



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIA AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE AGRONOMIA BACHARELADO

IRISLENE SOUZA ALBUQUERQUE

ESTABELECIMENTO E CALOGÊNESE *in vitro* A PARTIR DE FOLHAS E FLORES DE
BACURIZEIRO (*Platonia insignis* Mart.)

SÃO LUÍS

2022

IRISLENE SOUZA ALBUQUERQUE

ESTABELECIMENTO E CALOGÊNESE *in vitro* A PARTIR DE FOLHAS E FLORES DE
BACURIZEIRO (*Platonia insignis* Mart.)

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Estadual do Maranhão, como
requisito para obtenção do título de Engenheira
Agrônoma.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Roseli Corrêa

SÃO LUÍS

2022

Albuquerque, Irlene Souza.

Estabelecimento e calogênese *in vitro* a partir de folhas e flores do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart) / Irlene Souza Albuquerque. - São Luís, 2022.

51 f

Monografia (Graduação) – Curso de Engenharia Agrônoma, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Roseli Corrêa.

1.Bacuri. 2.Explantes. 3.Micropropagação. I.Título.

CDU: 634.471-153

IRISLENE SOUZA ALBUQUERQUE

ESTABELECIMENTO E CALOGÊNESE *in vitro* A PARTIR DE FOLHAS E FLORES DE
BACURIZEIRO (*Platonia insignis* Mart.)

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Estadual do Maranhão, como
requisito para obtenção do título de Engenheira
Agrônoma

Aprovada em: 29/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Thais Roseli Corrêa – **Orientadora**
Doutora em Genética e Melhoramento
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade/CCA/UEMA

Dra. Táciia Rayene dos Santos Marinho
Doutora em Agroecologia
Universidade Federal de Lavras – UFLA

Givago Lopes Alves

Dr. Givago Lopes Alves
Doutor em Agroecologia
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

A Deus, por seu amor, cuidado e proteção em todos os dias da minha vida.

Aos meus pais, por todo amor e encorajamento em todos os passos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por seu infinito amor, por toda sua graça sobre minha vida, por me permitir conhecer pessoas maravilhosas nessa caminhada, e por me dar saúde e força para correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus pais, Joselio Lourenço Albuquerque e Maria da Conceição Souza Albuquerque, por me incentivar, acreditar em mim e me ajudar em todos esses anos de graduação.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Thais Roseli Corrêa por ser essa pessoa incrível, dedicada, competente, responsável e por sempre acreditar em mim até quando eu mesma não acreditava, para a senhora um espaço na monografia, e no meu coração.

Ao meu noivo Josué Costa Cutrim, que ao longo dos 5 anos de graduação sempre mostrou apoio, respeito e amor.

Aos meus tios, Kleber Albuquerque, Marluce Albuquerque e Maria Santos por me acolherem em suas casas desde a minha vinda para São Luís com o intuito de finalizar o ensino médio e ingressar na universidade.

À Universidade Estadual do Maranhão pela oportunidade e apoio ao longo do curso.

A todo grupo LCT, por me receber com todo carinho e cuidado, por toda paciência e me dar a oportunidade de crescer profissionalmente. Eu sou muito grata aos professores Dr. Marcos Vinicius Pinheiro, Tiago Massi Ferraz e Sérgio Heitor Sousa por toda orientação, apoio e ajuda durante a Iniciação Científica.

Aos Doutores TÁCILA Rayene dos Santos Marinho e Givago Lopes Alves, a Mestranda Vitória Karla Silva, aos PIBICS Lúcio Rafael Moraes, Mariana Lima, Maria Cristina Rocha e Marion NAYON Braga pelo convívio todos os dias, por todo apoio e ajuda sem vocês a caminhada na iniciação científica não seria a mesma.

As minhas amigas Vanessa Silva, Andrea Sales, Hildelice Oliveira e Rebeca Silva por toda amizade, cuidado, preocupação e as mensagens de incentivo e orações.

À Luziane Marques Fontinele e Thainan Barros pela amizade ao longo de toda a graduação.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram nesta etapa.

Muito obrigada!

*E, tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor e não aos homens, sabendo que recebereis do Senhor o galardão da herança, porque a Cristo, o Senhor, servis.
Colossenses 3:23-24*

RESUMO

O bacurizeiro é uma fruteira arbórea nativa da Amazônia brasileira, com elevado valor socioeconômico ainda está em processo de domesticação, corre risco de erosão genética devido à pressão do uso da terra pela agricultura, e a falta de técnicas adequadas de propagação. Assim, como alternativa viável para a espécie, destaca-se a micropropagação através da embriogênese somática, técnica que explora a totipotencialidade e a alta plasticidade que as células vegetais podem proporcionar sendo uma importante ferramenta para propagação em larga escala de plantas. Um protocolo eficiente de propagação ajudará a superar as dificuldades de produção de mudas para a formação de pomares da espécie, e possibilitará a seleção de plantas com a características agrônômica de interesse. Portanto, o objetivo deste trabalho é determinar se explantes foliares e florais são eficientes para a indução da calogênese do bacurizeiro. Para indução da embriogênese somática foram utilizadas flores e folhas de diferentes matrizes de regiões do estado Maranhão, compondo quatro experimentos. Em todos os testes, os explantes florais e foliares passaram por processo de desinfestação de acordo com o tipo de explante, antes e durante manipulação em fluxo laminar. Em seguida os explantes foram excisados cuidadosamente e inoculados em meios de cultura com diferentes combinações de reguladores de crescimento. Foram realizadas as avaliações quanto à oxidação (%), indução de calos (%), contaminação (%) e sobrevivência (%) dos explantes. Para os explantes provenientes de flor, os seguimentos de ovário foram os únicos a apresentarem formação de calos, portanto, indicados para a indução da embriogênese somática do bacurizeiro. Os seguimentos de ovários nos meios de cultura contendo as três concentrações de Picloran mais o meio de cultura contendo a menor concentração de 2,4-D, proporcionaram respostas de calos (%) superiores quando comparados aos demais meios de cultura. Os explantes foliares não proporcionaram a formação de calos, e as contaminações impediram os avanços do trabalho, portanto, são necessários novos experimentos que busquem um protocolo de desinfestação eficiente. Assim, os explantes florais apresentaram elevado potencial para a indução de calogênese, e ainda o ovário da flor do bacurizeiro foi o explantes mais responsivo, além disso, meio de cultura com altas concentrações de picloram são eficientes para a indução de calos em ovário da flor do bacuri.

Palavra-chave: Bacuri. Explantes. Micropropagação.

ABSTRACT

The bacurizeiro is a tree fruit tree native to the Brazilian Amazon, with high socioeconomic value is still in the process of domestication, is at risk of genetic erosion due to the pressure of land use by agriculture, and the lack of adequate propagation techniques. Thus, as a viable alternative for the species, micropropagation through somatic embryogenesis stands out, a technique that explores the totipotentiality and high plasticity that plant cells can provide, being an important tool for large-scale propagation of plants. An efficient propagation protocol will help to overcome the difficulties in producing seedlings for the formation of orchards of the species and will enable the selection of plants with the agronomic characteristics of interest. Therefore, the objective of this work is to determine whether leaf and floral explants are efficient for inducing bacuri callogenesis. For the induction of somatic embryogenesis, flowers and leaves from different matrices in regions of the state of Maranhão were used, composing four experiments. In all tests, floral and foliar explants underwent a disinfection process according to the type of explant, before and during manipulation in laminar flow. Then the explants were carefully excised and inoculated in culture media with different combinations of growth regulators. Evaluations were performed regarding oxidation (%), callus induction (%), contamination (%) and survival (%) of explants. For the explants from flowers, the ovary segments were the only ones to present callus formation, therefore, indicated for the induction of bacuri somatic embryogenesis. The segments of ovaries in the culture media containing the three concentrations of Picloran plus the culture medium containing the lowest concentration of 2,4-D provided superior callus responses (%) when compared to the other culture media. The leaf explants did not provide the formation of calluses, and the contamination prevented the progress of the work, therefore, new experiments are needed that seek an efficient disinfection protocol. Thus, the floral explants showed a high potential for the induction of callogenesis, and the ovary of the bacuri flower was the most responsive explant, in addition, culture medium with high concentrations of Picloram are efficient for the induction of calluses in the ovary of the flower from bacuri.

Keyword: Bacuri. Explants. Micropropagation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da Árvore (A), flores (B), fruto (C) e endocarpo do bacurizeiro (D).....	19
Figura 2	Mapa da localização das três áreas de coletas de material vegetal em indivíduos arbóreos de bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i>) nos municípios de São Luís (borda vermelha no mapa), Barreirinhas (borda azul no mapa) e Codó (borda amarela no mapa), Maranhão, Brasil.....	27
Figura 3	Instalação do experimento I – (A) Processo de desinfestação das flores, (B) Corte longitudinal do explante, (C) Explantes inoculados em meio de cultura.....	30
Figura 4	Mapas de localização Fazenda Escola, UEMA, São Luís, Maranhão, Brasil (latitude: 2° 35' 8.29" S, longitude: 44° 12' 30.29" W) (Sistema Referente de Coordenadas (SRC): Geográficos, Datum: Sirgas 2000 e Código EPSG: 4674): Mapa a esquerda: localização do Brasil e o estado do Maranhão na América do Sul. Mapa a direita. Mapa de localização da área experimental Fazenda Escola – UEMA.....	32
Figura 5	Representação dos explantes florais do experimento II (A) Flor do bacurizeiro, (B) desinfestação das flores, (C) Separação dos órgãos florais, (D) Estruturas florais, pe = pétala; es = estame; ca = cálice; Ov= ovário; ap= apical; me = mediano; ba = basal.....	34
Figura 6	Instalação do experimento com explantes foliares. (A) Pré-limpeza com água e detergente neutro, (B) Desinfestação do material em câmara de fluxo laminar, (C) Excisão da folha em tamanho de 1 cm ² , (D) Inoculação do explante em meio de cultura.....	35
Figura 7	Contaminação de explantes florais de bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.....	38
Figura 8	Sobrevivência de explantes florais de bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart) aos 60 DAI. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	39
Figura 9	Percentual de calos oriundos de explantes do ovário da flor de bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart). Letras iguais não difere entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. PIC: Picloram.....	41
Figura 10	Calos em explantes de ovário da flor do bacurizeiro. (A – E) Calos de explantes de ovário de flores bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart) aos 30 DAI. Calos mantido no tratamento 5 (MS + 225,0 µM de Picloram, (F –J) Calos mantidos no tratamento 6 (MS + 450,0 µM de Picloram) e (K –O) Calos mantidos no tratamento 8 (MS + 225,0 µM de 2,4-D). A barra de escala representa 0,1 mm. Ca: calo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Meios de cultura com diferentes concentrações de auxinas para indução da embriogênese somática de bacurizeiro a partir de explantes florais.....	29
Tabela 2	Meio de cultura com diferentes concentrações de auxinas e combinações de auxinas e citocinina para indução da embriogênese somática de bacurizeiro a partir de explantes foliares.....	34

LISTA DE SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCT	Laboratório de Cultura de Tecidos
ES	Embriogênese Somática
DAI	Dia após a inoculação
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6- tricloropicolínico
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-Benzilaminopurina
MS	Murashige Skoog
TDZ	Thidiazuron

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
	2.1 Objetivo Geral	16
	2.1 Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
	3.1 Bacurizeiro	17
	3.1.1 Classificação Taxonômica.....	17
	3.1.2 Caracterização Botânica.....	17
	3.1.3 Centro de Origem e Distribuição Geográfica.....	20
	3.1.4 Métodos de Propagação do Bacurizeiro.....	20
	3.1.4. Propagação sexuada.....	20
	3.1.5 Propagação assexuada.....	21
	3.1.6 Importância socioeconômica.....	22
	3.2 Micropropagação em arbóreas	24
	3.2.1 Embriogênese Somática.....	25
4	METODOLOGIA	27
	4.1 Experimento I	27
	4.1.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> e indução da calogênese a partir de flores.....	27
	4.1.3 Delineamento Experimental.....	29
	4.2 Experimento II	29
	4.2.1 Coleta do material vegetal.....	29
	4.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> e indução da calogênese a partir de estruturas florais.....	30
	4.2.3 Delineamento Experimental.....	32
	4.3 EXPERIMENTO III	32
	4.3.1 Coleta de material vegetal.....	33
	4.3.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> e indução da calogênese a partir de folhas.....	33
	4.3.4 Delineamento Experimental.....	34
	4.4 Experimento IV	34
	4.4.1 Coleta de material vegetal.....	34
	4.4.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> e indução da calogênese a partir de folhas.....	35
	4.4.3 Delineamento Experimental.....	35

	4.5 Análise Estatística.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
	5.1 Experimento I.....	37
	5.2 Experimento II.....	37
	5.3 Experimentos III e IV.....	42
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie frutífera nativa da flora amazônica brasileira, com elevado valor socioeconômico e ambiental, especialmente para as regiões Norte e Nordeste (RODRIGUES et al., 2021). Indivíduos arbóreos desta espécie podem ser encontrados no estado do Maranhão, Pará, Mato Grosso, Piauí, Tocantins e Goiás (SOUZA et al., 2007). Além disso, segundo o censo agropecuário de 2017 do IBGE (2016/2017), a produção brasileira de bacuri concentra-se principalmente na região Norte (86,0%) e no Nordeste (13,5%), com o Pará e o Maranhão como os maiores produtores do fruto respectivamente (IBGE, 2017).

