



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROCOLOGIA
MESTRADO EM AGROECOLOGIA

KARINA DA SILVA VIEIRA

**GERMINAÇÃO E ORGANOGÊNESE *in vitro* DO BACURIZEIRO (*Platonia insignis*
Mart.): estratégia biotecnológica para propagação de uma espécie frutífera amazônica**

São Luís - MA

2022

KARINA DA SILVA VIEIRA
Engenheira Agrônoma

GERMINAÇÃO E ORGANOGÊNESE *in vitro* DO BACURIZEIRO
(*Platonia insignis* Mart.): estratégia biotecnológica para propagação de uma espécie
frutífera amazônica.

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr^a. Thais Roseli Corrêa - Orientadora

Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro -
Coorientador

São Luís - MA
2022

Vieira, Karina da Silva.

Germinação e organogênese *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) para propagação de uma espécie frutífera amazônica / Karina da Silva Vieira. – São Luís, 2022.

74f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Roseli Corrêa.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro.

1.Biotecnologia. 2.Cultura de tecidos. 3.Micropropagação. 4.Fruteiras nativas. 5.Calogênese. I.Título.

CDU: 634.471-153

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

Agradecimentos

Sou grata a Deus, por ter me dado a oportunidade de ter acesso à informação, de sempre me levar a lugares e pessoas que me estimulavam a ter sede do conhecimento. Por ter me sustentado tanto com alimento físico como espiritual.

A minha mãe, Alzenira Oliveira da Silva que em nenhum momento mediu esforços para que eu alcance meus objetivos por sempre ser a minha maior incentivadora e a todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para que não me faltasse nada. Ao meu marido, Júlio Soeiro Furtado por ter me apoiado e amparado em momentos de insegurança, de ser um parceiro incrível. Sou eternamente grata a Deus por ter você ao meu lado.

Aos melhores orientadores, Prof. Dr. Thais Roseli Corrêa que me abraçou quando lhe pedi ajuda e me apresentou o mundo da biotecnologia vegetal, ao Prof. Marcos Vinícius Marques Pinheiro por seu incansável desejo de ensinar e por fim a uma equipe que sempre estará eternamente em meu coração o grupo do laboratório de cultura de tecidos vegetais (LCT), composto pelos melhores doutorandos (Tacila Rayene e Givago Alves), mestrandos e de iniciação científica, só não citarei a todos porque poderia esquecer algum, mas em minha memória vocês estão eternizados.

KARINA DA SILVA VIEIRA
Engenheira Agrônoma

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr^a. Thais Roseli Corrêa - Orientadora

Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro -
Coorientador

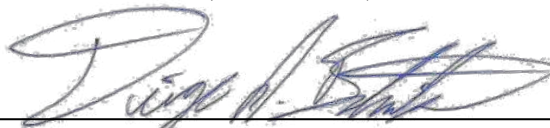
Aprovada em:

22/02/2022

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Thais Roseli Corrêa
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA
(Orientadora)



Prof. Dr. Diego Silva Batista
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Prof. Dr. Tiago Massi Ferraz
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. (A) Árvore de *Platonia insignis* em sua vegetação natural no município de Bacabeira, Maranhão – Brasil. (B) Fruto imaturo e (C) semente. Barra: 1 cm..... 17

CAPÍTULO II

Figura 1. Fruto (A) e semente de *Platonia insignis* Mart durante o início das condições de germinação *in vitro* (aos 0 dias após inoculação - DAI) (B). 38

Figura 2. Formação de calos (Ca) (A, B), porcentagem de oxidação (Ox) (C, D), aos 60 DAI e ao longo da permanência das sementes de *Platonia insignis* nos diferentes dias após inoculação (15, 30, 45 e 60 DAI). *Médias seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 43

Figura 3. Emissão de radícula (Er) (A, B) e emissão de parte aérea (Epa) (C, D), aos 60 DAI e ao longo da permanência das sementes de *Platonia insignis* nos diferentes dias após a inoculação (15, 30, 45 e 60 DAI). *Médias seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 41

Figura 4. Comprimento da parte aérea (Cpa) e da radícula (Cra) de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) aos 60 DAI mantidos em diferentes tratamentos (T1 - ágar + água destilada; T2 – MS0 - sem reguladores de crescimento; T3 - MS + 1µM de BAP; T4 - MS + 2µM de BAP; T5 - MS + 3µM de BAP; T6 - MS + 1µM de GA₃; T7 - MS + 2µM de GA₃; T8 - MS + 3µM de GA₃) (A). Calos rosáceos nos explantes de *Platonia insignis* dos 15 aos 60 DAI (B). Explante com a formação de parte aérea amorfa e radícula (C). Explante com a formação de parte aérea normal e radícula (D). Explante com calos rosáceos (E). Abreviaturas: Paa - parte aérea amorfa; Pan - Parte aérea normal; Ra - radícula; Pr - pelos radiculares; Me - Massa esponjosa; Cr - Calos rosáceos; Ox - Oxidação. Barras: 1cm (C-E) *Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 43

Figura 5. Explantes de *Platonia insignis* aos 60 DAI *in vitro* nos diferentes tratamentos. T1- ágar + água destilada (A); T2 - MS0 - sem regulador de crescimento (B); T3 - MS + 1 µM de BAP (C); T4 - MS + 2 µM de BAP (D); T5 - MS + 3 µM de BAP (E); T6 - MS + 1 µM de GA₃ (F); T7 - MS + 2µM de GA₃ (G) e T8 - MS + 3 µM de GA₃ (H). Abreviaturas: Me - Massa esponjosa; Ra - radícula; Cg - Calo globular; Ra - Radícula; Pr - pelos radiculares; Pan - Parte aérea normal. Barras: 1 cm..... 47

CAPITULO III

Figura 1. Experimentos realizados para a indução da organogênese *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis*). Abreviaturas: Sg – Sementes germinadas; Pan – Parte área normal; Paa – Parte área amorfa; Ca – Calos; Ap – Parte apical da radícula; Mr – Parte mediana da radícula; Ba – Parte basal da radícula..... 59

Figura 2. Porcentagem de oxidação (Ox) (A) e Porcentagem de indução de calo (Ica) (B) em explantes de parte área de *Platonia insignis*. *Médias seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. 60

Figura 3. Explante de parte área normal de *Platonia insignis in vitro* inoculado em meio de cultura MS contendo 2,5µM de BAP + 1,5µM de ANA (A); MS+ 6,25µM de BAP e 1,5µM de ANA (B), MS + 15,62µM de BAP e 1,5µM de ANA (C), MS+ 39µM de BAP e 1,5µM de ANA (D) aos 7 DAI e aos 90 DAI (A-D e E-H, respectivamente). Abreviaturas: Pan - Parte área normal; Paa - Parte área anormal; Cr – Calos rosáceos; Me - Massa esponjosa; Ca - Calo; Ra - radícula; Barras: 1 cm. 58

Figura 4. Porcentagem oxidação de calos de *Platonia insignis* aos 80 DAI (A) e ao longo dos DAI (7,15,30,45,60 e 80) (B). *Médias seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 59

Figura 5. Organogênese indireta *in vitro* a partir de explantes de calos de bacurizeiro (*Platonia insignis*). Calo inoculado em meios suplementados com 156µM de BAP aos 7 DAI (A) e aos 90 DAI com a formação de um meristema apical (B-C). Barras: 1mm..... 60

Figura 6. Porcentagem de oxidação (Ox)(A, B), Formação de radícula (Ra)(C, D) aos 90 DAI e ao longo da permanência dos explantes de *Platonia insignis* (7, 15, 30, 45, 60, 75 E 90 DAI) em meios com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 61

Figura 7. Formação de folhas (Fo) (A, B) aos 90 DAI e ao longo da permanência dos explantes de *Platonia insignis* (7, 15, 30, 45, 60, 75 E 90 DAI) em meios com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 62

Figura 8. Formação de calo (Ca) (A), calos esponjosos em explante de parte área de *Platonia insignis* aos 90DAI (B), Calos rosáceos (Cr) (C), Explantes de parte área de *Platonia insignis* aos 90DAI com calos rosáceos (D). *Médias seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras: 1cm. 63

Figura 9. Explantes de parte área de *Platonia insignis* (A), após seccionamento do ápice 63

Figura 10. Formação de gemas (Ge) de explantes de parte aérea de *Platonia insignis* ao longo dos DAI (7,15,30,45,60,75 e 90). 67

LISTA DE TABELAS
CAPÍTULO III

Tabela 1. Variáveis formação de radícula (Ra) e calos rosáceos (Cr) em explantes de parte área de *Platonia insignis*. *Médias seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.....59

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA - Ácido naftalenoacético;
Ap – Parte apical da radícula;
Ba – Parte basal da radícula;
BAP - 6-benzilamonopurina;
Ca - Formação de calos;
Cr - Calos rosáceos;
cm - Centímetros;
Cpa - Comprimento da parte área;
Cra - Comprimento de radícula;
DAI - Dias após a inoculação;
Epa - Emissão de parte aérea;
Er - Emissão de radícula;
g L⁻¹ - Gramas por litro;
GA₃ - Ácido giberélico;
IVG - Índice de velocidade germinativa;
Me - Massa esponjosa;
Mr – Parte mediana da radícula;
mL - Mililitro;
mm - Milímetro;
MS - Murashige & Skoog;
Ox - Porcentagem de oxidação;
Paa - Parte área amorfa;
Pan - Parte área normal;
Pr - Pelos radiculares;
Pr - Pelos radiculares;
Ra - Radícula;
μM - Micromolar;
μmol m⁻² s⁻¹ - Micromol por metros quadrado por segundo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
CAPÍTULO I.....	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 Aspectos botânicos do Bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart.).....	15
1.2 Centro de origem e distribuição geográfica.....	17
1.3 Características organolépticas e morfológica dos frutos	18
1.4 Aspectos econômicos	20
1.5 Propagação do bacurizeiro.....	21
1.5.1 Propagação sexuada.....	22
1.5.2 Propagação assexuada	22
1.6 CULTURA DE TECIDOS	24
1.7 MICROPROPAGAÇÃO.....	24
1.8 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	26
1.9 ORGANOGÊNESE.....	27
1.10 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	28
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO II	37
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Coleta do material vegetal	40
2.2 Desinfestação e inoculação do material vegetal	40
2.3 Delineamento experimental.....	41
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
3 RESULTADOS	42
4. DISCUSSÃO.....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO III.....	54
RESUMO	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	57
2.2 Material de cultivo.....	57
2.3 Experimento I – Diferentes tipos de explantes na indução de organogêneses no bacurizeiro	57
2.4 Experimento II – Calos na indução da organogênese indireta em bacurizeiro ...	58
2.5 Experimento III – Explantes de parte aérea normal na indução de organogênese em bacurizeiro	59
3. RESULTADOS	60
3.1 EXPLANTES DE PARTE ÁREA ANORMAL INDUZEM A CALOGÊNESE EM BACURIZEIRO.....	60

3.2 Calos de partes aéreas anormal induzem a organogênese indireta em bacurizeiro	61
4. DISCUSSÃO	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	70
CAPITULO IV	73
CONCLUSÕES.....	74

RESUMO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie arbórea nativa da Amazônia brasileira com elevado potencial econômico, dada a grande apreciação de seus frutos, contudo apresenta dificuldades em sua propagação vegetativa devido ao longo período de tempo para que a germinação se complete, e ainda uma baixa porcentagem de sobrevivência. Portanto, o uso de técnicas *in vitro*, como a germinação e a organogênese, podem se tornar excelentes alternativas para propagação desta espécie. Assim, este trabalho teve como objetivo estabelecer a germinação e a organogênese *in vitro* a partir de frutos imaturos de *P. insignis*, como estratégia biotecnológica para propagação desta frutífera amazônica. No capítulo II foi realizado o estabelecimento e germinação *in vitro* a partir de frutos imaturos de *P. insignis*. Os frutos foram coletados de diferentes matrizes localizadas no município de Bacabeira - MA, previamente desinfestados e inoculados em diferentes meios de cultura com e sem reguladores de crescimento. Aos 60 dias após a inoculação (DAI), foi possível observar que as sementes mantidas nos tratamentos sem adição de reguladores de crescimento (T1 - ágar + água destilada e T2 - MS0) apresentaram resultados superiores ou iguais a tratamentos com adição dos reguladores de crescimento. No capítulo III, experimentos foram estabelecidos com objetivo de induzir a organogênese a partir de explantes de parte aérea, calos e radículas dos embriões imaturos previamente germinados *in vitro* de *P. insignis*. Foram realizados cinco experimentos, utilizando meio MS suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Os resultados demonstraram que houve a organogênese indireta a partir de explantes de calos de parte aérea amorfa de *Platonia insignis*, quando inoculados em meios com 78,12 μM e 156 μM de BAP. Os explantes de parte aérea normal proporcionaram a formação de novas gemas axilares, podendo ser utilizado como fonte de explantes, contudo, não havendo diferenças significativa entre os meios testados. Este é o primeiro estudo sobre a germinação e organogênese *in vitro* de *Platonia insignis*, demonstrando resultados potencialmente promissores para o processo de domesticação da espécie, com redução do tempo de germinação para cerca de 60 dias após inoculação em condições de cultivo *in vitro*, e a possibilidade da sua multiplicação a partir da organogênese *in vitro* com uso de explantes de calos de parte aérea anormal.

Palavras-chave: Biotecnologia; Cultura de tecidos; Micropropagação; Fruteiras nativas; Calogênese.

CAPÍTULO I
OS DESAFIOS DA PROPAGAÇÃO DO BACURIZEIRO (*Platonia insignis*):
Revisão de literatura de uma espécie nativa da Amazona Oriental

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos botânicos do Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) pertence à divisão Angiosperma, família Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*, classificada como monotipo. A família botânica *Clusiaceae* engloba cerca de 800 espécies a 15 gêneros alocados em três tribos: Clusieae, Garcinieae e Symphonieae (STEVENS, 2001), dispersos em regiões tropicais e subtropicais do mundo (BARROSO et al., 2002).

Entre as espécies frutíferas nativas da Amazônia brasileira, são encontrados cinco representantes dessa família, sendo a mais importante, do ponto de vista econômico, o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), as demais pertencem ao gênero *Rheedia*, e são conhecidas como bacuri-mirim (*Rheedia gardneriana* Miers. ex. Pl. et.Tr.), bacuripari liso (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Pl. et.Tr.), bacurizinho (*Rheedia acuminata* (R. et. P.) Pl. et. Tr.) e bacuripari (*Rheedia macrophylla* (Mart.) Pl. et. Tr.), todas de porte e frutos bem menores, e de qualidade inferior, que o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) (CARVALHO, 2007).

O bacurizeiro foi primeiramente descrito pelo botânico brasileiro Manuel Arruda da Câmara, em 1816, que o enquadrou no táxon genérico *Moronobea* e o denominou de *Moronobea esculenta* Arruda da Câmara (ENGLER, 1888). Em 1832, o botânico alemão Karl Friedrich Phillip von Martius, reconhecendo a impropriedade da inclusão do bacurizeiro no gênero *Moronobea*, criou o gênero *Platonia* e o denominou de *Platonia insignis* Mart. Essa designação, de uso generalizado no Brasil, pois é como a espécie está grafada na Flora Brasiliensis (ENGLER, 1888), foi considerada como ilegítima, em meados do Século XX, pelos botânicos H. W. Rickett e F. A. Stafleu, pelo não-reconhecimento do epíteto específico básico, que deve ser respeitado por direito de propriedade quando uma espécie é transferida para outro táxon genérico (FERNANDES, 1996).

Diante desse fato, Rickett & Stafleu (1959) propuseram uma nova combinação – *Platonia esculenta* (Arruda da Câmara) Rickett et Stafleu, reconhecendo, nesse caso, o basônimo. No entanto, essa nova combinação, desde a sua proposição, foi de uso bastante limitado, pois persistia a dúvida se o tipo descrito por Manuel Arruda da Câmara correspondia, efetivamente, a *Platonia insignis* Mart. A dúvida era decorrente do fato de que algumas características descritas para *Platonia esculenta* (Arruda da Câmara) divergiam completamente de *Platonia insignis* Mart.

Rijkevorsel (2002), após análise criteriosa e detalhada das monografias publicadas sobre o bacurizeiro no Século XIX, concluiu pela validade do nome *Platonia insignis* Mart. Essa conclusão foi baseada no fato de que o nome *Moronobea esculenta* está associado a uma publicação duvidosa, com descrição precária, sem diagnose e com somente uma ilustração servindo como tipo, enquanto que o nome *Platonia insignis* está suportado por descrição e diagnose precisas, com ilustrações e bom material de herbário. O nome genérico *Platonia* é uma homenagem ao filósofo grego Platão (BARROSO et al., 2002). O epíteto específico *insignis* significa notável, insigne, importante, grande, aquele que chama a atenção (RIZZINI e RIZZINI, 1983; FERREIRA, 1998), isso em alusão ao porte e à utilidade da planta, e também ao tamanho, sabor e aroma do fruto.

O bacurizeiro é uma árvore de médio a grande porte, mede de 15 a 25 m de altura, podendo alcançar até 30 m, com tronco reto de até 1 m de diâmetro, casca espessa e às vezes enegrecida nos indivíduos adultos, fortemente fendida e com ritidoma sem esfoliação, quando cortada exsuda um látex amarelado e resinoso. A copa tem formato variado, porém é comum o formato de cone invertido. Os ramos ou galhos, normalmente, crescem formando um ângulo de 50 a 60° em relação ao tronco (CAVALCANTE, 1996; MORAES et al., 1994) (Fig. 1A).

As plantas de bacurizeiro possuem folhas simples e opostas, pecioladas, textura subcoriácea a coriácea, de formato elíptico-obovadas, medindo de 15 a 20 cm de comprimento e de 6 a 9 cm de largura, glabras e verde-brilhosas na face superior; ápice e base agudos, pecíolo curto e achatado ventralmente, possuindo ainda pequenas alas (MOURÃO e BELTRATI, 1995a). As flores são hermafroditas e andróginas, actinomorfa, polistemone, grandes (cerca de 7cm de comprimento e 3cm de diâmetro), solitárias e terminais, de coloração branco-rósea a amarela. O cálice é imbricado, com sépalas livres, e a corola é pentâmera e de coloração variando de róseo claro a róseo intenso (MOURÃO e BELTRATI, 1995b, c).

O fruto é uma baga volumosa, oniloculada, de formato ovoide a arredondado ou subglobosa, de tamanho variável, com diâmetro variando entre 7 e 15 cm e peso médio entre 350 e 400 g. Em alguns casos, porém, plantas podem produzir frutos que podem alcançar até 900 a 1000 g (CAVALCANTE, 1996; MORAES et al., 1994; MOURÃO e BELTRATI, 1995a, b). O epicarpo é delgado, com maior frequência de cor amarela, raramente apresenta a coloração verde-amarelada, marrom-avermelhada ou verde. O mesocarpo é espesso e de consistência coriácea, repleto de vasos lactíferos, exsudando substância resinosa de cor amarela, quando cortado ou ferido. O conjunto formado pelo epicarpo e mesocarpo, popularmente denominado de casca, apresenta espessura de 1 a 2 cm, de coloração variando de verde a amarelo-citrino,

lisa e lustrosa, rígido-coriácea, quebradiça, carnosa e resinosa (CAVALCANTE, 1996) (Fig. 1B).

A polpa corresponde ao endocarpo, é macia e delicadamente fibroso-mucilaginosa, de coloração branca a branco-amarelada e fortemente aderida à semente, possuindo aroma e sabor bastante agradáveis (CAVALCANTE, 1996; MOURÃO e BELTRATI, 1995b).

As sementes são grandes e superpostas, anátropas e de formato oblongo-anguloso ou elipsoide. São oleaginosas, ligeiramente côncavas na parte correspondente à linha da rafe e convexa no lado oposto; normalmente, apresentando-se em número de um a quatro por fruto, raramente cinco, e medindo em média de 5 a 6cm de comprimento e 3 e 4 cm de largura (CAVALCANTE, 1996; CLEMENT e VENTURIERI, 1990; MOURÃO e BELTRATI, 1995b) (Fig. 1C).

