JAIWAL, P. K., GULATI, A. *In vitro* high frequency plant regeneration of a tree legume *Tamarindus indica* (L.). **Plant Cell Reports**, Secaucus, v. 10, n. 1. p. 569-573. 1991.

JHA, A.K., PRAKASH, S., JAIN, N., NANDA, K., GUPTA, S.C. Micropropagation of *Sesbania rostrata* from the cotyledonary node. **Biologia Plantarum**, Delhi, v. 48, n. 2, p. 289-292, 2004.

JUNIOR, P. C. P. F., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (ducke) a.c. smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan.-mar., 2012.

KHATTAR, S. and H. Y. MOHAN RAM: Organogenesis in cultured tissues of *Sesbama sesban*, a leguminous shrub. **Indian Journal Experimental Biology**. Coimbatore V. 20, p. 216-219. 1982.

KHATTAR, S. and H. Y. MOHAN RAM Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in *Sesbama grandiflora*. **Indian Journal Experimental Biology**. Coimbatore V. 21, p. 251-253. 1983.

KHURANA. J. AND KHURANA P. K. Biolistic-mediated DNA delivery into hypocotyls of a leguminous tree - *Albizzia lebbeck* L.: influence of biological and physical parameters. **Journal. Plant Biochem. and Biotech**, Coimbatore v. 9 p. 31- 34. 2000

KHURANA, P., KHURANA, J., JANIM M. Regeneration and genetic transformation of tree legumes with special reference to *albizzia* species P K. Jaiwa I and R. P' Singh (eds.), **Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology**. Dordrecht, p. 285-300. © Kluwer Academic Publishers. 2003

KUMAR, S. & AGRAWAL, V. & GUPTA, S.C. Somatic embryogenesis in the woody legume *Calliandra tweedii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Orlando v. 71, p. 77–80, 2002.

LÉDO, A. S., SÁ, A. J., SILVA JUNIOR, J. F., SILVA, A. V. C., DINIZ, L. E. C., LÉDO, C. A. S. Development of *in vitro* propagation and conservation protocols of the native brazilian mangaba tree. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 918, p. 177-182, 2011.

LELU-WALTER, M.-A., THOMPSON, D., HARVENGT, L., SANCHEZ, L., TORIBIO, M., PÂQUES, L.E. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. **Tree Genetics Genomes**, [S. I.] v. 9, p. 883–899. 2013.

LEWIS, G., SCHIRE, B., MACKINDER, B. & LOCK, M. Legumes of the World. **The Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 1, n. 1, p. 577, 2005.

MANIRUZZAMAN, F. M. A Compendium of Plants in Bangladesh, 1st ed., Bangla Academy. Dhaka, v. 1, n. 1, p. 262. 1993

MYERS A. R., VENDRAME. W. A. Propagation of yellow kampong royal poincianavia somatic embryogenesis. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, [S. I.] v. 117, p. 338-341. 2004.

MERKLE, S. A., WIECKO, A. T. Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. **Canadian Journal Forrest Research**, [S. I.], v. 19, n. 1, p. 285–288, 1989.

MERKLE, S. A., DEAN, J. F. Forest tree biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. [S. I.], V. 11, n. 3, p. 298–302. 2000.

MOURA, L. C. de, TITON, M., FERNANDES, J. S. C., SANTANA, R. C., & DE OLIVEIRA, M. L. R. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.47, n.12, p.1691-1698, 2012

MOURA, L. C. de, TITON, M., MIRANDA, N. A., MOREIRA, T. P., & DE OLIVEIRA, M. L. R. Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymentia reticulata*). **Sci. For.**, Piracicaba, v. 40, n. 96, p. 499-505, 2012.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497. 1962.

MONTEUUIS, O. GALIANA A., GOH D. *In Vitro* Propagation of *Acacia mangium* and *A. mangium* × *A. auriculiformis*. Maurizio Lambardi et al. (eds.), Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology. **Springer Science** + Business Media New York, v. 11013, n. 1, 2013.

NAWROT-CHORABIK, K. Somatic Embryogenesis in Forest Plants, Embryogenesis, Ken-ichi Sato, **IntechOpen**, 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-woody-plants>, Acessado em: 25 de Janeiro de 2019.

LAWAL, I. O., UZOKWE, N. E., IGBOANUGO, A. B. I., ADIO, A. F., AWOSAN, E. A., NWOGWUGWU, J. O., FALOYE, B., OLATUNJI, B. P., ADESOGA, A. A. Ethno medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 4, n. 1, p. 001–007. 2010.

OLIVEIRA, L. S., DIAS, P. C., BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out. / dez. 2013.

PARK, Y. S, BONGA, J. M. Application of somatic embryogenesis in forest management and research. 2010.

PELEGRINI, L. L., RIBAS, L. L. F., ZANETTE, F., KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527-1523, 2011.

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

PIERIK, R. L. M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: **Mundi-Prensa**, P. 326, 1990.

PRADHAN, C., KAR, S., PATTAIK, S., CHAND, S. K. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. **Plant Cell Reports**, Bhubaneswar, v. 18, n. 1, p. 122–126, 1998.

POPELKA, J. C., GOLLASCH, S., MOORE, A., MOLVIG, L. & HIGGINS, T. J. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Reports**, Canberra, v. 25, n. 1, p. 304- 312. 2006.

QUOIRIN, M. Micropropagation of *Acácia* species. Departamento de Botânica, Universidade Federal do Parana, Caixa postal 19031, Curitiba-PR, 81531-990, Brazil. S.M. Jain and K. Ishii (eds.), **Micropropagation of Woody Trees and Fruits**, 245-268. 2003.

RANGAN, L. High frequency direct organogenesis and evaluation of genetic stability for *in vitro* regenerated *Pongamia pinnata*, a valuable biodiesel plant. Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, India. **Biomass and bioenergy**, Assam, v.1, n. 1, p. 23-32. 2012.

RASTOGI, S. RIZVI, S. M. H., SINGH, R. P., DWIVEDI, U. N. *In vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis. **BIOLOGIA PLANTARUM**, Lucknow, v. 52, n. 4, p. 743-748, 2008.

ROCHA D. I., VIEIRA L.M., KOEHLER A.D., OTONI W.C. Cellular and Morpho-histological Foundations of *In Vitro* Plant Regeneration. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) **Plant Cell Culture Protocols**. Methods in Molecular Biology, v. 1815. Humana Press, New York. 2018.

ROCHA, S. C. D., QUORIM, M., RIBAS, L. L. F., & KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, [S. I.], v. 31, n. 1, p. 43-50. 2007.

ROCHA, S. C., QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explante de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. *Ciência Florestal*, Santa Maria, RS, v. 14, n. 1, p. 91-101, 2004.

ROSSI E., SARTORETTO L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 45-52, jan./mar. 2013.

RAHMANI, M. S., PIJUT, P., SHABANIAN, N. Protoplast isolation and genetically true-to-type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of *Albizia julibrissin*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. [S. I.], v. 127, n. 2, p. 75-488, 2016.

RUFFONI, B., MASSABO, F. AND GIOVANNINI, A. Artificial seed technology in the ornamental species *Lisianthus* and *Genista*, **Acta Horticulture**, v. 55, n. 362, p. 297-304. 1994.

SAN-JOSÉ M. C., CORREDOIRA E., MARTÍNEZ M. T., VIDAL N., VALLADARES S., MALLÓN R., VIEITEZ A. M. Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. **Plant Cell Reports**, [S. I.], v. 29 p. 661–671. 2010.

SIDDIQUE, I., JAVED, S.B., AL-OTHMAN, M.R. ANIS, M. Stimulation of *in vitro* organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in *Cassia angustifolia* Vahl.: an important source of sennosides. **Agroforest Systems**, [S. I.], v. 87, p. 583. 2013.

SKOLMEN, R. G. Induction of embryogenesis in *Acacia koa*. In: Bajaj YPs (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry I*. **Springer**, Berlin, p. 335–384, 1986.

SHARMA, P., BABEL, P., GOSWAMI, N., PUROHIT S. D. Micropropagation of *Acacia leucophloea* (Roxb.) Willd.: A Multi-Purpose Legume Tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, v. 88, n. 4, p. 1329-1335, 2017.

SOBROSA, R. C., CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. *Floresta e Ambiente*, v.10, n.3, p.58-68, 2003.

SOUZA, A. V., PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOMERA D. A, et al. Recent advances in legume transformation, **Plant Physiology**. [S. I.], v. 131, p. 892-899, 2003.

SUGIMOTO K. Plant cell reprogramming as an adaptive strategy. **Plant Research** [S. I.] v. 128, p. 345–347. 2015.

STEBBINS, M. K. Flowering Trees of Florida. **Pineapple Press**, Sarasota, FL. 1999

STEIN, V. C. Et al. Calogênese em Ovários de *Inga vera* Willd. Sub sp. affinis (DC.) T.D. Penn. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, s. 2, p. 303-305, jul. 2007

STERK, P., DE VRIES, C. Molecular markers for plant embryos, in: K. Redenbaugh (Ed.), *Synseeds, Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, **CRC**, London, pp. 116–132; 1993.

SILVA, G. C. da. Distribuição espacial do flamboyant, espécie exótica da Mata Atlântica, no Câmpus I da Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências Exatas e da Natureza Curso de Graduação em Geografia, 2009.

SILVIA T. S. M. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul / Lidio Coradin., Alexandre Siminski., Ademir Reis. – Brasília: MMA, p. 934. 2011.

SILVA, T. dos S.; NEPOMUCENO, C. F.; BORGES, B. P. dos S.; ALVIM, B. F. M.; SANTANA, J. R. F. de S. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2014.

TIMMIS, R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. **Biotechnol. Prog.** Washington, v. 14, p. 156–166. 1998.

TRIGIANO, R. N., GENEVE, R. L., MERKLE, S. A., PREECE, J. E. Tissue and Cell Cultures of Woody Legumes. **Horticultural Reviews**, Knoxville, v.14, p. 265-331, September. 1992.

TRIGIANO, R. N., BEATY, R. M., & GRAHAM, E. T. Somatic embryogenesis from immature embryos of redbud (*Cercis canadensis*). **Plant Cell Rep.** 7: 148–150, 1988.

TIPPANI, R., YARRA, R., BULLE, M., PORIKA, M., ABBAGANI, S., THAMMIDALA, C. 2013b. *In vitro* plantlet regeneration and Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of Indian Kino tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.). **Acta Physiol. Plant**, Waranga, v. 35, p. 3437–3446. 2013.

TOMAR U. K., GUPTA S. C. Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume — *Albizia richardiana* King. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 70–73, 1988.

TORIBIO, M. & FERNÁNDEZ, C., CELESTINO, C., SANTIAGO, M. T. M., SAN JOSÉ, M. S., VIEITEZ, A. M. Somatic Embryogenesis in Mature *Quercus Robur* Trees. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [S. I.], v. 76, n. 1, p. 283-287. 2004.

UPADHYAYA, S. and N. CHANDRA: Shoot and plantlet formation in organ and callus cultures of *Albtzzia lebbek* Benth. **Ann. Bot.** [S. I.], V. 52, n. 3, p. 421-424, 1983.

WERNER, E. T. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa v.33, n.6, p.987-996, Nov./Dec. 2009.

WERNER, E. T., MILANEZ, C. R. D., MENGARDA, L. H. G., VENDRAME, W. A., CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) **Acta botanic.** Brasília, v. 24, n. 4, p. 1046-1051. 2010.

WENDLING, I. DUTRA, L. F., GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: **Embrapa Florestas**. p. 54 (Embrapa Florestas. Documentos, 130). 2006.

WENDLING, I., XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Viçosa, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WEAVER, L. A., TRIGIANO, R. N. Regeneration of *Cladrastis lutea* (Fabaceae) via somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, [S. I.], v. 10, n. 4, p. 183– 186, 1991.

YADAV, R. YADAV, N., KUMAR, S. An Improved Micropropagation and Assessment of Genetic Fidelity in Multipurpose Medicinal Tree, *Acacia auriculiformis*. Proc. Natl. Acad. Sci., **India, Section B Biology Scienc.** 2015.

CAPÍTULO 2 - INDUÇÃO DE MULTIBROTAÇÕES E ORGANOGÊNESE *IN VITRO* A PARTIR DE ÁPICES CAULINARES E COTILÉDONES DE FLAMBOYANT

RESUMO – Técnicas de micropropagação têm sido estabelecidas para a multiplicação de espécies arbóreas a fim de possibilitar a propagação massal e compreender processos de regeneração e rejuvenescimento das mesmas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial morfogênético de ápices caulinares e explantes cotiledonares de *Delonix regia*, espécie arbórea ornamental comumente utilizada na arborização e paisagismo urbano, a fim de induzir a formação de multibrotações e organogênese *in vitro*, respectivamente. Ápices caulinares e cotilédones obtidos de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (MS), suplementado com diferentes concentrações (0,125; 0,250; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) de 6-benziladenina (BA). No tratamento controle não foi adicionado reguladores de crescimento. Após 30 dias de cultivo, multibrotações e gemas adventícias foram observadas em ápices caulinares e segmentos cotiledonares de *D. regia*, respectivamente. Ambas as fontes de explante apresentaram comportamento dose dependente apresentando incremento de massa fresca e maior número de gemas com o aumento das doses de BA testadas. O maior número de gemas foi observado em explantes cultivados em meio suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BA. Contudo, folíolulos de brotações cultivadas em concentrações maiores de BA apresentavam menores dimensões. Em explantes cotiledonares de *D. regia*, análises histológicas evidenciaram que a formação de gemas adventícias ocorreu através da reprogramação de células do mesofilo, nas regiões de seccionamento do explante. Os resultados obtidos fornecem novas informações para otimização e estabelecimento de sistemas eficientes de regeneração e micropropagação de flamboyant, uma importante espécie arbórea ornamental.

Palavras-chave: *Delonix regia*, Micropropagação, Organogênese *in vitro*, Royal Poinciana, Fabaceae, Planta Ornamental.

SHOOT PROLIFERATION INDUCTION AND *IN VITRO* ORGANOGENESIS FROM SHOOT APEX AND MATURE COTYLEDONS OF FLAMBOYANT

ABSTRACT – Micropropagation techniques have been included for a multiplication of tree species and a process of mass propagation and integrated processes of regeneration and rejuvenation of the same. The present work had as its objective the morphogenetic potential of the apices and cotyledonary explorations of *Delonix regia*, arboreal, ornamental and ornamental species common in afforestation and landscaping, with the objective of inducing the formation of multiple shoots and organogenesis *in vitro*, respectively. Seedlings and cotyledons of *in vitro* germinated seedlings were inoculated in Murashige and Skoog (MS) culture medium, with 0,125; 0,250; 0,5; 1,0 and 2,0 mg.L⁻¹ of 6-benzyladenine (BA) . In control it was not growth regulators. After 30 days of cultivation, multiple shoots and adventitious buds were observed in shoot apices and cotyledonary regions of *D. regia*, respectively. Both explant sources have dose behavior dependent on fresh mass increment and higher number of buds with increasing doses of BA tested. The highest number of buds was observed in explants cultured in medium supplemented with 2,0 mg.L⁻¹ BA. However, leaflets of sprouts grown in greater are cauldron applications. In cotyledonary explants of *D. regia*, analysis histological evidence that the formation of adventitious gemstones detected by reprogramming of mesophyll cells, in the regions of sectioning the explant. The results obtained contain new information for optimization and establishment of regeneration and micropropagation systems of flamboyant, an important ornamental tree condition.

Keywords: *Delonix regia*, Micropropagation, Organogenesis *in vitro*, Royal Poinciana, Fabaceae, Ornamental Plant.

2.1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem desempenhado um papel importante no aperfeiçoamento de técnicas de multiplicação em larga escala de espécies florestais para aplicação nos diversos segmentos econômicos e ecológicos como, por exemplo, na silvicultura clonal, recuperação de áreas degradadas, melhoramento genético, conservação de germoplasma e produção de produtos madeireiros e compostos bioativos (RATHORE et al. 2004; WINKELMANN, 2013; VARSHNEY & ANIS 2014). Nas últimas décadas, ferramentas biotecnológicas, como a micropropagação, foram estabelecidas para espécies florestais (RATHORE et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2013, TEIXEIRA DA SILVA 2013, GANTAIT et al. 2018; SOUZA et al. 2019), embora a propagação da maioria das espécies arbóreas ainda seja realizada via seminal devido à ausência de informações silviculturais (DIAS et al. 2012).