O comércio do bacuri teve aumento significativo nos últimos anos, quando a polpa do fruto se destacou na agroindústria como insumos para diversos produtos, e por apresentar compostos fenólicos de interesse industrial, sendo também alvo de exportação *in natura* ou processada, destinada aos mercados Europeu, Estados Unidos e Japão (SINIMBÚ NETO, 2010; RODRIGUES et al., 2021; YAMAGUCHI et al., 2021). Embora o mercado de polpa de bacuri seja altamente promissor, essa produção é majoritariamente extrativista, o que afeta a cadeia produtiva (HOMMA, 2018). Isso se dá a grande dificuldade de produzir mudas via sementes, em decorrência da sua baixa viabilidade e por apresentar uma dormência na gema apical que ocasiona formação lenta da planta, quando se trata em brotações de raiz, o grande entrave está no desenvolvimento de sistema radicular independente da planta-mãe, pois quando a independência acontece, é inviável o uso da muda por apresentar altura superior a 1,5 m dificultando o pagamento das mesmas (MENEZES et al., 2012; CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

Diante deste cenário, a aplicação de técnicas biotecnológicas na *P. insignis*, poderá contribuir diretamente no processo de propagação, domesticação e melhoramento genético da espécie (MARINHO et al., 2022). Atualmente, dentre as técnicas que podem ser usadas, tem-se a embriogênese somática que se fundamenta na totipotencialidade e a alta plasticidade que as células vegetais exibem, sendo uma interessante ferramenta na propagação de plantas em larga escala (FEHÉR, 2019). Na ES há exposição de células ou tecidos de diferente explantes, como embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares entre outros, em condições *in vitro* e concentrações conhecidas de sais minerais, compostos orgânicos e reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas (OLIVEIRA et al., 2022). Um dos principais gargalos da ES, é a escolha do explante que apresente células jovens, e que irão responder aos estímulos proporcionados pelas características do meio de cultura, portanto, para o sucesso da

técnica, é necessário a exposição de células ou tecidos provenientes de diferentes explantes às condições de cultivo *in vitro* (CARDOSO, 2018).

As auxinas são frequentemente usadas para a indução de calos, essas induzem respostas que podem ser a chave para a reprogramação genética, metabólica e fisiológica, que resultam na competência embriogênica das células somáticas vegetais (FEHER et al., 2003). Porém, também podem ser usadas combinações de auxinas e citocininas para a indução de calos embriogênicos, como Almeida et al (2022) usou em pétalas de *Hippeastrum aiming* para a indução da embriogênese somática, e Nogueira et al (2007) ao usar explantes foliares de *Brysonima intermedia* A. Juss testou diferentes combinações de 2,4-D com BAP ou TDZ, e observou que o meio ideal para a indução de calos na espécie é o que contém apenas 2,4-D.

Embora a *P. insignis* seja altamente promissora para diferentes industriais e existam trabalhos que estudam alternativas para a sua propagação, aplicação farmacêuticas e haja trabalhos na cultura de tecidos que mostre o potencial da semente em gerar calos *in vitro*, ainda não há relatos da indução de calogênese na flor e folha do bacurizeiro *in vitro*. Um protocolo eficiente de propagação a partir de flores e folhas é importante por se tratar de fonte de explantes que geram plantas idênticas as plantas matrizes, assim, além de ajudar a superar as dificuldades de produção de mudas para a formação de pomares da espécie, possibilitará a propagação de plantas com as características agrônomicas de interesse. Assim, o objetivo do trabalho é determinar se explantes foliares e florais são eficientes para indução da calogênese

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar se explantes foliares e florais são eficientes para indução da embriogênese somática do bacurizeiro (*Platonia insignis*).

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer explantes de flor e folhas de bacurizeiro *in vitro*;
- Determinar um tipo de explante para a indução de calos em bacurizeiro;
- Determinar quais auxinas exógenas são eficientes para a indução de calos em bacurizeiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bacurizeiro

3.1.1 Classificação Taxonômica

O bacurizeiro pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Theales, família Clusiaceae, subfamília Clusioideae, gênero *Platonia*, espécie *Platonia insignis* Mart., cujo gênero *Platonia* é um monotipo, constituído por uma única espécie (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

A palavra bacuri vem do tupi, na qual “ba” significa – cair, curi” – logo, assim, é aquele que cai logo que amadurece (FONSECA, 1954 Apud RUFINO, 2008). O fruto do bacurizeiro possui nomes diversos, que são decorrentes das diferentes nacionalidades dos missionários e viajantes estrangeiros, que eram de diferentes nacionalidades e grafaram o nome como ouviam, esses nomes são: bacuri, bacuri-açu, bacuri-grande, bacori, bacoriba, bacuriuba, bulandim, ibá-curi-yba, ibacupari, ibacopari, ibacori, ibacuri, ibacurapari, ybacuri, ibicura, landirana, pari, pacori, pacuri, pacoru, pacuru, pacuriuva, paquori, ubacuri, ubacury (ARAÚJO et al., 2018; CARVALHO et al., 2022).

3.1.2 Caracterização Botânica

Em condições de vegetação primária, o bacurizeiro pode alcançar altura superior a 30m, com copa de 20 m de diâmetro (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). Possui tronco retilíneo, de forma circular e com ramificações somente no seu terço terminal, revestido de casca espessa variando entre 8-20 mm, irregular, fissurada, com sulcos longitudinais mais ou menos profundos, coloração pardo-escura, com pequenas zonas acinzentadas ou esbranquiçadas (Figura 1A) (GUIMARÃES et al., 1993; CAVALCANTE, 2010; CARVALHO et al., 2022). As folhas são simples, elípticas e com disposição oposta cruzada, nervuras secundárias copiosas e próximas, terminando em uma nervura que acompanha toda a periferia da folha, e pecíolos curtos com comprimento entre 1 e 2 cm (SOUZA et al., 2000; SINIMBÚ NETO;2010). Com coloração verde-brilhosas na face adaxial e verde mais claro e com pouco brilho na face abaxial (CAVALHO et al., 2022).

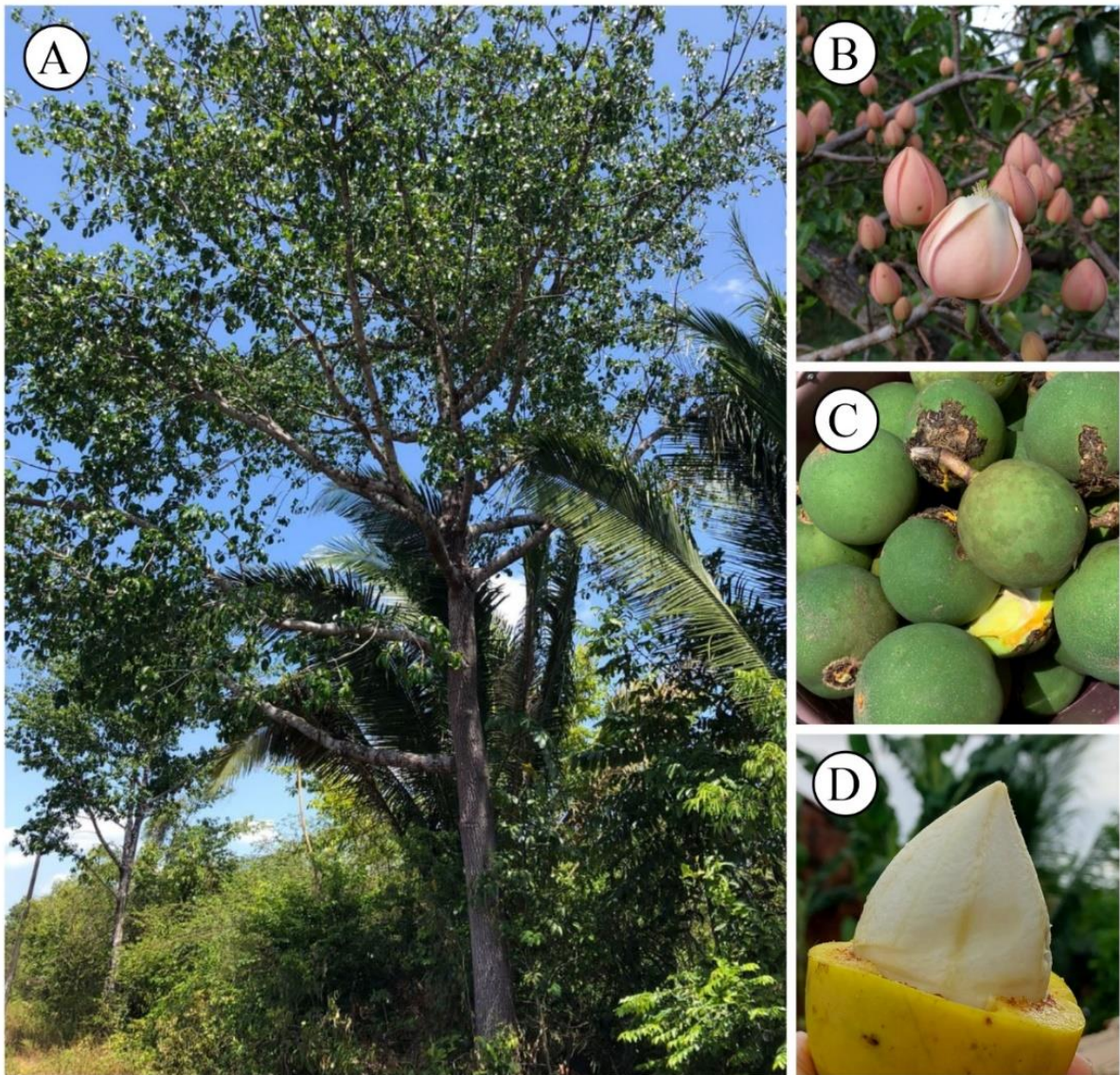
As flores são hermafroditas, distribuídas nas extremidades dos ramos, isoladas ou em grupos de duas até 30 e dispostas em pedúnculos, o cálice é formado por cinco sépalas de cor verde e a corola por cinco pétalas, sendo essas de coloração róseo intenso até creme (Figura 1B) (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). As flores possuem comprimento médio de 6,1

cm e largura de 4,1 cm (CARVALHO et al., 2022). Os estames são agrupados em cinco feixes, distribuídos de forma uniforme, unidos a base, cada um contendo numerosos estames, e a deiscência da antera é longitudinal, com demasiada quantidade de grão de pólen (MAUÉS e VENTURIERI, 1996; CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). Possuem ovário súpero, volumoso, com diâmetro em torno de 1,5 cm e comprimento 1,7 cm, com estigma situado, em alguns genótipos, em nível superior ao dos estames e em outros no mesmo nível ou um pouco abaixo, sendo constituído por cinco lóbulos (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

A polinização é realizada principalmente por psitacídeos de pequeno porte e traupídeos que visitam as flores em busca de néctar e de pólen (MAUÉS e VENTURIERI, 1996; CARVALHO et al., 2022). Diversas espécies de abelhas sem ferrão, principalmente do gênero *Trigona*, assumem o papel de polinizadoras, mas por permanecerem por mais de cinco minutos sobre a superfície dos estames, elas efetuam mais autopolinização, que raramente resulta na fecundação de óvulos (CARVALHO et al., 2022). O bacurizeiro é uma espécie que apresenta alogamia acentuada e autoincompatibilidade esporofítica devido ao momento em que as flores são autopolinizadas, não haver crescimento do tubo polínico (MAUÉS e VENTURIERI, 1996; SINIMBÚ NETO, 2010). A autoincompatibilidade, que é a incompatibilidade entre genótipos também se manifesta em maior ou menor intensidade (CARVALHO et al., 2022).