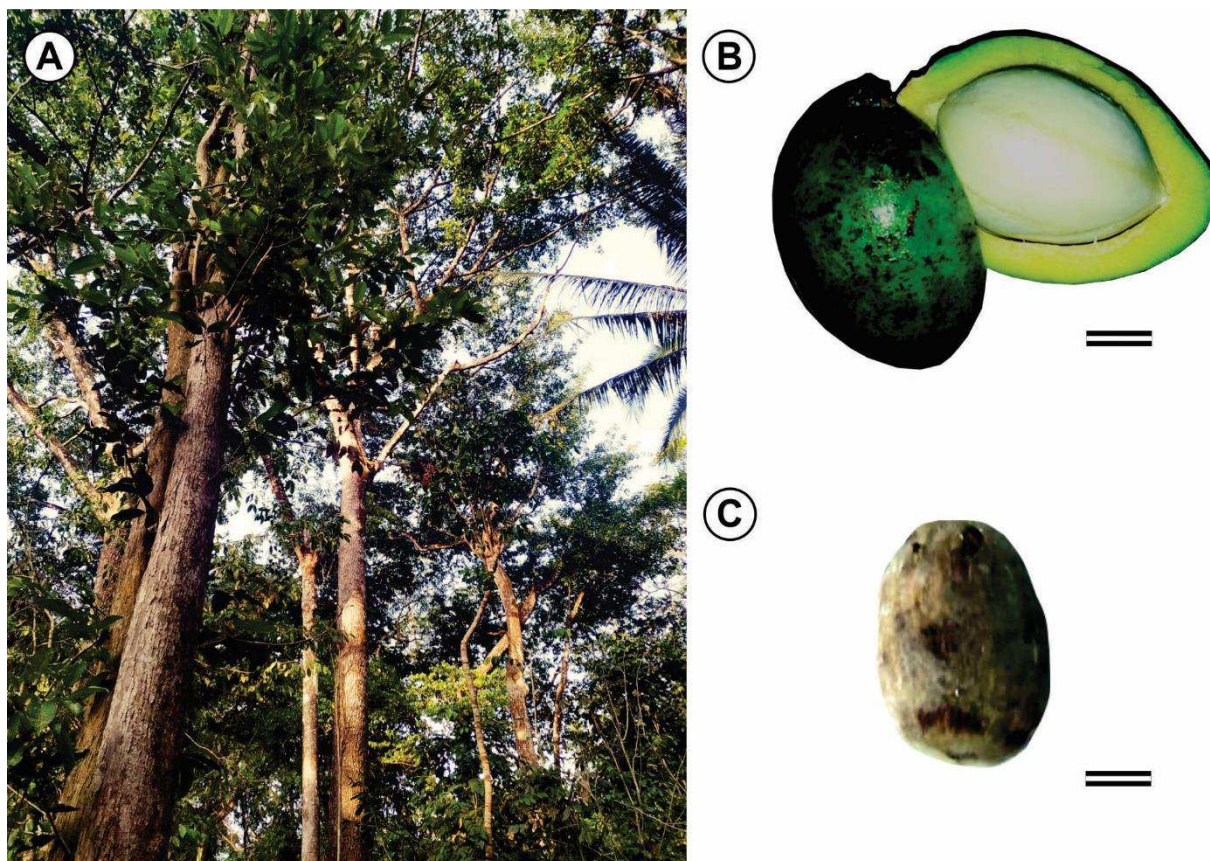


Figura 1. (A) Árvore de *Platonía insignis* em sua vegetação natural no município de Santa Rita, Maranhão – Brasil. (B) Fruto imaturo e (C) semente. Barra: 1cm.

1.2 Centro de origem e distribuição geográfica

O bacurizeiro é uma espécie de origem amazônica encontrado no século XX nas margens do Rio Pará (HUBER, 1904), na mesorregião Nordeste Paraense, que engloba as microrregiões Salgado, Bragantina, Cametá, Tomé-Açu e Guamá, consideráveis fragmentos de floresta secundária, tendo como espécie dominante o bacurizeiro (CARVALHO, 2007). Nessas microrregiões, em particular nas três primeiras, o bacurizeiro prolifera em multiplicidade de tipos, que se distinguem entre si pela coloração das flores, tamanho, cor e formato do fruto; espessura da casca, tamanho das sementes, número de sementes por fruto e rendimentos percentuais de casca, polpa e sementes, entre outras características. Na microrregião Arari, na Ilha de Marajó, a espécie ocorre predominantemente em áreas abertas e mais raramente em floresta primária (CARVALHO, 2007).

Do estado do Pará, o bacurizeiro se dispersou em direção ao Nordeste do Brasil, alcançando os cerrados e os chapadões dos estados do Maranhão e Piauí, onde forma povoamentos densos em áreas de vegetação secundária. Na direção sul, a dispersão atingiu os estados do Tocantins e do Mato Grosso, chegando a romper as fronteiras do Brasil, pois trata-se de uma espécie nativa, porém não endêmica do Brasil, com registro de ocorrência no Paraguai e no Equador (CAVALCANTE, 1996). No Brasil, a espécie ocorre nas regiões Norte (Amazonas, Pará, Roraima) e Nordeste (Maranhão) (FLORA DO BRASIL, 2017). A frequência de ocorrência é baixa, variando, normalmente, de 0,5 a 1,0 indivíduo por hectare, porém, ocasionalmente pode ser encontrado em populações de 50 a 100 indivíduos por hectare (CLEMENT et al., 1990).

No estado do Maranhão, o bacurizeiro forma densos aglomerados ou povoamentos, principalmente nas áreas de chapadas (FERREIRA et al., 1987; MACEDO, 1995), apresentando-se disperso nas regiões da pré-amazônia, baixada maranhense e nos cerrados do extremo sul e do baixo Parnaíba (SOUZA et al., 2000).

1.3 Características organolépticas e morfológica dos frutos

Em populações naturais de bacurizeiro são encontrados frutos de diferentes características organolépticas e morfológica nos frutos. Na área de germoplasma, o estudo de Guimarães et al. (1992), um dos poucos encontrados na literatura, foram coletados e caracterizados frutos de 15 matrizes de bacurizeiro de ocorrência na Ilha do Marajó-PA, havendo expressiva variabilidade fenotípica para as características das plantas e dos frutos, indicando ser a área, importante centro de diversidade da espécie. Somente uma variedade de bacurizeiro é conhecida: a de flores róseas, entretanto, tem-se observado alguns raros pés de bacuri com flores

brancas (MANICA, 2000). As variações de frutos quanto à forma são classificadas como: bacuri-comprido, bacuri-oblongo e bacuri sem semente, com maior percentagem de polpa comestível. Não existem variedades nem clones definidos e devidamente avaliados e caracterizados de bacurizeiro (MANICA, 2000). Em média, de uma planta adulta de bacurizeiro colhe-se 500 frutos, com peso médio variando de 350 a 500 gramas, sendo que algumas plantas chegam a produzir 900 a 1000 frutos. (VILLACHICA et al., 1996, CAVALCANTE, 1996). Em plantas enxertadas, ainda não se dispõe de dados de produção. Cavalcante (1996) cita que o rendimento de polpa é em média de 10 a 13%, porém, em algumas plantas matrizes já foram relatados teores de polpa em torno de 30%. Em trabalhos realizados pela Embrapa Meio-Norte, foram selecionadas plantas matrizes que produziram frutos com teor de polpa em torno de 27% (GIACOMETTI, 1993).

A colheita de frutos diretamente da planta no estágio “de vez” (início da pigmentação amarelada), proporcionou uma melhor qualidade final, caracterizando-se no melhor estágio de maturação para a colheita do bacurizeiro (TEIXEIRA, 2000). Alguns índices para a colheita desses frutos podem ser sugeridos, tais como: 15 °Brix de SS; 0,68% de AT e 22 para a relação SS/AT, e epicarpo com coloração predominantemente amarela, correspondendo a um conteúdo de clorofila total de 15mg 100g⁻¹ na casca fresca. (TEIXEIRA, 2000)

Os principais tipos de frutos de bacuri, segundo classificação proposta por Calvazarra (1970), são: bacuri comprido – fruto de comprimento maior que o diâmetro e geralmente apresenta até cinco sementes; bacuri redondo – frutos com medidas de comprimento e diâmetro semelhantes; bacuri sem sementes – fruto desprovido de sementes e de tamanho pequeno, aproximadamente 6 cm de comprimento; bacuri peito de moça – fruto pronunciadamente oblongo e ovalado, com leve protuberância no ápice; bacuri preto – esse tipo, encontrado na ilha do Marajó, estado, apresenta frutos com casca rugosa e coloração marrom-escuro, quando completamente maduro.

Geralmente os frutos são oriundos de ovários com seis lóculos e, com grande frequência, contêm seis sementes. O rendimento porcentual de polpa dos frutos geralmente é inferior a 10%; o bacuri verde - fruto com epicarpo de cor verde-escuro, mesmo quando em completo estágio de maturação. Geralmente de formato arredondado, ou levemente oblongo; bacuri-açu - fruto de tamanho grande, geralmente com peso igual ou superior a 700 g, em alguns casos, ultrapassando a barreira de 1.000g. Frutos desse tipo podem apresentar até 11 sementes; bacuri casca fina – fruto com peso entre 160 e 375 g, formato ovalado e com extremidade apical ligeiramente pontiaguda, espessura da casca inferior a 0,9 cm, número de sementes por fruto

variando entre um e quatro. Flor branca - bacurizeiros que apresentam flores com pétalas de coloração creme uniforme, bem diferente dos tipos mais frequentes, cujas flores têm pétalas, predominantemente, de cor rósea em diferentes tonalidades. Dentro desse tipo são encontrados frutos de diferentes tamanhos e formatos (CALVAZARRA, 1970).

Em geral, tem-se observado que os frutos compridos apresentam maiores teores de polpa e sólidos solúveis (°Brix) que os frutos redondos ou arredondados. Os frutos sem sementes, por sua vez, além de serem demasiadamente pequenos, possuem polpa pouco macia e meio quebradiça, portanto, não apresentando características desejáveis para a comercialização, quer seja na forma “*in natura*” ou na polpa congelada (SOUZA et al., 2000).

1.4 Aspectos econômicos

O fruto do bacuri é bastante apreciado no mercado de São Luís - MA, Teresina - PI e Belém - PA. Pode ser aproveitado como fruta fresca para consumo *in natura* e para a agroindústria de polpa, sorvetes e derivados. Segundo o censo agropecuário de 2017 do IBGE (2016/2017), a produção brasileira de bacuri concentra-se nas regiões Norte (86,0%) e Nordeste (13,5%), com o Pará e o Maranhão como os maiores produtores do fruto. As demandas do mercado para a polpa do bacuri são semelhantes às do açaí (*Euterpe oleracea*) e do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), em que se verifica um evidente conflito entre a oferta natural e a crescente pressão da demanda dessas fruteiras devida sua sazonalidade (MENEZES et al., 2012). No entanto, apesar da multiplicidade de uso, apenas a polpa tem sido utilizada de forma econômica, sendo o seu principal produto (CLEMENT e VENTURIERI, 1990).

A casca (epicarpo e mesocarpo) constitui a maior porção do fruto, apresenta sabor e odor semelhantes ao da polpa e, portanto, com excelentes qualidades para aproveitamento na fabricação de doces e refrescos, porém Mourão e Beltrati (1995c) relatam que esse aproveitamento não tem ocorrido devido há forte presença de resina nessa parte do fruto, no entanto a extração da resina seria de grande importância para utilização como flavorizante, uma vez que a mesma apresenta o mesmo sabor e odor da polpa.

A espécie apresenta elevadas concentrações de ácidos graxos, principalmente o oleico e o palmítico, conferem às sementes de bacuri bom valor de uso para a indústria, especialmente a de sabão, no meio rural, o óleo recebe a denominação de “banha de bacuri”, bastante utilizada no tratamento de diversas dermatoses, além do uso como cicatrizante de ferimentos em animais e na fabricação de sabão (MOURÃO, 1992; CAVALCANTE, 1996). O farelo resultante do

beneficiamento das sementes é aproveitado como adubo, como também, na alimentação animal (MOURÃO, 1992).

Além do uso como alimento, o bacurizeiro é considerado uma espécie bastante promissora para a produção de madeira de alta qualidade (MORAES et al., 1994; VILLACHICA et al., 1996). Possui madeira compacta e resistente (0,80-0,85g cm³ de densidade) e de boas propriedades físico-mecânicas, dura ao corte, apresenta textura grossa e é altamente resistente ao apodrecimento e moderadamente resistente ao ataque de cupins. Apresenta, ainda, cerne de coloração bege-rosado e alborno de bege-claro, e pode ser utilizada em obras hidráulicas, nas construções naval, civil e em carpintarias, para a fabricação de móveis, tacos, esteios, ripas, dormentes e embalagens pesadas (PAULA e ALVES, 1997).

O setor madeireiro do bacuri vem sendo estudado por indústrias cosmética e farmacêutica, pois sua casca apresenta atividade antioxidante (NASCIMENTO et al., 2014) e potencial fotoprotetor (YAMAGUCHI, 2015). A caracterização desta matéria-prima mostrou que a casca do bacuri tem potencial para a agregação de valor, uma vez que apresenta boa composição nutricional, destacando-se fibras e compostos bioativos (CARMO et al., 2016).

Alguns subprodutos como a manteiga de sementes de bacuri apresentou atividade contra leishmaniose tegumentar (BARROS et al., 2012), extratos da casca e da semente do fruto do bacurizeiro apresentaram atividade antiepiléptica (SILVA et al. 2016) e o óleo das sementes de bacuri revelou potencial cicatrizante (SANTOS-JÚNIOR et al., 2010; COSTA-JÚNIOR et al., 2011). Apesar da valorização dos seus subprodutos, como cosméticos e fármacos, ainda são escassos os cultivos comerciais dessa espécie, o que se deve às dificuldades da produção de mudas e das técnicas de manejo (ARAÚJO et al., 2007). A maior parte da produção do bacuri é oriunda da atividade extrativista, o que não tem sido suficiente para suprir à demanda do mercado consumidor (SILVA et al., 2010).

1.5 Propagação do bacurizeiro

A propagação do bacurizeiro pode ser realizada de forma sexuada a partir da germinação de sementes ou assexuada com a regeneração da raiz primária, uso de brotações naturais de raízes de plantas adultas ou de técnicas como a enxertia e a micropropagação (CARVALHO e MULLER, 1996).

Apesar das várias técnicas de propagação, os bacurizeiros apresentam produção irregular, pois trata-se de uma espécie com autoincompatibilidade esporófitica, apresenta flores grandes, actinomorfas e hermafroditas (SARAIVA et al., 2013). Na natureza, é necessário a

presença de alguns pássaros, como o periquito-de-asa-dourada, para o transporte do pólen de uma planta de bacurizeiro para outra, e que tenham compatibilidade, sendo necessário em torno de pelos menos dez tipos de frutos, assim evitando mudas incompatíveis (SHANLEY et al., 2010).

1.5.1 Propagação sexuada

O principal obstáculo para a formação de mudas de bacurizeiro por via sexuada é o tempo considerado longo (média de 589 dias) para que as sementes completem o processo de germinação. Além disso, a germinação é bastante desuniforme, com algumas sementes variando de 180 a 900 dias após a sementeira (CARVALHO et al., 1998).

A demora na germinação é decorrente do fato de que as sementes exibem um tipo particular de dormência, cujo sítio de ação está localizado na plúmula, por tanto a desuniformidade ocorre em função da variação no grau de dormência entre sementes. Esta característica tem forte influência com seu componente genético, existindo genótipos cujas sementes apresentam porcentagem de germinação superior a 30% (CARVALHO et al., 1998).

Outros fatores também limitam à implantação de pomares com mudas oriundas de sementes é o fato de o bacurizeiro ser uma espécie alógama (MAUÉS e VENTURIERI, 1996), e apresentar longa fase juvenil (CALZAVARA, 1970). O primeiro fator condiciona grandes variações entre plantas de um pomar, devido à segregação e à recombinação gênica, mesmo quando as sementes são provenientes de um só indivíduo. A longa fase jovem de plantas propagadas pela via sexuada faz com que as mesmas só entrem em fase reprodutiva dez a doze anos após o plantio (LIMA, 2007).

Existe quatro fases morfológicas bem definidas que são observadas no processo germinativo das sementes: a ruptura do delgado e tegumento pela raiz primária; o crescimento vigoroso da raiz primária, a emergência do epicótilo considerado a fase mais lenta e desuniforme e por último ocorre a abertura do primeiro par de folhas, estando a plântula, então com todas as suas estruturas essenciais claramente definidas (CARVALHO, et al., 1998)

1.5.2 Propagação assexuada

O processo de propagação assexuada mais utilizado para o bacurizeiro é a enxertia por garfagem no topo em fenda cheia, em que envolve primeiramente a formação do porta-enxerto, que é o próprio bacurizeiro obtido por semente ou por regeneração da raiz primária, sendo

considerado método de fácil execução e maior rendimento de mão-de-obra, proporciona maior percentagem de sucesso (CARVALHO e MÜLLER, 2007). A brotação dos enxertos inicia-se 20 dias após a enxertia, podendo, prolongar-se por até 80 dias, ocasião em que a porcentagem de enxertos brotados atinge valor em torno de 80% e 42%, para os métodos de garfagem no topo e garfagem lateral no alburno, respectivamente. (CARVALHO et al., 2002). A enxertia possibilita que as plantas entrem em fase reprodutiva cinco a seis anos após o plantio (PERES et al., 1997).

O sucesso deste método de propagação depende de outros fatores, da época de retirada das ponteiros e do diâmetro dessas. Obtém-se maior percentagem de enxertos pegos quando as ponteiros são retiradas antes da troca total das folhas da matriz que se deseja propagar. Geralmente, no período compreendido entre os meses de novembro a maio, as ponteiros estão em estágio ideal para serem enxertadas, com folhas maduras, tecidos lenhosos e gema apical em fase de dormência. Quando são utilizadas ponteiros oriundas de plantas que estejam em fase de renovação de folhas ou muito próximas dessa fase, a brotação dos enxertos se verifica em curto período de tempo, antes mesmo de ocorrer a soldadura com o porta-enxerto, e a quase totalidade dos enxertos senesce e morre (CARVALHO e MÜLLER, 2007).

O bacurizeiro exibe a capacidade de emitir abundantes brotações de raízes da planta-mãe. A emissão de rebentos ocorre mesmo após a derrubada da planta-mãe, dependendo da abundância e da distribuição espacial dos bacurizeiros, após a derrubada desses, o número de brotações oriundas de raízes é tão grande que pode cobrir totalmente a superfície do terreno (CARVALHO e MÜLLER, 2007). A obtenção de mudas oriundas de rebentos de raízes é muito difícil, pois a quase totalidade dessas estruturas não apresenta sistema radicular independente e, quando da retirada da brotação com parte do segmento de raiz que a originou, a sobrevivência é baixa, pois o enraizamento das brotações é pouco provável (CARVALHO e MÜLLER, 2007).

O processo em que se utiliza a raiz primária de sementes em início de germinação do bacuri, quando comparado com a propagação tradicional por sementes, é melhor por possibilitar a formação de mudas ou porta-enxertos no prazo de um ano, enquanto que, quando feito por sementes, esse prazo é de dois anos e meio a três anos (PERES et al., 1997). As sementes de onde a raiz primária foi destacada podem ser semeadas novamente, o que possibilita a obtenção de novos segmentos de raiz primária. Nesse caso, o tempo requerido para que a raiz primária atinja comprimento igual ou superior a 1,10 m é maior, sendo requeridos em média 180 dias, pois serão necessárias a cicatrização e a regeneração dessa raiz em função do pequeno segmento que permaneceu ligado à semente (CARVALHO e MÜLLER, 2007). O sucesso na formação

de mudas por esse processo depende da formação de raízes na porção basal do rebento. Resultados superiores são obtidos quando se utilizam rebentos com altura inferior a 20 cm e esses são retirados no período de chuvas, mas, mesmo nessa situação, a sobrevivência no viveiro é baixa, geralmente, inferior a 25% (LIMA, 2000). Necessitando assim de outras técnicas de propagação com maior eficiência.

1.6 Cultura de Tecidos

O cultivo de plantas *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais pode ser definido como o cultivo em ambiente artificial sob condições assépticas e controladas de células vegetais isoladas, ou tecidos ou órgãos, que podem dar origem a plantas inteiras, diretamente do explante ou indiretamente a partir de calos (LAKSHMANA et al., 2005). Trata-se de uma ferramenta da biotecnologia, que compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório, utilizada para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como plantas livres de pragas e doenças, e o acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (LAKSHMANA et al., 2005).

As técnicas da cultura de tecidos têm sido utilizadas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas (CHENGALRAYN et al., 2005), porém, a sua aplicação na propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação é considerada de grande impacto, pois tem como principal objetivo a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (DONATO et al., 2005; LIMA e MORAES, 2006). Até o momento não há trabalhos de cultura de tecido com o bacurizeiro, porém outras espécies lenhosas já se fazem uso da técnica, como a *Enterolobium contortisiliquum* (RODRIGUES et al., 2022), *Eugenia involucrata* (CHARLENE et al., 2021) e *Myracrodruon urundeuva* (SILVA et al., 2021).