A micropropagação é empregada para propagação clonal em massa de genótipos desejáveis, mas também, para fornecer material alvo adequado para programas de melhoramento genético e bioprospecção. Porém, o desenvolvimento de protocolos de micropropagação para as espécies arbóreas ainda se limitam aos primeiros passos do processo no que diz respeito à especificidade das respostas dos genótipos no cultivo *in vitro*, exigindo ajustes específicos de balanço hormonal para cada espécie / genótipo estudado (SOBROSA & CORDER 2003).

Sistemas de micropropagação e regeneração *in vitro* já foram estabelecidos para importantes espécies arbóreas, por exemplo, *Caesalpinia echinata* (WERNER et al. 2007; 2009), *Cedrela fissilis* (NUNES et al. 2002; 2007), *Swietenia macrophylla* (COUTO et al. 2004; LAMEIRA et al. 2005). Nesses sistemas, a micropropagação tem sido realizada, principalmente, a partir de ápices caulinares, segmentos nodais e tecidos embrionários, dado o menor nível de diferenciação desses explantes e a dificuldade em se obter material de plantas adultas livre de microrganismos (LAKSHMANAN & TAJI 2000; TRIGIANO 1992; SILVA et al. 2010).

Delonix regia (Bojer ex Hook) Raf., popularmente conhecida como royal ponciana ou flamboyant, é uma espécie arbórea da família Fabaceae amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. É uma espécie de rápido crescimento

e de reconhecida relevância agroflorestal e ornamental sendo utilizada, principalmente, no paisagismo urbano. *D. regia* também tem sido usada como agente medicinal. Diversas substâncias de atividade biológica foram identificadas nos extratos de folhas, flores e sementes como; anti-inflamatórios, antioxidantes, antidiabéticos, cicatrizantes e gastroprotetivo (PAREKH et al. 2007; AQIL et al. 2006; SINGH et al. 2014; SHABIR et al. 2011). Diante da importância ornamental e medicinal de *D. regia*, sistemas de micropropagação têm sido estabelecidos para essa espécie. Trabalhos anteriores relataram o potencial de explantes embrionários de *D. regia* na indução de respostas morfogênicas quando cultivados meios de cultura com elevada razão auxina / citocinina (MYERS & VENDRAME 2004; ABDI & HEDAYAT 2011). Contudo, a micropropagação de *D. regia* ainda está longe de ser uma realidade diante da reduzida taxa de formação de respostas morfogênicas e o comportamento recalcitrante da espécie quando cultivada *in vitro* (ABDI & HEDAYAT 2011). A compreensão do comportamento dessa espécie sob outras classes e concentrações de reguladores de crescimento pode auxiliar na otimização de sistemas de regeneração estabelecidos para *D. regia*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial morfogênico de ápices caulinares e explantes cotilédonares de *D. regia*, a fim de induzir a formação de multibrotações e organogênese *in vitro*, respectivamente. Além de descrever as alterações histológicas envolvidas na formação das respostas morfogênicas observadas contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para essa importante espécie florestal.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material Vegetal

Sementes de *D. regia* foram coletadas de cinco indivíduos do Instituto Federal Goiano, na cidade de Rio verde, GO (17°48'08.7"S e 50°54'27.0"O) e da Universidade Federal de Goiás, Jataí, GO, Brasil (17° 52' 51"S e 51° 42' 50"O). As sementes foram lavadas em água corrente para retirada do resíduo superficial, seguidas de secagem em temperatura ambiente, e armazenadas na geladeira em sacos plásticos.

2.2.2. Germinação *in vitro* e obtenção de explantes

Sementes de *D. regia* coletadas foram submetidas à escarificação mecânica, no lado oposto ao hilo, utilizando lixa NORTON A257 saint-gobain®. As sementes escarificadas foram lavadas e submersas em água estéril autoclavada, por duas horas. Posteriormente, foram desinfestadas com imersão em etanol a 70% por 2 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio [água sanitária comercial - 2,5% de cloro ativo] por 20 minutos e lavadas 4 vezes com água deionizada autoclavada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em frascos de 250 mL, contendo sais MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), 3% de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol e 0,8 % de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 20 min a 121 °C e 1 × 10⁵ Pa (1,1 kg.cm⁻²). Foram inoculadas duas sementes por frasco. Após a inoculação das sementes, os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25 °C ± 1°C e fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro). Quinze dias após a inoculação, ápices caulinares e cotilédones foram excisados das plântulas germinadas *in vitro*. Os ápices foram padronizados com ± 2 cm de comprimento e tiveram os primórdios foliares removidos. Os cotilédones tiveram suas bordas excisadas e foram seccionados em 3 - 4 segmentos de aproximadamente 2 cm² cada.

2.2.3. Indução de multibrotações e organogênese *in vitro*

Tanto os ápices quanto os segmentos cotiledonares obtidos foram inoculados em frascos de 250 ml contendo meio MS, conforme descrito anteriormente, acrescido de diferentes concentrações (0,125; 0,250; 0,500; 1,0; 2,0 mg.L⁻¹) de 6-benziladenina (BA). No tratamento controle, não houve adição de fitorreguladores (MS0). Os meios foram ajustados para pH 5,7 ± 0,1 e autoclavados por 20 min a 121 °C e 1 × 10⁵ Pa (1,1 kg cm⁻²). O BA foi adicionado antes da autoclavagem. Para cada tratamento foram preparados 20 frascos dos quais, 10 foram usados para inocular ápices caulinares e 10 para inocular cotilédones. Foram inoculados dois ápices por frasco, ambos na posição vertical. Os cotilédones foram colocados com a face abaxial em contato com o meio de cultivo, sendo inoculados 4 fragmentos por frasco. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25 °C ± 1°C e fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) durante 30 dias.

2.2.4. Parâmetros morfométricos

As amostras foram analisadas após 30 dias de cultivo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. A responsividade dos ápices caulinares foi avaliada pelo; (i) ganho de massa fresca e (ii) número de gemas por explante. O ganho massa fresca foi obtido após os 30 dias de cultivo por diferença de peso. Pesaram-se os frascos previamente com o meio de cultura (MS) e depois de inoculado o tecido obtendo por diferença o peso fresco das amostras no dia da inoculação. Após 30 dias, as amostras de cada repetição foram pesadas diretamente obtendo-se, por diferença, o ganho de massa dos tecidos. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey a um nível de significância 5% para comparar os valores médios. As análises foram realizadas no Software Sisvar versão 5.6.

A responsividade dos explantes cotiledonares foi avaliada pela; (i) Porcentagem de calos formados, (ii) porcentagem de explantes oxidados e (iii) número de gemas por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e avaliadas por regressão utilizando, também, o software Sisvar 5.6.

2.2.5. Análise histológica

Para caracterização estrutural, folíolulos medianos ($n = 6$) da primeira folha bipinada de ápices caulinares cultivados em meio MS0 e suplementados com 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg.L^{-1} de BA e explantes cotiledonares cultivados em todos os tratamentos avaliados foram fixados em solução de formaldeído, ácido acético e álcool 50% (FAA50). Amostras foliolulares de ápices caulinares cultivados em meio suplementado com 2,0 mg.L^{-1} de BA não foram analisados por não terem apresentado folíolulos expandidos.

As amostras fixadas foram desidratadas em série de concentração crescente de etanol e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 μm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático, montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina (O'BRIEN & MCCULLY 1981). A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz e fluorescência Zeiss Axioskope com câmera digital AxioCam HRc acoplada.

A fim de realizar a caracterização micromorfométrica, pelo menos 30 medidas da largura e da espessura foliolular foram mensuradas. As medidas para cada parâmetro foram realizadas a partir de pelo menos 20 secções para cada repetição ($n=3$) de cada tratamento. As análises foram realizadas com o auxílio do software ImageJ-win64. Em seguida os dados foram submetidos à ANOVA seguida pelo teste de Tukey a um nível de significância 5% utilizando o software Sisvar 5.6.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Indução de multibrotações a partir de ápices caulinares de *D. regia*

A concentração de citocinina no meio de cultivo influenciou na indução de respostas morfogênicas de ápices caulinares de *D. regia* (Fig. 1A-F). Tanto o número de gemas quanto o ganho de massa fresca apresentaram um comportamento crescente em relação as doses de BA testadas (Fig. 1G, H). Na ausência de BA (MS0) não houve ativação de gemas axilares nos ápices caulinares de *D. regia* (Fig. 1A). Em contrapartida, nos tratamentos suplementados com BA, observou-se o aumento tanto da formação de novas gemas quanto a indução de calogênese na base do explante, local de excisão (Fig. 1B-F). O maior número de gemas foi observado nos tratamentos suplementados com as maiores concentrações (1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) de BA apresentando, em média, 2,7 e 3,5 gemas por explante, sendo a média do tratamento de 2,0 mg.L⁻¹ de BA significativamente maior (Fig. 1G).

Os ápices caulinares cultivados na presença de 2,0 mg.L⁻¹ de BA apresentaram, também, maiores ganhos de massa fresca (Fig. 1H) apresentando, em média, 0,68 g de ganho por explante, sendo esse valor significativo em relação aos demais tratamentos. Na ausência de BA, os ápices caulinares permaneceram vivos até o final do experimento. Porém, esses explantes apresentaram o menor ganho médio de massa fresca, embora não tenham sido significativamente distintos dos tratamentos suplementados com baixas doses (0,125 e 0,250 mg.L⁻¹) de BA (Fig. 1H).

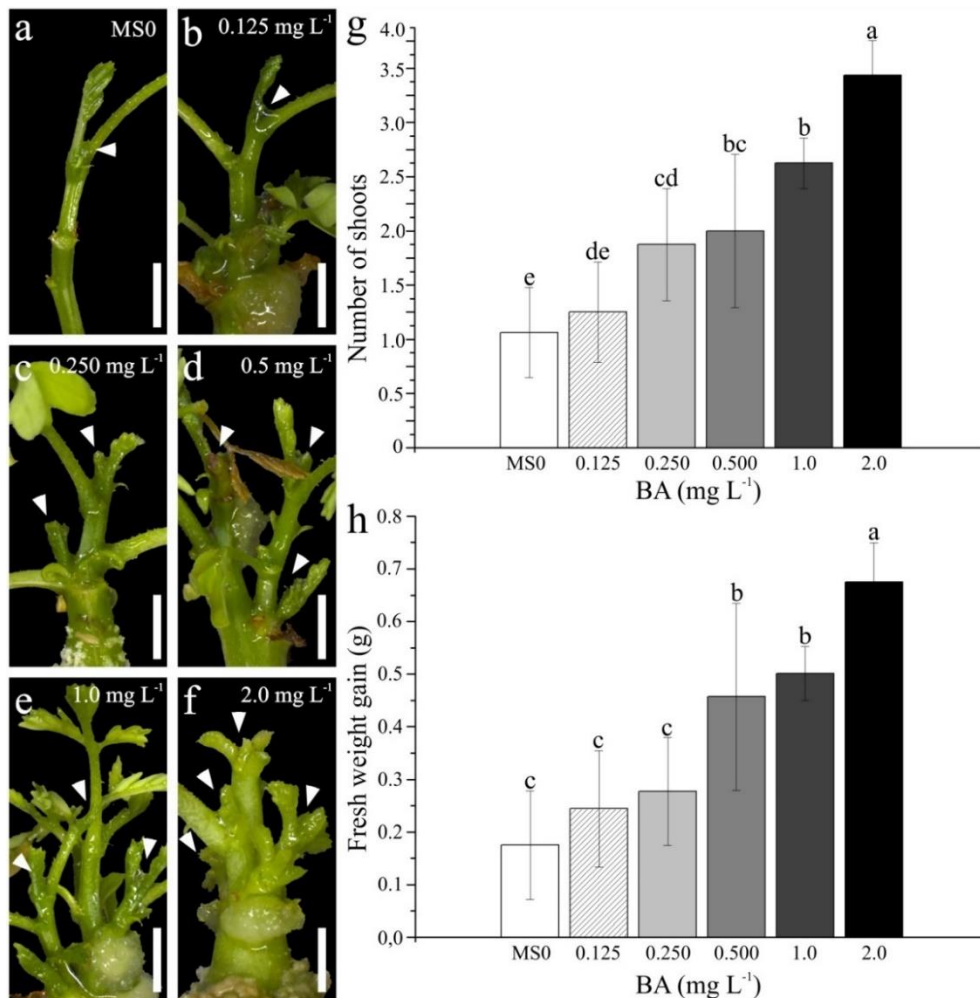


Figura 1. Indução de multibrotações em ápices caulinares de *Delonix regia* cultivados em meios suplementados com diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA). (a) Ápice caulinar cultivado na ausência de BA (MS0). (b-f) Ápices caulinares cultivados em meios suplementados com 0,125 (b), 0,250 (c), 0,5 (d), 1,0 (e) e 2,0 mg.L⁻¹ (f) de BA. (g) Número de gemas obtidas por explante. (h) Ganho médio de massa fresca por explante. As médias representadas em cada um dos gráficos seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Barras de escala = A-F 0,5 cm.

2.3.2. Citocininas afetam a largura e espessura foliolar de vitroplantas de *D. regia*.

Os ápices caulinares de *D. regia* cultivados na presença ou ausência de BA apresentaram as mesmas características histológicas. Os foliólulos possuíam uma epiderme unisseriada e hipoestomática. O mesofilo dorsiventral constituído por uma camada de parênquima paliçádico e duas a quatro camadas de parênquima lacunoso (Fig. 2A).

Contudo, alterações morfométricas foram observadas na primeira folha bipinada de explantes cultivados em meios suplementados com BA (Fig. 2B, C). Ápices caulinares cultivados em meio suplementado com BA apresentaram redução significativa na largura de seus folíolos quando comparadas ao tratamento controle (Fig. 2A, B). Essa redução foi gradativa e inversamente proporcional a concentração de BA. Ápices cultivados em meio contendo as maiores concentrações de BA apresentaram folíolos com dimensões reduzidas (Fig. 2A, B). Porém, esse comportamento não foi observado para a espessura dos folíolos. Ápices cultivados na presença de BA apresentaram redução significativa da espessura foliolar, em comparação ao tratamento controle (Fig. 2A, C). Contudo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos suplementados com BA (Fig. 2A, C).

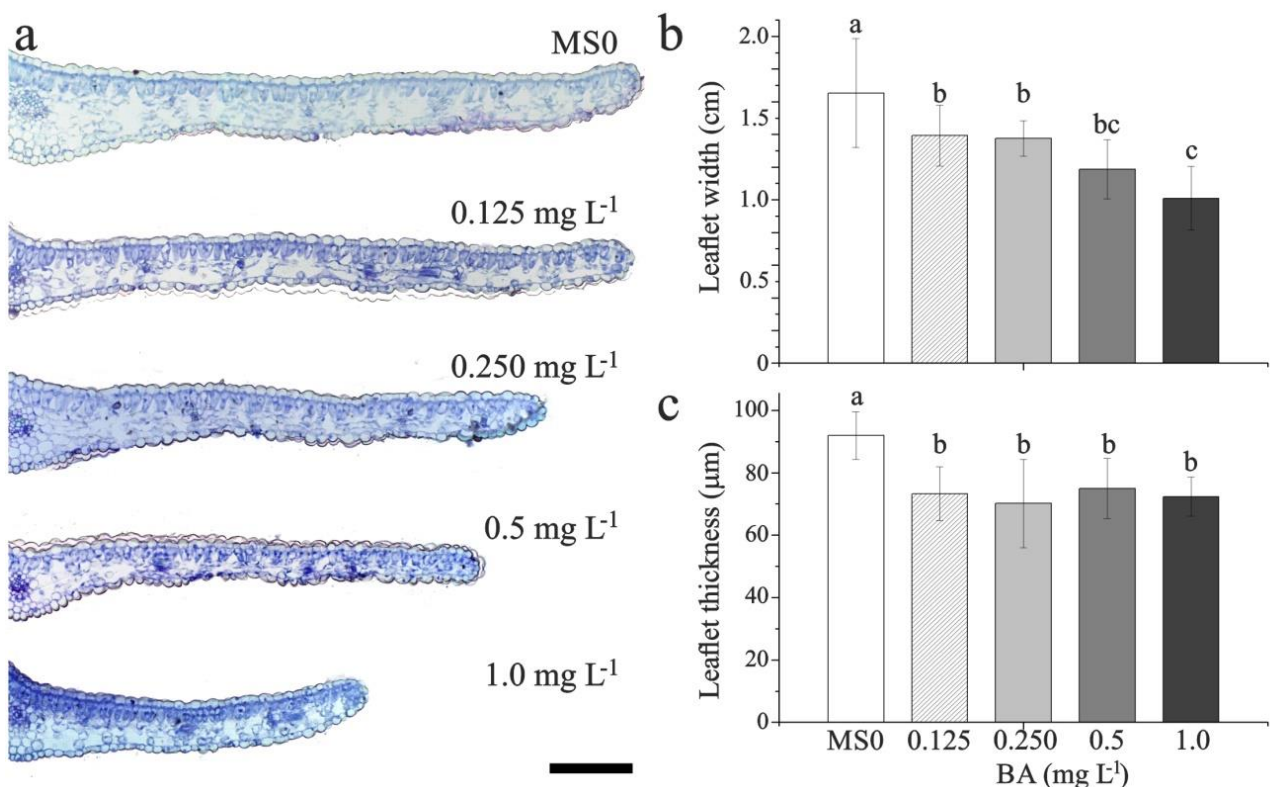


Figura 2. Caracterização micromorfométrica de folíolos de *D. regia* cultivados em meios suplementados com diferentes concentrações de 6-Benziladenina (BA). **(a)** Secções transversais da região mediana de folíolo médio da primeira folha bipinada. **(b)** Largura do folíolo (cm). **(c)** Espessura total da lâmina foliolar (μm). As médias representadas em cada um dos gráficos seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. **Abreviaturas:** MS0, Meio MS sem adição de BA (controle). Barra de escala= 100 μm .