O fruto do bacurizeiro é uma baga volumosa, uniloculada, formato arredondado, ovalado, piriforme ou achatado, nesse último caso com cinco sulcos visíveis na parte externa (Figura 1C) (CAVALCANTE, 1996; SINIMBÚ NETO, 2010). O epicarpo é delgado e indivisível do mesocarpo. O mesocarpo é espesso e de consistência coriácea, repleto de vasos que, exsudam substância resinosa de cor amarela, quando cortado ou ferido (SINIMBÚ NETO, 2010). O conjunto formado pelo epicarpo e mesocarpo, popularmente denominado de casca, representa 70% do peso do fruto, com endocarpo de cor branca, aroma forte, sabor agridoce e desprovido de vasos lactíferos (Figura 1D) (SINIMBÚ NETO, 2010).

Figura 1. Representação da árvore (A), flores (B), fruto (C) e endocarpo do bacurizeiro (D).



Fonte: ALBUQUERQUE (2022)

As sementes são oblongas-angulosas, grandes, ricas em óleo, apresentam formato elipsoidal, a intensidade das angulosidades, depende do número de sementes que se formam no fruto, a face onde se situa a linha da rafe é, em geral, ligeiramente côncava e o lado oposto convexo (CARVALHO, 2007). No caso de sementes oriundas de um mesmo lóculo do ovário, o formato é bastante irregular e dependente do número de sementes que se formam no lóculo (MOURÃO e BELTRATI, 1995; CARVALHO, 2007).

O tegumento apresenta coloração amarronzada, com vários feixes vasculares fáceis de serem visualizados devido a sua coloração mais clara, principalmente o que acompanha a linha da rafe, devido a sua robustez (CARVALHO, 2007). O hilo é de coloração mais escura que o tegumento, com pequena porção central mais clara e formato arredondado e a micrópila está situada próxima ao hilo sobre uma pequena protuberância triangular (CARVALHO, 2007). O

embrião é constituído unicamente pelo eixo hipocótilo-radícula, sendo os cotilédones vestigiais. Os tecidos de reserva estão armazenados no longo e espesso eixo hipocótilo-radícula (MOURÃO e BELTRATI, 1995; CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

3.1.3 Centro de Origem e Distribuição Geográfica

Do Pará, no norte do Brasil, o bacurizeiro se dispersou em direção ao Nordeste, atingindo as áreas de cerrado e chapadões dos estados do Maranhão e Piauí, povoando densamente as áreas de vegetação secundária, diferentemente dos Estados Acre, Amapá e Amazonas Roraima e Tocantins onde ocorre em vegetação primária (CAVALCANTI, 1996; CARVALHO, 2007). Entretanto, existem registros da ocorrência espontânea em outros países próximos ao Brasil, como por exemplo, o Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Amazônia Peruana, Equatoriana, Colombiana (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

Os bacurizeiros no Maranhão, estão localizados em áreas compreendidas a Oeste do meridiano de 44° W, seguindo a margem do rio Parnaíba e o paralelo de 60° Sul, situadas a 20° 32' de latitude Sul e 44° 17' de longitude Oeste. Esta árvore é encontrada com grande dispersão de forma espontânea, nas regiões do Cerrado, da Pré-Amazônia Maranhense, do Baixo Parnaíba Maranhense, na Baixa Maranhense e nas regiões do Planalto Sul do Maranhão (FIPE, 1979 apud SINIMBÚ NETO, 2010).

3.1.4 Métodos de Propagação do Bacurizeiro

3.1.4. Propagação sexuada

O principal obstáculo para a formação de mudas de bacurizeiro por via sexuada é o tempo demasiado longo, em média são 589,6 dias para que as sementes completem o processo germinativo (CARVALHO et al., 2022). A germinação de algumas sementes acontece aos 180 dias após a sementeira e outras aos 900 dias, esse fato, torna a germinação bastante desuniforme (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, essa dormência é variável entre sementes, e tem forte componente genético, alguns genótipos apresentam germinação superior a 30% aos 120 dias após sementeira (CARVALHO et al., 1998; CARVALHO e MULLER, 2007). Outros fatores que limitam à implantação de pomares com mudas oriundas de sementes é o fato de o bacurizeiro ser uma espécie alógama e por apresentar longa fase juvenil (CARVALHO et al, 2022). 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 (CARVALHO e MULLER, 2007). A longa fase jovem de

plantas propagadas pela via sexuada, faz com que elas só entrem em fase reprodutiva 10 anos após o plantio (CARVALHO et al, 2022).

Quatro eventos morfológicos bem definidos, são observados no processo germinativo das sementes: Ruptura do delgado tegumento pela raiz primária, e ocorre entre 12 e 35 dias após a sementeira, ocasião em que a porcentagem de sementes com raiz primária rompendo o tegumento atinge valor de 100%. Crescimento vigoroso da raiz primária, que atinge 210 dias após a sementeira, comprimento em torno de 180 cm. A taxa de crescimento da raiz primária, nos primeiros 60 dias, é inferior a 1 cm dia⁻¹, aumentando nos subsequentes, até 120 dias, quando então decresce, sendo particularmente baixa após atingir 180 cm e até o momento do início de emergência do epicótilo. Nessa fase as raízes secundárias, embora numerosas, são de tamanho diminuto, com comprimento em torno de 3,2 cm (CARVALHO et al., 1998).

A emergência do epicótilo é o evento mais lento e desuniforme. Em pequena proporção de sementes, geralmente inferior a 2%, esse evento manifesta-se 180 dias após a sementeira. No entanto, para a grande maioria das sementes, esse evento só ocorre 500 dias após a sementeira. A gema apical, em algumas sementes, apresenta grau de dormência tão acentuado, de tal forma que a emergência do epicótilo é extremamente lenta só se verificando em períodos superiores a 900 dias após a sementeira. Por ocasião da emergência do epicótilo, a raiz primária apresenta comprimento superior a 180 cm (CARVALHO et al., 1998).

Por último ocorre a abertura do primeiro par de folhas, estando a plântula, então com todas as suas estruturas essenciais claramente definidas. Ressalte-se que, precedendo a abertura do primeiro par de folhas, o epicótilo cresce cerca de 3 a 6 cm, desenvolvendo dois a cinco pares de folhas escamosas opostas (CARVALHO et al., 1998).

3.1.5 Propagação assexuada

O bacurizeiro exibe a capacidade de emitir muitas brotações de raízes, essas podem até ser consideradas plantas daninhas dependendo das condições que se encontra (HOMMA et al., 2018). A emissão de brotações ocorre mesmo após a derrubada da planta-mãe e 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 MULLER, 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, o percentual de sobrevivência é baixa (CARVALHO et al., 2022). O sucesso na formação de mudas por esse processo depende

da formação de raízes na porção basal do rebento, os melhores resultados 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; CARVALHO et al., 2022).

O método de enxertia convencional do bacurizeiro envolve a formação do porta-enxerto que é o próprio bacurizeiro obtido por sementes ou por regeneração da raiz primária (CARVALHO e MÜLLER, 2007). A enxertia possibilita que as plantas entrem em fase reprodutiva cinco a seis anos após o plantio, e deve ser efetuada pelo método de garfagem no topo em fenda cheia (PERES et al, 1997).

O sucesso da enxertia depende, entre 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, na Amazonia Brasileira, a época propícia para fazer enxerto de bacurizeiro é entre os meses de maio e junho (CARVALHO et al., 2022).

3.1.6 Importância socioeconômica

A polpa do fruto do bacuri é a principal demanda do mercado, essa é usada na culinária regional, servindo como insumo para a fabricação de diversos subprodutos como bolos, soverte, bebidas alcoólicas, sucos, entre outros (CARVALHO et al., 2022). As sementes do bacuri também apresentam importância alimentícia, por serem ricas em óleo, que gera subprodutos como farelo de proteína (PESCE, 2009; CARVALHO et al., 2022).

O fruto é protegido pelo mesocarpo que evita danos mantendo a qualidade da polpa para o consumo direto de cinco a dez dias, a partir da queda do fruto o que pode garantir o transporte para regiões mais afastadas, expandindo o comércio (LOCH, 2013). O sistema de comercialização do bacurizeiro é uma cadeia curta, tendo como característica a coleta de frutos em pequenas quantidades no curto período de safra que acontece de janeiro a março e a extração dos frutos de bacuri pode ser efetuada nos estabelecimentos dos próprios pequenos produtores, mas também, pode ocorrer nas matas e capoeiras (BOTELHO et al., 2020). A prática de comercialização dos frutos e polpas de bacuri acontece de forma desorganizada, e com pouca estrutura (BOTELHO et al., 2020).

A polpa dos frutos pode ser consumida tanto in natura como processada, a casca e as sementes apresentam propriedades que permitem o uso na alimentação, as sementes são matéria-prima para extração de óleo que é usada para produção de produtos medicinais, a polpa

fornece gordura para uso alimentício, medicinal e cosmético, e o tronco fornece madeira de boa qualidade, principalmente para a construção naval (CARVALHO et al., 2022).

Sem dúvida, a espécie *P. insignis* apresenta grande potencial como antioxidante, devido a presença de ácidos graxos insaturados, flavonoides, biflavonoides e benzofenonas (COSTA-JÚNIOR et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2020; BEZERRA et al., 2021;). A *Platonia insignis* Mart. é uma planta com potencial químico-farmacológico a ser explorado pois é rica em compostos bioativos, dentre eles, em especial, os fenólicos, com significativa atividade antioxidante em ensaios *in vitro* e *in vivo* (PINHEIRO et al., 2022). Em estudos com a manteiga de semente de bacuri Lindoso et al. (2022) relatou que a manteiga do bacuri apresenta efeito positivo no controle glicêmico evidenciado por uma diminuição na porcentagem de hemoglobina glicada, e promove aumento da defesa antioxidante hepática, sendo assim, um potencial remédio para o controle de diabetes.

Há necessidade de praticar a seleção de plantas matrizes com características desejáveis e de boa qualidade, entretanto para essa seleção, uma alternativa possível é a utilização de características fenotípicas (SILVA et al., 2009). Um gargalo no processo de seleção é a obtenção de parâmetros que apresentam herdabilidade alta para a obtenção de ganhos genéticos satisfatórios (SILVA et al., 2009).

O bacurizeiro está dentro do processo de sucessão ecológica, enquadrado no grupo de espécies oportunistas ou semitolerantes (BARIGAH et al., 1998), essas espécies sobrevivem em condições de sombra, mesmo com a de pendência de boa qualidade de luz para desenvolverem. Esse grupo ecológico envolve frequentemente espécies com sementes recalcitrantes (CARVALHO et al., 2022). A grande quantidade de reservas contida nas sementes de bacuri, associada à sua lenta mobilização, possibilita a sobrevivência das plântulas por dois anos e meio a três anos, em ambientes com baixa luminosidade e alta competição por nutrientes (CARVALHO et al., 2022).