1.7 Micropropagação

As técnicas de micropropagação ou propagação *in vitro* surgiram em meados do século XX (THORPE, 2007), e desde então têm sido largamente utilizadas em diversas áreas, como em estudos de biologia, agricultura, horticultura e silvicultura, e consistem em cultivar tecidos vegetais de um determinado material de tamanho reduzido em condições assépticas (CANHOTO, 2010; KUMAR, 2011). Isto porque as células vegetais em meio artificial têm a capacidade de regenerar e originar novas plantas por um processo conhecido por “totipotência” (HUSSAIN et al., 2012), descrito por Haberland em 1902, a teoria da totipotência celular, atribui que toda célula viva e nucleada possui potencial genético para desenvolver uma planta

inteira, base teórica da clonagem. Em geral, a micropropagação tem sido largamente utilizada para diversos fins, nomeadamente na reprodução de quantidades de plantas num período relativamente curto e isentas de doenças, produção de metabólitos secundários, e no estabelecimento de populações que se encontram ameaçadas ou em perigo de extinção (HUSSAIN et al., 2012).

A micropropagação pode ser definida como a propagação em larga escala de um genótipo selecionado por técnicas de cultura tecidos, pode ser também definida como a ciência e a arte de multiplicar plantas *in vitro* (GUERRA, 2016), a aplicação mais prática da cultura de tecidos é a micropropagação, chamada assim devido ao tamanho dos seus explantes (TORRES et al., 1998).

O princípio básico da micropropagação é estabelecer um meio de cultura com todos os componentes essenciais para o desenvolvimento de uma planta e a eficiência do protocolo de micropropagação pode ser influenciada por vários fatores, especialmente a composição do meio basal e a concentração de reguladores de crescimento utilizados (EDWIN et al., 2008; FLORES et al., 2015). De acordo com as necessidades fisiológicas da planta, são adicionadas fontes carbono e nitrogênio, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e ou reguladores de crescimento, por vezes um agente gelificante e pH ajustado para valores aceitáveis para determinado tipo de espécie (CARVALHO et al., 2006; HUSSAIN et al., 2012).

A micropropagação dá-se em diferentes fases: seleção da planta mãe; iniciação da cultura (desinfestação dos explantes e transferência destes para o meio de cultura); multiplicação (aumento do número de propágulos), alongamento e enraizamento e aclimação (transferência para condições *ex vitro*) (CANHOTO, 2010). O sucesso de um sistema de micropropagação depende de grande número de variáveis, uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), podendo englobar três técnicas, sendo elas a proliferação de meristemas existentes no explante inicial, a indução de organogênese e a embriogênese somática (CANHOTO, 2010).

A técnica da micropropagação pode ser realizada durante o ano todo, em larga escala e sem problemas de sazonalidade (CROCOMO, 1989), podendo também ser utilizada como mecanismo para solucionar problemas de espécies de difícil germinação pelos métodos convencionais (PASQUAL et al., 1998). Além disso, a micropropagação tem sido ferramenta útil para a propagação vegetativa nas mais diversas espécies vegetais, sendo a técnica dentro da cultura de tecidos que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (ERIG

e SCHUCH, 2005). Com isso a micropropagação do bacurizeiro pode se tornar uma excelente alternativa para superar gargalos existente na propagação da espécie.

1.8 Germinação *in vitro*

A germinação *in vitro* é uma alternativa para a propagação de plantas com alta qualidade fitossanitária (NOLETO et al. 2016), tendo aplicabilidade para muitas fruteiras nativas da Amazônia e do Cerrado. Entretanto, essa germinação pode ser influenciada por fatores externos e internos capazes de determinar o sucesso dessa propagação. Assim, compreender estes fatores pode tornar possível o controle e a manipulação desta técnica em condições de cultivo *in vitro* (NOGUEIRA et al., 2013).

Para que o processo de germinação *in vitro* ocorra de forma mais uniforme e com maior percentual de sucesso possível, alguns procedimentos podem ser adotados nas sementes, como a identificação adequada de temperatura ambiente e a aplicação de reguladores vegetais (FERRARI et al., 2008). Os níveis endógenos de hormônios presentes nas sementes são responsáveis por alterações no estado fisiológico e bioquímico, que levam na retomada do desenvolvimento embrionário, sendo que estas alterações responsáveis pela ativação e síntese de enzimas hidrolíticas, quebrando as moléculas de reservas utilizadas para o crescimento do eixo embrionário (MARCOS FILHO, 2015).

Condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser fornecidas em laboratórios por meio da multiplicação *in vitro*, assim, estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* de espécies recalcitrantes são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação, como para obter plântulas uniformes e com qualidade genética e fitossanitária adequada (STEIN et al., 2007).

No melhoramento de espécies que apresentam problemas de dormência de sementes, ou quando a frutificação é um processo prolongado, como as espécies arbóreas lenhosas, a técnica de cultivo de embriões imaturos na germinação *in vitro*, é uma excelente alternativa para superar estes tipos de barreiras (CARVALHO, 2006). Dentre algumas espécies que apresentaram sucesso em sua germinação *in vitro*, podemos citar o *Melocactus glaucescens* e *Melocactus paucispinus*, onde apresentaram redução de custos com o cultivo *in vitro* (RESENDE et al., 2021), SILVA et al., (2021) obtiveram a germinação de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com meio MS ½, Silvério et al. (2020) com o desenvolvimento de plântulas a partir da germinação *in vitro* de pau-ferro (*Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burkart) e Rocha et al. (2015) com germinação de embriões zigóticos imaturos de *Passiflora*

edulis, através do meio de cultura MS sem reguladores de crescimento e com diferentes concentrações de BAP (6-benzilamopurina). Com base em estudos como estes e outros a germinação *in vitro* do bacurizeiro pode possibilitar a aquisição de mudas de excelente qualidade fitossanitária e possivelmente acelerar a sua germinação.

1.9 Organogênese

A organogênese é uma rota morfogênica, que pode ser induzida a partir da cultura de tecidos, na qual há uma regeneração de células e tecidos a partir de um explante, oriundo de um tecido vegetal, proporcionando a formação de uma nova plântula (ANDRADE, 2005). O processo de organogênese é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente (ALVES et al., 2004). A organogênese é a formação e desenvolvimento de eixos caulinares ou radicular monopolares originados de gemas pré-existentes ou neoformadas, quando somente os eixos caulinares é induzido, se faz necessário o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* resultando em plântulas completas que podem ser então aclimatizadas (GUERRA, 2016).

O processo de organogênese *in vitro* pode ser de via direta ou indireta. No caso da organogênese direta é caracterizado por gemas ou primórdios de gemas pré-existentes que são induzidos à proliferação sem ocorrer a desdiferenciação dos tecidos dos explantes (GUERRA, 2016), o modelo indireto ocorre a indução de tecidos desdiferenciados (calos) a partir dos tecidos dos explantes, e novas gemas e eixos caulinares se desenvolvem a partir desses calos. Ainda, a organogênese indireta, ao contrário da direta, ocorre uma etapa de desdiferenciação, seguida por uma reprogramação celular (rediferenciação) para a formação dos novos tecidos e órgãos (GUERRA, 2016).

Atualmente, a obtenção de organogênese *in vitro* é um processo empírico onde são testados para cada espécie, ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, as seguintes condições: I) fonte de explante; II) composição mineral do meio de cultura (sais, vitaminas e fonte de carbono); III) balanço hormonal e IV) condições ambientais (PERES, 2002).

Quanto à fonte do explante, é necessário a utilização de tecidos com maior competência organogênica, sendo indicado tecidos mais jovens. Na composição do meio de cultura, os componentes decisivos são os hormônios vegetais, a partir da ação de reguladores de crescimento, como também da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo. Apesar dos estudos em relação a esta técnica terem avançado muito, ainda se faz necessário a adequação de protocolos de regeneração visando torná-la

aplicável para os programas de silvicultura, agricultura e outros (ALVES et al. 2004). As condições ambientais influenciam notavelmente a organogênese *in vitro*, sendo a luz o fator ambiental mais relevante (PERES, 2002). Porém, avanços são necessários para entender a ação dos reguladores de crescimento, principalmente a níveis moleculares.

Alguns genes associados a organogênese foram identificados, como o CRE1 (CAGE-Defined Tissue - Specific Enhancer) sendo considerado um receptor de citocinina e o CYCD3 (CYCD3-1) envolvido na aquisição de competência para organogênese (PHILLIPS, 2004), o que possibilita maior entendimento a respeito da sinalização de membranas, e suas interações com os genes envolvidos no processo de morfogênese nas plantas. A organogênese é uma técnica chave quando associada à transformação genética, pois possibilita a regeneração de plantas transgênicas após o cultivo com a bactéria, ou depois da submissão ao bombardeamento (QUORIN e QUINSEN, 2006).

No caso das arbóreas, alguns autores relatam sucesso na propagação a partir da organogênese, como Souza et al. (2019), que obtiveram protocolo eficiente para a regeneração *in vitro* de *Genipa americana* que permitiu altas taxas de regeneração de ramos (80%) usando segmentos de hipocótilo com baixas concentrações de BAP (1,12 mg L⁻¹). Costa (2019) observou em *Delonix regia* maior número de brotos em explantes cultivados em meio suplementado com BA (2,0 mg L⁻¹).

1.10 Reguladores de crescimento vegetal

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios naturais (CARVALHO et al., 2006), e estes são mensageiros químicos, produzidos em uma célula, que modulam os processos celulares em outra célula, interagindo com proteínas específicas que funcionam como receptores ligados a rotas de transdução de sinal (TAIZ et al., 2017), já os reguladores de crescimento são, substâncias químicas naturais ou sintéticas que podem ser aplicadas diretamente nos vegetais para alterar os processos vitais ou estruturais, por meio de modificações no balanço hormonal das plantas (ESPINDULA et al., 2010).

A adição de reguladores de crescimento em meios nutritivos tem o objetivo principal de suprir possíveis deficiências de teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (GRATTAPAGLIA et al., 1998). Simultaneamente, a adição de reguladores de crescimento estimula certa resposta como alongamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA et al., 1998).

A escolha dos reguladores de crescimento a ser utilizados na cultura *in vitro* dependerá do tipo de morfogênese desejada, de seu nível endógeno no explante no momento da excisão, da capacidade do tecido sintetizar o regulador durante o período de cultura e da possível interação entre os hormônios vegetais endógenos e aqueles adicionados ao meio de cultura (SANTOS, 2003). Segundo Peres (2002), os hormônios vegetais são os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura, pois difere qual rota morfogênica poderá ser induzida. Os principais hormônios utilizados para induzir a organogênese são citocininas em altas concentrações, e auxinas em menores, no caso da germinação, as giberelinas são mais utilizadas.

As giberelinas são consideradas promotores da germinação, estas atuam no crescimento vegetativo do embrião, mobilizando reservas para o enfraquecimento do endosperma que cobre o embrião e bloqueia seu crescimento (TAIZ et al., 2017). Giberelinas são encontradas em várias partes das plantas, como, raízes, folhas jovens, sementes em fase de germinação e nos frutos (LAVAGNINI et al., 2014). O ácido giberélico (GA_3) aumenta a elongação e divisão celular, o que é evidenciado pelo aumento do comprimento e do número de células em resposta à aplicação deste regulador de crescimento (TAIZ et al., 2017). Esta ação está relacionada à síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos, sendo expansivas e de enzimas hidrolíticas de reserva nutritiva contida no endosperma, como a amilase (PAIXÃO, 2019).

As auxinas e citocininas são consideradas as mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento na cultura de tecidos (GASPAR et al., 1996), e de acordo com Hussain et al. (2012), estes dois hormônios em altas concentrações são capazes de produzir efeitos na formação das raízes e na regeneração dos caules. A auxina foi o primeiro hormônio descoberto em plantas, que regula o desenvolvimento do vegetal, promovendo o desenvolvimento de nós, raízes adventícias e formação de calo, baixos níveis de auxina são também necessários para o alongamento da raiz, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão (TAIZ et al., 2017). As principais auxinas utilizadas no cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA).

De acordo com Taiz et al. (2017), as citocininas participam na regulação de muitos processos do desenvolvimento vegetal induzindo a divisão celular em calos, promovendo a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, entre outros. O tipo de citocinina, assim como sua concentração são fatores fundamentais para o bom desempenho da multiplicação *in vitro*.

Grattapaglia e Machado (1998) ressaltam que as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina são eficazes em promover a multiplicação, entretanto, não é regra absoluta e, conforme a espécie, outras citocininas podem apresentar melhores resultados. Furtado (2004) destaca um composto do grupo das fenilureias, que desempenha atividade de citocinina, o tiadizuron, que vem apresentando excelentes resultados na indução da organogênese. Porém, o uso de BAP tem revelado eficiência no processo de multiplicação, tanto de estruturas aéreas como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (LEITZKE et al., 2009).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, e. C. S. C. et al. (2004). Organogênese de explante foliar de clones de *eucalyptus grandis* x *e. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430.
- Andrade, W. F. (2005). **Efeito do “pulse” na organogênese de Eucalyptus grandis cultivado in vitro**. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.
- Araújo, J. R. G. et al. (2007). Porta-enxertos para o bacurizeiro: situação e perspectivas. In: LIMA, M.C. (Org.). **Bacuri: agrobiodiversidade**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. p. 47- 63.
- Barros, Y.S.O. et al. (2012). **Desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas de uso tópico a partir de *Platonia insignis* Mart. para o tratamento da leishmaniose tegumentar**. In: XXI Seminário de Iniciação Científica e IV Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2012, Teresina. Anais.
- Barroso, G. M. et al. (2002). G. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, v. 1, ed. 2, p. 309.
- Calzavara, B. B. G. (1970). **Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro, cupuaçuzeiro**. Embrapa Amazônia Oriental (EMBRAPA). v.1., n.2, p.63-70.
- Canhoto, J. M. (2010). **Biotecnologia vegetal: Da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Carmo, J.R. et al. (2016). **Caracterização físico-química e determinação de compostos bioativos em casca de bacuri**. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Gramado. Anais.
- Carvalho, J. E. U. (2007). Aspectos Botânicos, Origem e Distribuição Geográfica do Bacurizeiro. In: LIMA, M. C. (org.). **Bacuri Agrobiodiversidade**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Ed 1, cap. 1, p. 17-28.
- Carvalho, J. E. U. de. et al. (2002). **Métodos de Propagação do Bacurizeiro, (*Platonia insignis* Mart.)**. Circular técnica 30. Embrapa Amazônia Oriental 1a edição
- Carvalho, J. E. U. de; Müller, C. H. (2007). Propagação do Bacurizeiro. In: LIMA, M. C. (org.). **Bacuri Agrobiodiversidade**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. cap. 2, p. 29-46.
- Carvalho, J. E. U. de et al. (1998). Cronologia de eventos morfológicos associados à germinação e sensibilidade ao dessecamento em sementes de bacuri (*Platonia insignis* Mart. – Clusiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 475-479.
- Carvalho, J. M. C. et al. (2006). **Fatores Inerentes á Micropropagação**. República Federativa do Brasil. 28.
- Carvalho, J. M. F. C. et al. (2006). **Fatores Inerentes À Micropropagação**. EMBRAPA ALGODÃO. Campina Grande, p. 28.
- Cavalcante, P. B. (1996). **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém:CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi. ed. 6, p.279.

- Charlene M. (2021) Antioxidante e giberelina no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC. **Revista de Ciências Agrárias**, v.44, n.1, p.43-50.
- Chengalrayan, M. K. et al. (2005). *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 41, p. 447-482.
- Clement, C. R.; Venturieri, G. A. (1990). **Bacuri and cupuaçu**. In: Nagy, S.; Shaw, P.E.; Wardowski, W.G., eds. Fruits of tropical and subtropical origin. Composition, properties and uses. Lake Alfred: Florida Department of Citrus, p.178-192.
- Costa, A. de O. (2019). Shoot proliferation and *in vitro* organogenesis from shoot apex and cotyledonary explants of royal poinciana (*Delonix regia*), an ornamental leguminous. **Tree**, v. 35, n.1.
- Costa-júnior, J.S. et al. (2011). Evaluation of antioxidante effects *in vitro* of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.2, p.293-299.
- Crocom, O. J. (1989). Biotechnological approaches for the control of plant morphogenesis and their applications in agriculture. **Genome**, v.31, n.2, p.1034-1041.
- Donato, V. M. T. S. et al. (2005). Plantas de cana-de-açúcar *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 134-141.
- Edwinz F, G.; Hall, M. A.; Klerk, G. de. (2008). **Plant Propagation by Tissue Culture** (G. Edwin F, M. A. Hall, & G. de Klerk (eds.); 3 ed.
- Engler, A. G. In: Martius, C. F. P. (1888). Flora brasiliensis, Monachii. Frid. **Freischer**. v. 12, n. 1, p.112.
- Erig, A. C.; Schuch, M. W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v.35, n.4.
- Espindula, M. C. et al. (2010). Efeitos de reguladores de crescimento na elongação do colmo de trigo. **Acta Scientiarum, Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 109-116.
- Fernandes, A. (1996). **Compêndio botânico: diversificação-taxonomia**. Fortaleza: UFC,.144 p.
- Ferreira, A. G. (1998). **Dicionário de latim-português**. Lisboa: Porto Editora, p.1.240
- Ferreira, G. et al. (2005). Efeito de arilo na germinação de sementes de *Passiflora alata* Curtis em diferentes substratos e submetidas a tratamentos com giberelina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 277-280.
- Ferreira, M. E. et al. (1998). Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BOSU, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, v.1, p.21-43.
- Flora do Brasil. (2020) *Clusiaceae* In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Flores, R. et al. (2015). Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de Ipomoea batatas. **Revista de Ciências Agrárias**, 2015, v.38, n.3, p.429-437.

Furtado, C.M. (2005). **Micropropagação da cultivar BR-1 de amendoim (*Arachis hipogaea*) *in vitro* utilizando citocininas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

Gaspar, T. et al. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant***, v.32, n.4, p. 272–289.

Giacometti, D. C. (1993). **Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. Anais. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, p. 13-27.

Grattapaglia, D. Machado, M. A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa –SNPH, v. 1, p. 183 - 260.

Guerra, M. P. et al. (2016). FIT5507 – **BIOTECNOLOGIA I**, APOSTILA v 2016.1. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia.

Huber, J. (1904). **Notas sobre a pátria e distribuição geográfica das árvores frutíferas do Pará**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi de História Natural Ethnografia, v. 4, p. 375-406. (Museu Paraense Emílio Goeldi de História Natural e Ethnografia. Boletim de Pesquisa, 4.).

Hussain, A. et al. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. **Recent Advances in Plant in Vitro Culture**, p.1-28.

Ibge (2017). **Censo agropecuário 2017**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6617#resultado>.

Kumar, N. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest and Environmental Science**, v.27, n.2, p.61–72.

Lakshmanan, P. (2005). Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. ***In vitro cellular and developmental biology – Plant***, v.41, p. 345-363.

Lavagnini, C. G. et al. (2014). Fisiologia Vegetal – Hormônio Giberelina. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 25 n.1 p. 48-52.

Leitzke, L. N.; Damiani, C. R.; Schuch, M. W. (2009). Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amora-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.2, p.582-587.

Lima, J. D.; Moraes, W. S. (2006). Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, p. 13-19.

Lima, M. da C. (2010). **Bacuri: (*Platonia insignis* Mart) – Agrobiodiversidade**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, p. 210.

Macedo, M. (1995). **Contribuição ao estudo de plantas econômicas no Estado do Mato Grosso**. Cuiabá: UFMT, p.70.

Manica, I. (2000). **Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e Mercado**. Porto Alegre: Ed. Cinco Continentes.

- Marcos filho, J. (2015). **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**, 2 ed., Londrina, PR, ABRATES, p. 660.
- Maués, M. M.; Venturieri, G.C. (1996). **Ecologia da polinização do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) Clusiaceae**. Belém: Embrapa-CPATU, (Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 170), p. 24.
- Menezes, A. J. E.; Homma, A.K.O.; Schöffel, E.R. (2012). **Do extrativismo à domesticação: caso do bacurizeiro no nordeste paraense e na Ilha de Marajó**. Documentos – 379. Embrapa, v. 99, p. 66.
- Moraes, V. H. F. et al. (1994). Native fruit species of economic potential from the Brazilian Amazon. **Angewandte Botanik**, v. 68, p. 47-52.
- Mourão, K. S. M. M.; Beltrati, C. M. (1995a). Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (*Clusiaceae*). III. Germinação e plântulas. **Acta Amazônica**, v. 25 n.1/2, p. 47-3.
- Mourão, K. S. M. M.; Beltrati, C. M. (1995b). Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (*Clusiaceae*). I. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento. **Acta Amazônica**, v. 25, n.1/2, p.11-14.
- Mourão, K. S. M. M.; Beltrati, C. M. (1995c). Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (*Clusiaceae*). II. Morfo-anatomia dos frutos e sementes maduros. **Acta Amazônica**, v. 25, n.1/2, p.33-45.
- Mourão, K. S. M. (1992). **Morfologia e desenvolvimento de frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (*Clusiaceae*)**. Dissertação (Mestrado). UNESP, Rio Claro, p. 90.
- Nascimento, J. L. et al. (2014). **Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina**. Boletim Informativo Geum, v.5, n.2, p.44-53.
- Paixão, M. V. S. (2019). **Propagação de Plantas**. 2.ed. Santa Teresa: Ifes, p 230.
- Pasqual, M.; Hoffman, A.; Ramos, J. D. (1998). **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. Introdução – Fundamentos básicos**. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, p.159.
- Paula, J. E.; Alves, J.L.H. (1997). **Madeiras nativas; anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília: Empresa Gráfica Gutenberg, p.541.
- Peres, L. E. P. (2002). Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 25, p. 44-48.
- Phillips, G. C. (2004). *In vitro* morphogenesis in plants: recent advances. **In vitro cellular and developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v. 40, p. 342-345.
- Pinhal, F. H et al. (2011) Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v.41, n.7.
- Quorin, M.; Quinsen, R. (2006). Advantages in genetic transformation of Eucalyptus species. **Molecular Biology of tropical Plants**, Trivandrum, v. 1, p. 1-57.