Organogênese *in vitro* a partir de explantes cotiledonares

Os explantes cotiledonares de *D. regia* apresentaram diferentes respostas morfogênicas de acordo com as concentrações de BA presentes nos meios de cultura (Fig. 3a). Os explantes cotiledonares cultivados em meio MS na ausência de regulador de crescimento (MS0) não apresentaram respostas morfogênicas (Fig. 3a). Nos meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de BA, a porcentagem de explantes responsivos e que apresentaram calos, calculada adotando notas de 0 a 4 por unidade experimental (frasco), foi significativamente diferente entre os tratamentos e variou entre 12,5 % e 94,37 % (Fig. 3b). Nesses tratamentos, o início da formação de calos foi observado nas bordas dos explantes cotiledonares de *D. regia* (Fig. 3a). Contudo, esses calos apresentaram um aspecto compacto e poucas gemas foram obtidas a partir dessa proliferação celular (Fig. 3a). A maior responsividade dos explantes foliares foi observada nos meios de cultura suplementados com 2,0 mg.L⁻¹ de BA, uma vez que, mais de 94 % dos explantes apresentaram calos e gemas adventícias após 30 dias de cultivo (Fig. 3b, c).

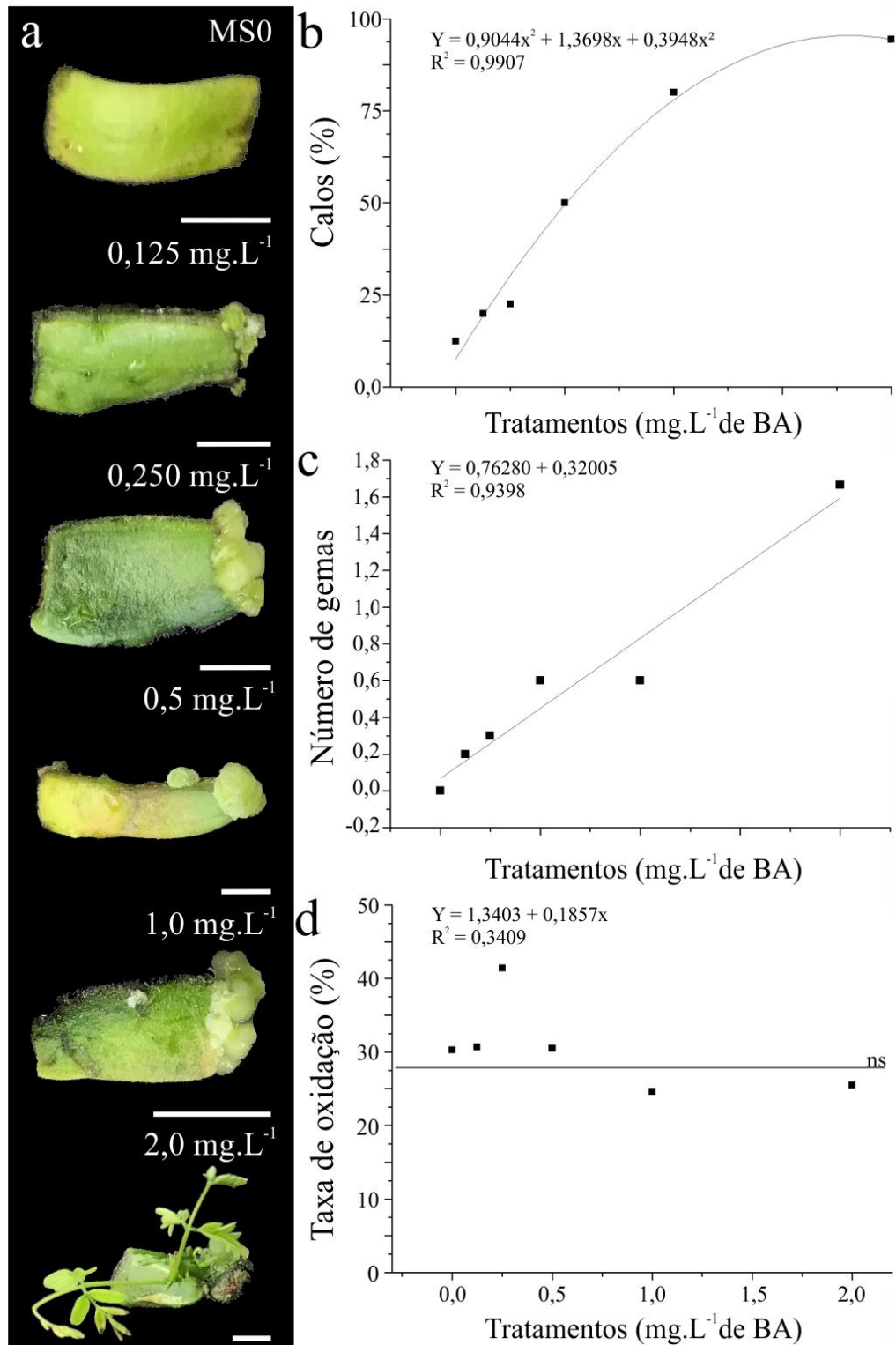


Figura 3. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos cotiledonares de *Delonix regia*. **(a-d)** Visão geral dos explantes cotiledonares aos 30 dias cultivados em meio na ausência (MS0; **a**) e na presença de diferentes concentrações de 6-Benziladenina (BA). **(b)** Porcentagem de calos; **(c)** número de gemas por explante; **(d)** Taxa de oxidação. Barras de escala = 0,5 cm, ns = não significativo.

Os explantes cotiledonares cultivados em meios de cultura suplementados com menores concentrações de BA apresentam em média maiores taxas de oxidação, porém para esta variável não se obteve ajuste (ns) (Fig. 3d). No tratamento suplementado com 0,250 mg.L⁻¹ de BA, observou-se a maior média de oxidação (41,3 %). Nos tratamentos suplementados com 1,0 e 2,0 de BA (Fig. 3d), a taxa de oxidação foi menor apresentando, em média, 24,8 e 26,0 %, respectivamente (Fig. 3d).

2.3.3. Citocininas influenciam na proliferação celular e formação de gemas em cotilédones de vitroplantas de *D. regia*.

Para caracterização estrutural das respostas morfogênicas de *D. regia*, foi realizada uma avaliação histológica comparativa de explantes cotiledonares cultivados na ausência e na presença das diferentes concentrações de BA testadas (Fig. 4).

Os cotilédones de *D. regia* eram espessos e apresentavam epiderme unisseriada e anfiestomática. O mesofilo era dorsiventral constituído por 3-4 camadas de parênquima paliádico e cerca de 10-15 camadas de parênquima lacunoso (Fig. 4a). Em explantes cotiledonares cultivados na ausência de BA, as análises em histológicas corroboraram as observações macroscópicas evidenciando que nenhuma resposta morfogênica foi observada na borda do explante após 30 dias de cultivo (Fig. 4a). Na região de secção foi observada, apenas, uma série de células com conteúdo escurecido, aparentemente, acúmulo de compostos fenólicos (Fig. 4a).

Proliferação celular e formação dos calos foram observadas somente nos tratamentos suplementados com BA (Fig. 4b-f). Nesses tratamentos, as respostas morfogênicas iniciaram-se a partir de divisões celulares do mesofilo, na região de secção do explante (Fig. 4b-e). Nessa região também foi observado células contendo acúmulo de compostos fenólicos em todos os tratamentos suplementados com BA (Fig. 4b, c, e). As maiores concentrações de BA promoveram maior proliferação celular (Fig. 3B). Porém, não foram observadas diferenças citológicas entre os calos obtidos nos diferentes tratamentos. As células apresentam-se volumosas, vacuolizadas e citoplasma hialino, aparência típica de células de calo (Fig. 4b-f). Gemas adventícias também foram observadas, principalmente, no tratamento suplementado com 2 mg.L⁻¹

¹ de BA. As gemas se formavam na superfície dos calos organogênicos e apresentaram histologicamente estruturadas, constituídas por primórdios foliares e um promeristema bem definido com células menores com citoplasma denso e núcleos evidentes, consistente com a via de regeneração organogênica (Fig. 4f).

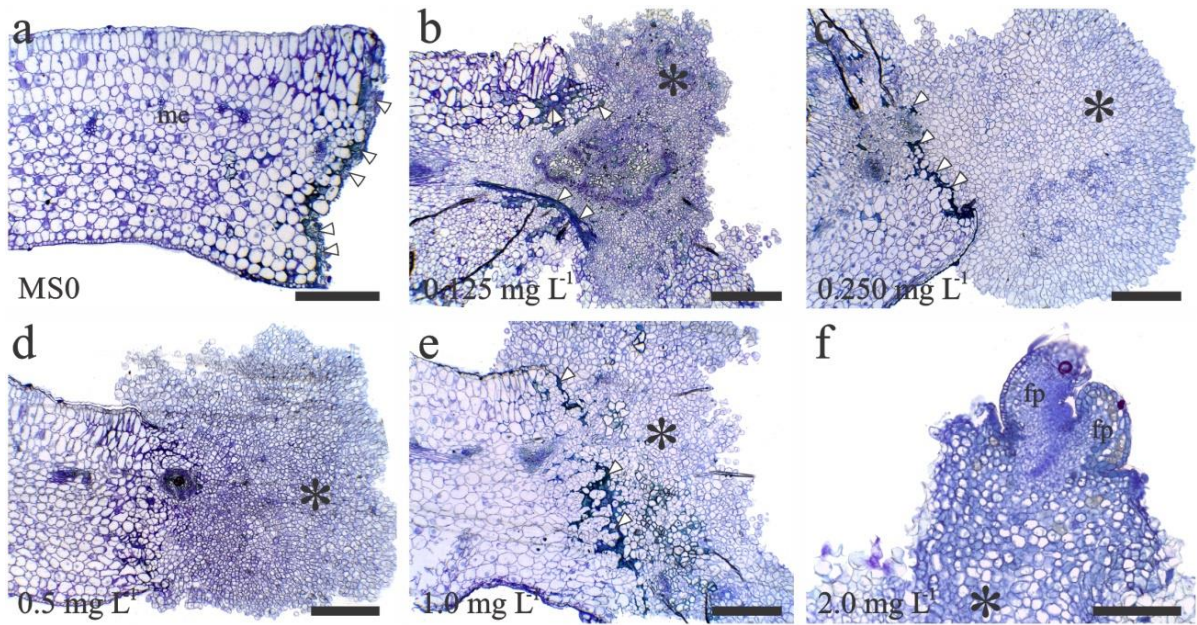


Figura 4. Caracterização histológica de explantes cotiledonares de *D. regia* após 30 dias de cultivo em meios suplementados com diferentes concentrações de 6-Benziladenina (BA). Secções transversais. **(a)** Explante cotiledonar cultivado em meio MS na ausência de reguladores de crescimento. **(b-f)** Explantes cotiledonares cultivados em meios suplementados com 0,125 **(b)**, 0,250 **(c)**, 0,5 **(d)**, 1,0 **(e)** e 2,0 mg.L⁻¹ **(f)** de BA. **Abreviaturas:** asterisco – calo; cabeça de seta - compostos fenólicos; me – mesofilo; fp – Primórdio foliar. Barras de escala = A, E 500μm; F 200 μm.

2.4. DISCUSSÃO

No presente estudo descrevemos as respostas morfogênicas obtidas a partir do cultivo de ápices caulinares e cotilédones de *D. regia* cultivados sob diferentes concentrações de citocinina. A escolha desses explantes foi baseada no uso recorrente de ápices caulinares para a indução de multibrotações em espécies arbóreas (OLIVEIRA et al. 2013) e, também, nos poucos trabalhos de micropropagação realizados com *D. regia*, que utilizaram explantes embrionários (ABDI & HEDAYAT 2011; MYERS & VENDRAME 2004). Sabe-se que, tecidos jovens

como ápices caulinares e cotilédones representam fontes de explantes promissoras para regeneração, pois são compostos de células no início do seu caminho de desenvolvimento apresentando baixo nível de diferenciação (WENDLING et al. 2006; ELHITI & STASOLLA 2011; Rocha et al. 2015).

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares pode proporcionar maior estabilidade genética do genótipo, uma vez que, a ativação meristemática é menos propícia a eventos de variação somaclonal comumente observadas em processos de neoformação de órgãos (TORRES et al. 2008). O uso de segmentos apicais também foi reportado, com sucesso, para a multiplicação *in vitro* de *Bauhinia cheilantha* (GUTIÉRREZ et al. 2011) e *Acacia auriculiformis* (YADAV et al 2015). Já para *Erythrina velutina* (COSTA et al. 2010) e *Plathymenia reticulata* (MOURA et al. 2012), importantes espécies arbóreas da família Fabaceae, o uso de segmento cotiledonar foi recomendado para o estabelecimento *in vitro* devido a elevada capacidade de regeneração desse tecido. Nestes trabalhos, tanto ápices caulinares quanto explantes cotiledonares de *D. regia* se mostraram eficientes para a indução de multibrotações e organogênese *in vitro*, respectivamente. Contudo, a conversão das gemas em plântulas não foi observada. Futuros estudos são necessários a fim de otimizar as etapas de alongamento e enraizamento das gemas adventícias de *D. regia*.

Çölgeçen e Toker (2008) constataram que a formação de gemas em calos formados a partir do cultivo de ápices caulinares de *Trifolium pratense* (Fabaceae) começam em 2 a 3 semanas. Porém, não foi observado formação de calos ou quaisquer outras respostas morfogenéticas em hipocótilos, epicótilos, cotilédones ou folhas primárias em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BA. A maior formação dessas gemas foi em ápices caulinares inoculados em meio MS suplementados com 2,5 e 3 mg.L⁻¹ de BA, concentrações similares as utilizadas, também, no presente estudo.

A presença de BA no meio de cultivo foi essencial para o sucesso da indução de multibrotações em ápices caulinares e organogênese *in vitro* em segmentos cotiledonares de *D. regia*. Na ausência de BA nenhuma resposta morfogenética foi observada em ambos explantes utilizados. Ao contrário, o aumento gradativo das concentrações de BA no meio de cultura aumentaram a frequência de formação de massa fresca e gemas em ambos, ápices caulinares e cotilédones, evidenciando o comportamento de dose-dependente de *D. regia*. A sinalização molecular da citocinina

é necessária para a manutenção e diferenciação de gemas. Durante a organogênese *in vitro*, as citocininas promovem a expressão de genes essenciais para induzir a formação de novos meristemas caulinares (SU et al. 2011). Porém, a concentração correta de fitorreguladores é essencial para a especificação e diferenciação celular. No presente estudo, a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BA foi a melhor concentração para induzir a formação de gemas, tanto em ápices quanto em segmentos cotiledonares.

As citocininas também desempenham um importante papel no desenvolvimento foliar. Nesse órgão, as citocininas atuam como fatores de “juvenildade” promovendo a morfogênese e retardando a diferenciação e a senescência. Aqui, a suplementação de BA no meio de cultivo promoveu a redução das dimensões foliares. Esse comportamento também foi observado em *Arabidopsis thaliana* (espécie modelo) em que aplicação exógena de citocinina também resultou em rosetas com folhas pequenas (Greenboim-Wainberg et al. 2005). Essas respostas evidenciam o efeito compensatório das citocininas no desenvolvimento vegetal, uma vez que, elevadas concentrações de citocinina induzem maior formação / ativação de gemas adventícias, porém apresentam órgãos com menores dimensões.