Em regiões de ocorrência de bacurizeiros antigas, é possível verificar que a espécie tem uma grande facilidade de rebrota, alcançando até 40 mil/plantas/ha, como se fosse uma planta daninha (HOMMA et al., 2018). O controle desses rebentos espontâneos é realizado, mediante o manejo, que envolve o controle do mato, o desbaste de bacurizeiros permite a formação de pomares de bacurizeiros nas áreas degradadas das Mesorregiões do Nordeste Paraense e Marajó, com reduzida opção para outras culturas (HOMMA et al., 2018). Esse aspecto do bacurizeiro é de muita importância e pode ser uma alternativa para auxiliar na recuperação de áreas degradadas e para recompor Áreas de Reserva Legal (ARLs) constitui

importante alternativa para promover a recuperação de áreas degradadas e para recompor Áreas de Reserva Legal (ARLs) e de Preservação Permanente (APPs), através de seu manejo ou efetuando plantios atendendo às normas do Novo Código Florestal (Lei 12.651, 25/05/2012) (HOMMA et al., 2018).

O bacurizeiro se desenvolve em áreas com déficit hídrico bem mais intenso do que nas áreas de ocorrência natural na Amazônia brasileira, por isso, é possível a existência de ecótipos mais tolerantes à seca (CARVALHO et al., 2022). Já houve relatos de bacurizeiros nativos do estado do Maranhão, na região compreendida entre os municípios de Zé Doca e São Luís, que são nitidamente mais tolerantes à seca do que plantas nativas da região de Belém, no Pará (Kerr et al., 1986 Apud CARVALHO et al., 2022). Por outro lado, é possível também a existência de ecótipos tolerantes à condição de drenagem deficiente. Esse fato, deve ser considerado devido a ocorrência da espécie em populações naturais em algumas áreas da ilha do Marajó, estado do Pará (CARVALHO et al., 2022).

3.2 Micropropagação em arbóreas

A cultura de tecidos é uma técnica biotecnológica que envolve um conjunto de métodos pelas quais, em condições assépticas, células, órgãos, ou tecidos denominados “explantos”, são retirados da planta matriz e utilizados para produzir novas plantas num processo contínuo, em um período relativamente curto (SOUZA et al., 2018). No cultivo *in vitro*, os explantes são mantidos em condições controladas, com oferta adequada de nutrientes, pH, temperatura, fotoperíodo e fonte de carbono (MORAIS et al., 2012).

Além da produção de mudas em larga escala, o cultivo *in vitro* é usada para estudos de morfogênese vegetal e proporciona condições que visam a compreensão de rotas metabólicas primárias e secundárias (SOUZA et al., 2018). Alguns conceitos são importantes para a cultura de tecidos como a totipotência celular, competência e determinação (CHAGAS, 2014). A totipotência celular, se caracteriza como a capacidade que a célula vegetal viva, com sistema laminar intacto, nucleada e já diferenciada, possui de voltar ao seu estado meristemático, podendo redefinir seu padrão de diferenciação celular (TERMIGNONI, 2005 Apud GOLLE, 2007). A competência é a capacidade das células responderem a um sinal específico e a determinação é o processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (TREWAVAS, 1981; CHRISTIANSON, 1985; CHAGAS, 2014).

Para o sucesso da micropropagação é necessário um protocolo de desinfestação adequado, explantes que apresentem tecidos meristemáticos e um meio de cultivo que associado

as condições proporcionadas, promova estímulos suficientes para o desenvolvimento da rota morfo genética no tecido vegetal (MORAIS et al., 2012).

A composição do meio de cultura principalmente com uso de reguladores de crescimento, propiciam efeitos intensos sobre a resposta dos explantes nas diferentes fases do cultivo *in vitro*. Além disso, estes são responsáveis pela determinação do desenvolvimento de células, tecidos ou plantas em meio de cultura (SOUZA et al., 2018).

A propagação de plantas por cultivo *in vitro* geralmente é alcançada através das técnicas de organogênese e embriogênese somática, sendo a última, um processo mais complexo de diferenciação, pois é um evento morfo genético no qual uma célula somática tem a capacidade de produzir uma planta inteira sem a fusão de gametas (FEHÉR et al., 2003).

3.2.1 Embriogênese Somática

A embriogênese somática (ES) pode ser descrita como um processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de estruturas similares a embriões zigóticos, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (PINHAL et al., 2011). Esta técnica é importante para plantas lenhosas pois caracteriza-se como ferramenta mais promissora para a propagação clonal massal e rápida. visto que estas plantas que têm um ciclo de vida longo e são difíceis de propagar por métodos convencionais (GUAN et al., 2016).

A embriogênese somática baseia-se na exposição de células ou tecidos de diferentes explantes em concentrações de sais minerais, compostos orgânicos e reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas (OLIVEIRA et al., 2022). Além disso, essa técnica pode ser induzida de maneira direta ou indireta, em que o embrião somático pode ser obtido diretamente do explante (direta) ou desenvolvido a partir de calos (indireta).

A indução de calos *in vitro* é dividida em três etapas: (i) indução na qual há a preparação do tecido isolado com a ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular; (ii) mitose, as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor, normalmente inicia-se nas bordas do explantes, se expandindo para o centro; (iii) desdiferenciação, o tecido perde a sua identidade histológica e as células tornam-se maiores, a taxa de divisão celular diminui e ocorre o equilíbrio entre a divisão e expansão celular (SOUZA et al., 2018).

A técnica da embriogêneses compreende um protocolo com várias etapas: indução, multiplicação, desenvolvimento, maturação, germinação e conversão de plantas. Todas essas etapas são caracterizadas por eventos fisiológicos, morfológicos e moleculares distintos (ZAVATTIERI et al., 2010). Para que se tenha a formação de calos, normalmente é necessário

que ocorra a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo (VIETEZ e SAN-JOSÉ, 1996). Sabe-se ainda que para cada etapa de diferenciação da ES, há a atuação de reguladores de crescimento específicos, como por exemplo as auxinas, que são requeridas principalmente nas fases de indução e multiplicação de embriões somáticos (VONDRÁKOVÁ et al., 2011).

A fase de indução da ES é uma das etapas mais importante do processo, pois é influenciada pelas condições de cultivo, tecidos vegetais utilizados, genótipo e reguladores de crescimento (CHAGAS, 2014). No geral, na maioria dos protocolos de indução da ES, é utilizadas as auxinas sintéticas como por exemplo o 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6- tricloropicolínico) e ANA (ácido naftalenoacético), esses reguladores de crescimento desencadeiam os processos de desdiferenciação e rediferenciação para os modelos indiretos e diretos respectivamente (GUERRA, 1999 Apud CHAGAS, 2014; CHAUDHARY e PRAKASH, 2019). Além disso, a indução de calos pode ser realizada sem adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo de acordo com o trabalho de Marinho et al. (2022) com bacuri.

A multiplicação dos calos pode ser realizada em meio contendo auxinas como por exemplo, meio contendo AIA (Ácido indolacético) (PINHEIRO et al., 2012), ou meios suplementados com combinação de 2,4-D e putrescina (CORRÊA, 2015). A maturação é a fase que se refere ao estágio em que há o prosseguimento da fase inicial dos embriões para a tardia (CHAGAS, 2014). Para essa fase, as principais substâncias utilizadas são o ácido abscísico (ABA); Agentes osmóticos, a exemplo: PEG (polietilenoglicol), carboidratos, hexitois e carvão ativado (CHAGAS, 2014). Na ausência de ABA, a maturação resulta em embriões somáticos pouco desenvolvidos e frequentemente anormais, apresentando baixa capacidade para a germinação e desenvolvimento da planta (DETONI, 2013).

Os embriões somáticos podem ser germinados em diferentes composição meios, que pode ser suplementado com ácido giberélico (GA3) como é observado no trabalho de Nuño et al. (2012) na cultura do *Jarilla heterophylla*, e por Rodrigues et al. (2022) em *Euterpe edulis*, além disso, em diferentes combinações de citocininas e auxinas (SUN et al., 2011), combinação de auxina ANA e poliamina putrecina (CORRÊA, 2015) ou desprovido de reguladores de crescimento como mostrado em trabalhos com *Lactuca sativa* (PINHEIRO et al., 2012). É importante ressaltar que o sucesso de cada etapa é imprescindível para um protocolo eficiente de ES, além de que as concentrações e reguladores de crescimento para cada fase, depende da espécie e explante utilizado.

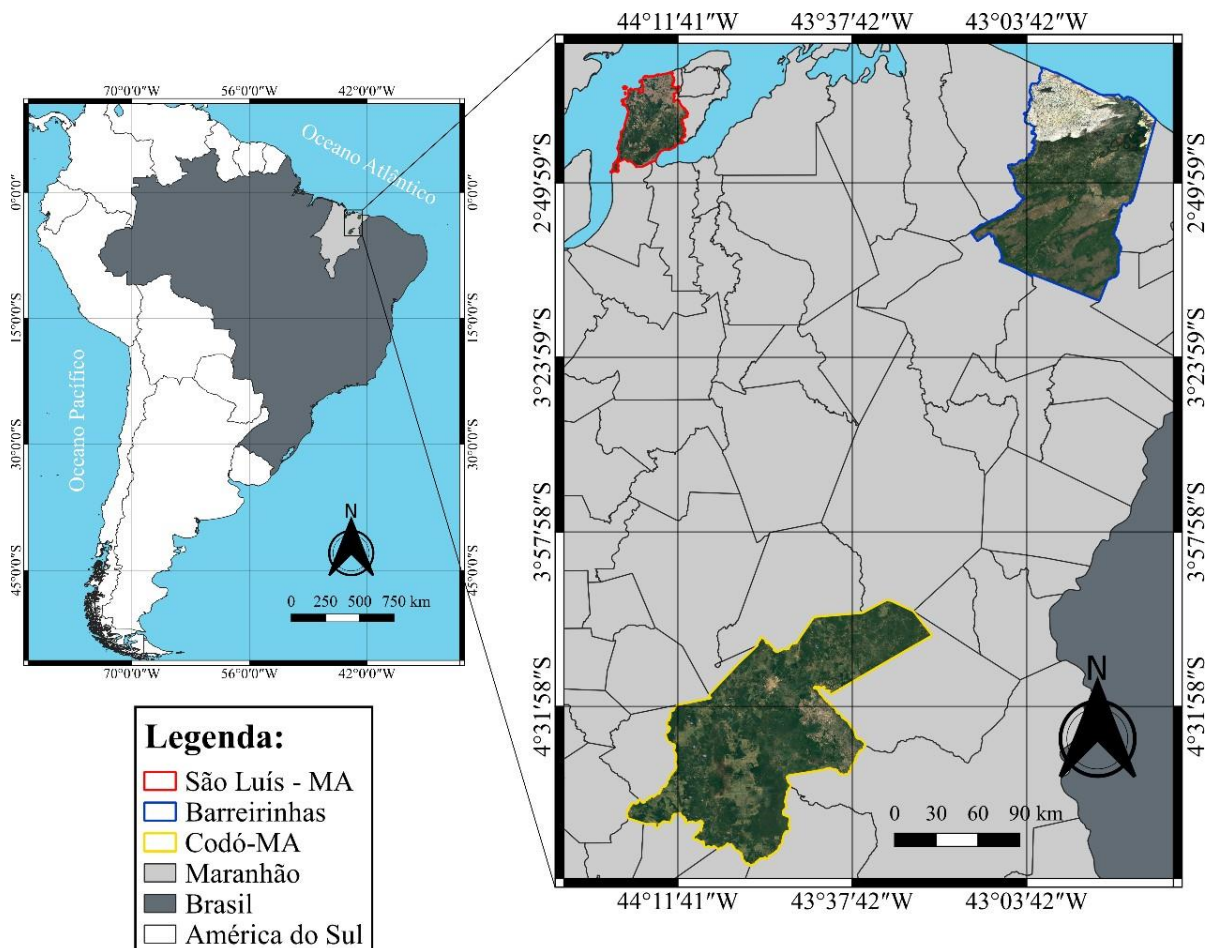
4 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), Campus Paulo VI, São Luís, Maranhão.

4.1 Experimento I

Foram realizados três experimentos iniciais, com flores coletadas em três municípios do estado do Maranhão: Barreirinhas, Codó povoado Bom Jesus e São Luís (Figura 2).

Figura 2 – Mapa da localização das três áreas de coletas de material vegetal em indivíduos arbóreos de bacurizeiro (*Platonia insignis*) nos municípios de São Luís (borda vermelha no mapa), Barreirinhas (borda azul no mapa) e Codó (borda amarela no mapa), Maranhão, Brasil. (Sistema Referente de Coordenadas (SRC): Geográficos, Datum: Sirgas 2000 e Código EPSG: 4674).