- Resende, S. V. et al. (2021). *In vitro* seed germination and plant growth of “Cabeça-De-Frade” (Cactaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 1, p. 1 – 8.
- Rickett, H. W.; Stafleu, F. A. (1959). Nomina generica conservanda et rejicienda apermatophytorum III. **Taxon**, v. 8, n. 1, p. 282-314.
- Rijkevorsel, P. V. (2002). Proposal to conserve the name *Platonia insignis* Against *Moronobea esculenta* (Guttiferae). **Taxon**, v. 51, n. 14, p. 813-815.
- Rizzini, C. T. Rizzini, C. M. (1983). **Dicionário botânico clássico latino-português**. Rio de Janeiro: IBDF/Jardim Botânico, (Série Estudos e Contribuições, 2), p.282.
- Rodrigues, F. A. et al. (2022) Calli growth curve of *Enterolobium contortisiliquum* in vitro induced. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e24911124550.
- Santos, E. K. (2003). dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Ed UFRGS, p. 415-444.
- Santos-Júnior, R.Q. et al. (2010). Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, v.9, n.4, p.575-581.
- Shanley, P. et al. (2010). **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. 2. ed. rev. ampl. – Bogor, ID: Cifor, p. 316.
- Silva, A. P. S. C. L. (2016). *Platonia insignis* Mart com aplicações farmacológicas para o Sistema Nervoso Central: uma revisão. **Boletim Informativo Geum**, v.7, n.2, p. 24-31.
- Silva, et al. (2021). Cultivo *in vitro* de diferentes genótipos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 11, n. 1, p. 31-45.
- Silva, T. dos S. et al. (2021) *In vitro* shoot regeneration in *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e69269.
- Silvério, L. de O. et al (2020). Concentrações de benzylaminopurina e agentes gelificantes no cultivo *in vitro* de pau-ferro. **Scientia Amazonia**, v. 9, n.4, p 11-16.
- Souza, R. R. de. et al. (2019). Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient *in vitro* regeneration of *Genipa* sp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.136, p.153–160.
- Souza, V. A. B. et al. (2000). **Bacurizeiro** (*Platonia insignis* Mart) Jaboticabal: FUNEP, (série frutas nativas, 11), p.72.
- Stein, V. C., et al. (2007). Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. **Ciências e Agrotecnologia de Lavras**, v. 31, n. 6, p. 1702-1708.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2017). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, ISBN 978-85-8271-367-9.
- Takahashi, E.K. (2002). **Transferência do gene *atacina A* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Teixeira, G. H. A. (2000). **Frutos do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.):** caracterização, qualidade e conservação. 106 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v.37, v.2, p.169–180.

Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (1998). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Embrapa-SPI; Embrapa Hortaliças, v. 1, p. 11-20.

Villachica, H. (1996). **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia.** Lima: Pro – Tempore, p.50-55.

Yamaguchi, K. K. L. et al. (2014). Farmacologia do Bacuri (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 39-46.

CAPÍTULO II

Estabelecimento e germinação *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)

Estabelecimento e germinação *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)

Karina da Silva Vieira^{1*}, TÁCILA Rayene dos Santos Marinho¹, Irislene Silva Albuquerque¹, Givago Lopes Alves¹, Marcos VinÍcius Marques Pinheiro², FÁbio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo², FabrÍcio de Oliveira Reis¹, Tiago Massi Ferraz^{1,2}, Thais Roseli Corrêa^{1,2}.

Filiação:

¹Graduate Program in Agroecology State University of Maranhão, 65055-310 São Luís, MA, Brazil. E-mail address: karinavieira@aluno.uema.br; ORCID KVS: 0000-0002-4697-835X; thaiscorrea@professor.uema.br; ORCID TRC: 0000-0003-3131-4996; tacilarayene@hormail.com; ORCID TRSM: 0000-0002-3838-1393; albuquerqueiris0@gmail.com; ORCID ISA:0000-0002-0276-0535; engivago@hotmail.com; ORCID GLA: 0000-0002-6455-6062; fareoli@gmail.com; ORCID FOR: 0000-0002-1781-3695; E-mail: ferraztm@gmail.com; ORCID TMF: 0000-0002-9840-3523.

²Graduate Program in Agriculture and Environment, State University of Maranhão, 65055-310 São Luís, MA, Brazil.

E-mail address: macvini@gmail.com; ORCID MVMP: 0000-0002-5028-7818; figueiredo.uema@gmail; ORCID FAMMAF: 0000-0002-6904-9828.0.

RESUMO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie arbórea nativa da Amazônia brasileira, que apresenta diversas limitações para a sua propagação, umas delas é o seu processo de germinação, onde é necessário cerca de 500 a 700 dias para que se complete. Contudo, o estabelecimento e a germinação *in vitro* pode ser uma alternativa eficiente para superar este gargalo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o estabelecimento e germinação *in vitro* de *Platonia insignis* a partir de frutos imaturos de *Platonia insignis*. Os frutos foram coletados no município de Bacabeira - MA, Brasil, desinfestados e inoculados nos tratamentos: T1 - ágar + água destilada; T2 – MS0 (sem reguladores de crescimento); T3 - MS + 1 µM de BAP; T4 - MS + 2 µM de BAP; T5 - MS + 3 µM de BAP; T6 - MS + 1 µM de GA₃; T7 - MS + 2 µM de GA₃; T8 - MS + 3 µM de GA₃. Os materiais estabelecidos *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento a 24±2 °C, no escuro até emergência da parte aérea. A cada 15 dias após inoculação (15, 30, 45 e 60 DAI) foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calos; porcentagem de oxidação; emissão de radícula; emissão de parte aérea; porcentagem de contaminação; calos rosáceos ao longo dos dias e após a inoculação; comprimento da radícula e comprimento da parte aérea. Aos 60 DAI, foi possível observar que os explantes de sementes mantidas nos meios sem adição de reguladores de crescimento (T1 e T2) apresentaram valores superiores ou iguais quanto as variáveis formação de calo, emissão de radícula e parte aérea, comprimento de radícula e parte aérea comparado com meios com adição dos reguladores de crescimento. Assim, a germinação e o estabelecimento *in vitro* do bacurizeiro foram eficientes, os resultados desta pesquisa são promissores para o processo de domesticação de *P. insignis*, com redução do tempo para que a germinação se complete para cerca de 60 DAI em condições de cultivo *in vitro*, obtendo-se um satisfatório número de plantas homogêneas em curto período e possibilitando a prospecção de outras técnicas e estratégias biotecnológicas para o cultivo da espécie.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*; Fruteiras nativas; Fruteiras da Amazônia.

1. INTRODUÇÃO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), espécie que apresenta um dos frutos mais populares e apreciados nos estados da região Norte e Nordeste do Brasil, que é destinada ao consumo *in natura* e para a agroindústria de polpa, considerados nobres por suas características organolépticas e alto valor nutricional (CLEMENT & VENTURIERI, 1990; SANTOS et al., 2019), é uma das poucas espécies arbóreas amazônicas de grande porte, e que apresenta estratégias de reprodução sexuada a partir de sementes, e assexuada por brotações oriundas de raízes (HOMMA et al. 2018). Esta espécie é predominantemente alógama, ou seja, apresenta alta heterozigose, fator este que promove a desuniformidade na produção e dificulta as práticas de manejo (PONTES et al., 2017).

Atualmente, a principal técnica de propagação do bacurizeiro é a enxertia, mesmo sendo limitada, em decorrência de problemas de autoincompatibilidade esporofítica, considerado fenômeno comum em espécies nativas da flora amazônica (CARVALHO et al., 2007), refletindo em irregularidade de plantio e riscos de erosão genética, devido à pressão do uso da terra pela agricultura e a falta de técnicas adequadas de propagação clonal (SARAIVA et al., 2013). No caso da propagação sexuada, o principal fator limitante é o tempo requerido para que as sementes completem o processo de germinação, pois pode levar de 500 a 700 dias para o completo processo germinativo, e ainda possui longo período juvenil da planta, que pode alcançar mais dez anos para o início da frutificação (MENEZES et al., 2012), resultando em baixa oferta do produto, mesmo que haja demanda crescente.

Neste contexto, as técnicas de cultura de tecidos podem possibilitar a produção de elevado número de plantas a partir de um único indivíduo, podendo ser utilizada para propagação dessa espécie em escala comercial. Como alternativa viável para a propagação de muitas espécies, pode ser adotada a germinação *in vitro*, por permitir maior taxa de germinação de suas sementes, em função das condições do cultivo *in vitro* oferecerem maior controle ambiental, quando comparado às condições de campo (NOLETO et al., 2004 FREIRE et al. 2017).

A multiplicação de plantas *in vitro* permite desenvolvimento mais rápido, quando comparado àquelas obtidas por germinação em viveiros ou sistemas naturais (CORREIA et al., 2011). Vale ressaltar que plântulas obtidas a partir da germinação *in vitro*, bem como o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, podem ser utilizadas para estudos alternativos que servirão como base para outras técnicas biotecnológicas, como a entrada uma

das rotas morfogênicas (XAVIER et al. 2009). Para que protocolos como este venham a ser desenvolvidos é necessário a determinação das formulações de meios de cultura e das concentrações dos reguladores de crescimento, tais como o ácido giberélico e as citocininas em que podem acelerar o processo de germinação e a multiplicação.

O uso de técnicas de micropagação pode se tornar excelente alternativa para acelerar o processo de propagação do bacurizeiro, proporcionando produção de plantas sadias em larga escala, uniformidade nos plantios, facilidade nas práticas de manejo, e ainda auxiliar o processo de domesticação desta espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento e germinação *in vitro* de *Platonia insignis* a partir de frutos imaturos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

Frutos imaturos de bacurizeiro (*Platonia insignis*) com diâmetro médio de 78 mm, foram coletados de diferentes matrizes localizadas no povoado de Santa Luzia, município de Bacabeira, estado do Maranhão, Brasil (coordenadas geográficas 2° 58' 14" Sul e 44° 18' 32" Oeste). Após a coleta, os frutos foram acondicionados em caixas de poliestireno e levados ao Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), Campus Paulo VI, São Luís - MA.

2.2 Desinfestação e inoculação do material vegetal

Em condições de laboratório, os frutos passaram por processo de desinfestação, em água corrente e sabão neutro, com posterior imersão em álcool 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) adicionado uma gota de solução de Tween® (Isofar Ltda®, Duque de Caxias – RJ, Brasil) para cada 100 mL, mantendo-se nesta solução por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, casca, polpa e tegumento dos frutos foram seccionados, até a exposição do meristema fundamental cortical (Fig. 1), onde foi realizada outra desinfestação, iniciando por álcool 70%, um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por dois minutos, e lavados três vezes em água destilada autoclavada, por um minuto cada.

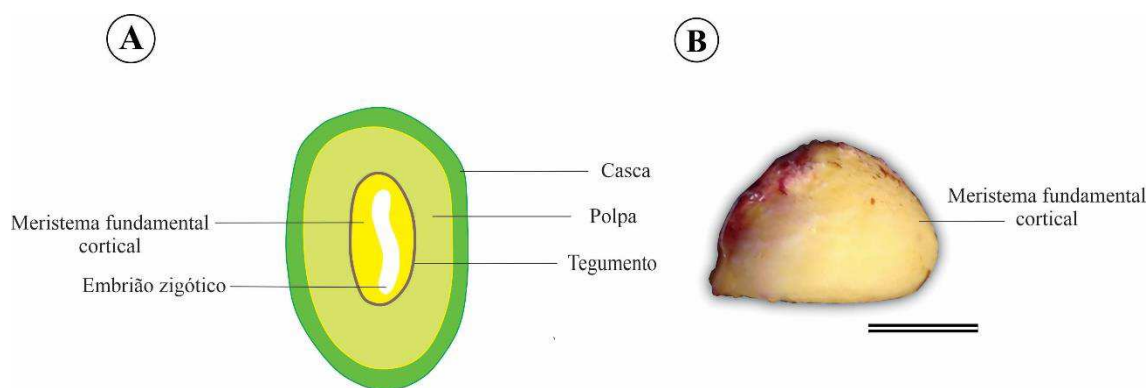


Figura 1. Fruto (A) e semente (B) de *Platonia insignis* Mart durante o início das condições de germinação *in vitro* (aos 0 dias após inoculação).

As sementes (meristema fundamental cortical e embrião zigótico) foram inoculadas em frascos de vidro de 350 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (PhytoTech Lab[®] Kansas - USA) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar[®] Ltda, Duque de Caxias – RJ, Brasil), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri - USA), 6,5 g L⁻¹ de ágar (Agargel Indústria e Comércio LTDA, Brasil), 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri - USA) e diferentes concentrações (0, 1, 2 ou 3 µM) de 6-benzilamopurina (BAP) e ácido giberélico (GA₃), sendo este último filtro esterilizado e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem. Além destes, foi utilizado um tratamento controle, sendo composto por água destilada + 6,5 g L⁻¹ de ágar. O pH destes tratamentos foram ajustados para 5,7 + 0,01, antes da autoclavagem a 121 °C e 108 kPa durante 15 min. Após inoculação das sementes nos tratamentos, estes foram mantidos em sala de crescimento a 24±2 °C, inicialmente no escuro até a emissão da parte área, cerca de 7 á 15 DAI, em seguida na luz a 5 µmol m⁻² s⁻¹ até os 60 DAI.

2.3 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto por oito tratamentos, sendo: T1 - ágar + água destilada; T2 – MS0 - sem reguladores de crescimento; T3 - MS + 1 µM de BAP; T4 - MS + 2 µM de BAP; T5 - MS + 3 µM de BAP; T6 - MS + 1 µM de GA₃; T7 - MS + 2 µM de GA₃; T8 - MS + 3 µM de GA₃, cada tratamento composto por seis repetições e a unidade experimental composta por uma semente por frasco.

A cada 15 dias após inoculação (15, 30, 45 e 60 DAI) foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calos (Ca), emissão de radícula (Er), emissão de parte área (Epa), porcentagem de contaminação (Co); calos rosáceos (Cr) de coloração rosácea ao longo dos dias após a inoculação, estas variáveis foram analisadas com base em sua presença e ausência.

Para porcentagem de oxidação (Ox), foram atribuídos os seguintes valores: 0 - para explantes não oxidados; 25% - para explantes com até ¼ de oxidação; 50% - para explantes com até ½ de oxidação; 75% - para até ¾ de oxidação e 100% - para explantes totalmente oxidados. Quanto ao comprimento da radícula (Cra) (cm) e comprimento da parte aérea (Cpa) (cm), foi utilizado um barbante e uma régua para medi-los. Foi adotada como sementes germinadas, aqueles explantes com presença de radícula e parte aérea.

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias dos tratamentos aos 60 dias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. A fim de encontrar os melhores resultados de permanência das sementes em meio de cultura (15, 30, 45 ou 60 DAI), realizou-se a análise de regressão. Os dados foram analisados pelo *software* SISVAR (Ferreira, 2011).

3 RESULTADOS

A partir da análise de variância, foi possível observar que houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis, formação de calo (Ca), porcentagem de oxidação (Ox), emissão de radícula (Er), emissão de parte aérea (Epa), comprimento de parte aérea (Cpa) e comprimento de radícula (Cra) ($P \leq 0,05$). No entanto, não houve diferença para as variáveis porcentagem de contaminação (Co) e calos rosáceos (Cr) ($P \leq 0,05$).

Para as variáveis Ca, Ox, Er e Epa, também apresentaram diferenças significativas quando submetidas a análise de regressão. Todavia, para a variável Cb, houve diferença apenas com relação aos DAI ($P \leq 0,05$). Para a variável Ca, aos 60 DAI, foi possível observar que T1 (água + água destilada), T2 (MS0 - sem reguladores de crescimento), T6 (MS + 1 µM de GA₃) e T7 (MS + 2µM de GA₃), foram superiores apenas quando comparado ao T8 (MS + 3 µM de GA₃) (Fig. 2A). Ainda, a equação que melhor se ajustou foi a quadrática com R² de 93,93%, em que a partir dos 45 dias houve máxima Ca, com redução aos 60DAI (Fig. 2B).

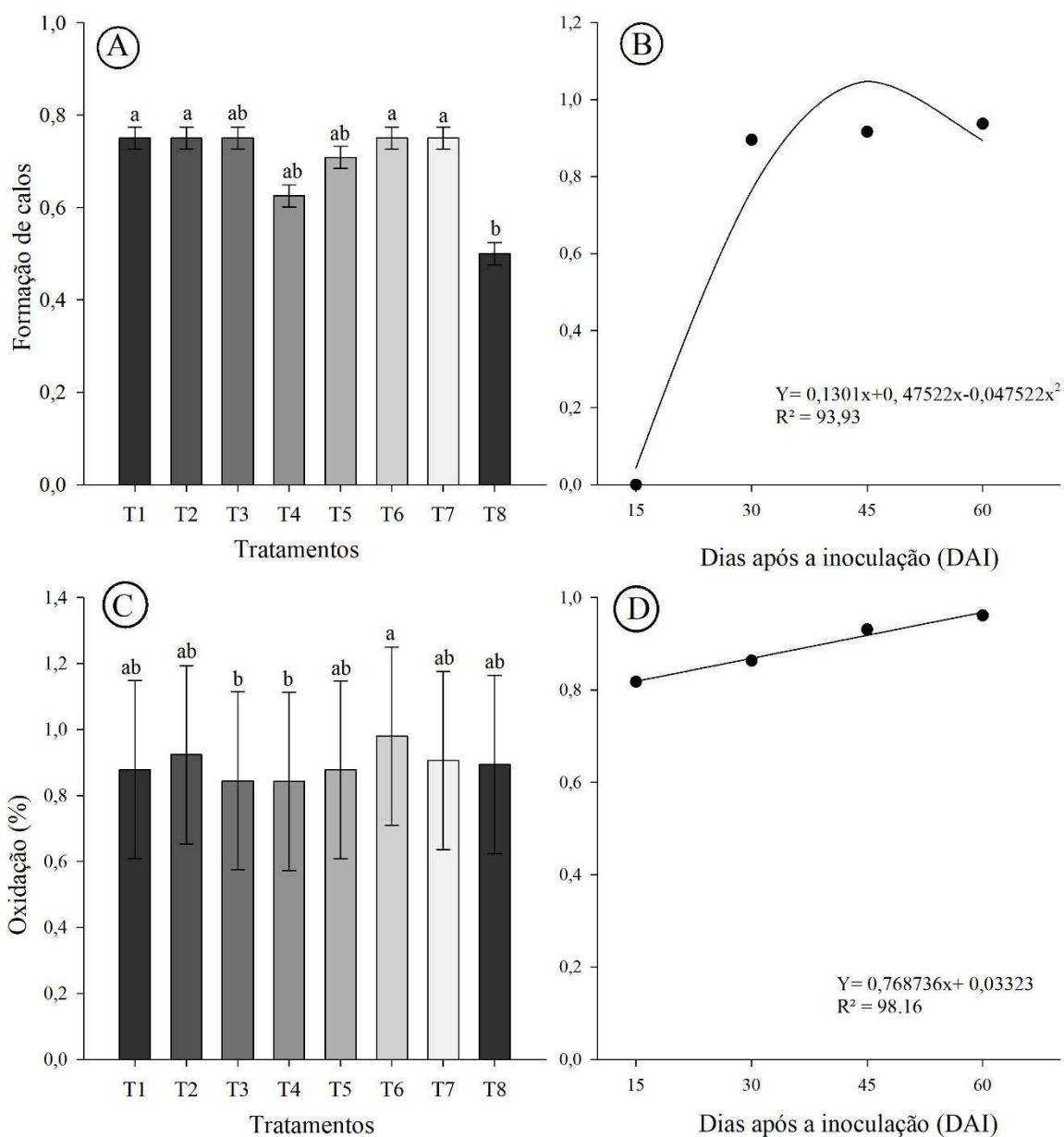


Figura 2. Formação de calos (A, B), porcentagem de oxidação (C, D), aos 60 DAI e ao longo da permanência das sementes de *Platonia insignis* nos diferentes dias após inoculação (15, 30, 45 e 60 DAI). *Médias indicadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras e linhas de limite representam a média e os valores de erro padrão, respectivamente.