Jaiwal e Gulati (1991) estudando os efeitos de BA em explantes cotiledonares de *Tamarindus indica* observaram que a maior proporção de gemas neoformadas ocorreu em meio suplementado com 1,12 mg.L⁻¹. Valores próximos aos encontrados para *D. regia*.

De acordo com Ikeuchi et al. (2016), o processo de regeneração pode ocorrer a partir da reativação de células somáticas indiferenciadas do corpo vegetal ou a partir da reprogramação de células somáticas diferenciadas. Nos explantes cotiledonares de *D. regia*, as análises histológicas evidenciaram que a origem das respostas morfogenéticas (calos e gemas adventícias) ocorreram a partir de divisões celulares do mesofilo. Embora os cotilédones constituam tecidos embrionários, as células parenquimáticas desse órgão já apresentavam certo grau de diferenciação sendo, inclusive, classificadas em parênquima paliçádico e lacunoso. Essa diferenciação dos tecidos de mesofilo cotiledonar sugere que o processo de regeneração de *D. regia* tenha ocorrido a partir da reprogramação celular. A capacidade de células do mesofilo foliar e/ou cotiledonar induzirem respostas morfogenéticas já foi reportada em alguns

estudos histológicos (SHARMA & MILLAM 2004; WANG et al. 2011), sendo observada, principalmente, em explantes excisados previamente a inoculação.

2.5. CONCLUSÕES

Em resumo, a suplementação de BA foi essencial para a indução de multibrotações e organogênese *in vitro* em ápices caulinares e cotilédones de *D. regia*, respectivamente. Ambas as fontes de explante apresentaram comportamento dose-dependente, em que, a maior formação de gemas e de massa fresca foi observada em meios de cultura suplementados com 2,0 mg.L⁻¹ de BA. As alterações histológicas observadas em folíolos dos ápices caulinares cultivados na presença de diferentes concentrações de citocininas, bem como, a origem das respostas morfogênicas obtidas a partir de explantes cotiledonares também foram descritas. Os resultados obtidos no presente estudo poderão contribuir para o estabelecimento e otimização de sistemas de micropropagação dessa importante espécie arbórea ornamental.

2.6. REFERÊNCIAS

- ABDI, G., HEDAYAT, M. Induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo and immature seed of royal poinciana (*Delonix regia*). **World Applied Sciences Journal**, Boushehr, v. 13, p. 391-395. 2011.
- AQIL, F., AHMAD, I., MEHMOOD, Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, [S. l.], v. 30, p. 177-183. 2006.
- ÇÖLGEÇEN. H., TOKER, M. C., Plant regeneration of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. **Biol Res** v. 41, p. 25-31, 2008.
- COSTA, G. M., NEPOMUCENO, C. F., SANTANA, J. R. F., Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 40, n. 5, p. 1090-1096. 2010.
- DIAS, P. C. OLIVEIRA, L. S. DE O., XAVIER, A., WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, p. 72, p. 453-462, 2012.
- ELHITI, M., STASOLLA, C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview. In: THORPE, T.A., YEUNG, E.C. Plant embryo culture: methods and protocols. New York: **Humana**. v.17, p.229-255. 2011.
- GANTAIT, S., KUNDU, S., DAS, P. K. Acacia: An exclusive survey on *in vitro* propagation. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences** v. 17 n. 2, p. 163-177. 2018.
- GREENBOIM-WAINBERG, Y., MAYMON, I., BOROCHOV, R., ALVAREZ, J., OLSZEWSKI, N. ORI, N., ESHED, Y., WEISS, D. Cross talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. **Plant Cell**, [S. l.], v. 17 n. 1, p. 92–102. 2005.
- GUTIÉRREZ, I. E.M, NEPOMUCENO CF, LEDO CAS, SANTANA JRF Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural** v. 41, n. 2, p. 260-265, 2011.
- IKEUCHI, M., OGAWA, Y., IWASE, A., SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, v. 143 n. 1 1442–1451. 2016.
- JAIWAL, P. K., GULATI, A. *In vitro* high frequency plant regeneration of a tree legume *Tamarindus indica* (L.). **Plant Cell Reports**, [S. l.], V. 10, p. 569-573. 1991.
- LAKSHMANAN, P., TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, Armidale, v. 2, n.1, p. 136-148. 2000.
- LAMEIRA, O. A., LOPES, S. C., NOGUEIRA, R. C., CORDEIRO, I. M. C. C., PINTO, J. E. B. P., REIS, L. R. S. Efeito de diferentes concentrações de reguladores de

crescimento sobre a micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla* King) por meio de explantes juvenis. **Plan Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 53-58, 2005.

MOURA, L. C., TITON, M., FERNANDES, J. S. C., SANTANA, R. C., OLIVEIRA, M. L. R. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1691-1698. 2012.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, Riverside, v. 15 n. 1, p. 473-497. 1962.

MYERS A. R. & VENDRAME W. A. Propagation of yellow kampong royal poincianavia somatic embryogenesis. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. Homestead, v. 117, n. 1, p. 338-341. 2004.

NUNES, E. C., CASTILHO, C. V., MORENO, F. N., VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 259-268, 2002.

NUNES, E. C., LAUDANO, W. L. S., MORENO, F. N., CASTILHO, C. V., MIOTO, P., SAMPAIO, F. L., BORTOLUZI, J. H., BENSON, E. E., PIZOLATTI, M. G., CARASEK, E. e VIANA, A. M. Micropropagation of *cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) S.M. Jain and H. Häggman (eds.), **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**, p. 221-235. 2007.

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

PAREKH, J., & CHANDA, S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. **African Journal of Biomedical Research**, v. 10 n. 2, p. 175 - 181. 2007.

RATHORE, J. S., RATHORE, V., SHEKHAWAT, N. S., SINGH, R. P., LILER. G., PHULWARIA, M., DAGLA. H. R. (2004) Micropropagation of woody plants. In: *Plant Biotechnology and Molecular Markers* Srivastava PS, Narula A, Srivastava S *Plant Biotechnol Mol Markers* Springer, Netherland v. 13, n. 1, p. 207-217. 2004.

ROCHA, D. I., MONTE-BELLO C. C., DORNELAS, M. C. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell Tiss Org**, Campinas, v. 120, n. 1, p. 1087-1098. 2015.

SHABIR, G., ANWAR, F., SULTANA, B., KHALID, Z. M., AFZAL, M., KHAN, Q. M., Antioxidant and antimicrobial attributes and phenolics of different solvent extracts from leaves, flowers and bark of Gold Mohar [*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf]. *Molecules*. [S. I.], v. 16 n. 9, p. 7302±19. 2011.

SHARMA, S. K., MILLAM, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Reports**, Dundee, v. 23, n. 3 115–119. 2004.

SILVA, J. A. T. A Review of the *in Vitro* Propagation of *Bauhinia* Spp. **Journal Horticulture Research**, Kagawa-ken, v. 21, n. 1, p. 39–45. 2013.

SILVA, P. P., CONTIM, L. A. S., FREITAS, D de. V., ARIDE, P. H. R., SANTOS, A. L. W Dos. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). *Scientia Agraria*. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.6, p. 437-443. 2010.

SINGH S., KUMAR S. N., A review: introduction to genus *Delonix*. **World J Pharm Pharm Sci**. Hisar, v. 3 n. 6, p. 2042±55. 2014.

SOBROSA, R. C., CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Santa Maria, v.10, n.1, p. 58-68. 2003.

SOUZA, R. R., PAIVA, P. D. O., SILVA, R. R., SILVA, D. P. C., REIS, M. V., PAIVA, R. Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient *in vitro* regeneration of *Genipa* sp. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. Lavras, v. 136n. 1, p. 153-160. 2018

SU, Y. H., LIU, Y. B., ZHANG, X. S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. **Mol. Plant**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 616–25. 2011

TORRES, A. C., TEIXEIRA, S. L., POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus TORRES, A.C. de (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA**. p. 133. 1998.

TRIGIANO, R. N., GENEVE, R. L., MERKLE, S. A., PREECE, J. E. Tissue and Cell Cultures of Woody Legumes. **Horticultural Reviews**, Knoxville, v.14, n. 1, p. 265-331, September. 1992.

VARSHNEY, A., ANIS, M. Trees: propagation and conservation, biotechnological approaches for the propagation of a multipurpose tree, *Balanites aegyptica* Del. Springer, India, [S. l.], p. 126. 2014.

WANG, X. D., NOLAN, K. E., IRWANTO, R. R., SHEAHAN, M. B., ROSE, R. J. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: The fate of the pluripotent and totipotent stem cells. **Ann Bot**, [S. l.], v. 107, n. 4, p. 599-609. 2011.

WENDLING, I., DUTRA, L. F., GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: **Embrapa Florestas**, p. 54 (**Embrapa Florestas. Documentos**, 130). 2006.

WERNER, E. T., PESSOTTI, K. V., LOPES F. P., CUZZUOL, G. R. F. Indução da calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1053-1055. 2007.

WINKELMANN, T. Recent advances in the propagation of woody plants. **Acta Hortic** (ISHS) [S. I.], v. 990, n. 1, p. 375–381. 2013

YADAV, R., YADAV. N., KUMAR, S. An Improved Micropropagation and Assessment of Genetic Fidelity in Multipurpose Medicinal Tree, *Acacia auriculiformis*. Proc. Natl. Acad. Sci., **India Section B Biology Science**, [S. I.], v. 86, n. 1, p. 921-929. 2015.

CAPÍTULO 3 - 6-BENZILADENINA E CINETINA INDUZEM DIFERENTES RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS EM SEGMENTOS COTILEDONARES DE FLAMBOYANT

RESUMO – Estudos prévios evidenciaram que explantes cotiledonares de flamboyant são responsivos à suplementação de baixas concentrações de 6-benziladenina (BA) no meio de cultivo apresentando maior número de gemas com o aumento da concentração. Contudo, altas concentrações de BA, bem como, outras fontes de citocininas não foram avaliadas. O objetivo desse trabalho foi comparar as respostas morfogênicas de flamboyant quando cultivados sob elevadas concentrações de BA e cinetina (KIN). Segmentos cotiledonares obtidos de vitroplantas foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) suplementado com diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 mg.L⁻¹) de BA ou KIN. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 °C em fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro). Após 40 dias de cultivo, independente da concentração utilizada, os tratamentos suplementados com BA apresentaram maiores porcentagens de formação de calos e massa fresca, em comparação aos tratamentos suplementados com KIN. Na ausência de reguladores de crescimento, os explantes cotiledonares não apresentaram nenhuma resposta morfogênica. A formação de gemas adventícias foi observada nos tratamentos suplementados com BA e KIN, sendo os maiores valores observados no tratamento suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BA. Os tratamentos suplementados com KIN não tiveram ajuste quanto ao número de gemas. Apesar de não ter sido observado a conversão de gemas em plântulas, acreditamos que este estudo poderá contribuir para o estabelecimento de sistemas de regeneração e micropropagação de flamboyant e demais espécies lenhosas da família Fabaceae.

Palavras-chave: Citocinina, Micropropagação, Organogênese *de novo*, Fabaceae, Planta Ornamental.

6-BENZYLADENIN AND CINETINE INDUCE DIFFERENT MORPHOGENETIC RESPONSES IN FLAMBOYANT COTILEDONARY SEGMENTS

ABSTRACT - Previous studies have shown that flamboyant cotyledonary explants are responsive to low concentration supplementation of 6-benzyladenine (BA), in order to increase the number of buds with increasing concentration. However, high concentrations of BA as well as other sources of cytokines have not been tested. The objective was compared to the morphogenetic responses of flamboyant when grown in large concentrations of BA and kinetin (KIN). Cotyledonary segments of vitroplants have been inoculated in Murashige and Skoog (MS) culture medium containing (1, 2, 4 e 8 mg.L⁻¹) BA or KIN. They were grown in a growth room at 25 °C in a 16:8 photoperiod (light:dark). After 40 days of cultivation, regardless of the concentration used, the treatments supplemented with BA presented higher percentage of callus formation and fresh mass in comparison to treatments supplemented with KIN. In the absence of growth regulators, non-cotyledonary explants have no other morphogenetic response. Adventitious bud formation was performed in the assays supplemented with BA and KIN, the highest values being observed without treatment supplemented with 2 mg.L⁻¹ BA. In the treatments supplemented with KIN do not adjust by itself. Although there was no conversion of buds to seedlings, we believe that this study may contribute to the establishment of regeneration and micropropagation systems of plants and other plant species of the Fabaceae family.

Key words: Cytokine, Micropropagation, De novo organogenesis, Fabaceae, Ornamental Plant.

3.1. INTRODUÇÃO

Delonix regia (Bojer ex Hook.) Raf., popularmente conhecida como flamboyant ou royal ponciana, é uma espécie arbórea da família Fabaceae amplamente distribuída nas regiões tropicais do planeta (LÓPEZ 2010). Possui rápido crescimento com uma copa que desenvolve em forma de 'guarda-chuva', tornando-se uma espécie de reconhecida relevância agroflorestal e ornamental, sendo utilizada, principalmente, no paisagismo urbano. *D. regia* também tem sido usada como agente medicinal devido o potencial para a produção de compostos com atividade antioxidante, antibacteriana, antiinflamatória, antidiarreico, antidiabético, antimicrobial, gastroprotetivo (AQIL et al. 2006; PAREKH et al. 2005; SINGH et al. 2014; SHABIR et al. 2011). Além disso, a goma obtida a partir das suas sementes são usadas como ligantes na fabricação de comprimidos (ADETOGUN & ALEBIOWU, 2009).

Diante da importância ornamental e medicinal dessa espécie, sistemas de micropropagação e regeneração *in vitro* têm sido estabelecidos a fim de contribuir com a multiplicação de genótipos e auxiliar em programas de bioprospecção. Trabalhos anteriores relataram o potencial de explantes cotiledonares de *D. regia* na indução de resposta morfogenéticas (MYERS & VENDRAME 2004; ABDI & HEDAYAT 2011). Costa et al. (2019) estudaram a indução de multibrotações e organogênese *in vitro* a partir de ápices caulinares e cotilédones. De acordo com os autores, as respostas morfogenéticas da espécie foram crescentes em relação às diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) testadas, sendo a maior taxa de gemas adventícias observada no tratamento de 2,0 mg.L⁻¹.

Contudo, concentrações maiores desse regulador de crescimento, ou mesmo, outro tipo de citocinina não foram testados. A cinetina (KIN), por exemplo, é capaz de induzir a proliferação celular e formação de novas gemas adventícias quanto adicionadas no meio de cultivo (FRÁGUAS et al. 2004), sendo, inclusive, recomendada para a micropropagação de algumas espécies lenhosas como, por exemplo, *Ficus carica*; *Salix humboldtiana*; *Emblica officinalis* (JORDAN & ITURRIAGA, 1980; PEREIRA et al. 2000; MISHRA et al. 1999).

A compreensão do comportamento *in vitro* de flamboyant sob outras classes e concentrações de reguladores de crescimento pode auxiliar na otimização de sistemas de regeneração estabelecidos para essa espécie vegetal. O presente estudo

teve como objetivo avaliar o comportamento de explantes cotiledonares de *D. regia* quando cultivados na presença de elevadas concentrações de 6-Benziladenina (BA) e cinetina (KIN) a fim de induzir de regeneração via organogênese *in vitro* para *D. regia*.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Material Vegetal

Sementes de *D. regia* foram coletadas de cinco indivíduos do Instituto Federal Goiano, na cidade de Rio verde, GO (17°48'08.7"S e 50°54'27.0"O) e da Universidade Federal de Goiás, Jataí, GO, Brasil (17° 52' 51"S e 51° 42' 50"O) e submetidas à escarificação mecânica. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água corrente e desinfestadas em etanol 70% por 2 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio comercial - 2,5% de cloro ativo (Qboa®) por 20 minutos. Por fim as sementes foram lavadas 4 vezes com água deionizada autoclavada, e inoculadas em frascos de 250 mL contendo 20 ml de meio de cultura composto por sais básicos MS (MURASHIGE & SKOOG 1962) (meia força), 100 mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado a 121°C e 1,5 atm. Os frascos foram acondicionadas em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 µmol m⁻².s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes de 20 W (Osram® luz do dia, Brasil). Sendo inoculadas duas sementes por frasco.