Fonte: MORAES (2022)

4.1.2 Estabelecimento *in vitro* e indução da calogênese a partir de flores

As flores usadas nesse experimento tinham um comprimento médio de 2,99 cm, diâmetro médio de 5,5 cm e peso médio de 4,69 g. Em câmara de fluxo laminar, os explantes florais foram imersos em álcool etílico 70% (v/v) por três minutos, seguida da imersão em

hipoclorito de sódio comercial (NaOCl, Qboa®, Osasco, SP, Brasil) (com 2,5% de cloro ativo) acrescido de uma gota de Tween 20® (Isobar Ltda®, Duque de Caxias - RJ) para cada 100 mL de solução, mantendo-os em imersão por 30 minutos (Figura 3 A). Posteriormente, foram enxaguados em água destilada autoclavada por três vezes, com duração de cinco minutos cada lavagem.

Após a desinfestação, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de pinças e bisturis, as flores foram cuidadosamente excisadas em dois cortes verticais e horizontais (Figura 3 B). Os explantes foram inoculados em placas de Petri descartáveis contendo 30 mL⁻¹ de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (PhytoTech®, Lenexa, KS, USA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (ISO FAR®, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ mio-inositol (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), 1 g L⁻¹ de L-glutamina (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil), 1 g L⁻¹ de L-arginina (Inlab®, Vila Campestre, SP, Brasil), 0,5 g L⁻¹ de L-asparagina (Synth®, Diadema, SP, Brasil),), 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (SIGMA® St. Louis, MO, USA) (Figura 3 C), com diferentes concentrações de auxinas constando de dez tratamentos e cinco repetições (Tabela 1).

Todos os meios tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 1,0$ antes da adição do agente gelificante (2,0 g L⁻¹ de Phytigel - Sigma, St. Louis, MO) e foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C durante 15 minutos à 1,5 atm de pressão. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento controlada sob condições de escuro, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 60 dias. Foram realizadas as avaliações oxidação dos explantes (%), indução de calos (%), contaminação (%) e sobrevivência (%) aos 15, 30, 45, 60 DAI (dias após a inoculação).

Figura 3. Instalação do experimento I – (A) Processo de desinfestação das flores, (B) Corte longitudinal do explante, (C) Explantes inoculados em meio de cultura.



Fonte: ALBUQUERQUE (2022)

Tabela 1 – Meios de cultura com diferentes concentrações de auxinas para indução da embriogênese somática de bacurizeiro a partir de explantes florais.

Meio de Cultura
MS sem reguladores de crescimento (controle)
MS + 225,0 µM de ANA
MS + 450,0 µM de ANAMS + 675,0 µM de ANA
MS + 225,0 µM de Picloram
MS + 450,0 µM de Picloram
MS + 675,0 µM de Picloram
MS + 225,0 µM de 2,4-D
MS + 450,0 µM de 2,4-D
MS + 675,0 µM de 2,4-D

4.1.3 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dez meio de cultura (Tabela 1) e cinco repetições. A unidade experimental foi composta por quatro explantes por placa.

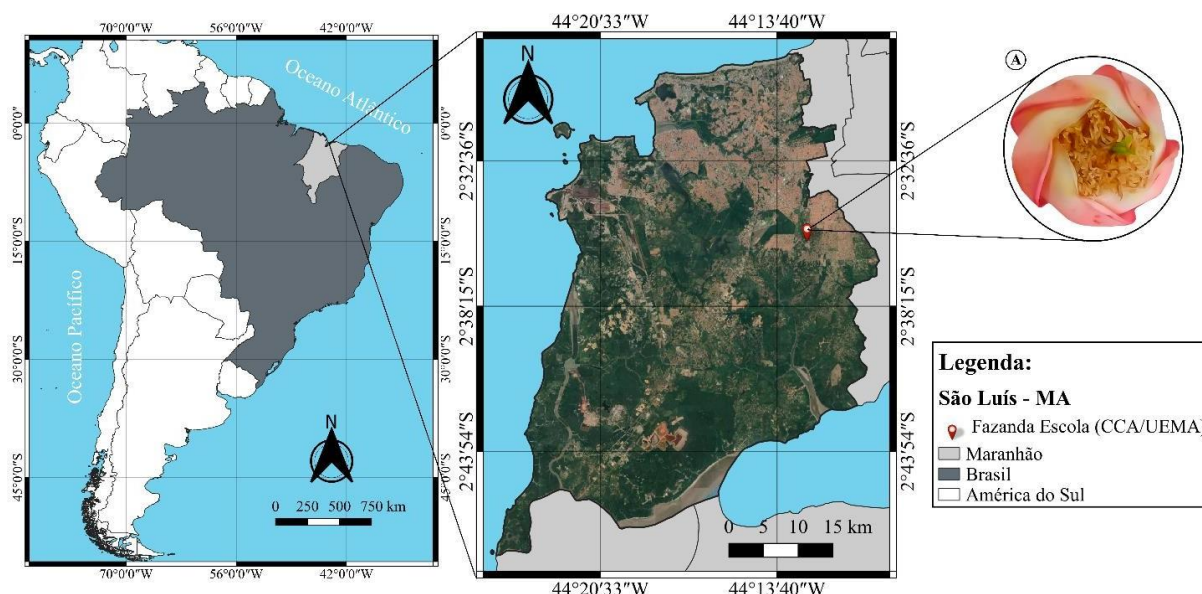
4.2 Experimento II

4.2.1 Coleta do material vegetal

Foram utilizadas como fonte de explantes 50 flores imaturas de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) com comprimento médio de 4,15 cm, diâmetro médio de 2,63 cm, peso médio de 10,60 g, e coloração rosa clara (Figura 5A), provenientes de um indivíduo arbóreo proveniente da Fazenda Escola, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA.

As flores foram acondicionadas em embalagens plásticas e transportadas ao LCT-UEMA. Em seguida, realizou-se a triagem e análise biométrica das flores. Após a triagem, realizou-se a pré-desinfestação das flores por meio de solução de Cercobin® 875 WG (1g L-1) por 16 horas, seguida da lavagem em água corrente por 60 minuto

Figura 4 – Mapas de localização Fazenda Escola, UEMA, São Luís, Maranhão, Brasil (latitude: 2° 35' 8.29" S, longitude: 44° 12' 30.29" W) (Sistema Referente de Coordenadas (SRC): Geográficos, Datum: Sirgas 2000 e Código EPSG: 4674): Mapa a esquerda: localização do Brasil e o estado do Maranhão na América do Sul. Mapa a direita. Mapa de localização da área experimental Fazenda Escola – UEMA.



Fonte: MORAES, 2022

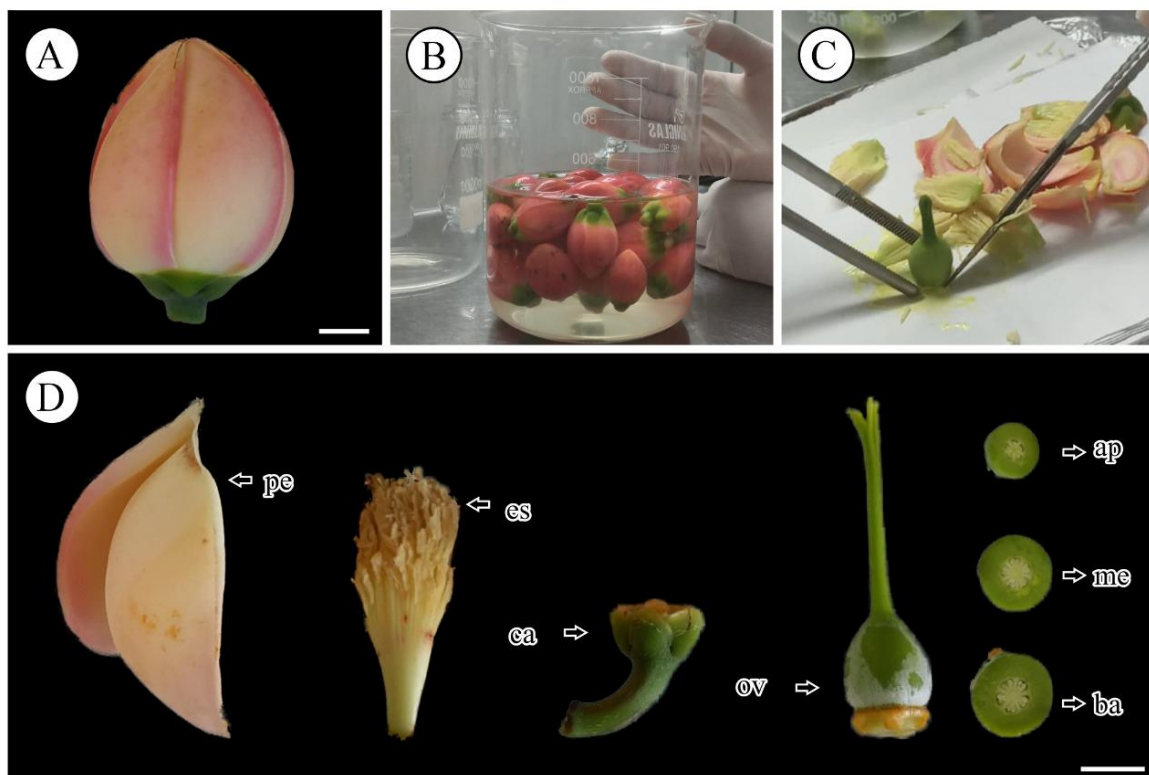
4.2.2 Estabelecimento *in vitro* e indução da calogênese a partir de estruturas florais

Em câmara de fluxo laminar, as flores foram submetidas a desinfestação por meio da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por dois minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO; Qboa®, Osasco, SP, Brasil) na concentração de 2,5% de cloro ativo e acrescido de 1 gota de Tween® 20 para cada 100 mL⁻¹ de solução e 10 mL⁻¹ ácido ascórbico (filtro-estéril) por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem por três vezes em água destilada autoclavada durante 2 minutos para a remoção do resíduo das soluções desinfetantes (Figura 5B).

Ainda em câmara de fluxo laminar, as estruturas florais foram cuidadosamente separadas em cálice, estame, ovário e pétala (Figura 5C e Figura 5D). Após a separação, realizou-se uma segunda desinfestação, onde as estruturas florais foram imersas em álcool etílico 70% (v/v) por um minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl; Qboa®, Osasco, SP, Brasil) a 1% de cloro ativo, acrescido de uma gota de Tween® 20 para cada 100 mL⁻¹ de solução por dois minutos para os estames e ovários, enquanto adotou-se cinco minutos para pétalas e cálices devido serem estruturas florais que permanecem mais expostas em condições de campo. Posteriormente, todas as estruturas foram enxaguadas em tríplice lavagem com água destilada autoclavada com duração de 2 minutos cada lavagem. Após as desinfestações, os explantes foram mantidos em solução de ácido ascórbico estéril (10 mL⁻¹) até o momento de inoculação em meio de cultura.

Após as desinfestações, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de pinças e bisturis, as pétalas foram excisadas em segmentos de aproximadamente 1 cm², os ovários excisados em cortes cilíndricos de aproximadamente 1 cm. (Figura 5D). Os explantes de cálices, estames, ovários e pétalas foram inoculados em placas de Petri descartável 90 x 15 cm (Olen®, São José dos Pinhais -PR, Brasil) contendo 25 mL de meio de cultura MS (PhytoTech®, Lenexa, KS, USA) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (ISO FAR®, Duque de Caxias – RJ, Brasil), 100 mg L⁻¹ mio-inositol (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), 1 g L⁻¹ de L-glutamina (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil), 1 g L⁻¹ de L-arginina (Inlab®, Vila Campestre, SP, Brasil), 0,5 g L⁻¹ de L-asparagina (Synth®, Diadema, SP, Brasil), 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (SIGMA®, St. Louis, MO, USA) e diferentes concentrações de auxinas: ácido naftalenoacético (ANA) (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Phytotech®, Lenexa, KS, USA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), com diferentes concentrações, além de um meio de cultura controle, MS sem adição de reguladores de crescimento (Tabela 1). Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,7 ± 1,0 antes da adição do agente gelificante (2,0 g L⁻¹ de Phytigel® - Sigma, St. Louis, MO) e foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C durante 15 minutos à 1,5 atm de pressão. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento controlada sob condições de escuro, 24±2°C, durante 60 dias. Foram realizadas as avaliações oxidação dos explantes (%), calos (%), contaminação (%) e sobrevivência (%) aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 DAI (dias após a inoculação).