Para porcentagem de oxidação (Ox), as sementes mantidas em meio T6 (MS + 1 μ M de GA₃) obtiveram uma maior oxidação (47,29%), diferindo apenas de T3 (MS + 1 μ M de BAP) e T4 (MS + 2 μ M de BAP), tratamentos que apresentaram menores valores com 23,12% e 23,54%, respectivamente (Fig. 2C). Para a regressão, a equação que melhor se ajustou foi a

linear ($R^2 = 98,16\%$), sendo observado valor crescente de oxidação ao longo dos DAI, comprovando máxima oxidação aos 60DAI (Fig. 2D).

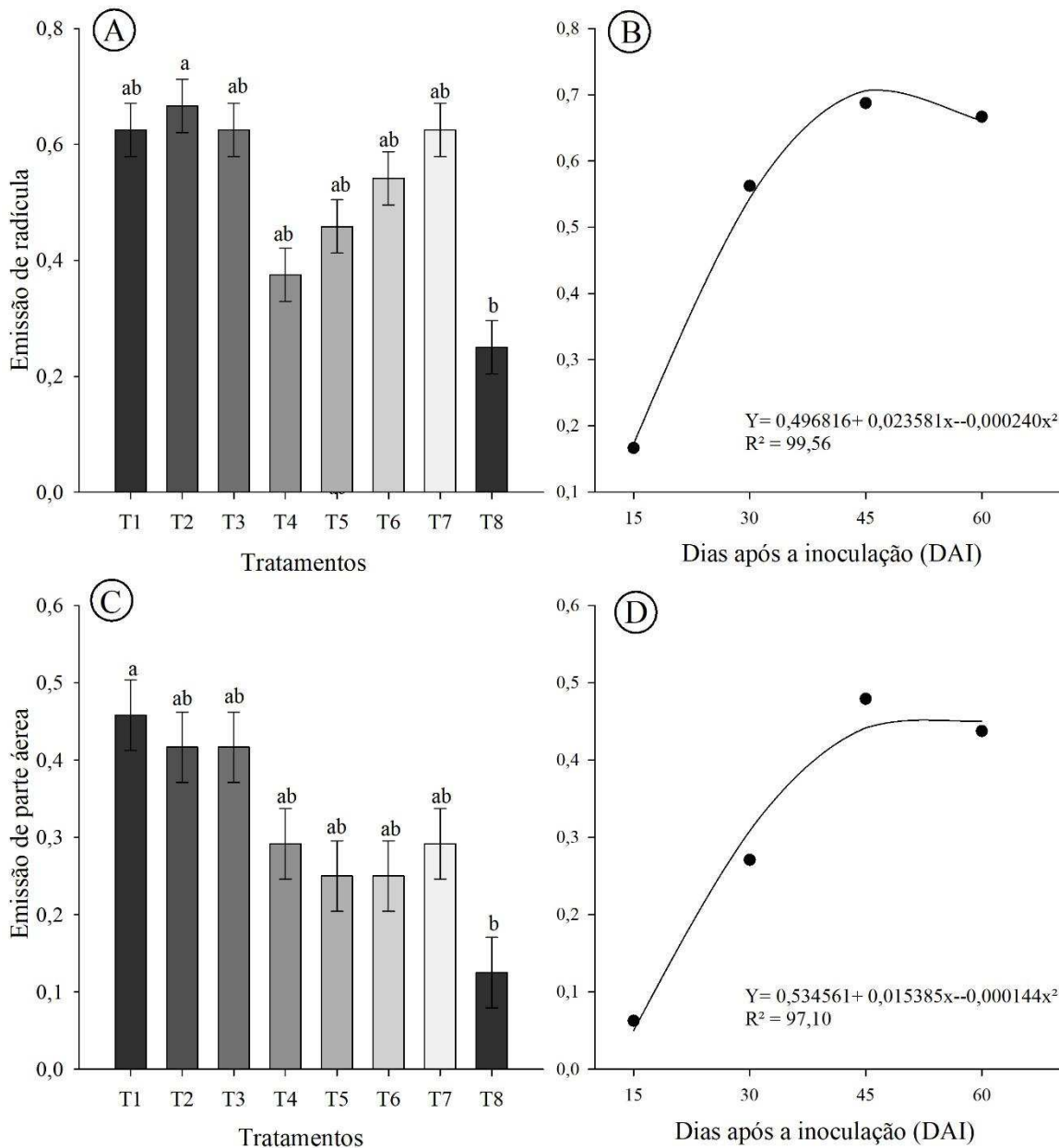


Figura 3. Emissão de radícula (Er) (A, B) e emissão de parte aérea (Epa) (C, D), aos 60 DAI e ao longo da permanência das sementes de *Platonia insignis* nos diferentes dias após a inoculação (15, 30, 45 e 60 DAI). *Médias indicadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey. Barras e linhas de limite representam a média e o valores de erro padrão, respectivamente.

Para a variável Er, T2 (MS0 - sem reguladores de crescimento) foi superior apenas quando comparado ao T8 (MS + $3\mu\text{M}$ de GA_3), com valores de 0,62% e 0,25%, respectivamente (Fig. 3A). Para emissão de parte aérea (Epa), sementes mantidas em T1 (água + água destilada)

demonstraram superioridade apenas quando comparado ao T8 (MS + 3 μ M de GA₃), 0,41% e 0,12%, respectivamente (Fig. 3C). Para a mesma variável, a equação que melhor se ajustou foi a quadrática (R^2 - 99,66% e 97,10%, respectivamente) com crescimento exponencial até os 45 DAI (Fig. 3D). No entanto, foi observado declínio na emissão de radícula (Er) (Fig. 3B), e uma constância na emissão de parte aérea (Epa) (Fig. 3D), o que demonstra redução da germinação *in vitro* dos frutos de bacuri.

Para a variável Cpa, as sementes mantidas em T2 (MS0 - sem reguladores de crescimento), apresentou valores maiores, porém somente se diferiu do T8 (MS + 3 μ M de GA₃). Para Cra, os embriões germinados em meio T2 (MS0 - sem reguladores de crescimento) obteve maior incremento quando comparado àqueles mantidos sob T4 (MS + 2 μ M de BAP) e T8 (MS + 3 μ M de GA₃) (Fig. 4A).

Ao longo da condução do experimento, também foram observadas algumas alterações no aspecto morfológico das sementes, como por exemplo, houve formação de massa esponjosa em todos os tratamentos testados (Fig. 5A-H). As sementes também apresentaram a formação de partes áreas amorfas (Fig. 4C), porém, após a excisão desta porção, houve a quebra da dominância apical e houve o desenvolvimento de partes áreas normais (Fig. 4D).

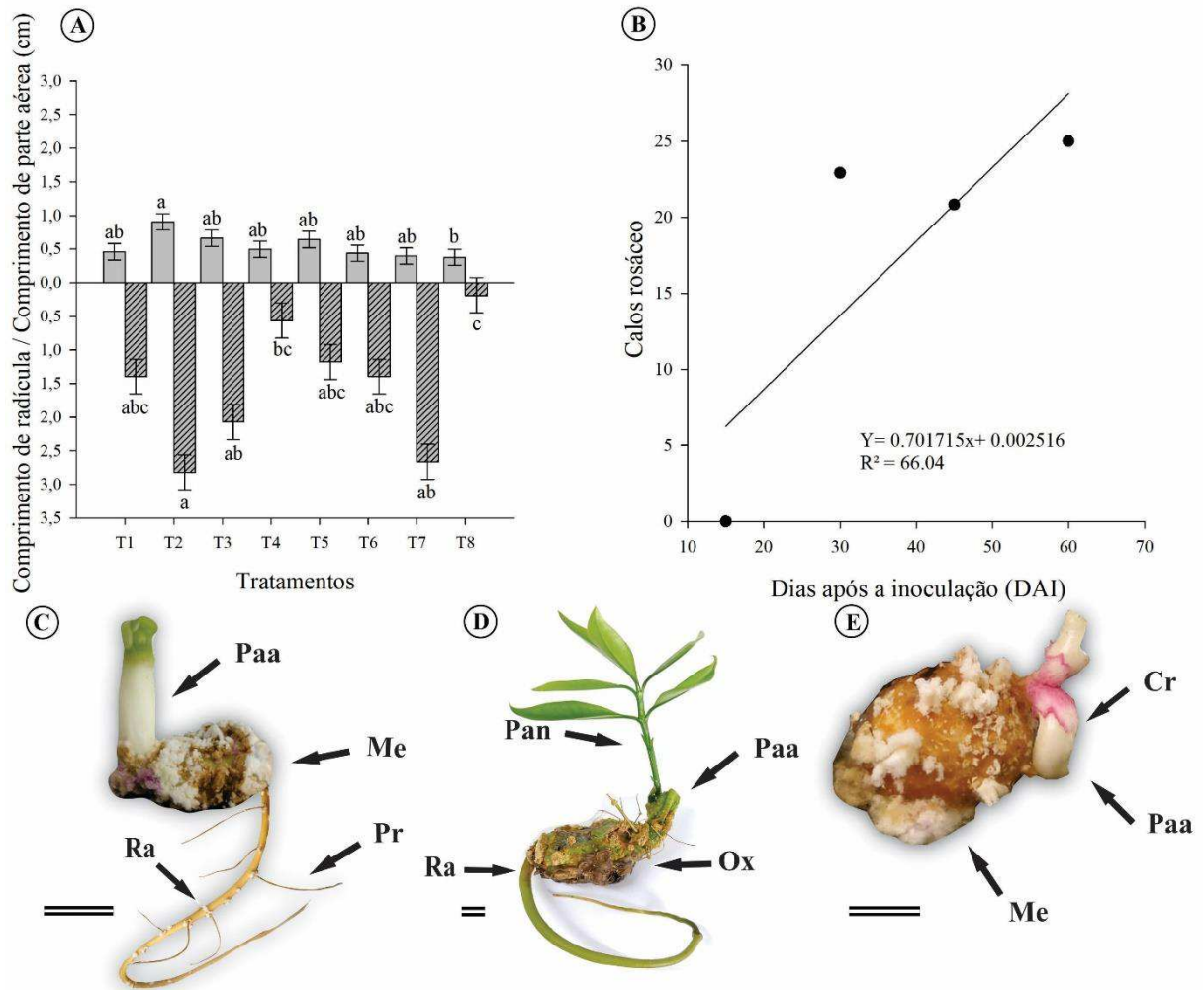


Figura 4. Comprimento da parte aérea (Cpa) e da radícula (Cra) de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) aos 60 DAI mantidos em diferentes tratamentos (T1 - ágar + água destilada; T2 - MS0 - sem reguladores de crescimento; T3 - MS + 1 μ M de BAP; T4 - MS + 2 μ M de BAP; T5 - MS + 3 μ M de BAP; T6 - MS + 1 μ M de GA₃; T7 - MS + 2 μ M de GA₃; T8 - MS + 3 μ M de GA₃) (A). Presença de calos rosáceo nos explantes de *Platonia insignis* dos 15 aos 60 DAI (B). Explante com a formação de parte aérea amorfa e radícula (C). Explante com a formação de parte aérea normal e radícula (D). Explante com calos rosáceos (E). Abreviaturas: Paa - parte aérea amorfa; Pan - Parte aérea normal; Ra - radícula; Pr - pelos radiculares; Me - Massa esponjosa; Cr - Calos rosáceos; Ox - Oxidação. Barras: 1cm (C-E) *Tratamentos indicados pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras e linhas de limite representam a média e o valores de erro padrão, respectivamente.

No tratamento T7 (2 μ M de GA₃) foi observado a emissão de radícula com o desenvolvimento de pelos radiculares (Fig. 4C e Fig. 5G). Ainda, durante o experimento foi observada, na base da parte aérea das plântulas, uma coloração rosácea nos explantes (Fig. 4E), semelhante a um composto de defesa. De acordo com a análise de regressão, a presença Cb que melhor se ajustou em uma função linear (R^2 - 66,04) com um crescimento exponencial até os 60 DAI (Fig. 4B). No momento da inoculação, apresentava uma coloração branca com tons

amarelados (Fig. 1B) porém, ao longo do experimento, também foi observado o aumento da Ox (Fig. 2D).

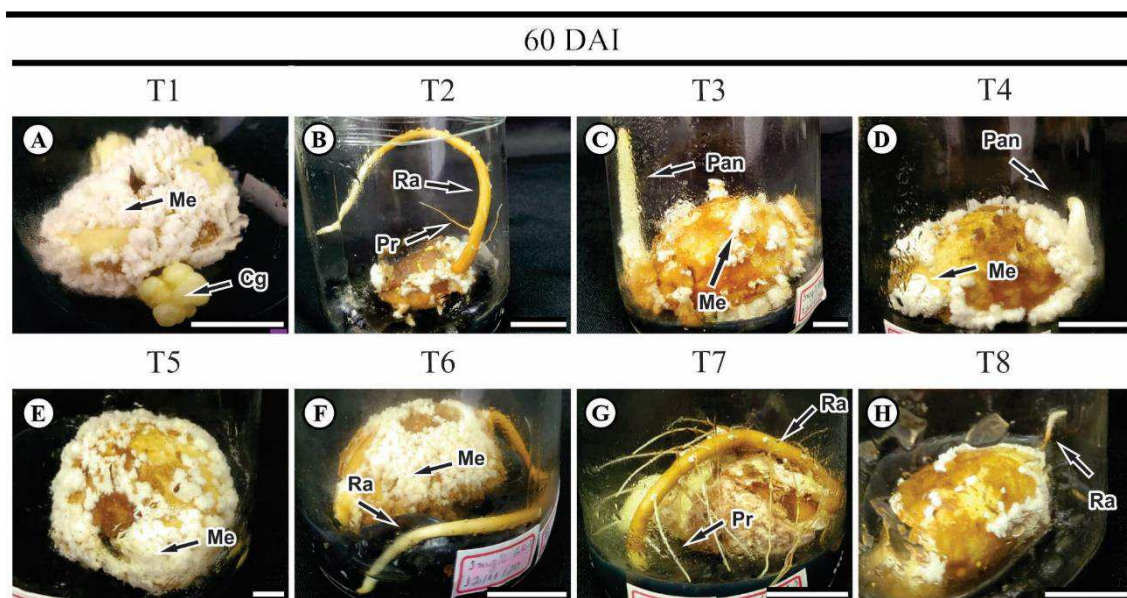


Figura 5. Explantes de *Platanon insignis* aos 60 DAI *in vitro* nos diferentes tratamentos. T1- ágar + água destilada (A); T2 - MS0 - sem regulador de crescimento (B); T3 - MS + 1 μM de BAP (C); T4 - MS + 2 μM de BAP (D); T5 - MS + 3 μM de BAP (E); T6 - MS + 1 μM de GA₃ (F); T7 - MS + 2 μM de GA₃ (G) e T8 - MS + 3 μM de GA₃ (H). Abreviaturas: Me - Massa esponjosa; Ra - radícula; Cg - Calo globular; Ra - Radícula; Pr - pelos radiculares; Pan - Parte área normal. Barras: 1 cm.

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da germinação *in vitro* de *P. insignis*, com destaque ao estabelecimento *in vitro* desta cultura, sendo esta etapa considerada de maior dificuldade dentro da cultura de tecidos, para que este protocolo atenda a obtenção de explantes sem contaminação, e que não resulte na morte do tecido vegetal (GRATTAPAGLIA et al., 1998; PINHAL et al., 2011).

Em condições de campo, as sementes de bacurizeiro são recalcitrantes, e apresentam processo germinativo característico, com emergência rápida da radícula, e parte aérea lenta e desuniforme. No campo, a emissão da raiz primária ocorre entre 15 a 35 dias após a semeadura, e a emissão da parte aérea ocorre por volta dos 180 dias, e estabiliza-se por volta de 900 dias (CARVALHO et al., 2018). No presente trabalho, foi possível observar que a germinação *in vitro* para as sementes inoculadas nos diferentes meios de cultura, também iniciou com a emissão de radícula (Er) em poucos dias após a inoculação, e independente do tratamento

utilizado. Todavia a Emissão de parte área (Epa) ocorreu aproximadamente três a cinco dias após a Er (Fig. 3D), o que demonstra que a cultura de tecidos pode ser uma excelente ferramenta para obtenção de plantas de bacuri de maneira rápida e eficiente.

A germinação *in vitro* do bacurizeiro demonstrou ser um processo viável e de baixo custo, pois as sementes inoculadas nos tratamentos T1 (ágar + água destilada) e T2 (MS0 - sem regulador de crescimento), apresentaram respostas semelhantes aos tratamentos com adição de reguladores de crescimento, BAP ou GA₃, portanto, a utilização de meios de cultura básicos atende as necessidades das sementes dessa espécie. Diferentemente de outras espécies lenhosas e frutíferas, que necessitam de reguladores de crescimento para favorecer, como no caso das sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), onde obteve melhores resultados com o uso do meio WPM suplementado com 72,18-92,39 µM de GA₃ ou meio MS com 75,06-86,61 µM de GA₃ e 10,74µM de ANA promoveu enraizamento e crescimento das plantas (RIBEIRO et al. 2009).

Durante o experimento, foi observado que sementes inoculadas no tratamento T8 (MS+ 3µM de GA₃), apresentaram valores inferiores de Ca, Er, Epa, Cra e Cpa. Rau et al. (2021) demonstraram resultados semelhantes com a espécie *Psidium cattleianum*, através da aplicação de 144,35 µM de GA₃ que reduziu significativamente a porcentagem, tempo médio e o IVG, indicando a existência de alteração hormonal que estaria impedindo, ou atrasando a germinação nesta fruteira ou ainda, a indicação de uma dormência fisiológica nas sementes.

O efeito das aplicações exógenas de GA₃ na germinação de sementes é dependente de outros fatores, como a concentração endógena de ácido abscísico (ABA) e outros compostos inibidores presentes na semente (GILROY, et al.1994). É provável que a sementes de bacurizeiro possui elevada concentração de ABA e isso cause uma relação antagônica existente entre o ABA e o GA₃ em que pode determinar a dormência e a germinação de sementes. Durante os primeiros estágios do desenvolvimento da semente, a sensibilidade ao ABA é alta quanto a sensibilidade ao GA₃ é baixa, o que favorece a dormência sobre a germinação, porém mais tarde no desenvolvimento da semente, a sensibilidade ao ABA declina e a sensibilidade ao GA₃ aumenta, favorecendo a germinação. Ao mesmo tempo, a semente torna-se progressivamente mais sensível aos estímulos ambientais, como temperatura e luz, que podem tanto estimular quanto inibir a germinação (Taiz et al. 2017), sendo que no caso do presente trabalho, acreditasse que houve a sua inibição.

Esta alta concentração de auxinas endógena que pode estar presente nas sementes, possibilita responder motivo da indução da calogênese, pois houve a formação de calos de

aspectos esponjoso e globulares (Fig. 5A), mesmo em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento sintéticos. A formação de calos esponjosos e globulares no bacurizeiro *in vitro* foi encontrado aos 45 e 60 DAI, o mesmo foi observado em outras espécies, como cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*) (GOLLE et al. 2020), seringueira (*Hevea* spp.) (SILVA et al. 2021) e segurelha (*Satureja hortensis* L.) (NAVROSKI et al. 2012).

A oxidação das plântulas mantidas no tratamento T6 (MS + 1 μ M de GA₃) foi maior, quando comparada às mantidas nos tratamentos T3 (MS + 1 μ M de BAP) e T4 (MS + 2 μ M de BAP). O escurecimento de explantes é uma dificuldade no estabelecimento de culturas *in vitro* em algumas espécies lenhosas, como consequência de oxidações, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta aos ferimentos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura e pela oxidação de polifenóis e quininas (PIOUS et al., 1997). Contudo, no presente experimento, a presença de oxidação fenólica não inviabilizou o estabelecimento nem a germinação dos explantes. Sousa et al. (2007) avaliando sementes de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*, em meio de cultivo com e sem carvão ativado, observaram maior percentual de germinação em sementes inoculadas com 0,1% de carvão ativado, o que inibiu o surgimento de necrose, indicando que o uso de carvão ativado no presente experimento também contribuiu para a redução da oxidação.

As sementes também apresentaram diferenças morfológicas entre a resposta dos explantes, como a formação de calos esponjosos e globulares, partes áreas amorfas e uma coloração rosácea. Todavia, Nabors et al. (1983), explicam que calos aquosos, formados por tecido esponjoso e sem consistência, não apresentam capacidade de regenerar plantas ou mesmo desenvolvimento para uma das rotas morfogênicas (embriogênese somática ou organogênese indireta).