3.2.2. Obtenção dos explantes e indução da organogênese *in vitro*

Quinze dias após a inoculação, cotilédones foram retirados de plântulas recém-emergidas e segmentados em 4 fragmentos com aproximadamente 2 cm² cada. Os fragmentos cotiledonares que tiveram suas bordas removidas foram inoculados em novos frascos de 250 mL contendo 20 mL de meio MS (força total) conforme citado anteriormente. Contudo, nessa etapa os meios foram suplementados, também, com diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 mg.L⁻¹) de BA ou KIN. No tratamento controle

(MS0) não houve adição de regulador de crescimento. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ anteriormente à autoclavagem. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições citadas anteriormente. Os frascos foram acondicionadas em sala de crescimento sob temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.2.3. Parâmetros morfogenéticos

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os explantes cotiledonares foram avaliados por; (i) Formação de calos; (ii) número de gemas por explante (iii) ganho de massa fresca. O ganho massa fresca foi obtido após os 40 dias de cultivo por diferença de peso. Pesaram-se os frascos previamente com o meio de cultura (MS) (força total) e depois de inoculado o tecido obtendo por diferença o peso fresco das amostras no dia da inoculação. Após 40 dias, as amostras de cada repetição foram pesadas diretamente obtendo-se, por diferença, o ganho de massa dos tecidos. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida por regressão a um nível de significância 5% para comparar as melhores respostas das concentrações. As análises foram realizadas no Software Sisvar versão 5.6.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença, concentração e tipo de citocinina, influenciaram na indução de respostas morfogenéticas de *D. regia* (Fig. 1). Calos organogênicos foram observados somente na presença das citocininas. Na ausência de reguladores de crescimento, os explantes cotiledonares não apresentaram nenhuma resposta morfogenética (Fig. 1B, C). A suplementação de citocinina é essencial para a indução de respostas morfogenéticas em explantes cotiledonares de flamboyant (COSTA et al. 2019). Durante a organogênese *in vitro*, a sinalização molecular de citocininas é necessária para indução de proliferação celular e ativação do crescimento de gemas axilares promovendo a expressão diferencial de genes essenciais para a formação desses órgãos (MÜLLER & LEYSER 2011; SU et al. 2011).

No presente estudo, as porcentagens de formação de calos dos tratamentos suplementados com BA e KIN ajustaram-se a um modelo quadrático. Independente da concentração utilizada, os tratamentos suplementados com BA apresentaram maiores porcentagens de formação de calos, em comparação aos tratamentos suplementados com KIN, na qual a maior porcentagem de formação de calo foi de 85% na concentração de 2 mg.L⁻¹ de BA. A maior eficiência de BA, em relação a KIN, na indução de respostas morfogênicas pode estar relacionada a variações nas taxas de translocação diferencial dos mesmos nos explantes. (BLAKESEY 1991), ou mesmo, a menor susceptibilidade de degradação enzimática (MAGYARTABORI et al. 2010). Nos estudos envolvendo a micropropagação espécies lenhosas cultivadas em meio suplementado com citocininas é reportado a eficiência de citocininas mais ativas para a indução de respostas morfogênicas. Em *Stevia rebaudiana*, Rock-Okuyucu (2016) reportou que apesar de todas as citocininas testadas terem aumentado a responsividade dos explantes, BA foi mais efetiva que KIN e Tidiazuron (TDZ) para proliferação de gemas em segmentos nodais da espécie.

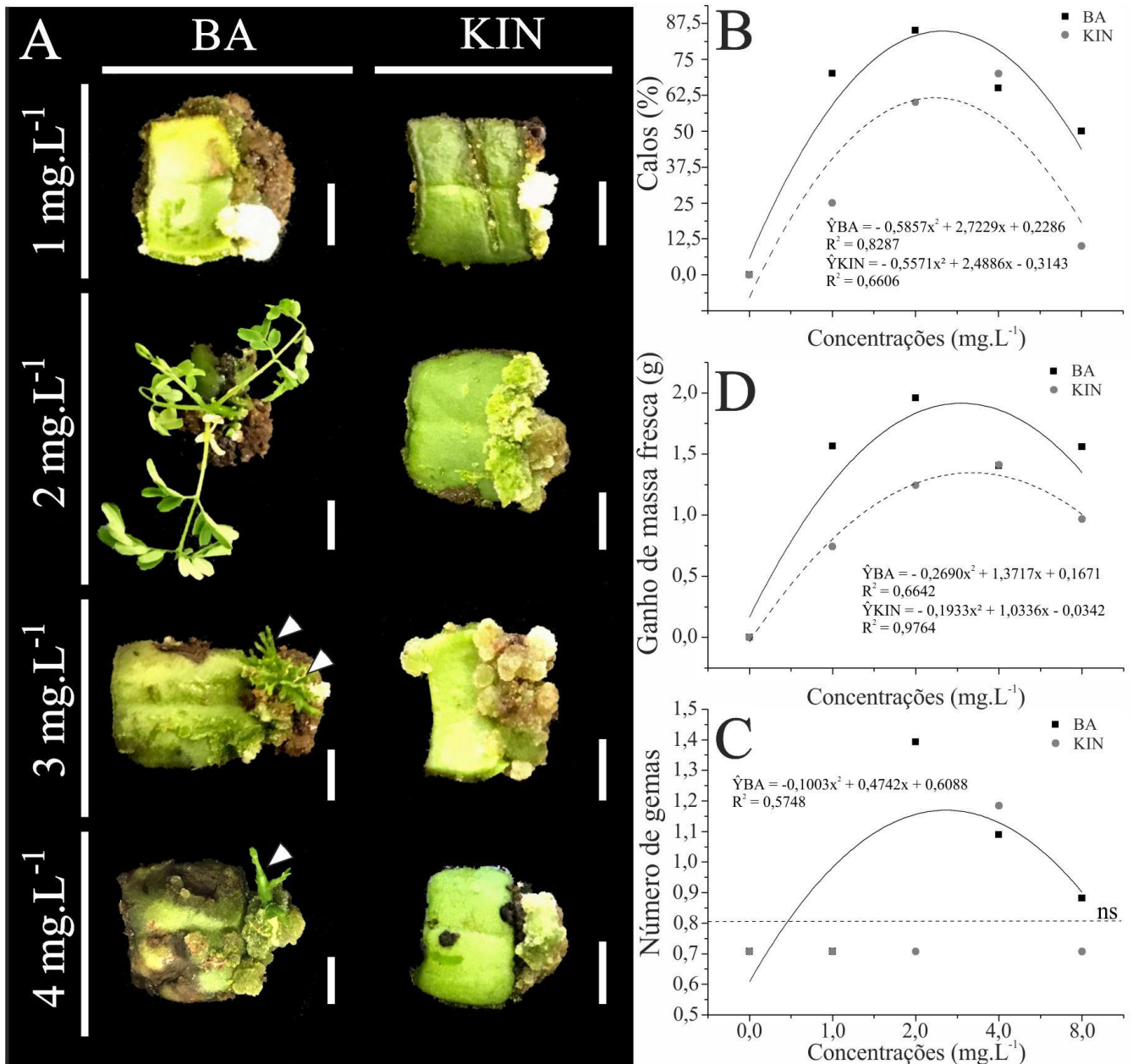


Figura 1. Indução da organogênese *in vitro* a partir de segmentos cotiledonares de *Delonix regia*. **(A)** Visão geral dos explantes cotiledonares cultivados em meio suplementado diferentes concentrações de 6-Benziladenina (BA) ou Cinetina (KIN). **(B)** Porcentagem de calos; **(C)** Número de gemas; **(D)** Massa fresca. Barras de escala = 0,5 cm.

A maior porcentagem de formação de calos para BA e KIN foi de 84,75% e 55,75% nas concentrações de 2,32 e 2,23 mg.L⁻¹ respectivamente (Fig. 1B). Em contrapartida, as maiores concentrações de BA e KIN testadas (8 mg.L⁻¹) inibiram a indução de calos apresentando as menores porcentagens de calos 50% e 10% respectivamente (Fig. 1B). Os tratamentos suplementados com BA apresentaram

maiores valores de massa fresca (Fig. 1D) e ajustando-se a um modelo quadrático, sendo o maior valor observado no tratamento suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BA. Os tratamentos suplementados com BA apresentaram maiores valores de massa fresca (Fig. 1D) e ajustando-se a um modelo quadrático, sendo o maior valor observado no tratamento suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BA. Esses resultados reforçam as evidências encontradas por Costa et al. (2019) que descreveram um comportamento dose-dependente de flamboyant, em que, a melhor concentração de BA para a indução de respostas morfogênicas em explantes cotiledonares era 2 mg.L⁻¹. Ibrahim et al. (2008), também reportou para *S. rebaudiana* que o maior número de respostas morfogênicas foram obtidas em MS suplementado com 2 mg.L⁻¹ BA, sendo que, as respostas decrescem nas maiores e menores concentrações (0 e 1, 4 e 8 mg.L⁻¹ desse mesmo regulador de crescimento).

A formação de gemas adventícias (Fig. 1C) foi observada nos tratamentos suplementados com BA e KIN, sendo os maiores valores observados no tratamento suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BA com 1,39 gemas, enquanto que para os tratamentos suplementados com KIN não tiveram ajuste. Os resultados encontrados para flamboyant estão de acordo com Balaraju (2008) e Iapichino e Airò (2008), em que a formação de gemas por explante de *Vitex agnus-castus* e *Metrosideros excelsa*, respectivamente, foi superior em meio de cultura suplementado com BA, em relação aos tratamentos suplementados com KIN. A maior formação de calos (93,71%) e gemas (72,34%) em explantes cotilédonares de *Punica granatum* L. (Romã) foi com a utilização de 4 e 2 mg.L⁻¹ de BA respectivamente (PARMAR 2012), comportamento igual ao encontrado com *D. regia*.

A eficácia do BA em comparação com outras citocininas também foram reportados, por exemplo, por Sharma (1981), utilizando ápices caulinares de *Bougainvillea glabra* (buganville), uma espécie também ornamental e de difícil propagação *in vitro*. Nesse trabalho os autores observaram que a cinetina, foi considerada ineficaz para induzir a diferenciação de gemas adventícias além disso de produziu apenas calos como o reportado no presente trabalho.

Neste estudo, a cinetina não apresentou grande capacidade de formação de gemas e alguns dos problemas para essa resposta pode estar relacionado a fatores, como a taxa de translocação diferencial das citocininas ou sensibilidade a degradação enzimática, como já reportado anteriormente, mas também, a necessidade de

associar a cinetina com outras classes de reguladores de crescimento. Trabalhos anteriores relataram o potencial de explantes embrionários de *D. regia* na indução de respostas morfogênicas quando cultivados meios de cultura com elevada razão auxina / citocinina (MYERS & VENDRAME 2004; ABDI & HEDAYAT 2011).

A suplementação de BA foi essencial para a indução de multibrotações e organogênese *in vitro* de cotilédones de *D. regia*. Em todos os tratamentos suplementados com BA apresentaram maior formação de gemas e calos em comparação com KIN, |os maiores valores foram observados quando suplementados com 2,0 mg.L⁻¹ de BA. Apesar de não ter sido observado alta conversão das gemas obtidas em plântulas, acredita-se que os resultados obtidos poderão contribuir para o estabelecimento e otimização de sistemas de regeneração *in vitro* dessa espécie, dado a escassez de dados na literatura.

3.4. CONCLUSÕES

O presente estudo pode confirmar que tecidos embrionários além de terem maiores capacidades de regeneração que outros tecidos mais juvenis, estes também quando suplementados em determinadas citocininas mais ativas, podem fornecer melhores respostas morfogênicas, no presente estudo foi possível constatar que a suplementação de 2,0 mg.L⁻¹ de 6-Benziladenina foi mais efetiva que cinetina, garantindo melhores repostas em todas as características morfogênicas. O presente estudo pode fornecer informações de base para programas de melhoramento genético com espécies florestais além de programas de bioprospecção

3.5. REFERÊNCIAS

- ABDI, G., HEDAYAT, M. Induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo and immature seed of royal poinciana (*Delonix regia*). **World Appl Sci J**, Boushehr, v. 13, n. 3, p. 391-395, 2011.
- ADETOGUN, G. E., ALEBIOWU, G. Properties of *Delonix regia* seed gum as a novel tablet binder. **Acta Polica Pharmacology**, Ile-Ife, v.66, p.433-438, 2009.
- AQIL, F., AHMAD, I., MEHMOOD, Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, New Delhi, v. 30, p. 177-183. 2006.
- BALARAJU, K., AGASTIAN, P., PREETAMRAJ, J. P., AROKIYARAJ, S., IGNACIMUTHU, S. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae) - a valuable medicinal plant. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, Wallingford, v. 44, n. 5, p. 436-441. 2008.
- BLAKESEY D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot proliferation of *Musa* and *Rhododendron*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** Giastonbury, v. 25, n. 1, p. 69–74. 1991.
- COSTA, A de. O., SILVA, L. A. S., DUARTE, I. M., ROCHA, M. M., SILVA, G. Z da., SILVA, D. F. P da., NETTO, A. P. DA C., ROCHA, D. I. Shoot proliferation and *in vitro* organogenesis from shoot apex and cotyledonary explants of royal poinciana (*Delonix regia*), an ornamental leguminous tree. **Tree** – Submitted, Jataí, v. 1, n. 1, p. 1-15. 2019.
- FRÁGUAS, C. B., PASQUAL, M., PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n. 1, p. 49- 55. 2004.
- IAPICHINO G., AIRÒ M. Micropropagation of *Metrosideros excelsa*. **In Vitro Cell. Development Biology Plant**, Wallingford, v. 44, n. 4, p. 330-337. 2008.
- IBRAHIM, I. A., NASR M. I., B. R. MOHAMMED, B. R., EL-ZEFZAFI, M. M. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. **Sugar Tech**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 254–259. 2008.
- JORDAN, M., ITURRIAGA, L. Formación de raíces en entrenudos de higuera (*Ficus carica* L. cv. Adriatic) cultivados *in vitro*. **Ciencia Investiones Agrícolas**, Buenos Aires, v. 7, n. 2, p. 149-151. 1980.

MAGYAR-TÁBORI K., DOBRÁNSKI J., TEIXEIRA DA SILVA J. A., BULLEY S. M., HUDÁK I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. Debrecen, V. 101, p. 251–267. 2010.

MISHRA, M., SAXENA, R. P., PATHAK, R. K., SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chaubattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122. 1999.

MÜLLER, D. AND LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Ann. Bot.** [S. I.], v. 107, 1203–1212. 2011.

MYERS, A. R., VENDRAME, W. A. Propagation of yellow kampong royal poincianavia somatic embryogenesis. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v. 117, n. 1, p. 338-341. 2004.

PAREKH, J., & CHANDA, S. 2007. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. **African Journal of Biomedical Research**, Rajkot, v. 10, n. 2, p. 175 - 181. 2007

PARMAR, N., KANWAR, K. THAKUR, A. K. *In Vitro* Organogenesis from Cotyledon Derived Callus Cultures of *Punica granatum* L. cv. Kandhari Kabuli. **National Academy Science Letters**, Allahabad, v. 35 n. 3, p. 215-220. 2012.

PEREIRA, A. M. S., BERTONI, B. W., MORAES, R. M., FRANCA, S. C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Ribeirão Preto, v. 2, n. 2, p. 17-21, 2000.

RÖCK-OKUYUCU, B., BAYRAKTAR, M., AKGUN, I. H., & GUREL, A. Plant Growth Regulator Effects on *In Vitro* Propagation and Stevioside Production in *Stevia rebaudiana*, **Bertoni HortScience**, Akhisar/Manisa, v. 51 n. 12, p. 1573–1580. 2016

SHABIR, G., ANWAR, F., SULTANA, B., KHALID, Z. M., AFZAL, M., KHAN, Q. M., Antioxidant and antimicrobial attributes and phenolics of different solvent extracts from leaves, flowers and bark of Gold Mohar [*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf]. **Molecules**, [S. I.], v. 16, n. 9, p. 7302±19. 2011.

SHARMA, A. K., PRASAD, R. N., CHATURVEDI, H. C. Clonal propagation of *Bougainvillea glabra* 'Magnifica' through shoot apex culture, **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Lucknow, v. 1 n. 1 p. 33–38. 1981.

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 Organ Culture**, Bhubaneshwar, v. 68 n. 2, p. 203–209. 2002.

SU, Y. H., LIU, Y. B., ZHANG, X. S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, [S. I.], v. 4, n. 4, p. 616–25. 2011.

CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE COTILÉDONES DE *Delonix regia* (BOJER EX HOOK) RAF. EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento morfofisiológico de explantes cotiledonares em diferentes estádios de desenvolvimento durante a indução de embriogênese somática. Embriões zigóticos imaturos, cotilédones maduros e derivados de plântulas foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) suplementado com 0,125 mg.L⁻¹ de 6-benziladenina (BA) e 1,0 mg.L⁻¹ de ácido diclorofenóxiacético (2,4D). O experimento foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 1°C e com ausência de luz durante 30 dias. Os segmentos cotiledonares maduros, excisados de sementes, não apresentaram nenhuma resposta morfogenética, tampouco, alterações citológicas ao longo dos 30 dias de cultivo. Em contrapartida, embriões zigóticos e segmentos cotiledonares derivado de plântulas apresentaram formação de calos embriogênicos, apresentando ganho de massa e formação de estruturas pré-embriogênicas ao longo do experimento. Durante a indução embriogênica, a dinâmica de mobilização de reservas foi diferente entre as fontes de explante. Enquanto cotilédones maduros não sofreram grandes alterações nos níveis de proteínas, lipídios e carboidratos, esses compostos foram mobilizados em embriões imaturos e cotilédones derivados de plântulas. Os resultados obtidos poderão contribuir para a melhor compreensão do comportamento *in vitro* de explantes embrionários, bem como, para o estabelecimento de sistemas de regeneração e micropropagação de espécies de leguminosas lenhosas via embriogênese somática.

Palavras-chave: Flamboyant, embriogênese somática, Cotilédones, Fabaceae

**DETERMINATION OF THE EMBRYOGENIC POTENTIAL OF *Delonix regia*
COTYLEDONS (BOJER EX HOOK) RAF. IN DIFFERENT DEVELOPMENT
STAGES**

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the morphophysiological behavior of cotyledonary explants at different stages of development during the induction of somatic embryogenesis. Immature zygote embryo, mature cotyledons and cotyledons of plants grown *in vitro* were inoculated in Murashige and Skoog (MS) culture medium with 0,125 mg.L⁻¹ of 6-benzyladenine (BA) and 1,0 mg.L⁻¹ of dichlorophenacetic acid (2,4D). The experiment was updated in room growth at 25 ± 1°C with absence of light for 30 days. The mature cotyledonary segments, excised from seeds, are not identical to the morphogenetic response, nor are cytological changes along the 30 days of culture. In contrast, zygotic embryos and cotyledon derived from seedlings, evidence embryogenic formation, presenting mass gain and formation of pre-embryogenic structures throughout the experiment. During embryogenic induction, a dynamics of reserve mobilization was different between sources of explant. The mature cotyledons did not undergo major changes in the levels of proteins, lipids and carbohydrates, which were transformed into immature embryos and cotyledons derived from seedlings. The results obtained contribute to a better understanding of the *in vitro* behavior of embryonic explants, as well as to the establishment of regeneration and micropropagation systems of woody leguminous species via somatic embryogenesis.

Keywords: Flamboyant, somatic embryogenesis, cotyledons, Fabaceae

4.1. INTRODUÇÃO

Espécies lenhosas quando micropropagadas *in vitro*, tem demonstrado grande viabilidade para produção de novas mudas em escala comercial, bem como, para ações de conservação de espécies nativas e exóticas e recuperação de áreas degradadas (MERKLE & MAIRN 2005). Dentre as diversas técnicas de micropropagação, a embriogênese somática é um método biotecnológico para se obter material clonal que pode servir como um eficiente fornecedor de propágulos para produção de sementes sintéticas, biorreatores e criopreservação, especialmente para espécies florestais (SILVA, 2012). A embriogênese somática refere-se a um processo de formação de estrutura bipolar em que os meristemas apicais caulinares e radiculares são formados de maneira sincrônica. Além de fornecerem base para o melhoramento genético, a embriogênese somática também tem sido usada como metodologia para a compreensão dos mecanismos e aspectos relacionados a formação de embriões em plantas (SANJEEV & STEVE 2004).

Diversos protocolos de regeneração, via embriogênese somática, têm sido estabelecidos e constantemente otimizados para as espécies florestais, especialmente da família Fabaceae (KUMAR et al. 2002; MYERS & VENDRAME 2004; RASTOGI et al. 2008; GANTAIT et al. 2016; ABDI & HEDAYAT 2011; PERVEEN et al. 2011; SILVA et al. 2017). Em geral, a indução de embriogênese somática depende, principalmente, dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura e o tipo de explante utilizado. A escolha do explante de espécies lenhosas é um fator crítico para o sucesso da maioria dos protocolos (OLIVEIRA et al. 2013). É de conhecimento que tecidos embrionários como embriões zigóticos, e cotilédones têm sido frequentemente escolhidos por apresentarem menor diferenciação celular (TRIGIANO et al. 1999). Na literatura, um grande número de trabalhos que envolvem embriogênese somática relatam o uso de embriões zigóticos, ou parte deles, como explantes para obtenção de embriões somáticos, como em: *Ilex aquifolium* (HU & SUSSEX 1971), *Fagus sylvatica* (VIEITEZ et al. 1992), *Liriodendron tuipifera* (SOTAK et al. 1991) e *Citrillus lonatus* (COMPTON & GRAY, 1993).

Trabalhos anteriores relataram o potencial de embriões zigóticos imaturos para a indução de embriogênese somática de *Delonix regia*, espécie ornamental popularmente conhecida como flamboyant, quando cultivados em meios com elevada razão auxina / citocinina (MYERS E VENDRAME 2004; ABDI E HEDAYAT 2011). Contudo, esses sistemas embriogênicos são ineficientes e apresentaram baixa frequência de formação de embriões somáticos, além da limitação para a obtenção de explantes, uma vez que, o florescimento de *D. regia* é anual (PALIOTO et al. 2007).

Considerando que cotilédone é um tecido embrionário e pode ser obtido de sementes maduras e recém-germinadas, esse explante torna-se uma fonte viável de otimização dos processos de regeneração *in vitro* de flamboyant. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial morfogênético de explantes cotiledonares imaturos, maduros e obtidos a partir de plântulas de flamboyant para a indução de embriogênese somática.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal e obtenção dos explantes

O trabalho foi realizado com três fontes de explantes, sendo elas: embriões zigóticos imaturos, cotilédones maduros e cotilédones derivados de plântulas (Fig. 1).

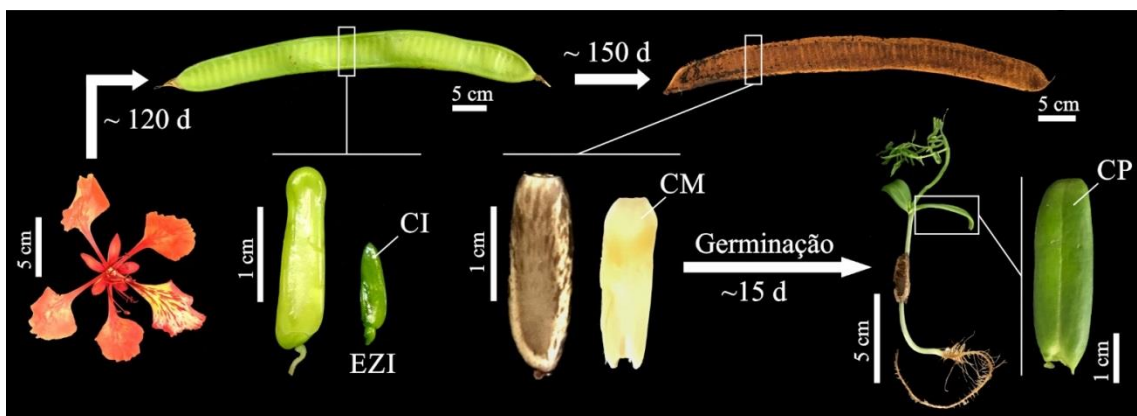


Figura 1. Fenologia de *D. regia* e caracterização dos explantes utilizados para a indução de embriogênese somática. **Abreviaturas:** CI = Cotilédone imaturo; CM = Cotilédone maduro; CP = Cotilédone derivado de plântula; EZI = Embrião zigótico imaturo.

Sementes de flamboyant foram coletadas de cinco indivíduos do Instituto Federal Goiano na cidade de Rio verde, GO (17°48'08.7"S e 50°54'27.0"O) e da Universidade Federal de Goiás, Jataí, GO, Brasil (17° 52' 51"S e 51° 42' 50"O). Sementes imaturas foram coletadas de frutos verdes aproximadamente 120 dias após o início da primavera (Fig. 1). Sementes maduras foram coletadas durante todo o ano a partir de frutos maduros ou do banco de sementes do solo. Sementes maduras foram submetidas à escarificação mecânica, no lado oposto ao hilo, utilizando lixa NORTON A257 saint-gobain®. Posteriormente, as sementes escarificadas foram lavadas e submersas em água estéril autoclavada, por oito horas.

A desinfestação de sementes imaturas e maduras ocorreu com a imersão das mesmas em etanol a 70% por 2 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio comercial [água sanitária comercial - 2,5% de cloro ativo] por 20 minutos e lavadas 4 vezes com água estéril autoclavada. Após a desinfestação, na câmara de fluxo, as sementes imaturas foram excisadas, com auxílio de bisturi, para a retirada dos embriões imaturos. Parte das sementes maduras também foi excisada para a retirada dos cotilédones maduros. As demais foram inoculadas em frascos de 250 mL, previamente esterilizados, contendo meio de cultura para germinação e obtenção dos cotilédones derivados de plântulas (Fig. 1). O meio era constituído de sais MS (MURASHIGE E SKOOG 1962), 3% de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol e 0,8 % de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 20 min a 121°C e 1 × 10⁵ Pa (1,1 kg.cm⁻²). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25 °C ± 1°C e fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) por 15 dias (Fig. 1).

4.2.2. Indução de embriogênese somática

Após a obtenção dos explantes, embriões zigóticos imaturos, cotilédones maduros e cotilédones derivados de plântulas com 15 dias de idade foram inoculados em frascos contendo meio de indução embriogênica. O meio era constituído por sais MS, 3 % de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0,8% de ágar, acrescido de 0,125 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BA) e 1,0 mg/L⁻¹ de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), conforme reportado por Vendrame e Meyers (2004). Antes da inoculação, os cotilédones maduros e os cotilédones derivados de plântulas tiveram suas bordas

excisadas e foram seccionadas em 3 - 4 segmentos de aproximadamente 2 cm² cada. Em cada frasco foram inoculados 4 embriões imaturos ou segmentos cotiledonares (maduros e derivados de plântulas). As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 °C ± 1°C no escuro durante 30 dias.

Considerando a ausência de respostas morfogenéticas em explantes cotiledonares maduros e o efeito das giberelinas na promoção de germinação, explantes de cotilédones maduros também foram inoculados em meio MS com 3 % de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0,8% de ágar, acrescido de 0,125 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BA) e 1,0 mg/L⁻¹ de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) com adição de 0,5; 1,0 ou 2,0 mg.L⁻¹ de GA (ácido giberélico). Os explantes tiveram suas bordas excisadas e foram seccionadas em 3 - 4 segmentos de aproximadamente 2 cm² cada. Em cada frasco foram inoculados 4 segmentos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 °C ± 1°C no escuro durante 30 dias.

4.2.3. Ganho de massa

A massa fresca foi obtida após os 30 dias de cultivo por diferença de peso. Pesaram-se os frascos previamente com o meio de cultura (MS) e depois de inoculado o tecido obtendo por diferença o peso fresco das amostras no dia da inoculação. Após 30 dias, as amostras de cada repetição foram pesadas diretamente obtendo-se, por diferença, o ganho de massa dos tecidos. Para cada fonte de explante avaliada, foram pesadas 15 repetições, sendo, cada frasco contendo quatro explantes uma unidade experimental.

4.2.4. Análise histológica

Para caracterização estrutural, embriões zigóticos imaturos, cotilédones maduros e derivados de plântulas foram fixados em solução de formaldeído, ácido acético e álcool 50% (FAA50). As amostras fixadas foram desidratadas em série de concentração crescente de etanol e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 µm de espessura foram obtidas

em micrótomo rotativo de avanço automático, montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina (O'BRIEN E MCCULLY 1981). A captura de imagens foi realizada em microscópio de luz Zeiss Axioskope com câmera digital AxioCam HRc acoplada.

4.2.5. Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas (Açúcares solúveis totais, lipídeos e proteínas), amostras de embriões zigóticos imaturos e segmentos de cotilédones maduros e derivados de plântulas foram coletados no dia da inoculação e após 5, 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*. As amostras coletadas foram armazenadas em envelopes de papel alumínio e congeladas em freezer a -20 °C. Cada amostra apresentava cerca de 1 g de tecido, sendo coletados três repetições em cada tempo de avaliação amostrado por tipo de explante. Previamente às análises, as amostras foram maceradas utilizando nitrogênio líquido.

4.2.6. Quantificação de Carboidratos totais

Foram pesados 100 mg de cada amostra. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 2N, levados ao banho por 80°C por 30 minutos. Os extratos foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos. Em seguida foram pipetados 20 µL do extrato da amostra, sendo neste adicionados diretamente na amostra, 300 µL de fenol 5% e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram mantidas em banho termostatizado a 90 °C durante 5 minutos e, depois, deixadas para esfriar a temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, para realização da curva de calibração foi utilizada glicose (DUBOIS et al. 1956).

4.2.7. Quantificação de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram quantificados por extração contínua de éteres, empregando-se éter etílico como solvente, adotando o método de extração de lipídeos Roese-Gottlieb modificado (AOAC 1990).

Tubos de ensaio foram limpos e secos, a fim de determinar o peso deles, após isso foram adicionados 400 mg de matéria fresca macerada. Em seguida, foram adicionados 2 ml de HCL 8M que foram levados ao banho termostatizado (mod. NT236) a 70°C por 30 minutos. A extração foi realizada com a adição de 2,5 mL de éter etílico, 2,5 de éter de petróleo e 2 mL de álcool etílico PA. Após centrifugação, retirou-se o sobrenadante apolar e o transferiu para o tubo de ensaio (limpo e tarado) sendo levado a banho a 60°C para evaporar o solvente. Após a evaporação do solvente, os tubos de ensaio foram levados a estufa (60°C) para secagem completa, até a obtenção do peso constante. O peso dos lipídeos foram obtidos por diferença de peso.

4.2.8. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas hidrossolúveis totais foi realizada de acordo com o protocolo de Bradford (1976) com adaptações. A extração foi realizada utilizando 100 mg de cada uma das amostras em tubo do tipo eppendorf® (MICHIELSEN et al. 1998). Os pellets foram lavados com 1 mL de álcool etílico PA, em seguida foi utilizado um tampão de extração KOH 0,2 M, levado ao banho por 1 hora a 95°C, em seguida colocados no gelo. Após isso foram adicionados Acido Acético 1M, retirado uma porção (sobrenadante) em novo eppendorf, adicionado KOH 0,2 M e 1,5 mL de reagente de Bradford para corar as proteínas. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de espectrofotômetro (UVM 340, AsysHitech). A albumina do soro bovino (BSA), foi utilizada para efeitos de curva de calibração, sendo os resultados expressos em µg/g de biomassa fresca.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Desenvolvimento das respostas morfogenéticas

Para caracterizar o processo embriogênico de *D. regia*, as respostas morfogenéticas foram acompanhadas desde o explante inicial até que as estruturas semelhantes a embriões se tornassem visíveis na superfície do calo. Embriões

zigóticos imaturos, inicialmente verdes, apresentaram grande divisão celular / formação de calos, tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones, após 5 dias de cultivo (Fig. 2A). Após 15 dias de cultivo em meio de indução auxina / citocinina, além do ganho de massa expressivo, os calos apresentaram coloração marrom-amarelada, quase toda a extensão dos explantes (Fig 2A). Nos 30 dias é possível verificar a formação de regiões embriogênicas, em toda a extensão do tecido, além da coloração característica (Fig 2A).