Figura 5 – Representação dos explantes florais do experimento II (A) Flor do bacurizeiro, (B) desinfetação das flores, (C) Separação dos órgãos florais, (D) Estruturas florais, pe = pétala; es = estame; ca = cálice; Ov= ovário; ap= apical; me = mediano; ba = basal.



Fonte: ALBUQUERQUE (2022)

4.2.3 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 10, com quatro tipos de explante: cálice, estame, pétala e ovário e dez meios de culturas (Tabela 1) e cinco repetições. A unidade experimental foi composta por sete explantes dos segmentos de estame, pétala e ovário, enquanto para cálice houve apenas um explante por placa.

4.3 Experimento III

4.3.1 Coleta de material vegetal

Foram utilizadas como fonte de explantes, folhas jovens de bacurizeiro (*P. insignis*) provenientes de uma matriz localizada na Fazenda Escola, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA, Brasil.

As folhas foram acondicionadas em caixa de papelão e levadas ao LCT/UEMA. No LCT, as folhas passaram por pré-lavagem com água e detergente neutro com o auxílio de esponja. Em seguida, as bordas das folhas foram levemente cortadas com tesoura previamente desinfestada em solução de hipoclorito de sódio (NaClO, Qboa®, Osasco, SP, Brasil),

reduzindo a dimensão do explante a fim de aumentar a superfície de contato com o meio de cultura (Figura 6A).

4.3.2 Estabelecimento *in vitro* e indução da calogênese a partir de folhas

Em câmara de fluxo laminar, as folhas foram submetidas ao processo de desinfestação por meio da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por dois minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO; Qboa®, Osasco, SP, Brasil) na concentração de 2,5% de cloro ativo, acrescido de uma gota de Tween® 20 para cada 100 mL⁻¹ de solução e 10 mL⁻¹ de ácido ascórbico estéril por 20 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem por três vezes em água destilada autoclavada durante 2 minutos para a remoção do resíduo das soluções desinfetantes (Figura 6B).

Após a desinfestação, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de pinças e bisturis, as folhas foram excisadas em segmentos de aproximadamente 1 cm² (Figura 6C). Os explantes foliares foram inoculados em placas de Petri descartável 90 x 15 cm (Olen®, São José do Pinhais -PR, Brasil) (Figura 6D) contendo 25 mL de meio de cultura MS (PhytoTech®, Lenexa, KS, USA) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (ISOFAR®, Duque de Caxias – RJ, Brasil), 100 mg L⁻¹ mio-inositol (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), 1 g L⁻¹ de L-glutamina (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil), 1 g L⁻¹ de L-arginina (Inlab®, Vila Campestre, SP, Brasil), 0,5 g L⁻¹ de L-asparagina (Synth®, Diadema, SP, Brasil), 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (SIGMA®, St. Louis, MO, USA) e diferentes concentrações de auxinas, ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Phytotech®, Lenexa, KS, USA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), além de meio de cultura contendo diferentes concentrações de auxinas Picloram e 2,4-D + 6- benzilaminopurina (BAP) (Tabela 2). Todos os meios tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 1,0$ antes da adição do agente gelificante (2 g L⁻¹ de Phytigel - Sigma, St. Louis, MO) e foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C durante 15 minutos à 1,5 atm de pressão. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento controlada sob condições de escuro, $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram realizadas as avaliações oxidação dos explantes (%), calos (%), contaminação (%) e sobrevivência (%) aos 15, 30, 45, 60 DAI (dias após a inoculação).

Figura 6 -Instalação do experimento com explantes foliares. (A) Pré-limpeza com água e detergente neutro, (B) Desinfestação do material em câmara de fluxo laminar, (C) Excisão da folha em tamanho de 1 cm², (D) Inoculação do explante em meio de cultura.



Fonte: ALBUQUERQUE (2022)

Tabela 2 - Meios de cultura com diferentes concentrações de auxinas e combinações de auxinas e citocinina para indução da embriogênese somática de bacurizeiro a partir de explantes foliares.

Meio de Cultura
MS + 400,0 µM de Picloram
MS + 800,0 µM de Picloram
MS + 400,0 µM de 2,4-D
MS + 800,0 µM de 2,4-D
MS + 400,0 µM de Picloram + 10 µM de BAPMS + 800,0 µM de Picloram + 10 µM de BAPMS + 400,0 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP
MS + 800,0 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP

4.3.4 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), constando de oito tratamentos e dez repetições. A unidade experimental foi composta por sete explantes foliares por placa.

4.4 Experimento IV

4.4.1 Coleta de material vegetal

Foram coletadas folhas jovens de bacurizeiro (*P. insignis*) provenientes de uma matriz localizada na Fazenda Escola, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA, Brasil.

As folhas foram acondicionadas em caixa de papelão e levadas ao LCT/UEMA. No LCT, as folhas passaram por pré-lavagem com água e detergente neutro com o auxílio de esponja. Em seguida, as bordas das folhas foram levemente cortadas com tesoura previamente

desinfestada em solução de hipoclorito de sódio (NaClO, Qboa®, Osasco, SP, Brasil), reduzindo a dimensão do explante a fim de aumentar a superfície de contato com o meio de cultura.

4.4.2 Estabelecimento *in vitro* e indução da calogênese a partir de folhas

Em câmara de fluxo laminar, as folhas foram submetidas ao processo de desinfestação, por meio da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por dois minutos, em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) (Qboa®, Osasco, SP, Brasil) (2% de cloro ativo) acrescido de uma gota de Tween® 20 para cada 100 mL⁻¹ de solução por 30 minutos, posteriormente enxaguadas em tríplice lavagem com água destilada autoclavada com duração de 2 minutos cada.

Após a desinfestação, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de pinças e bisturis, as folhas foram excisadas em segmentos de aproximadamente 1 cm². Os explantes foliares foram inoculados em placas de Petri descartável 90 x15 cm (Olen®, São José do Pinhais -PR, Brasil) contendo 25 mL de meio de cultura MS (PhytoTech®, Lenexa, KS, USA) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (ISOFAR®, Duque de Caxias – RJ, Brasil), 100 mg L⁻¹ mio-inositol (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), 1 g L⁻¹ de L-glutamina (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil), 1 g L⁻¹ de L-arginina (Inlab®, Vila Campestre, SP, Brasil), 0,5 g L⁻¹ de L-asparagina (Synth®, Diadema, SP, Brasil), 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (SIGMA®, St. Louis, MO, USA) e diferentes concentrações de auxinas, ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Phytotech®, Lenexa, KS, USA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (SIGMA®, St. Louis, MO, USA), além de meio de cultura contendo diferentes concentrações de auxinas Picloram e 2,4-D + 6- benzilaminopurina (BAP) (Tabela 2). Todos os meios tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 1,0$ antes da adição do agente gelificante (2 g L⁻¹ de Phytigel - Sigma, St. Louis, MO) e foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C durante 15 minutos à 1,5 atm de pressão. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento controlada sob condições de escuro, $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram realizadas as avaliações oxidação dos explantes (%), calos (%), contaminação (%) e sobrevivência (%) aos 15, 30, 45, 60 DAI (dias após a inoculação).

4.4.3 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), constando de oito tratamentos e dez repetições. A unidade experimental foi composta por sete explantes foliares por placa.

4.5 Análise Estatística

Os dados dos experimentos I, II, III e IV foram submetidos à análise de variância e quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas pelo software SISVAR® (Ferreira, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento I

Houve elevada infestação de microrganismos associados aos explantes florais de bacurizeiro, impossibilitando avaliar a potencial responsividade para formação de calos nos meios de cultivos testados sob diversas concentrações de reguladores. Possivelmente, essas respostas estejam relacionadas com o protocolo utilizado na etapa de desinfestação. Além disso, o estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes do campo é outro fator que afeta diretamente o nível de contaminação devido ao elevado grau de associações de diversos microrganismos com a plantas matriz.

Por fim, ressalta-se que a partir desses resultados foram determinadas novas estratégias de assepsia dos explantes conforme descrito no Experimento II.

5.2 Experimento II

A partir da análise de variância, foi possível observar que houve diferença significativa na interação entre os fatores explantes e meios de cultura ($P < 0,05$) somente para a variável oxidação. Contudo, ao analisar os fatores de forma isolada, os meios de cultura evidenciaram diferença significativa apenas para os explantes de ovários em relação a indução de calos enquanto para o tipo de explante, houve diferença significativa no percentual de contaminação e sobrevivência aos 60 DAI.

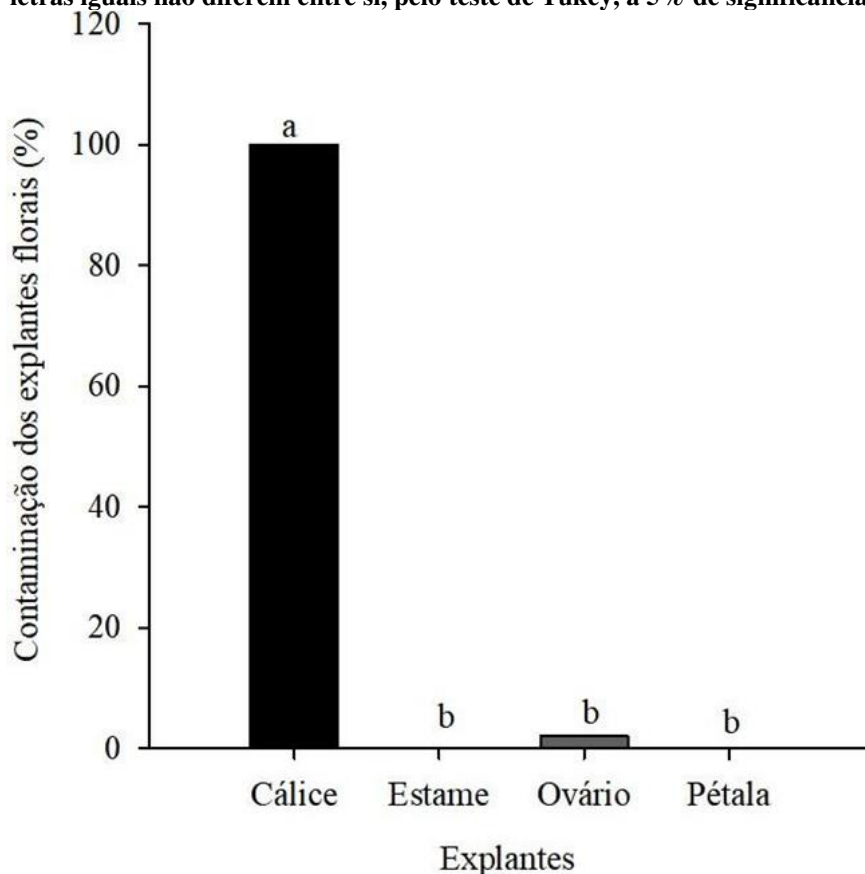
Os explantes de pétalas não apresentaram contaminação e oxidação, no entanto, também não foram responsivos a nenhum dos tratamentos. Os resultados observados, demonstram que a pétala da flor do bacurizeiro é um explante que aparentemente não permite a expressão da totipotencialidade em altas concentrações de auxinas sintéticas. A totipotência celular é a capacidade que uma célula vegetal possui de se dividir e produzir células diferenciadas em um organismo, incluindo tecidos extraembrionários (SEYDOUX e BRAUN, 2006; CARDOSO, 2018).