Houve formação de partes áreas amorfas em alguns explantes, o que também foi observado na germinação *in vitro* de *Byrsonima intermedia*, onde folhas cotiledonares, ao entrarem em contato com o meio de cultura, foram estimuladas a multiplicação de células, de forma que o desenvolvimento normal da plântula foi comprometido (Nogueira et al., 2014). No caso das sementes do bacurizeiro acreditasse que pode ocorrido um balanço hormonal entre altas concentrações de auxinas endógenas e a citocinina adicionada ao meio de cultura, esta composição pode ter favorecido a divisão celular, induzindo uma proliferação desorganizada das células vegetais, assim favorecendo a formação de calos (Ca) ao invés de múltiplas brotações, que era o resultado esperado.

Os calos de coloração rosácea foram observados a partir dos 15 DAI (Fig. 4B). Resultados como este pode ser considerado como fontes de compostos bioativos e podem agir de diferentes formas, tanto no que se refere aos alvos fisiológicos, como aos seus mecanismos de ação (BASTOS et al. 2019). Dentre estas substâncias bioativas já conhecidas, destaca-se as antocianinas por corante natural responsável pelos tons que compreendem desde a coloração vermelha até a púrpura e azul, parecido com que foi encontrado no experimento, esta substância pertencente ao grupo dos flavonoides está presente em células de muitas frutas, hortaliças, folhas e flores, (SAMPAIO, 2015).

Em conclusão, os resultados deste trabalho são promissores para o processo de domesticação de *Platonia insignis*. A utilização de meios de cultura básicos, como ágar + água destilada e meio MS sem adição de regulador de crescimento pode ser utilizado para a germinação do bacurizeiro *in vitro*, com redução do tempo de germinação de 500 a 700 dias, que se observa em campo, para cerca de 60 dias, obtendo-se um bom número de plantas homogêneas, possibilitando a prospecção de outras técnicas biotecnológicas, como a micropropagação, transformação genética, conservação em bancos de germoplasma e etc. Assim, o uso destas técnicas são cruciais para compreender as respostas genéticas e morfo fisiológicas de *Platonia insignis*, pois apesar do potencial em termos econômicos, ainda são poucas as abordagens biotecnológicas para esta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard, P. e Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how gas shutdown DELLA proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p.1085-1092.
- Bastos D. H. M.; Rogero M. M.; Arêas J. A. G. (2009) Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.**, v.53, n. 5, p. 646-656.
- Carvalho J.E.U. (2007) Aspectos botânicos, origem e distribuição geográfica do bacurizeiro. In: LIMA, M.C. (Org.). **Bacuri: agrobiodiversidade**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, p.17-27.
- Carvalho, J. E. U. de. E.; Nascimento, W. M. O. do. (2018) BACURI (*Platonia insignis*). **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)**, Edición. p. 30.
- Clement, C.R. e Venturieri, G.A. Bacuri e cupuaçu. In: NAGY, S.; SHAW, P.E.; WARDOWSKI, W.G., (1990) eds. **Fruits of tropical and subtropical origin**. Composition, properties and uses. Lake Alfred: Florida Department of Citrus. p.178-192.
- Correia D. et al. (2011). **Germinação de sementes de cactáceas in vitro**. Comunicado técnico 181, Fortaleza: Embrapa.
- Davière, J.M. e Achard, P. 2013. Gibberellin signaling in plants. **Development**, v.140, p.1147-1151.
- Ferreira D. F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042.
- Freire, C.G.; Gardin, J. Baratto, C.; Vieira, R. (2017). Different Methods for Overcoming Integumental Dormancy during *in vitro* Germination of Red Araza Seeds. **Journal of Agricultural Science**; v. 9, n. 1, p. 174 -183.
- George, E.F.; Sherrington, N.P.D. (1984). **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics Limited, p.593.
- Gilroy, S. Jones, R. L. (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. **Plant Physiology**, v.104, n. 4, p. 1185–1192.
- Golle, D. P. (2020). Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 40, p.1-9. Doi: 10.4336/2020.pfb.40e201901908.
- Homma, A. K. O. et al. (2018) Manejo e plantio de bacurizeiros (*Platonia insignis* Mart.): a experiência no manejo e domesticação de um recurso da biodiversidade amazônica. **Revista Inclusão social**, Brasília - DF, v.12 n.1, p.48-57.
- Homma, A. K. O; Carvalo, J. E. U; Menezes, A. J. E. A. (2014). **Extrativismo Vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação**. Embrapa Brasília, DF.

Maguire, J. D. (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p. 176-177.

Marcos Filho, J. (2005) **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq.

Medeiros, D. (2001) **Efeitos da palha de cana de açúcar (*Saccharum spp.*) sobre o manejo de plantas daninhas e dinâmica do banco de sementes**. Piracicaba Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. Dissertação de Mestrado.

Menezes AJE, Homma AKO, Schöffel ER. (2012) **Do extrativismo à domesticação: caso do bacurizeiro no nordeste paraense e na Ilha de Marajó**. *Documentos* – 379. Embrapa. p. 66.

Müller, C.H. et al. (1994) Native fruit species of economic potential from the brazilian Amazon. **Angewandte Botanik**, v. 68, p. 47-52.

Murashige T. Skoog F. (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497.

Nabors, M.W. et al. (1983) Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. **Plant**, Berlin, v. 157, n. 3, p. 385- 391.

Noletto, L.G.; Silveira, C.E.S. (2004) Micropropagação de copaíba. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/copaiba.pdf>.

Pádua, M. S. (2012) **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas proembriogênicas de Dendezeiro (*Elais guineenses*)**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Vegetal. Lavras, p. 20.

Pontes, L.C.G. et al. (2017) Molecular characterization of progenies of bacurizeiro (*Platonia insignis*) from Marajó Island, northeastern Amazon. **Acta Amazonica**. v. 47, p. 293-300.

Rau, T. G. et al. (2021). Benzylaminopurine and gibereline in the germinate process of yellow araça. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5. Doi: 10.33448/rsd-v10i5.15124.

Ribeiro, M.N.O. (2009) et al. *In vitro* seed germination and seedling development of *Annona crassiflora*. **Scientia Agricola**, v.66, p.410-413. Doi: 10.1590/ S0103-90162009000300017.

Santos, E. M. et al. (2017) Genetic and population diversity of bacuri (*Platonia insignis* Mart.) in Chapada Limpa extractive reserve, Maranhão State, Brazil. **African Journal of Biotechnology**. v.16 n. 50, p. 2317-2325.

Santos, R.F. et al. (2019) Biometric and Chemical Characterization of Fruits From Selections of *Platonia insignis* Mart., Native of the State of Maranhão, Brazil. **Journal Agriculture Science**. v.11, p.376-384.

Saraiva, R.V.C.; Albuquerque, P.M.C. De Girnos, E.C. (2013). Floral and vegetative morphometrics of three *Platonia insignis* Mart. (*Clusiaceae*) populations, a native tree from the Brazilian Amazon. **Plant Biosystems**, v.148, p.1-9.

Silva, A. C. L. da. M. et al. (2021). Induction of calogenesis in leaf segment of rubber (*hevea* spp.) in the South-Western Amazon. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9. Doi: 10.33448/rsd-v10i9.17639.

Soares F. P. P. et al. (2009) Effect of culture media, GA₃ concentrations and pH on *in vitro* germination of *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1847 -1852.

Sousa, G. C. et al. (2007) Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. n. 1, p. 405-407.

Taiz, L. et al. (2017). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Artmed editora, Porto Alegre, p.888.

Thomas, P. e Ravindra, M. B. (1997) Effect of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* root regeneration and growth in micropropagated grapes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 177–180.

Xavier A.; Wendling I.; Silva R.L. (2009). **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 3º ed., p. 272.

CAPITULO III

Diferentes fontes de explante na organogênese *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.): uma espécie nativa da Amazonia Oriental

Diferentes fontes de explante na organogênese do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.): uma espécie nativa da Amazonia Oriental

Karina da Silva Vieira^{1*}, Tacila Rayene dos Santos Marinho¹, Irislene Silva Albuquerque¹, Givago Lopes Alves¹, Marcos Vinícius Marques Pinheiro², Fábio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo², Fabrício de Oliveira Reis¹, Tiago Massi Ferraz^{1,2}, Thais Roseli Corrêa^{1,2}.

Filiação:

¹Graduate Program in Agroecology State University of Maranhão, 65055-310 São Luís - MA, Brazil. E-mail address: karinavieira@aluno.uema.br; ORCID KVS: 0000-0002-4697-835X; thaiscorrea@professor.uema.br; ORCID TRC: 0000-0003-3131-4996; tacilarayene@hormail.com; ORCID TRSM: 0000-0002-3838-1393; albuquerqueiris0@gmail.com; ORCID ISA:0000-0002-0276-0535; engivago@hotmail.com; ORCID GLA: 0000-0002-6455-6062; fareoli@gmail.com; ORCID FOR: 0000-0002-1781-3695; E-mail: ferraztm@gmail.com; ORCID TMF: 0000-0002-9840-3523.

²Graduate Program in Agriculture and Environment, State University of Maranhão, 65055-310 São Luís, ma, Brazil.

E-mail address: macvini@gmail.com; ORCID MVMP: 0000-0002-5028-7818; figueiredo.uema@gmail; ORCID FAMMAF: 0000-0002-6904-9828.0.

RESUMO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma fruteira arbórea da Amazônia oriental brasileira com elevado valor socioeconômico, contudo, ainda é uma espécie não-domesticada e que apresenta diversos gargalos em sua propagação. Portanto, estudos biotecnológicos como técnicas de micropropagação são fundamentais para os avanços na propagação e o melhoramento genético da espécie. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi definir o explante e o meio de cultivo ideal para a indução da organogênese *in vitro* de *Platonia insignis*. Foram executados três experimentos com explantes obtidos a partir da germinação *in vitro*, sendo estes: “parte aérea normal”; “parte aérea anormal” e “calos de parte aérea anormal”. O meio basal utilizado foi o MS, com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. No primeiro experimento as concentrações foram: 2,5 µM de BAP + 1,5 µM de ANA; 6,25 µM de BAP + 1,5 µM de ANA; 15,62 µM de BAP + 1,5 µM de ANA e 39 µM de BAP + 1,5 µM de ANA. Nos demais experimentos, foram utilizadas as concentrações: 78,12 µM, 156 µM e 234 µM de BAP. Foram avaliadas: Porcentagem de oxidação, porcentagem de contaminação, porcentagem de indução de calo, formação de calo, formação de radícula e calos rosáceos. Com a utilização de “explantes de parte áreas anormais” foi observada 100% de indução de calo nos meios com 39 µM de BAP + 1,5 µM de ANA. Os “Calos de parte área anormal” utilizados como explante, em meios com 78,12 µM de BAP apresentaram uma menor porcentagem de contaminação, e houve formação de brotos tanto nessa condição de cultivo, quanto em meios com 156 µM de BAP, indicando a presença de organogênese indireta. Os “explantes de parte área normal” em meios com 234 µM de BAP proporcionaram maior formação de folhas, tais explantes, após o corte de seu meristema apical, tiveram uma diminuição de folhas, em consequência da quebra de sua dominância apical, posteriormente apresentaram um estímulo de novas gemas laterais. Os resultados demonstraram que houve a organogênese indireta em bacurizeiro, a técnica pode ser induzida por explantes de calos de parte área anormal nos meios MS + 156 µM de BAP se tornando assim condições indicadas para a indução dessa rota morfogênica, que poderá proporcionar uma multiplicação rápida e formação de novas plantas. Estes resultados

possibilitarão estudos futuros sobre a compressão as respostas genéticas e morfofisiológicas em bacurizeiro.

Palavras chaves: Fruteiras Amazônica; Propagação *in vitro*; Rota morfogênica; Reguladores de Crescimento; Citocinina.

1. INTRODUÇÃO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma fruteira arbórea, nativa da Amazônia oriental brasileira (SOUZA et al., 2013), que apresenta elevado valor socioeconômico (PONTES et al., 2017). Na região nordeste o Maranhão é um dos centros de dispersão da fruta, mas também é encontrada no Pará, Mato Grosso, Piauí e Goiás. Segundo o censo agropecuário de 2017 do IBGE (2016/2017), a produção brasileira de bacuri concentra-se nas regiões Norte (86,0%) e Nordeste (13,5%), com o Pará e o Maranhão como os maiores produtores do fruto. Porém sua produção é advinda do extravismo vegetal, sendo considerada uma espécie não domesticada, que corre risco de erosão genética devido à pressão do uso da terra pela agricultura e a falta de técnicas adequadas para sua propagação.

O mecanismo reprodutivo, como quase todos os aspectos do bacurizeiro, é pouco conhecido, havendo poucos registros na literatura, alguns deles é descrito por Maués e Venturieri (1996), onde verificaram que a espécie é alógama, apresenta auto-incompatibilidade esporofítica, tem polinização efetuada por pássaros (CARVALHO et al. 2016) e sua propagação via sementes apresenta lentidão e desuniformidade da germinação (CARVALHO et al., 1998).

A micropropagação é um método viável para propagação de espécies de difícil multiplicação. Tal técnica proporciona a multiplicação em massa de plantas geneticamente uniformes e proporciona aos indivíduos alta condições fitossanitárias (Erig e Schuch 2005), garantindo a disponibilidade de material vegetal para métodos de reprodução. Entre as vias morfogênicas *in vitro*, a organogênese permite a regeneração de células e tecidos a partir de um explante, oriundo de um tecido vegetal, proporcionando a formação de uma nova plântula (ANDRADE, 2005), é um processo complexo que requer hormônios vegetais, como auxinas e citocininas, têm sido amplamente utilizados (Duclercq et al. 2011; Motte et ai. 2014; Rocha et ai. 2018).

O processo de organogênese *in vitro* pode ser de via direta ou indireta. No caso da organogênese direta é caracterizado por gemas ou primórdios de gemas pré-existentes que são induzidos à proliferação sem ocorrer a desdiferenciação dos tecidos dos explantes, o modelo indireto ocorre a indução de tecidos desdiferenciados (calos), a partir dessas células desorganizadas pode ocorrer a formação de novos órgãos vegetais (GUERRA, 2016). Desta maneira, a presente trabalho buscou o estabelecimento de um protocolo de organogênese *in vitro* de *Platonia insignis*, a partir de diferentes fontes de explantes coletados de plantas germinadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2 Material de cultivo

Frutos imaturos de bacurizeiro (*Platonia insignis*) foram coletados de diferentes matrizes localizadas no povoado de Santa Luzia, município de Bacabeira, estado do Maranhão, Brasil (coordenadas geográficas 2° 58' 14" Sul e 44° 18' 32" Oeste) e germinados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), estabelecidos em sala de crescimento a 24±2 °C, inicialmente no escuro até a emissão da parte aérea, em seguida em luz a 5 μmol m⁻² s⁻¹ até os 60DAI Para a realização dos experimentos, plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), Campus Paulo VI, São Luís – MA.

2.3 Experimento I – Diferentes tipos de explantes na indução de organogêneses no bacurizeiro

Foram utilizados como explantes parte aérea de bacurizeiro previamente estabelecido *in vitro* (Fig.7 Pan e Paa), inoculadas em placas de Petri descartáveis de 90 x 15 mm (ProLab Ltda) contendo meios de cultivo basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (PhytoTech Lab[®] Kansas - USA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar[®] Ltda, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, Missouri - USA), 2,0 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, Missouri - USA) e 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, Missouri - USA), suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, sendo: 2,5 μM de BAP +1,5 μM de ANA; 6,25 μM de BAP + 1.5 μM de ANA; 15,62 μM de BAP + 1,5 μM de NA e 39 μM de BAP +1,5 μM de ANA.

O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de autoclavagem a 121°C e 108 kPa durante 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro por 90 dias, a 24 ± 2°C de temperatura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, onde cada parte aérea consistiu em uma unidade experimental. Foram avaliadas as seguintes variáveis: Porcentagem de indução de calo (Ica), formação de radícula (Ra) e Calos rosáceos (Cr), foram analisadas com base em sua presença e ausência.

Para porcentagem de oxidação (Ox), foram atribuídos os seguintes valores: 0 - para explantes não oxidados; 25% - para explantes com até ¼ de oxidação; 50% - para explantes

com até ½ de oxidação; 75% - para até ¾ de oxidação e 100% - para explantes totalmente oxidados.

2.4 Experimento II – Calos na indução da organogênese indireta em bacurizeiro

Calos provenientes do Experimento I foram inoculados em placas de Petri descartáveis de 90 x 15 mm (ProLab Ltda) contendo meios de cultivo basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (PhytoTech Lab® Kansas - USA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar® Ltda, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA), 2,0 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA) e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri - USA), com adição de BAP nas concentrações de 78,12 µM, 156 µM e 234 µM.

O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes de autoclavagem a 121°C e 108 kPa durante 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro por volta de 7 DAI, em seguida transferidos para luz a $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 90 dias, a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e sete repetições, e a unidade experimental consistiu em uma placa contendo duas porções de calo. Foram avaliadas as seguintes variáveis: Porcentagem de contaminação (Co), porcentagem de oxidação (Ox), Porcentagem de indução de calo (Ica), formação de broto (Br) e Calos rosáceos (Cr). foram analisadas quanto a sua presença e ausência.

Para porcentagem de oxidação (Ox), foram atribuídos os seguintes valores: 0 - para explantes não oxidados; 25% - para explantes com até ¼ de oxidação; 50% - para explantes com até ½ de oxidação; 75% - para até ¾ de oxidação e 100% - para explantes totalmente oxidados.

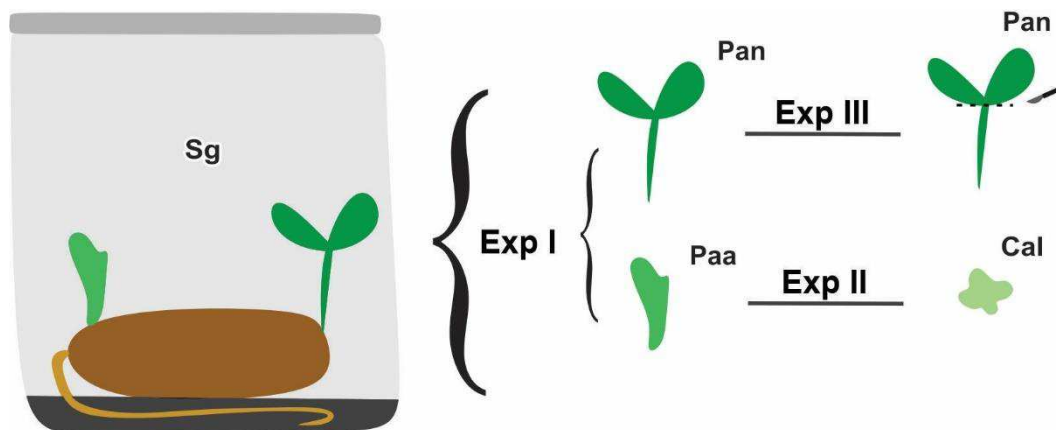


Figura 1. Experimentos realizados para a indução da organogênese *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis*). Abreviaturas: Sg – Sementes germinadas; Pan – Parte área normal; Paa – Parte área anormal; Cal – Calos.

2.5 Experimento III – Explantes de parte aérea normal na indução de organogênese em bacurizeiro

Explantes de parte aérea adotadas como normais (Fig. 1, Pan), no qual foram observadas folhas verdadeiras, foram inoculadas em tubos de ensaio de 2,5 cm x 15 cm contendo 10 mL de meio de cultivo basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (PhytoTech Lab® Kansas - USA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar® Ltda, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA), 2,0 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA) e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA), com adição de BAP nas concentrações de 78,12 µM, 156 µM e 234 µM.

O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes de autoclavagem a 121°C e 108 kPa durante 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento em luz difusa com 5 µmol m⁻² s⁻¹ por 90 dias, a 24 ± 2°C de temperatura. Aos 45 DAI foram realizados cortes dos ápices caulinares dos explantes da parte aérea para a quebra dominância apical.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e 13 repetições, onde cada tubo contendo uma parte aérea consistiu em uma unidade experimental. Foram avaliadas as seguintes variáveis: Porcentagem de contaminação (Co), formação de radícula (Ra), formação de folha (Fo), formação de calo (Ca) e Calos rosáceos (Cr), foram analisadas quanto a sua presença e ausência.

Para porcentagem de oxidação (Ox), foram atribuídos os seguintes valores: 0 - para explantes não oxidados; 25% - para explantes com até ¼ de oxidação; 50% - para explantes

com até ½ de oxidação; 75% - para até ¾ de oxidação e 100% - para explantes totalmente oxidados.