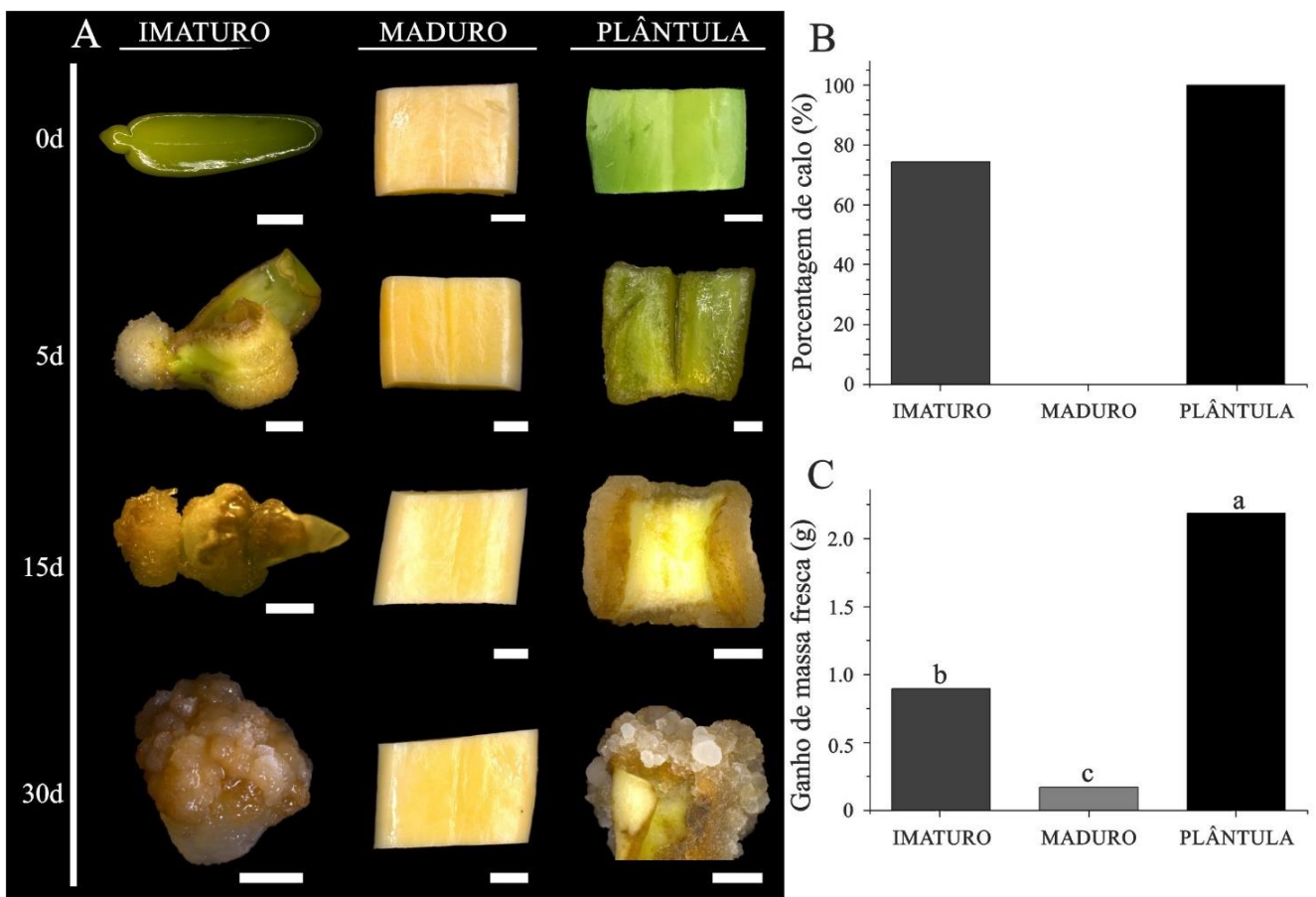


Figura 2: Respostas morfológicas de cotilédones imaturos, maduros e derivados de plântulas em meio de indução embriogênica, suplementado com elevada razão de auxina / citocinina. (A) Aspecto morfológicos dos explantes ao longo de 30 dias de indução. (B) Porcentagem de calo (%). (C) Ganho de massa fresca. As médias seguidas de letras diferentes se diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Barras = 5 mm.

Os segmentos de cotilédones maduros de *D. regia* não induziram a formação de nenhuma resposta morfológica além de não apresentarem nenhuma alteração morfológica (Fig. 2A), não sendo observado formação de calo (Fig. 2B) e pouco ganho de massa fresca, devido a inchamento do tecido (Fig. 2C). Em contrapartida,

segmentos de cotilédones derivados de plântulas induziram respostas morfogênicas, assim como os embriões zigóticos imaturos (Fig. 2A). Esses explantes eram inicialmente verdes e começaram a expandir após 5 dias de cultivo em meio de indução de auxina / citocinina (Fig. 2A). Após 15 dias de cultura, os explantes apresentavam uma massa celular friável marrom-amarelado que começou a se formar na superfície dos explantes (Fig. 2A). O crescimento do calo progrediu em todo o explante e, após 30 dias de cultura, os primeiros aglomerados embriogênicos se tornaram visíveis na superfície do calo (Fig. 2A). Todos os explantes cotiledonares derivados de plântulas induziram a formação de calos (Fig. 2B) e, apresentaram significativo ganho de massa fresca (Fig. 2C).

4.3.2. GAs não induzem respostas morfogênicas em cotilédones maduros de *D. regia*

As giberelinas (GAs) constituem uma classe de fitohormônios relacionadas à quebra de dormência e ativação do processo germinativo (RUSSEL et al. 2000). Em decorrência da ausência de respostas morfogênicas em segmentos de cotilédones maduros de *D. regia*, quando cultivados em meio com alta razão auxina / citocinina, esses segmentos foram inoculados no mesmo meio de indução embriogênica acrescido de diferentes concentrações de ácido giberélico (0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). Contudo, após 30 dias de cultivo, os explantes mantiveram-se morfológicamente inalterados, não sendo observada nenhuma resposta morfogênica (dados não representados, por não apresentar resultados esperados).

4.3.3. Caracterização estrutural

Para caracterização estrutural das respostas morfogênicas de *D. regia* foi realizada uma avaliação histológica comparativa dos diferentes tipos de explantes cotiledonares ao longo do processo de indução (Fig. 3).

Inicialmente, os explantes cotiledonares, independente do estágio de desenvolvimento, eram constituídos por epiderme unisseriada e anfiestomática e mesofilo dorsiventral. Nos cotilédones imaturos, as células do mesofilo apresentavam

conteúdo hialino (Fig. 3A, B). Após 5 dias de cultivo, intensas divisões anticlinais foram observadas na superfície do explante (Fig 3C, D). Essas divisões se proliferaram por todo explante e após 15 dias de cultivo, protuberâncias foram observadas ao longo de toda a superfície do explante (Fig. 3E, F). As protuberâncias apresentavam protoderme definida e intensa divisão no seu interior com células apresentando citoplasma denso (Fig. 3F). Após 30 dias, embriões somáticos foram observados.

Nos cotilédones maduros, as células do mesofilo apresentaram-se, inicialmente, intensamente coradas e conteúdo denso que ocupava todo o volume celular (Fig. 3H, I). Ao longo do processo de indução embriogênica, os segmentos de cotilédones maduros não apresentaram nenhuma alteração histológica e / ou resposta morfogênica (Fig. 3J, K). Porém, o conteúdo celular dos cotilédones maduros apresentou-se menos denso e mais granular, ao longo do período avaliado (Fig. 3L-O).

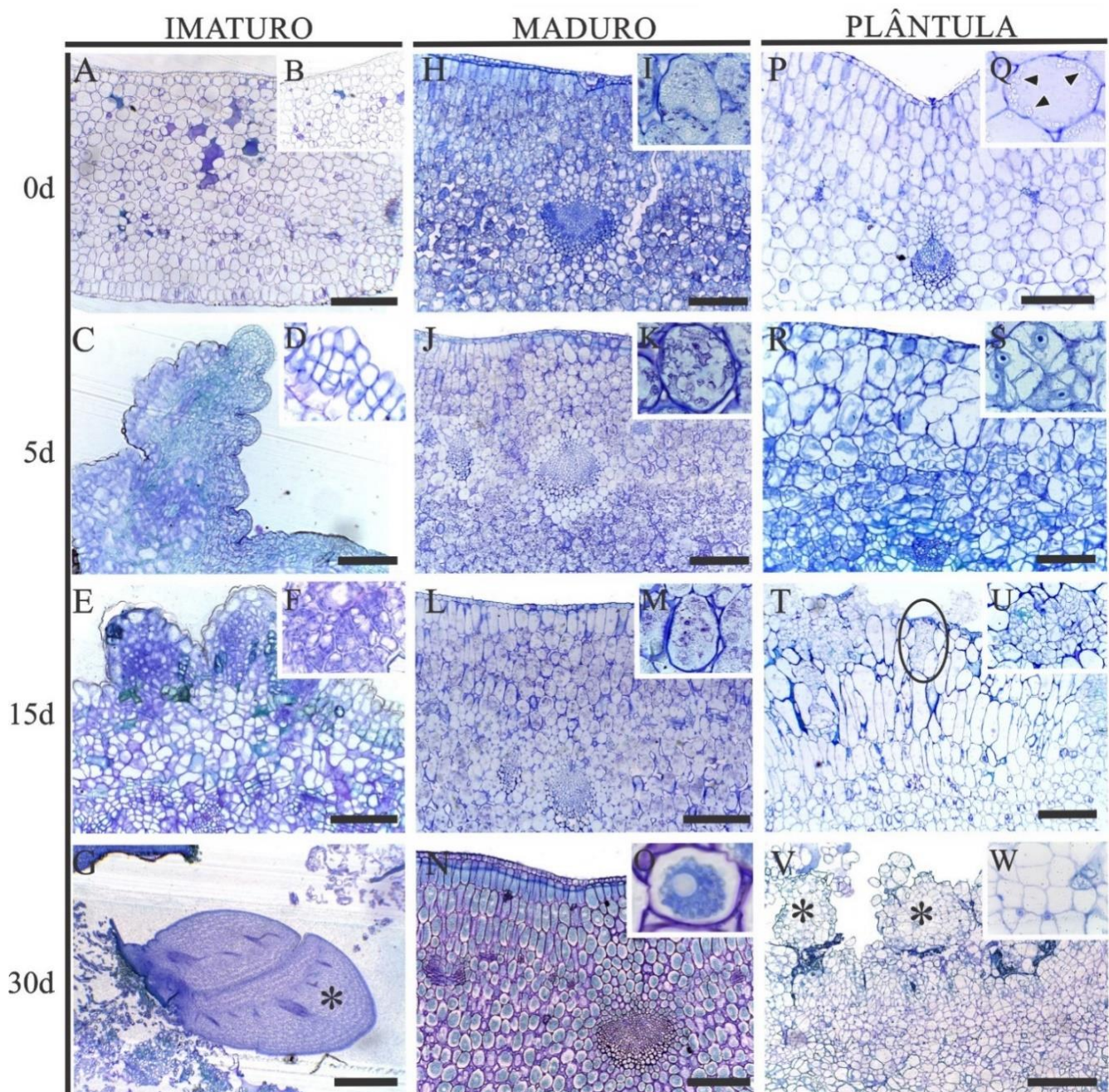


Figura 3: Caracterização histológica de explantes de embriões zigóticos imaturos, e explantes cotiledonares maduro e derivado de plântulas de *D. regia* durante o processo embriogênico. Abreviaturas: asterisco – estruturas globulares; cabeça de seta – grãos de amido; círculo – zonas pró-embriogênica. Barras de escala = 200 μm.

Os explantes cotiledonares derivados de plântulas apresentaram, inicialmente, a mesma estrutura histológica observada em cotilédones imaturos (Fig. 3P). As células do mesofilo possuíam citoplasma hialino e pequenos grãos de amido distribuídos ao longo de toda região parietal (Fig. 3Q). Cinco dias após a indução, intensa proliferação celular foi observada no mesofilo dos cotilédones, dando início a formação dos calos embriogênicos (Fig. 3R). As células do mesofilo apresentaram-se hipertrofiadas e em intenso processo de divisão. As células filhas possuíam citoplasma denso, núcleos volumosos e nucléolos evidentes (Fig. 3S). Aos 15 dias, diversos grupos de células localizados na periferia dos explantes apresentaram características meristemáticas como tamanho pequeno e citoplasma denso, caracterizando a formação das estruturas proembriogênicas (Fig. 3T, U). No final do processo de indução, estruturas globulares foram observadas na periferia do calo (Fig. 3V), sendo possível observar paredes mais finas e citoplasma denso, confirmando o padrão embriogênico. Contudo, não foi observado conteúdo de reserva no interior das células das estruturas globulares (Fig. 3W).

4.3.4. Análises bioquímicas

Considerando a natureza de reserva dos cotilédones, análises bioquímicas foram realizadas a fim de verificar a dinâmica de mobilização das principais classes de reserva observadas em sementes.

Os teores de carboidratos totais (Fig. 3A), apresentaram um comportamento semelhante para imaturo e cotilédones derivados de plântulas, sendo maior teor observado em embriões zigóticos imaturos. Nos cotilédones maduros, o teor de açúcares totais foi diretamente proporcional ao longo dos dias, saindo de 4,88 no 5º Dia, para 17,38 aos 30 dias de cultura. Ao contrário, nos tecidos cotiledonares derivados de plântulas, as menores concentrações dessa variável, foi de 5,84 mg de glicose / g de biomassa fresca aos 15 dias, e máximo de 18,76 mg de glicose / g de biomassa fresca no fim do processo de indução embriogênico. Já os tecidos imaturos apresentaram maiores valores desta variável, alcançando 24,31 mg de glicose / g de biomassa fresca aos 5 dias de inoculação decrescendo ao longo do tempo. (Fig. 3A).

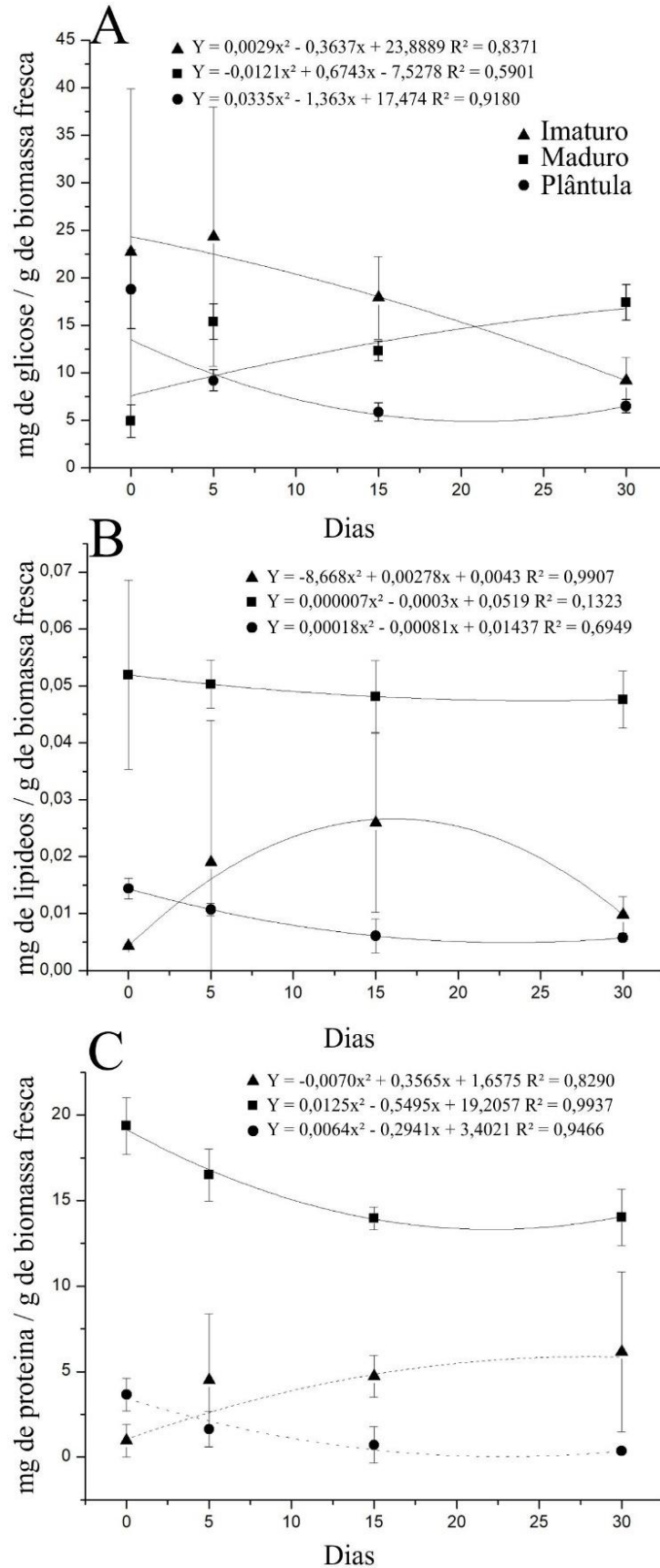


Figura 4: Dinâmica de mobilização de açúcares solúveis totais (A), Lipídeos (B), Proteínas (C) durante a indução de embriogênese somática a partir de EZI, segmentos de cotilédones maduros e derivados de plântulas de *D. regia*.