Ademais, os tecidos meristemáticos podem perder a capacidade de formação de novas células, o que pode acontecer tanto pela diferenciação de suas células-tronco em estruturas especializadas como pela parada do seu desenvolvimento vegetal, assim, esses tecidos vegetais podem ser chamados de determinados e indeterminados em função da atividade meristemáticas típicas de órgãos em crescimento (RODRIGUES e KERBAUY, 2009). Os meristemas determinados possuem um programa genético que desencadeia a parada da produção de novas células em um estágio específico do desenvolvimento, esse tipo de meristema é comumente

responsável pela formação de órgão com tamanho e forma definido (SABLOWSKI, 2007; RODRIGUES e KERBAUY, 2009) portanto, menor será sua responsividade aos estímulos *in vitro*.

Para o percentual de contaminação, foi observado que o explante de cálice apresentou maior contaminação (Figura 7), alcançando um percentual de 100%. A fase de estabelecimento *in vitro* é caracterizada por apresentar maior dificuldade na cultura de tecidos, pois é necessário o desenvolvimento de um protocolo que atenda a obtenção de explantes sem contaminação e, ao mesmo tempo, não resulte na morte do tecido vegetal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PINHAL et al., 2011). No geral, um fator limitante dessa fase é o problema de contaminação, causadas por bactérias endógenas apresentado pelos meristemas oriundos de plantas adultas (SILVA et al., 2011). Ainda, os explantes extraídos de plantas matrizes provenientes do campo têm tendência a manifestar maiores níveis de contaminação (SANTOS et al., 2015).

Figura 7 – Contaminação de explantes florais de bacurizeiro (*P. insignis* Mart). * Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

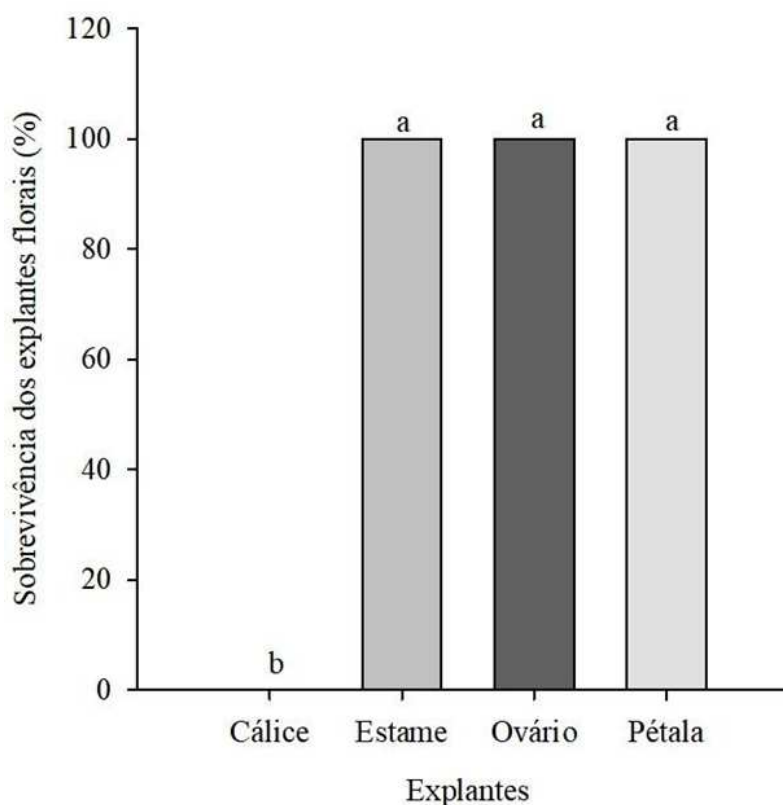


Os explantes cálice apresentaram contaminações endógenas, e mesmo após uma pré-desinfestação com fungicida Cercobin® 875 WG, continuaram apresentando contaminações fúngicas e bacterianas. Esse resultado sugere que em experimentos futuros poderia ser pensado

em uma estratégia de testar um tratamento com combinação entre bactericida + fungicida nas plantas ainda em campo, alguns dias antes da coleta do material, a fim de potencializar o controle de agentes contaminantes no processo *in vitro*. Malysz et al. (2011) realizaram testes de descontaminação com explantes de gema apical e gemas laterais de *Eucalyptus dunnii* aos 60 dias antes dos explantes serem coletados, e observaram que *in vitro*, os explantes sem tratamento prévio com bactericida + fungicida foram insatisfatórios, contaminando todos os explantes, contudo, o bactericida + fungicida aumentaram o índice de explantes assépticos e vivos em 91,7%.

Devido a elevada contaminação, o explante cálice teve seu desenvolvimento impedido, consequente não apresentou significância quanto a sobrevivência (%) (Figura 8). As contaminações microbianas, especialmente por fungos e bactérias, de explantes *in vitro*, é um dos principais problemas encontrados e pode ser intensificado pela natureza endofítica dos contaminantes (ANDRADE et al., 2002; FARIA, 2012). Esses microrganismos impedem o desenvolvimento do explante, tanto pela competição pelos nutrientes do meio de cultura, quanto pela liberação de compostos tóxicos no meio de cultura durante o aumento das colônias (SMITH, 2000; FARIA, 2012). Por esse motivo, houve de descarte desses materiais ao apresentarem contaminações.

Figura 8 – Sobrevivência de explantes florais de bacurizeiro (*P. insignis* Mart) aos 60 DAI. * Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.



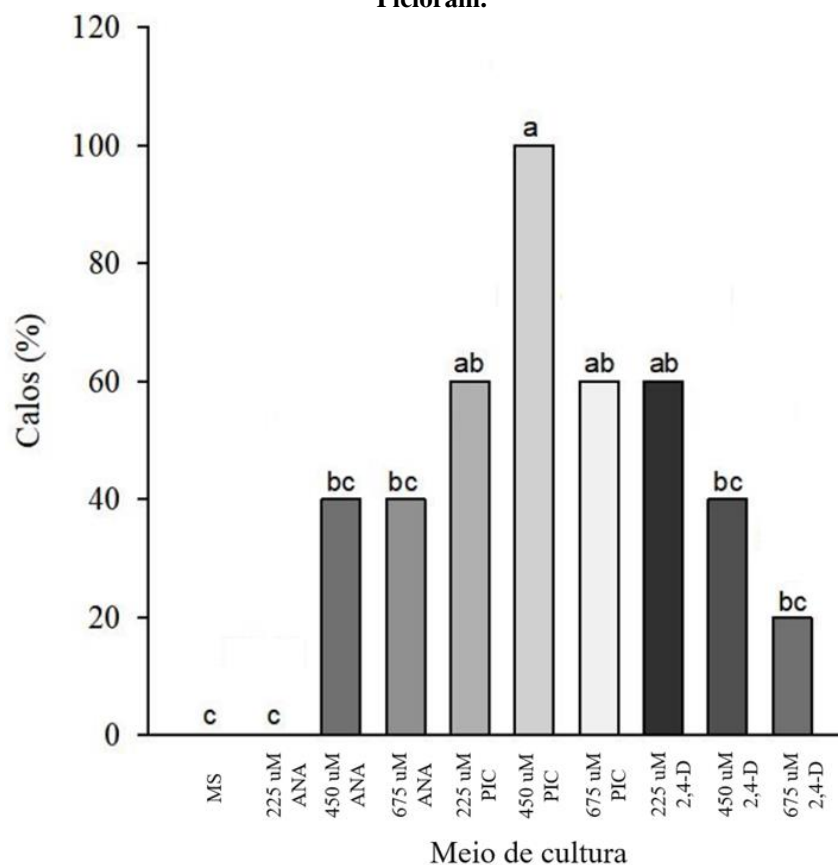
Para a variável oxidação, foi possível observar que os explantes de estame e de ovário foram os únicos a manifestarem. Além disso, entre ambos, os explantes de ovário foram significativamente superior em todos os tratamentos. Quando observamos os explantes de forma individual, percebemos que para os explantes de ovário, o tratamento 8 (MS + 225,0 μ M de 2,4-D) foi significativamente superior, alcançando 80% de oxidação, enquanto os explantes de estame não diferiram significativamente entre si, e apresentaram 25% de oxidação.

Dentre os principais aspectos que deve ser considerado no momento da propagação *in vitro* de plantas, é a sanidade que será alcançada com aquele explante, contudo, diversos problemas podem ser encontrados na multiplicação *in vitro*, conforme exemplificado pela oxidação, propiciada principalmente pelos compostos fenólicos liberados na forma de exsudatos em plantas lenhosas (GONÇALVES et al., 2013). A oxidação decorre da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, quando o tecido está injuriado. O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, alteram a composição do meio de cultura e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000; GONÇALVES et al., 2013).

As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário, os quais exercem importante papel no metabolismo destas espécies, bem como na defesa contra predadores e microrganismos (GONÇALVES et al., 2013). O bacurizeiro em campo quando lesionado apresenta exsudato de coloração amarela (LOUREIRO et al., 1979 Apud GARCIA, 2021). No presente trabalho, esse exsudado foi observado em todas os explantes florais do bacuri quando manipuladas em laboratório para o cultivo *in vitro*, alguns explantes quando individualizados, apresentaram mais resina que outros, geralmente os que foram segmentados mais vezes, como os oriundos dos ovários, a liberação desse composto pode ter influenciado a maior oxidação desses explantes.

As plantas apresentam milhares de células somáticas, no entanto, o processo da embriogênese somática depende da proliferação de tecidos vegetais embriogênicos, que muitas vezes, são derivados de um material inicial especializado, como embriões imaturos, tecido gametofítico, partes de flores ou tecidos meristemáticos excisados (ELHITI et al., 2013; FEHER, 2015; SHIRES et al., 2017). No caso, dos explantes oriundos de flor, os explantes de ovário foram os únicos a apresentarem percentual de calos (Figura 9). Nestes explantes, os meios de cultura MS com as concentrações de Picloram foram significativamente superiores ao demais meios testados para a indução de calos, enquanto o meio MS (controle) e MS + 225,0 μ M de ANA) não apresentaram calos (0%).

Figura 8 – Percentual de calos oriundos de explantes do ovário da flor de bacurizeiro (*P.insignis*). * Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. PIC: Picloram.



O resultado observado para explantes de ovário de bacurizeiro, demonstraram que o picloram tem alto potencial para a indução de calos em explantes de ovário de *P. insignis*, como observado em materiais nos meios de cultura MS + 225,0 μ M de Picloram, MS + 450,0 μ M de Picloram e MS + 675,0 μ M de Picloram com percentual de calos de 60, 100 e 60%, respectivamente. Além disso, o meio com concentração de 225,0 μ M de 2,4-D também foi significativo para variável.

Outros autores conseguiram resultados promissores com outras espécies usando essas auxinas, como Oliveira et al (2022) tiveram alta indução de calos usando diferentes concentrações de auxinas 2,4-D e Picloram em explantes de *E. edullis* palms provenientes de embriões zigóticos imaturos, nesta pesquisa foi demonstrado que calos induzidos com maiores concentrações de Picloram (300 μ M) induziram calos com potencial embriogênicos, enquanto para 2,4-D as menores concentrações (150 μ M) induziram calos com potencial embriogênicos.