3. RESULTADOS

3.1 Explantes de parte área anormal induzem a calogênese em bacurizeiro

A partir da análise de variância, foi possível observar que houve diferença significativa entre os meios de cultivo para as variáveis porcentagem de oxidação (Ox) e porcentagem de indução de calo (Ica) ($P \leq 0,05$). Quanto as variáveis, formação de radícula (Ra) e Calos rosáceos (Cr) não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para a variável Ox, foi possível observar que o meio com 6,25 μM de BAP + 1,5 μM de ANA apresentou redução de 52% quando comparado ao meio 15,62 μM de BAP + 1,5 μM de ANA e não diferiu dos demais meios de cultivo (Fig. 2A).

Quanto a indução de calos, explantes de parte área anormal em meio suplementado com 39 μM de BAP + 1,5 μM de ANA apresentaram 100% de calos, diferindo apenas dos explantes nos 15,62 μM de BAP + 1,5 μM de ANA (Fig. 2B), que apresentaram a menor formação de calos nos explantes (Fig. 3).

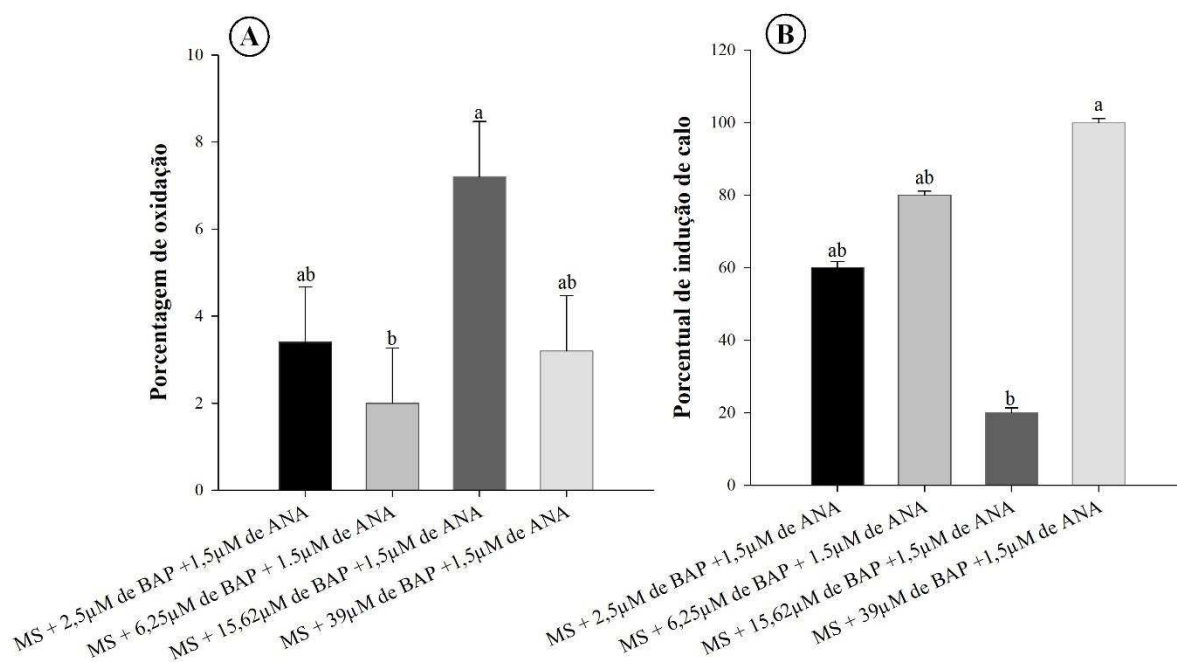


Figura 2. Porcentagem de oxidação (Ox) (A) e Porcentagem de indução de calo (Ica) (B) em explantes de parte área de *Platonia insignis*. *Médias indicadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Mesmo as variáveis formação de radícula e compostos bioativos não apresentando diferença significativa, porém é possível observar que explantes nos meios de cultivo com maior concentração de BAP (39 μM de BAP +1,5 μM de ANA) apresentou uma média de 0,6 para formação de radículas (Ra), quanto que no meio com menor concentração de BAP (2,5 μM de BAP +1,5 μM de ANA) não houve a formação de radículas. Já a presença de compostos bioativos todos os explantes apresentaram a coloração rosácea (Tab. 1).

Tabela 1. Variáveis formação de radícula (Ra) e composto bioativo (Cb) em explantes de parte área de *Platonia insignis*. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Meios de cultivo	Ra	Cb
MS + 2,5 μM de BAP +1,5 μM de ANA	0,0 a	0,8 a
MS + 6,25 μM de BAP + 1.5 μM de ANA	0,4 a	1,0 a
MS + 15,62 μM de BAP +1,5 μM de ANA	0,4 a	0,6 a
MS + 39 μM de BAP +1,5 μM de ANA	0,6 a	0,4 a

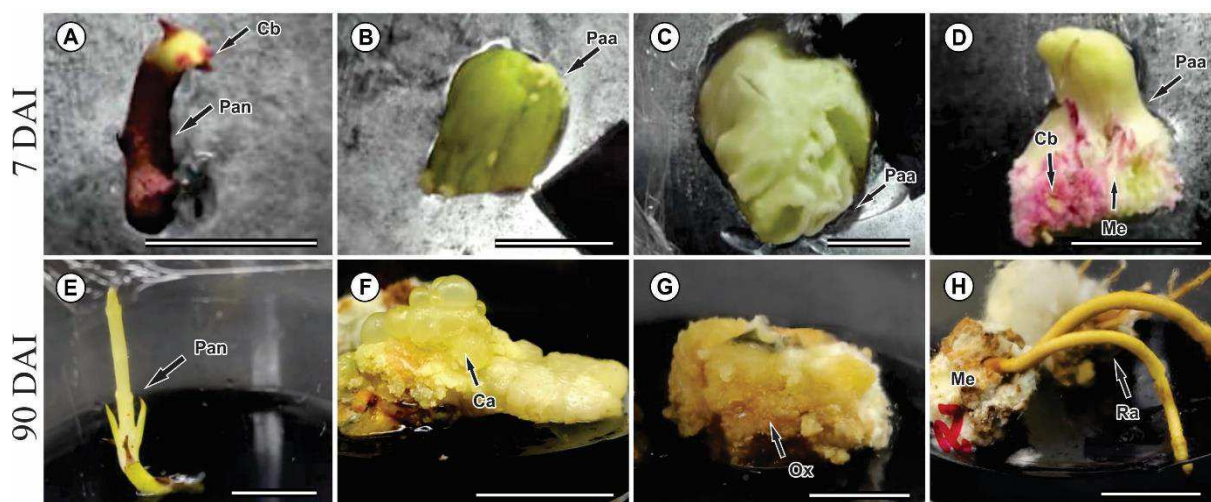


Figura 3. Explante de parte área normal de *Platonia insignis* *in vitro* inoculado em meio de cultura MS contendo 2,5 μM de BAP + 1,5 μM de ANA (A); MS+ 6,25 μM de BAP e 1,5 μM de ANA (B), MS + 15,62 μM de BAP e 1,5 μM de ANA (C), MS+ 39 μM de BAP e 1,5 μM de ANA (D) aos 7 DAI e aos 90 DAI (A-D e E-H, respectivamente). Abreviaturas: Pan - Parte área normal; Paa - Parte área anormal; Cr – Calos rosáceos; Me - Massa esponjosa; Ca - Calo; Ra - radícula; Barras:1 cm.

3.2 Calos de partes aéreas anormal induzem a organogênese indireta em bacurizeiro

De acordo com análise de variância, somente as variáveis porcentagem de contaminação (Co) e porcentagem de oxidação (Ox) apresentaram diferenças significativas entre os diferentes

meios de cultivo testado ($P \leq 0,05$). As variáveis formação de broto (Br), Calos rosáceos (Cr) não apresentaram diferença significativa quando comparado entre os meios avaliados. Para a variável Co, os meios com 78,12 μM de BAP e 156 μM de BAP apresentaram uma menor contaminação (0% e 14,28%, respectivamente) quando comparado ao meio com 234 μM de BAP em que houve a contaminação de 71,42% dos explantes

Quanto à variável Ox, os explantes mantidos no meio com 78,12 μM de BAP demonstraram uma redução de 22,86% da oxidação quando comparado ao meio com 234 μM de BAP (Fig. 4A). A equação que melhor se ajustou ao seu comportamento foi a linear ($R^2 = 91,54\%$), podendo-se observar um crescimento exponencial ao longo dos DAI (Fig. 4B).

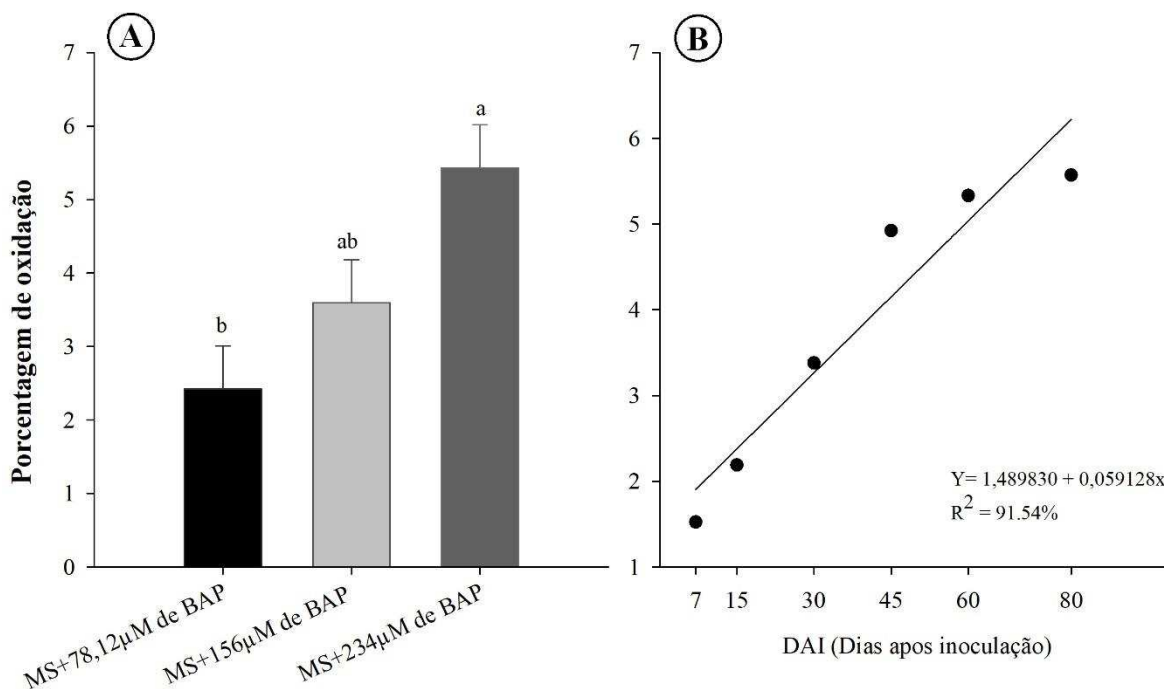


Figura 4. Porcentagem oxidação de calos de *Platonia insignis* aos 80 DAI (A) e ao longo dos DAI (7,15,30,45,60 e 80) (B). *Médias indicadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A variável formação de brotos não apresentou diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os meios utilizados, porém houve 14,28% novas brotações dos calos nos meios com 78,12 μM de BAP e 156 μM de BAP após 15 DAI (Fig. 5B-C), que demonstrou a indução da organogênese indireta nessas condições.

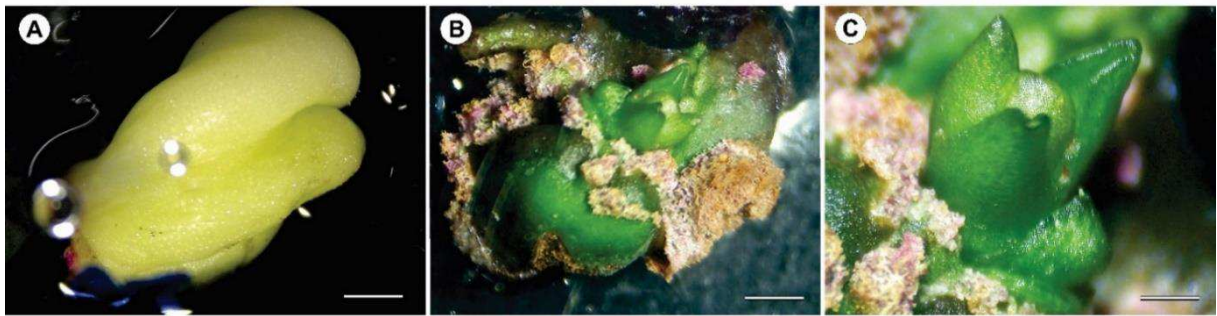


Figura 5. Organogênese indireta *in vitro* a partir de explantes de calos de bacurizeiro (*Platonia insignis*). Calo inoculado em meios suplementados com 156 µM de BAP aos 7 DAI (A) e aos 90 DAI com a formação de um meristema apical (B-C). Barras: 1 mm.

3.3 Explantes de parte área normal induzem organogênese indireta em bacurizeiro

Quando utilizados como explante parte aérea normal, foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis: porcentagem de contaminação (Co), porcentagem de oxidação (Ox), formação de radícula (Ra), formação de folha (Fo), formação de calo (Ca) e composto bioativo (Cb) ($P \leq 0,05$). Para as variáveis Ox, Ra, Fo, também houve diferenças significativas para análise de regressão (Fig. 6B, 6D e 6B), já a variável formação de gemas (Ge) apresentou diferença significativa apenas quando submetidas a análise de regressão (Fig. 10).

Quanto as variáveis Ox e Ra foi possível observar que explantes em meio suplementado com 78,12 µM de BAP, apresentou maior porcentagem de oxidação e formação de radícula (51,53% e 46,15%, respectivamente), quando comparado aos demais meios de cultivo (Fig. 6A e C). Além disso, a equação que melhor se ajustou para ambas as variáveis foi a quadrática (R^2 de 93.93% e 77.39%, respectivamente) com o crescimento exponencial até os 90 DAI (Fig. 6B e D). Quanto a variável formação de folha, os explantes mantidos no meio com 234 µM proporcionaram maiores valores (46,15%), diferindo dos demais meios (Fig. 7A). A equação que melhor se ajustou foi a equação de 5º grau (R^2 de 78.12%), sendo observado um aumento aos 30 DAI, em seguida uma redução aos 45 DAI e novamente um acréscimo aos 60 DAI (Fig. 7B).

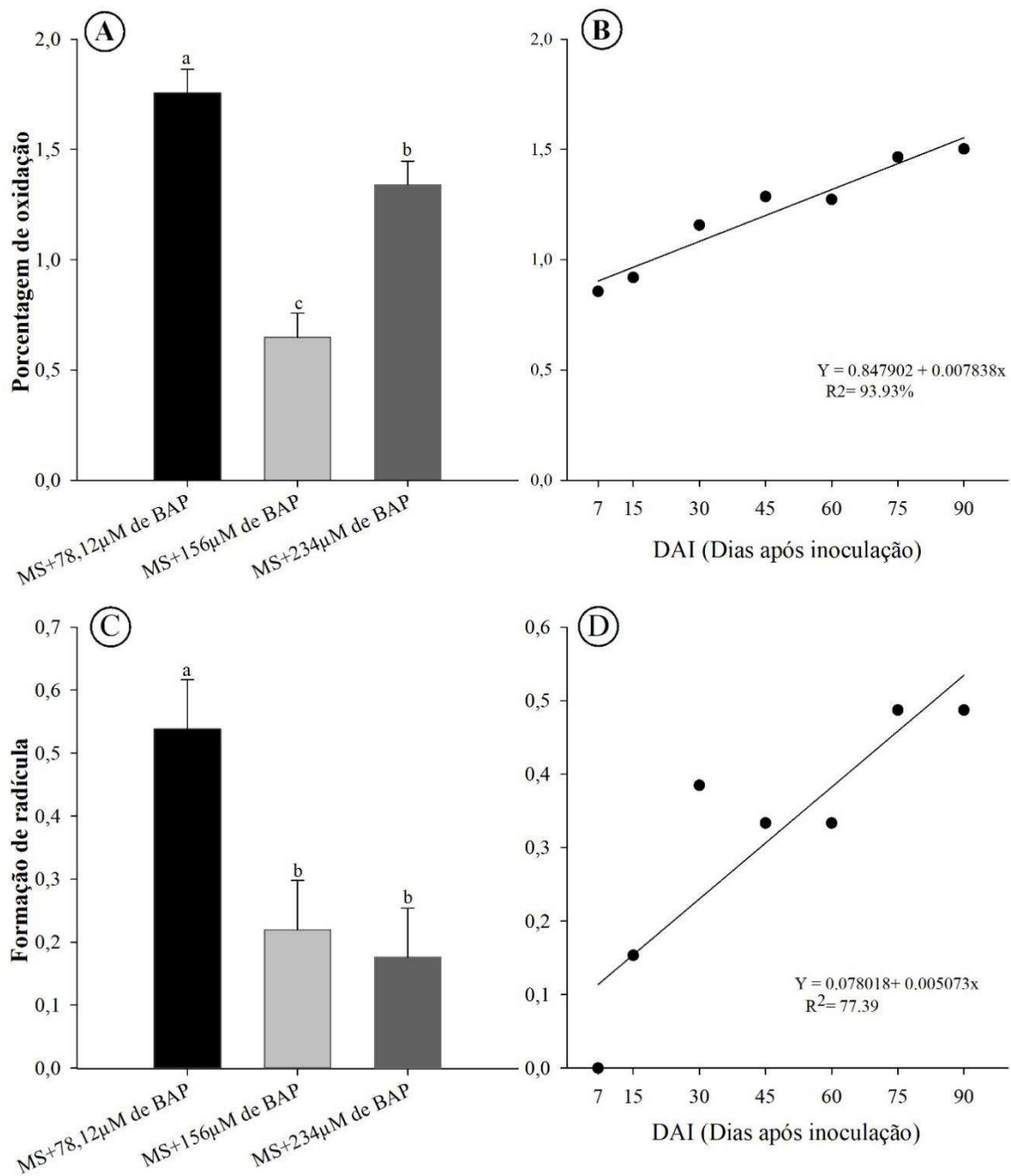


Figura 6. Porcentagem de oxidação (Ox) (A, B), Formação de radícula (Ra) (C, D) aos 90 DAI e ao longo da permanência dos explantes de *Platonia insignis* (7, 15, 30, 45, 60, 75 E 90 DAI) em meios com diferentes concentrações de BAP. *Médias indicadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

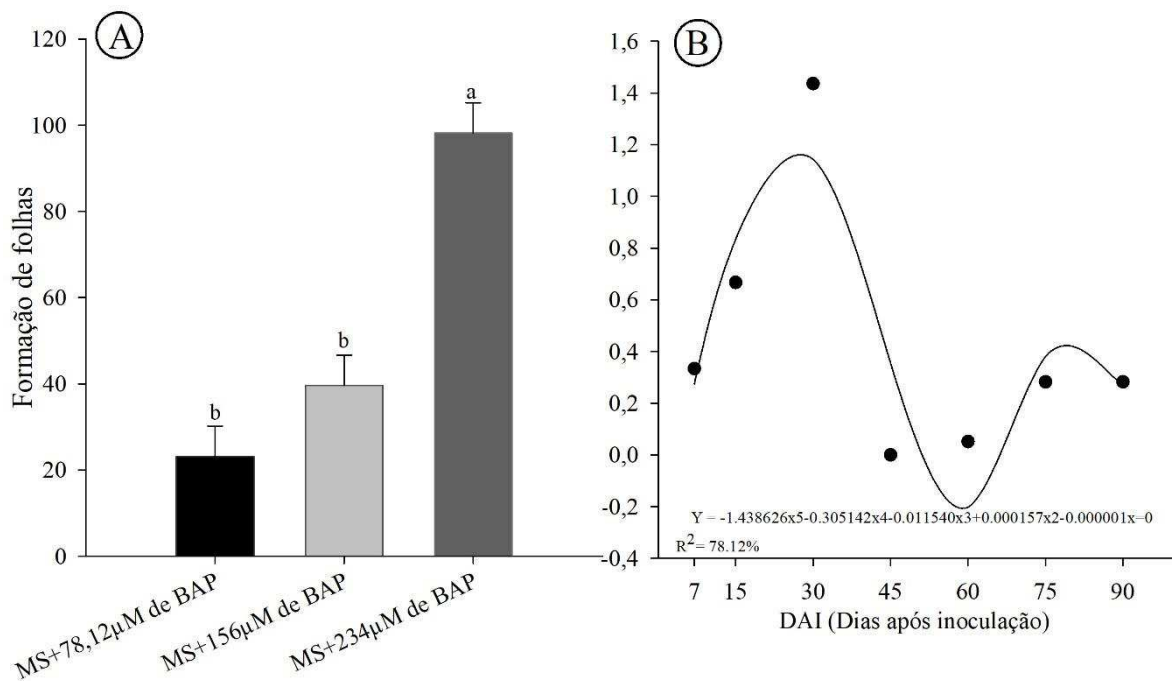


Figura 7. Formação de folhas (Fo) (A, B) aos 90 DAI e ao longo da permanência dos explantes de *Platonia insignis* (7, 15, 30, 45, 60, 75 E 90 DAI) em meios com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os meios com 78,12 μM e 234 μM de BAP apresentaram maior formação de calos (30,76% e 46,15%, respectivamente) (Fig. 8A), estes com aspecto esponjosos e amarelados (Fig. 8B). Além disso, também foi possível observar a presença de compostos bioativos a partir da coloração rosácea na base e nos ápices dos explantes (Fig. 8D), em maiores quantidades em explantes mantidos nos meios com 156 μM e 234 μM de BAP (53,84% e 69,23%) (Fig. 8C).