Quanto aos teores de proteínas e lipídeos (Fig. 3B, C) apresentaram a mesma dinâmica de mobilização. Os cotilédones maduros apresentaram valores significativamente maiores dessas duas classes de compostos ao longo de todo experimento. Porém, para essa fonte de explante não houve mobilização desses compostos durante a indução embriogênica. Os explantes cotiledonares derivados de plântulas apresentaram valores decrescentes de teores de lipídeos e proteínas ao longo do tempo de avaliação, devido ao consumo destas macromoléculas no período *in vitro*. Além disso, foi observada essa redução significativa dos mesmos nos primeiros quinze dias de cultivo (Fig. 3B, C). Os cotilédones imaturos apresentaram comportamento contrário, obtendo maiores valores ao longo do tempo e a partir do 5º Dia de avaliação em relação aos de vitroplantas.

4.4. DISCUSSÃO

A escolha da fonte de explante para a indução de vias morfogenéticas deve ser feita preferencialmente a partir de tecidos fisiologicamente ativos, ou em estádios primários de crescimento como, por exemplo cotilédones e embriões zigóticos (OLIVEIRA et al. 2013). No presente trabalho, optamos por analisar o potencial morfogenético de um mesmo órgão (cotilédone) em diferentes estádios de desenvolvimento. O cotilédone é um tecido de reserva embrionário. Muitos estudos têm proposto a utilização dessa fonte de explante para o estabelecimento de sistemas de regeneração de espécies lenhosas devido as brotações estarem fisiologicamente ativas e em estádios primários de crescimento (OLIVEIRA et al. 2013). Além disso, embriões zigóticos imaturos e maduros ainda se apresentam com as fontes de explantes mais frequentemente aplicadas à indução de embriogênese somática (CORREIA et al. 2016; ISAH 2016).

Arrillaga et al. (1994) esclarece que a porcentagem de embriões somáticos formados a partir das embriões zigóticos imaturos de *Acacia bastarda*, foi significativamente afetada pela idade do explante e pela composição dos diferentes meios, as sementes coletadas de 2 a 3 semanas após a antese (2-2,5 mm de comprimento) responderam com maiores porcentagens de células embriogênicas, comprovando a eficiência dessa fonte de explante para a indução de respostas

morfogenéticas. Abdi e Hedayat (2011), demonstraram resultados semelhantes utilizando embriões zigóticos imaturos de *Delonix regia* (Boger.) Raf., suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D e BA, em que a formação de calos embriogênicos foi observada em 45% dos explantes, Valor menor ao reportado no presente estudo. Porém, Abdi e Hedayat (2011) também relatam a formação direta de embriões somáticos, característica não observada aqui. Myers e Vendrame (2004), também estudaram a formação de embriões somáticos de flamboyant. Utilizando embriões zigóticos imaturos como explantes foram testados diferentes razão de auxina / citocinina. Os resultados demonstraram que o melhor tratamento era suplementado com 0.125 mg.L⁻¹ de BA + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D, conforme usados neste estudo, formando 52,4% de calos com zonas pro-embriogênicas. Contudo, em todos os trabalhos realizados com o flamboyant (incluindo o presente estudo) evidenciaram a baixa de regeneração, requerendo experimentos adicionais para melhorar a diferenciação de embriões somáticos.

Outro problema recorrente da utilização de explantes imaturos, mesmo que recomendado na literatura, é a disponibilidade destes explantes que, no caso de flamboyant, ocorre de janeiro - fevereiro, deixando experimentos limitados, justificando a utilização de cotilédones maduros e cotilédones derivados de plântulas para a otimização do processo embriogênico, pois estes explantes estão prontamente disponíveis a qualquer período do ano, seja na planta mãe (vagem) ou através do banco de sementes.

Dentre os resultados encontrados, os cotilédones maduros não apresentam nenhuma atividade fisiológica expressiva quando em contato com o meio de cultura suplementado com auxina e citocinina, nem mesmo quando adicionado Giberelinas no meio de cultivo. Porém, os cotilédones provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro* obtiveram grande responsividade. Estes resultados relacionados aos cotilédones maduros, provavelmente, estão associados com as altas taxas de compostos de reserva como sugerido por Trigioni et al. (1999). Esses autores mencionaram que *Cercis canadensis* apresenta elevado teor de proteínas levando a um declínio do potencial morfogenético dos explantes. Níveis elevados de proteínas de armazenamento de sementes podem estar associados à perda de potencial embriogênico (DAHMER et al. 1992). Como exemplo, a perda de capacidade embriogênica dos embriões zigóticos de *Picea glauca engelmannii* (ROBERTS et al.

1989) e *Lirioderulron tulipifera* (SOTAK et al. 1991) está associada ao acúmulo de proteínas de reserva. Além disso, concentrações elevadas de proteínas de armazenamento provavelmente anunciam um estado de maturidade fisiológica / bioquímica do embrião zigótico no qual a competência para formar embriões somáticos é perdida.

A maioria dos calos encontrados neste trabalho apresentaram características de calos embriogênicos como mencionado por Williams e Maheswaran (1986) que apontam como características de calos embriogênicos a presença de células com pequena dimensão, conteúdo citoplasmático denso, com grandes núcleos proeminentes, nucléolos alargados, conforme observado durante a formação das zonas pró-embriogênicas.

Moura (2007), estudando a formação de embriões somáticos de macaúba, também ao longo do tempo e características anatômicas, verificou que apesar da região da plúmula ter sofrido muitas divisões celulares, a região distal referente ao cotilédone, foi a que produziu maior resposta embriogênica, e após 60 dias, demonstrou maior proliferação de calos embriogênicos. Guerra e Handro (1998) obtiveram repostas similares com calos embriogênicos na região cotiledonar de embriões de *Euterpe edulis*. O que comprova a capacidade destes tecidos em formarem embriões somáticos. As células do calo que, primeiramente, apresentam citoplasma menos denso que as células da periferia, passaram a apresentar citoplasma denso e núcleos e nucléolos mais evidentes. Esta mudança na morfologia celular é um sinal da aquisição de competência embriogênica

Já para as variáveis bioquímicas, temos uma grande quantidade de macromoléculas de reservas nesses tecidos maduros que não decrescem ao longo dos dias de avaliação. Segundo os resultados encontrados por Rodrigues (2014) trabalhando com *Quercus suber* verificou-se que o teor de açúcares solúveis vai aumentando ao longo do desenvolvimento dos estádios embrionários, cerca de 7,5 mg / g de biomassa fresca, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho a partir do 15º dia; O teor lipídico também foi estudado e encontrou-se valores máximos de 53 mg / g de biomassa fresca em embriões somáticos maduros, valores muito superiores aos encontrados pra *Delonix regia*. Porém para proteínas, os valores se assemelham para cotilédones derivados de plântulas, onde atingem 5 mg / g de biomassa fresca.

A análise bioquímica dos calos maduros de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), uma espécie lenhosa, estudada por Vasconcelos et al. (2012) revelou teor de 3,157 mg de proteína total.g⁻¹ massa fresca, valores próximos para os encontrados para espécie em estudo. O teor de açúcar solúvel total foi equivalente a 43,32 mg.g⁻¹ massa fresca, valores superiores os apresentados neste estudo com *Delonix regia*.

As leguminosas lenhosas têm sido estudadas extensivamente com relação ao seu potencial para indução de embriogênese somática com pouco sucesso. No entanto, a indução é apenas o primeiro passo no desenvolvimento de um sistema de regeneração embriogênico eficiente. Assim como acontece com outras espécies lenhosas, as barreiras à adequada maturação e conversão embrionária colocam as árvores leguminosas como um grupo desafiador para o desenvolvimento de embriogênese somática, podendo ter uma aplicação comercial visível no futuro. Apesar de não ter sido obtido plântulas ao final do experimento, acreditamos que os resultados aqui obtidos contribuirão para a melhor compreensão dos aspectos morfofisiológicos associados ao potencial morfogenético de explantes cotiledonares de *D. regia*, bem como, de outras espécies arbóreas.

4.5. CONCLUSÕES

Os tecidos embrionários, foram capazes de demonstrar respostas morfogenéticas específicas, sendo possível ver para cotilédones provenientes de plântulas, um maior número tanto de formação de calos, ganho de massa, divisões celulares, principalmente com regiões embrionárias, e pontos de consumo dessas variáveis bioquímicas. Para EZI, estes por sua vez, apresentaram formação de calos, ganho de massa,

4.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho observou-se que a suplementação de citocinina foi essencial para a ativação de gemas axiliares em ápices caulinares e indução de gemas adventícias em cotilédones de *Delonix regia*. Para a indução dessas repostas morfogenéticas, 6-benziladenina (BA) demonstrou

ser mais efetiva que a cinetina, sendo recomendado a concentração de 2 mg.L⁻¹ de BA. A regeneração de gemas adventícias nos cotilédones ocorreu a partir da reprogramação de células do mesófilo cotiledonar. Porém, o estágio de desenvolvimento dos cotilédones pode afetar o processo morfogênico. O presente estudo mostrou, também, que a embriogênese somática pode ser induzida a partir de explantes embrionários imaturos ou de segmentos cotiledonares derivados de plântulas. Porém, não foi observado respostas morfogenéticas a partir de cotilédones maduros. Apesar de não ter sido observado a conversão de gemas / embriões somáticos em plântulas acredita-se que os resultados aqui descritos contribuirão para o maior conhecimento do comportamento *in vitro* de flamboyant e o estabelecimento de sistemas de regeneração para essa importante espécie lenhosa ornamental.

4.7. REFERÊNCIAS

- ABDI, G. H., HEDAYAT, M. Induction of Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryo and Immature Seed of Royal Poinciana (*Delonix regia*), **World Applied Sciences Journal**, Boushehr, v. 13, n. 3, p. 391-395. 2011.
- ARRILLAGA, I., J.J. TOBOLSKI, J. J., MERKLE, S. A. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) **Plant Cell Reports**, Athens, v. 13, p. 171 – t 75. 1994.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (W. Horwitz, Ed.), 15th edn., Method 989.05. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, U.S.A. v. 1. 771p. 1990.
- AZEVEDO, K. de S. Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – **Universidade Federal de Lavras**, lavras, p. 86. 2003.
- BAJAJ, Y. P. S. Some Indian Ornamental Trees: *Cassia fistula* Linn., *Poinciana regia* (Boj.) and *Jacaranda acutifolia* anet. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Vol. 5 Trees II (ed. by Y. P. S. Bajaj). New Delhi, v. 1, p. 1-8. 1989.
- 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**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 248-254. 1976.
- COMPTON, M. E., GRAY, D. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotylrdons of watermelon. **Plant Cell Reports**, Leesburg, v.12, n. 2, p. 61-65, 1993.
- CORREIA, S. I., PINTO, G., CANHOTO ,J. M. “Molecular biology of somatic embryogenesis in hard woods,” in *Vegetative Propagation of Forest Trees*, eds Y. S.Park ,J. M. Bonga, and H. K. Moon (**Seoul: National Institute of Forest Science**), 97–122. 2016.
- CROSS J. M., VON K. M., ALTMANN, T., BARTZETKO, L., SULPICE, R., GIBON, Y., PALACIOS. N., STITT, M. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. **Plant Physiology**. [S. l.], V. 142, n. 4, p. 1-15. 2006.
- DAHMER, M. L., HILDEBRAND, D.F., COLLINS, G.B. Comparative protein accumulation patterns in soybean zygotic and somatic embryos, **In Vitro Cell and Development. Biology**. [S. l.], V. 28, p. 106-114. 1992.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., & SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, St. Paul, v. 28 n. 3, p. 350–356. 1956.

FERREIRA, A. G., HU, C. Y. Light-mediated inhibition of *in vitro* late embryogeny of *Ilex*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, [S. l.], v. 114, n. 4, p. 819-823, 1989.

GANTAIT, S., KUNDU, S., DAS, P. K. Acacia: An exclusive survey on *in vitro* propagation. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, West Bengal v. 16, n. 2, p 163-177. 2016.

MIGUEL, G., WALTER, H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, Florianopolis, v. 111, n. 1, p. 65-71. 1998.

HU, C. Y., SUSSEX, I. M. *In vitro* development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. **Phytomorphology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p.103-107, 1971.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiology Plant** New Delhi, v. 38, n. 118, p. 1–22. 2016.

KUMAR, S., AGRAWAL, V., GUPTA, S. C. Somatic embryogenesis in the woody legume *Calliandra tweedii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Delhi, v. 71, p. 77–80. 2002.

MERKLE, S. A., NAIRN, C. J. Hardwood tree biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant*, Wallingford, UK, v. 41, p. 602-619, set./out. 2005.

MICHELSEN, M. J. F., MEIJER, E. A., WIJFFELS, R. H., TRAMPER, J., BEEFTINK, H. H. Kinetics of d-Malate Production by Permeabilized *Pseudomonas Pseudoalcaligenes*. **Enzyme and Microbial Technology**, Wageningen, v. 22, n. 7, p. 621-628,1998.

MOURA, E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. – Viçosa: **UFV**. 66p. 2007.

MYERS, A. R., VENDRAME, W. A., propagation of yellow kampong royal poinciana via somatic embryogenesis. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v.117, n. 1, p. 338-341. 2004.

O'BRIEN, T. P., McCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne: **Termarcaphy Pty**. 1981.

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

OLIVEIRA, R. P., NINO, A. F. P. Potencial de Multiplicação *in vitro* de cultivares de framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 31, n. 1, p. 280-284, mar. 2009.

PALIOTO, G. F., SUGIOKA, D. K., CODA, J., ZAMPAR, R., LAZARIN, M. O., LOYOLA, M. B. P., FILHO, C. J. R. Fenologia de Espécies Arbóreas no Campus da Universidade Estadual de Maringá. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 441-443, jul. 2007.

PEERVEN, S., VARSHNEY, A., ANIS, M., AREF, I. M. Influence of cytokinins, basal media and pH on adventitious shoot regeneration from excised root cultures of *Albizia lebbbeck*, **Journal of Forestry Research**, Pakiston, v. 22 n. 1, p. 47-52. 2011.

RASTOGI, S., RIZVI, S.M.H., SINGH, R.P., DWIVEDI, U.N. *In vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, Delphi, v. 52, n. 4, p. 743-748. 2008.

RODRIGUES, S. C. R. Embriogênese somática em genótipos de *Quercus suber* análise bioquímica e histológica de produtos de reserva. Dissertação de mestrado em Biotecnologia Vegetal, Coimbra, 81p. 2014.

RUSSEL, L., LANER, V., KURUP, S., BOUGOURD, S. & HOLDSWRTH, M. The Arabidosis COMATOSE locus regulates germination potencial. **Development**. V. 127, n. 17, p. 3759-67. 2000.

SANJEEV, S., STEVE. M. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: A histological examination of key developmental stages. **Plant cell reports**. [S. I.], v. 23, n. 3, p. 115-9. 2004.

SILVA, P. D. C., PAIVA, R., HERRERA, R. C., SILVA, L. C., FERREIRA, G. N., REIS, M. V. Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Lavras, v. 133, n. 1, p. 115-122. 2017.

SINHA, R. K., MALLICK, R. Plantlets from somatic callus tissue of the woody legume *Sesbania bispinosa* (Jacq.) W. E Wight. **Plant Cell Reports**, [S. I.], v. 10, n. 5, p. 247-250. 1990.

SOTAK, R.J., SOMMER, H.E. AND MERKLE, S.A. Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow poplar to their somatic embryogenic potential, **Plant Cell Reports**. [S. I.], V. 10, n. 1, p. 175-178. 1991.

TEIXEIRA DA SILVA J.A., MALABADI R.B. Factors affecting somatic embryogenesis in conifers. **Journal Forest Research**, Kagawa-ken, v. 23, n. 4, p. 503–515. 2012.

TIVAREKAR, S., EAPEN, S. High frequency plant regeneration from immature cotyledons of mungbean. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** [S. I.], v. 66, n. 3, p. 227–230. 2001.

TRIGIANO, R. N., BUCKLEY, L. G., MERKLEB, S. A. Somatic Embryogenesis in Woody Legumes. S. Mohan Jain eta/. (eds.), **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, [S. I.], v. 4, n. 1, p. 189-208. 1999.

VASCONCELOS, J. N. C., CARDOSO, N. S. N., OLIVEIRA, L. M., SANTANA, J. R. F., FERNANDEZ, L. G., BELLO KOBLITZ, M. G. I., SILVA, M. L. C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Revista brasileira de plantas medicinais**. Botucatu, v. 14, n. 4. p. 592-597. 2012.

VIEITEZ, F. J., BALLESTER, A., VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L. **Plant Cell Reports**, Santiago de Compostela, v. 11, n. 12, p. 609-613, 1992.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, n. 3, p. 307–313. 1994.

WILLIAMS, E.G., MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v.57, n.4, p. 443-462, 1986.