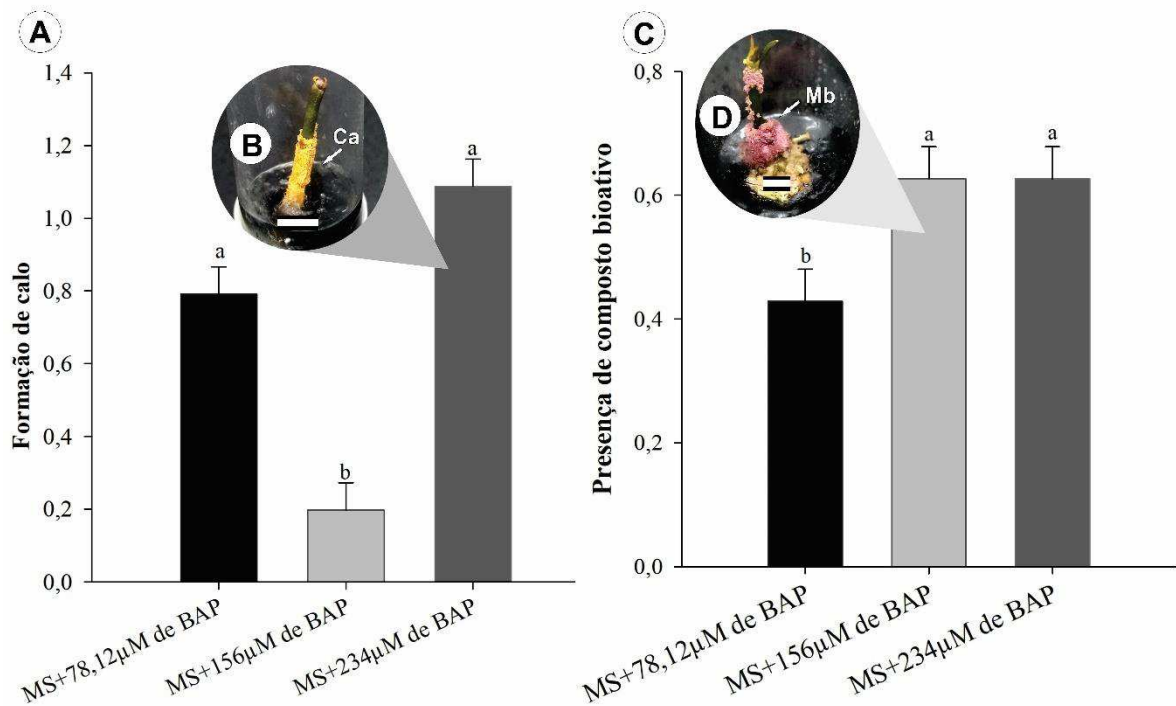


Figura. 8 Formação de calos (Ca) (A), calos esponjosos em explante de parte aérea de *Platonia insignis* aos 90 DAI (B), Calos rosáceos (Cr) (C), Calos rosáceos em explantes de parte aérea de *Platonia insignis* aos 90 DAI (D). *Médias Cbseguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras: 1cm.

Com a finalidade de quebrar a dominância apical dos explantes de parte aérea, foram realizados cortes dos ápices caulinares dos explantes aos 45DAI, sendo possível observar aumento no desenvolvimento de gemas laterais (Fig. 9). Na análise de regressão foi possível observar um aumento ao longo dos DAI ($p < 0,05$), com o pico de desenvolvimento aos 90 DAI. A equação que melhor se ajustou a esta variável foi a quadrática com o R^2 de 99,81% (Fig. 10).

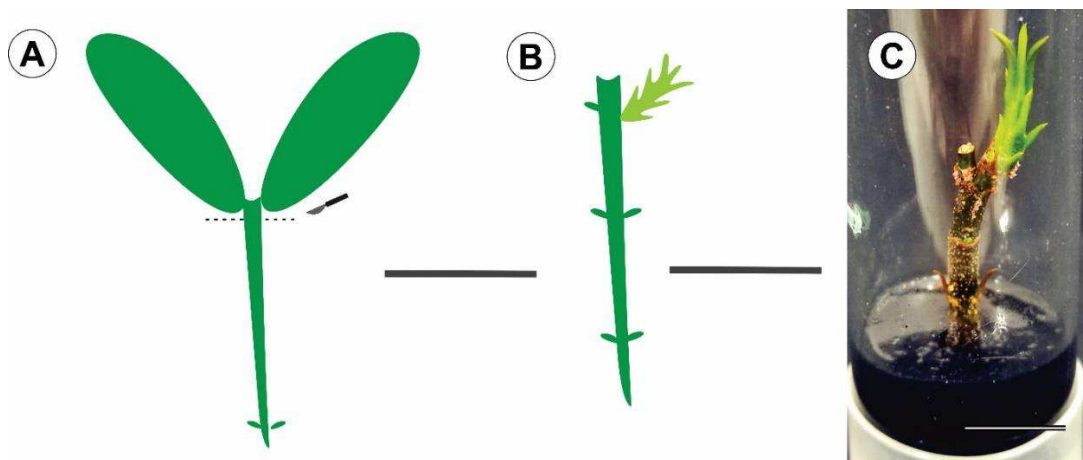


Figura 9. Explantes de parte aérea de *Platonia insignis* (A), após seccionamento do ápice caulinar (B). Explante inoculado em meio MS + 234 μM de BAP, com brotações no ápice caulinar aos 90 DAI (C) Barras: 1 cm.

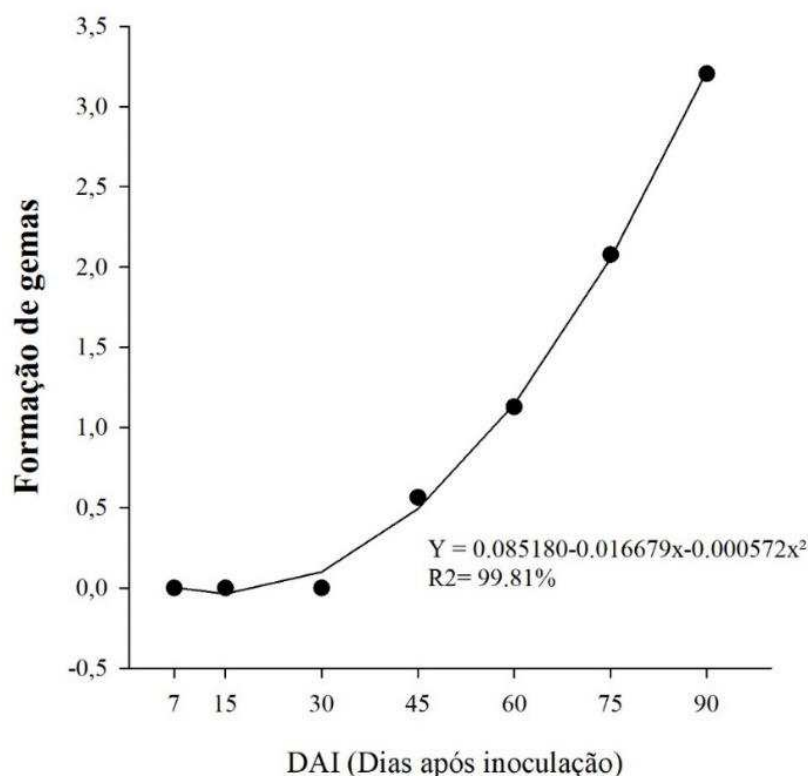


Figura 10. Formação de gemas (Ge) de explantes de parte área de *Platonia insignis* ao longo dos DAI (7,15,30,45,60,75 e 90).

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato do estudo da organogênese de *P. insignis*, é de fundamental importância a determinação de explantes que possuam competência organogênica. A formação de novos órgãos vegetais é considerada uma característica única da regeneração de plantas (HARTMANN et al., 2010), e pode ser aumentada *in vitro* quando os explantes são cultivados em meio nutritivo suplementado com hormônios vegetais (SKOOG E MILLER, 1957; MURASHIGE, 1974; GEORGE et al., 2008). A partir disto, foi observado diferentes respostas morfogênicas de explantes de parte área normal e anormal e calos quando inoculadas em diferentes concentrações de BAP e ANA.

Foram obtidos calos a partir de partes aéreas anormal quando estes explantes foram mantidos em condições com maiores concentrações da BAP. A formação de calos em elevados percentuais em meios contendo citocininas, pode ser explicado através do balanço hormonal exógeno que interage de forma significativa com os níveis endógenos, desencadeando essa resposta morfogênica. Provavelmente há um conteúdo endógeno de auxinas nos explantes de

bacurizeiro, com isso o balanço hormonal entre as auxinas endógenas e a citocinina adicionada ao meio, proporcionou a formação da calogênese (ALENCAR, 2021).

Explantos de parte aérea anormal proporcionaram a formação de radícula (Ra) e composto bioativo (Cb) com a adição do BAP no meio de cultivo. Para o bacurizeiro, o desenvolvimento de raízes independente é algo importante, pois a espécie exibe a capacidade de emitir abundantes brotações de raízes da planta-mãe, mas a obtenção de mudas oriundas de rebentos de raízes é muito difícil, pois a quase totalidade dessas estruturas não apresenta sistema radicular independente, quando ocorre a retirada da brotação com parte do segmento de raiz que a originou, a sobrevivência é baixa pela dificuldade com o enraizamento (CARVALHO e MÜLLER, 2007), diferente do que foi visto no presente estudo, onde os explantes de parte aérea *in vitro* apresentaram a formação de um sistema radicular independente e bem desenvolvido.

Compostos bioativos com a coloração rosácea foram encontrados em praticamente todos os explantes, acredita-se que este composto possa ser um corante natural pertencente ao grupo dos flavonoides, como é o caso das antocianinas, que têm diversas funções nas plantas, como atividade antioxidante, proteção à radiação ultravioleta e auxílio à polinização e dispersão de sementes (LOPES et al., 2007). Porém é necessária uma análise específica para identificação desse composto.

Houve a entrada na organogênese indireta, com a formação de brotos em calos utilizados como explantes mantidos em concentrações de 156 μM e 78,12 μM de BA. Yu et al. (2021), trabalhando com *Phaseolus vulgaris* também conseguiram a indução de brotações em 4,44 μM de BAP. Ivannikov et al., (2021), para *Astrophytum asterias* com MS suplementado com 4,44 - 6,66 μM de BAP, para *Blossfeldia liliputiana* com 4,44 μM de BAP ou 4,44 μM de BAP + 0,45 μM de 2,4-D, para *Strombocactus disciforme* com 2,22 - 4,44 μM de BAP ou 4,44 μM de BAP + 0,45 μM de 2,4-D, definiu em seu trabalho sendo ótimas concentrações de reguladores para indução da organogênese. Com base nos exemplos citados acima é possível observar que diferente de outras espécies o bacurizeiro necessita de maiores concentrações de BAP para a indução da organogênese. Até o momento não houve a realização de um perfil hormonal endógeno desta espécie, contudo os resultados desta pesquisa demonstram que pode existir altas concentrações de auxinas endógenas, por isso a necessidade de maiores concentrações de citocinina para a indução da organogênese.

As partes aéreas normais quando inoculadas em meio com 78,12 μM de BAP apresentaram uma alta porcentagem de oxidação (Ox), cerca de 51,53% (Fig. 6A). Pious e Ravindra (1997) relatam que a oxidação dos explantes é uma dificuldade em algumas espécies

lenhosas, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta aos ferimentos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura e pela oxidação de polifenóis e quininas.

Os explantes partes aéreas normais, também em condições de cultivo com 78,12 μM de BAP, apresentaram uma maior formação de radícula (Ra), que pode ser explicado devido a interação de forma significativa entre a possível existência de altos níveis hormonais endógenos de auxinas e concentrações de citocinina exógena adicionada, desencadeando essa resposta morfogênica. Contudo explantes mantidos nas demais concentrações houve uma diminuição da formação radículas, Monfort et al., 2012 explica que altas dosagens de citocina favorece a inibição da ação das auxinas endógenas, consequentemente dificulta a formação de raízes. Garcia et al. (2021) obtiveram resultados semelhantes com a micropropagação de *Aechmea miniata* e *Aechmea blanchetiana*, em que o aumento na concentração de BAP (4,44 μM) apresentou um efeito negativo para comprimento e número de raízes formadas.

Os explantes mantidos com 234 μM de BAP apresentaram uma maior formação de folhas. Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas et al. (2016) com *Justicia pectoralis*, que observaram aumento no número de folhas ao elevarem as concentrações da citocinina (20 μM), porém não houve o estímulo de produção de novos brotos.

Aos 45DAI, os explantes foram submetidos ao corte de seu meristema apical, e isso proporcionou a diminuição de folhas e o estímulo das gemas laterais em consequência da quebra da dominância apical. Este fenômeno pode ser explicado devido a maior quantidade de auxina no meristema apical da planta e a distribuição até as gemas laterais da base para inibir a sua brotação (FAGAN et al., 2015). No entanto, quando o ápice das plantas é retirado, o aumento nos níveis de citocininas sinalizam para o maior desenvolvimento de gemas laterais.

Os meios com 78,12 e 234 μM de BAP proporcionaram uma maior formação de calos, estes com aspecto esponjosos e amarelados na base e no ápice dos explantes de partes aéreas. A formação de calos (Ca) é comum em espécies lenhosas, podendo inibir ou não o desenvolvimento das culturas *in vitro* (MOLINARI et al. 2021). A presença da variável compostos bioativos em explantes mantidos com 156 e 234 μM de BAP, pode ser devido a um estresse causado por alta concentrações de citocininas, já que houve um estímulo para uma multiplicação celular e o material vegetal não conseguiu responder da forma desejável.

Este é o primeiro relato da organogênese de *Platonia insignis*. Calos de “parte área anormal” são explantes promissores para a organogênese indireta, podendo otimizar a multiplicação e formação de novas plantas. Os meios de cultivo suplementados com 78,12 e

156 μM de BAP se mostraram os mais eficazes para indução da organogênese. Explantes de “parte área normal” proporcionaram a indução novas gemas laterais, podendo também serem utilizados como fonte de explante com a suplementação de 234 μM de BAP. Sendo assim, este estudo nos mostra que a técnica da organogênese *in vitro* pode se tornar uma alternativa para a propagação do bacurizeiro, podendo proporcionar uma multiplicação rápida e formação de novas plantas, contribuindo com a indústria e o comércio do bacuri.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, W. F. (2005). **Efeito do “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

Akbaş F. et al. (2009) Effect of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltsinki. **Afr J Biotechnol**, v.8, p.6168–6174.

Alencar, a. C. I. (2021). **Multiplicação clonal e calogênese em tecidos embrionários de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* l.) Var. Branca**. Dissertação de mestrado.

Andrade, W. F. (2005). **Efeito do “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

Arabes M. A. et al. (2014) Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G \times N15 (hybrid of almond \times peach) vegetative rootstock. **J Genet Engin Biotechnol**, v.12, p.81–87.

Bastos D. H. et al. (2009) Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.**, v.53, n. 5, p. 646-656. Doi: 10.1590/S0004-27302009000500017.

Cançado, G.M. de A. et al. (2012). **Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações**: In: Oliveira, A. F. Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Epamig. cap.10, p. 275-310.

Carvalho, J.E.U. (2016). Nascimento, W.M.O. **Psitacídeos: polinizadores ou predadores da flor do bacurizeiro**. XXIV Congresso Brasileiro de Fruticultura, São Luis-MA,

Carvalho, J.E.U. et al. (1998). **Cronologia de eventos morfológicos associados à germinação e sensibilidade ao dessecamento em sementes de bacuri (*Platonia insignis* Mart. - *Clusiaceae*)**. Revista Brasileira de Sementes, v.20, n.2, p.475-479.

Cheng, Z. J. et al. (2013). Paternof auxin and cytokinin responses for shoot meristema induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR 3. **Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 240-251.

- Fagan, E. B. D. et al. (2015). **Fisiologia Vegetal: Reguladores vegetais**. São Paulo: Andrei Editora, p. 300.
- Freitas, R. M. O. de et al. (2016). *In vitro* propagation of *Justicia pectoralis*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 3, p. 159–163.
- Garcia, F. R. et al. (2021). Micropropagação de *Aechmea miniata* e *Aechmea blanchetiana*. **Rodriguésia**, v. 72. Doi: <http://doi.org/10.1590/2175-7860202172037>.
- George, E. F. et al. (2008). **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3rd edn. Dordrecht: Springer.
- Goulart, P. B. et al. (2010). Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, v.34, p.961-97.
- Hartmann, H. T. et al. (2010). **Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practices**, 8th edn. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice-Hall.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017). **Censo agropecuário 2017**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6617#resultado>.
- Ivannikov, R. (2021). Micropropagation and organogenesis of *Astrophytum asterias* (zucc.) lem. (cactaceae juss.), *Blossfeldia liliputianawerderm* and *Strombocactus disciformis* (dc.) britton & rose. **J. Microbiol Biotech Food Sci/Ivannikovet al.** Doi: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2201>.
- Maués, M.M. e venturieri, G.C. (1996). **Ecologia da polinização do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) Clusiaceae**. Belém, PA: Embrapa-CPATU. 24 p. (Embrapa-CPATU. Boletim de pesquisa, 170).
- Molinari, L. V. Óleos essenciais e benzilaminopurina (BAP) para o cultivo in vitro de *Dimorphandra mollis*. **Brazilian Journal of Forestry Research**. Doi: <https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201901926>.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. **Annu. Rev. Plant Physiol.** v. 25, p.135-166.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497.
- Patricia, D.R. et al. (2021). Shoot organogenesis from leaf discs of the African ginger (*Mondia whitei* (Hook.f.) Skeels), an endangered medicinal plant. Patricia, D. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.57, n.3, p.493–498. Doi:10.1007/s11627-020-10146-0.
- Pontes L. C. G, et al. (2017) Molecular characterization of progenies of bacurizeiro (*Platonia insignis*) from Marajó Island, northeastern Amazon. **Acta Amazon**, v.47 p.293-300.
- Sakhanokho, H. F. (2021). Micropropagation of *Hibiscus moscheutos* L. 'Luna White': effect of growth regulators and explants on nuclear DNA content and ploidy stability of regenerants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. Doi; <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10209-w>.

Santos, J. D. et al. (2019). Estabelecimento *in vitro* de oliveira ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’. **Ciência Florestal**, v.29, n.2, p.508-518. Doi: <https://doi.org/10.5902/>.

Scherwinski-Pereira, J. E. (2010). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica. <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00083840>.

Skoog, F. and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp Soc Exp Bio**, v.11, p.118-30.

Souza, V.A.B. de. et al. (2013). Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* MART.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.677-684. Doi: 10.1590/S0100-29452013000300003.

Thorpe T, Stasolla C, Yeung EC, de Klerk GJ, Roberts A, George EF (2008) In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (Eds.), **Plant propagation by tissue culture**, Springer (pp. 115–173).
Yu, Y. (2021). *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via direct and indirect organogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v.15, p.279–288.

CAPITULO IV

Conclusão

CONCLUSÕES

- Houve uma redução do tempo de germinação da espécie *Platonia insignis*, sendo que em condições de campo, ela necessita de três anos para que sua germinação se complete, com o uso da técnica de germinação *in vitro*, isso se reduz a 60 dias;
- A germinação *in vitro* do bacuri não apresenta necessidade de adição de reguladores de crescimento, pois houve respostas significativas nos tratamentos MS sem reguladores de crescimento, ágar e água;
- Explantes a partir de plantas de *P. insignis* germinadas *in vitro* são fontes de explantes eficientes para a indução de organogênese. A partir de explantes de calos de parte área anormal foi possível a indução da organogênese indireta quando inoculadas nos meios MS + 156 μM de BAP, sendo assim indicados para essa indução.
- O presente trabalho é o ponto inicial para futuras pesquisas, os resultados obtidos demonstram que a técnica da micropropagação associada a outras técnicas pode otimizar a domesticação e a conservação do bacurizeiro, garantindo inúmeras possibilidades quanto à pesquisa e exploração mercadológica da espécie.