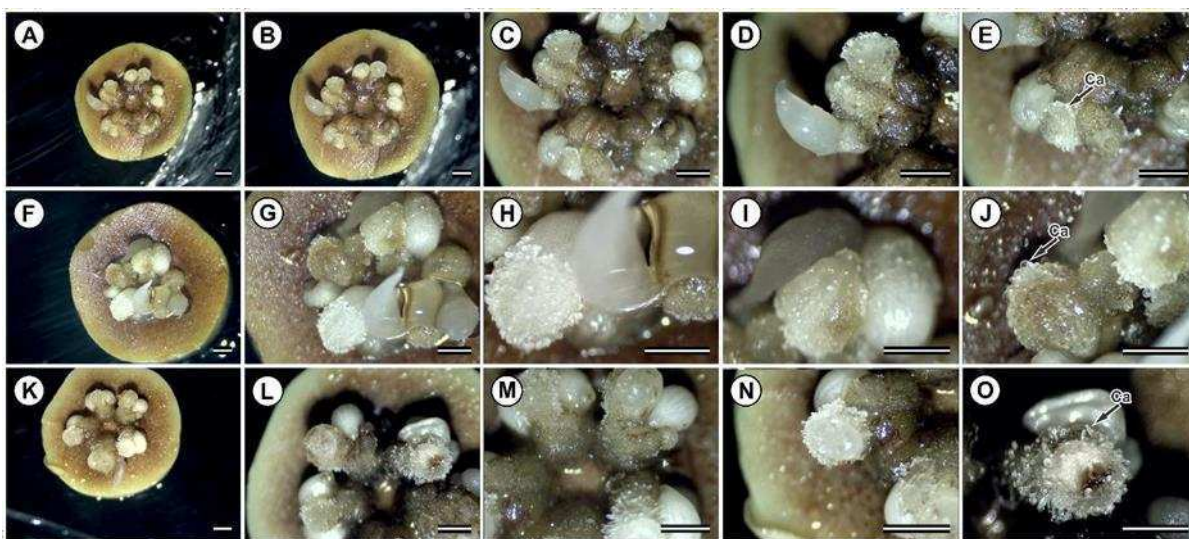
Em trabalho para testar a indução de calos em explantes de embrião zigótico imaturo de *Carica papaya* var. P-7-9 Chaudhary e Prakash (2019), os autores utilizaram meios de cultura adicionados de 2,4-D e picloram em baixas concentrações (0, 5, 6, e 7 mg L⁻¹), os quais demonstraram que o 2,4-D e o picloram podem induzir calos embriogênicos, porém o 2,4-D

7,0 mg L⁻¹ foi o mais responsivo em comparação com as outras concentrações e auxina, com uma taxa de 80% de indução de calos. Esses estudos demonstraram o potencial das auxinas utilizadas nesse trabalho para a indução de calos, porém cada espécie pode responder de maneira diferente, portanto, são necessários estudos morfoanatômicos para comprovar se os calos são embriogênicos ou não embriogênicos.

No protocolo testado para a embriogênese somática a partir das flores apresentou o melhor desempenho na indução de calos foi obtido pela auxina sintética picloram na concentração de 450,0 µM, estes resultados podem contribuir com o processo de propagação em larga escala dessa espécie.

Os calos observados nos explantes de ovário apresentaram coloração transparente, em calos de ovário em meio com picloram, foi percebido um calo mais arredondado (Figura 10-J), enquanto para calos em meio contendo 2,4-D o calo estava mais alongado (Figura 10K-O), e há necessidade de testes morfoanatômicos para identificar se possuem caráter embriogênico.

Figura 10 – Calos em explantes de ovário da flor do bacurizeiro. (A – E) Calos de explantes de ovário de flores bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart) aos 30 DAI. Calos mantido no tratamento 5 (MS + 225,0 µM de Picloram, (F – J) Calos mantidos no tratamento 6 (MS + 450,0 µM de Picloram) e (K – O) Calos mantidos no tratamento 8 (MS + 225,0 µM de 2,4-D). A barra de escala representa 0,1 mm. Ca: calo.



Fonte: ALBUQUERQUE (2022)

As avaliações, dentre os períodos de 60 aos 105 DAI, demonstraram que os explantes de ovário sofreram contaminações, que por sua vez ocorreram após os subcultivos, o que possivelmente aconteceu pela manipulação durante as avaliações.

5.3 Experimentos III e IV

Os explantes foliares não foram submetidos a estatística por contaminarem 100 % na primeira semana após a inoculação, em ambos os testes de desinfestação.

Esses resultados diferem dos observados por SANTOS et al (2015), que ao utilizarem explantes foliares de bacurizeiro obtiveram 100% de descontaminação ao utilizarem concentrações 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 1,25%, 2,50%, 5,0%, 10,0% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos.

6 CONCLUSÃO

O explante de flor ovário apresentou elevado potencial para indução de calogênese, assim, faz-se necessário aprimorar os estudos para a calogênese a partir de explantes ovário, e determinar qual o tamanho ideal do ovário para se induzir calos com mais eficiência. Neste sentido, baseado nos resultados deste projeto, recomenda-se usar os meios de cultura que apresentaram maior potencial de calogênese (225 μM , 450 μM e 675 μM de Picloram; 225 μM de 2,4-D) em ovários.

Embora não tenha sido possível desenvolver um protocolo eficiente para a desinfestação dos explantes foliares nas condições testadas, tais resultados direcionam novas pesquisas em que sejam avaliadas folhas provenientes de plantas estabelecidas *in vitro*, o que eliminaria as contaminações encontradas neste estudo, como também testar novos protocolos de descontaminação com uso de outros reagentes como o hipoclorito de cálcio ou usar medidas preventivas ainda nas plantas em campo, tais como a aplicação de fungicidas e bactericidas, para a redução das contaminações *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. V. de; RIVAS, E. B.; CARDOSO, J.C. Somatic embryogenesis from flower tepals of *Hippeastrum* aiming regeneration of virus-free plants. **Plant Science**. v. 317, n. 111191.p.8. 2022.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Cerrados. 1. ed. Planaltina-DF, n. 58, p.16, 2002.
- ARAÚJO, E. C. E.; VASCONCELOS, L. F.; ALVES, R. E.; SOUZA, V. A. B. de. *Platonia insignis* – Bacuri in: Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro. Brasília, DF. **Serie Biodiversidade**. p. 245-261, 2018. Disponível em < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189688/1/Livro-Nordeste-1-2018.pdf>>. Acesso em: 13 dez 2022.
- BARIGAH, T.S.; IMBERT, P.; HUC, R. Croissance et assimilation nette foliaire de jeunes plants de dix arbres de la forêt guyanaise, cultivés à cinq niveaux d'éclairément. **Annales des sciences forestières**, v. 55, n. 6, p. 681-706. 1998.
- BEZERRA, E. A.; ALVES, M. M. de M.; LIMA, S. K. R.; PINHEIRO, E. E. A.; AMORIM, L. V.; LIMA NETO, J. de S.; CARVALHO, F. A. de A. CITÓ, A. M. das G. L. Biflavones from *Platonia insignis* Mart. Flowers Promote *In Vitro* Antileishmanial and Immunomodulatory Effects against Internalized Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. **Pathogens**, v. 10. 2021.
- BOTELHO, M. G. L.; HOMMA, A. K. O.; FURTADO, L. G.; LIMA, M. do C. S.; COSTA, M. do S. Potencial produtivo e de mercado do fruto de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) no Pará, Brasil. **Society and Development**, v. 9, n. 7, 2020.
- CARDOSO, I. M. de A. S. **Embriogênese somática de gueroba (*Syagrus oleracea* Mart. Becc) com ênfase em aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais**. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasília - DF. p. 359, 2018.
- CARVALHO, J. E. U. de.; HOMMA, A. K. O.; NASCIMENTO, W. M. O. *Platonia insignis* – Bacuri in: Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial. Brasília, DF. **Serie Biodiversidade**. p. 424-449, 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/manejo-e-uso-sustentavel/flora>>. Acesso em: 13 dez 2022.
- CARVALHO, J. E. U. de.; MULLER, C. H. Propagação do bacurizeiro. In: LIMA, M. C. da. Bacuri Agrobiodiversidade. São Luís – MA. Ed. **Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura**, p. 29-46, 2007.
- CARVALHO, J. E. U. de.; NASCIMENTO, W. M. O. do. BACURI (*Platonia insignis*). **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)**. p. 30, 2018
- CARVALHO, J. E. U. de.; NASCIMENTO, W. M. O. do. Técnicas para a propagação do bacurizeiro por semeadura direta no campo. (**Comunicado técnico, 298**). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, p. 08, 2018.

CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; LEÃO, N. V. M. Cronologia de eventos morfológicos associados à germinação e sensibilidade ao dessecamento em sementes de bacuri (*Platonia insignis* Mart. – Clusiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 475-479, 1998.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6.ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 279. 1996.

CHAGAS, K. **Maturação e germinação de embriões somáticos do mamoeiro ‘Golden THB’**. Dissertação. Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo. São Matheus – ES. p. 54, 2014.

CHAUDHARY, K.; PRAKASH, J. Effect of 2, 4-D and Picloram on Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* var. P-7-9. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 25–32, 2019. Disponível em: <https://www.banglajol.info/index.php/PTCB/article/view/41976>. Acesso em: 24 Ago. 2022.

CHRISTIANSON, M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. *In*: HENKE, R. R., HUGHES, K. W., CONSTATIN, M. J., HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p.83 - 103.

CORRÊA, T. R. **Clonagem e controle genético da embriogênese somática em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Tese. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. p. 58, 2014.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G. de.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; CAVALCANTE, R. M. F.; SPEROTTO, A. R. M.; PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SAFFI, J. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 1, p. 34–41, 2013.

DETONI, J. L. **Embriogênese somática em mamoeiro seleção ‘THB’**. Dissertação. Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo. São Matheus – ES. p. 78, 2013.

FARIA, P. R. **Isolamento de bactérias endofíticas e estabelecimento *in vitro* de diferentes genótipos de cana-de-açúcar**. Dissertação. Universidade Federal de Goiás, Goiás. p. 82. 2012

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2019

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D.; Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 74:201–228. 2003.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 6, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GARCIA, C. B. **Genômica populacional do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart)**. Dissertação. Escola Superior de Agricultura – USP. Piracicaba. São Paulo. p. 56. 2021.

GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas.** Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS. p. 96, 2007.

GONÇALVES, T. S. et al. **Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L.** 5ª Jornada Científica e Tecnológica e 2º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS 06 a 09 de novembro de 2013, Inconfidentes-MG. Disponível em: <<https://jornada.ifsuldeminas.edu.br/index.php/jcinc/jcinc/paper/viewFile/266/119>>. Acesso em 16 agosto. 2022.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa. v. 1, p.99-169, 1998.

GUAN Y; LI S.G; FAN X.F; SU Z.H. Aplicação da embriogênese somática em plantas lenhosas. **Frontiers in Plant Science**, 2016.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CBAB, v.2. p. 533- 568, 1999.

GUIMARÃES, A.D.S.; MOTA, M.G. da C.; NAZARE, R.F.R. de. Coleta de germoplas.a de bacuri (*Platonia insignis*) na Amazônia I. Microrregião Campos do Marajó (Soure/Salvaterra). Belém: EMBRAPA-CPATU. **Boletim de Pesquisa**, p. 23, 1993.

HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A.; CARVALHO, J. E. U.; MATOS, G. B. Manejo e plantio de bacurizeiros (*Platonia insignis* Mart.): a experiência no manejo e domesticação de um recurso da biodiversidade amazônica. **Inclusão Social**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 48-57, 2018.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6617#resultado>>. Acesso em:01 de dezembro de 2022.

LINDOSO, J. V. dos S.; ALENCAR, S. R.; SANTOS, A. A. dos.; MELLO NETO, R. S; MENDES, A. V. da S.; FURTADO, M. M.; SILVA, M. G. da.; BRITO, A. K. da S.; BATISTA, E. K. F.; BAËTA, S. de A. F.; NUNES, P. H. M.; LUCARINI, M. DURAZZO, A>; ARCANJO, D. D. R.; MARTINS, M. do C. de C. Effects of “Bacuri” Seed Butter (*Platonia insignis* Mart.), a Brazilian Amazon Fruit, on Oxidative Stress and Diabetes Mellitus-Related Parameters in STZ-Diabetic Rats. **Biology**. v. 11, ed. 4 p. 562, 2022.

LOCH, V. do C. **Impactos do manejo do bacuri (*Platonia insignis* MART.) na estrutura da vegetação de Cerrado Stricto Sensu na reserva extrativista Chapada Limpa, Chapadinha/MA.** Dissertação. Universidade Estadual do Maranhão, São Luís – MA. São Luís, 2013.

MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSII, A. J. M. Desinfestação e Micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Perspectiva**, Erechim. v.35, n.131, p. 69-77. 2011.

MARINHO, T. R. dos S.; CORRÊA, T. R.; VIEIRA, K. da S.; ALBUQUERQUE, I. S.; ALVES, G. L.; PINHEIRO, M.V.M.; REIS, F. de O.; FIGUEIREDO, F. A.M. de A. ARAÚJO, J. R.G.; FERRAZ, T. M. Genetic variability during *in vitro* establishment of bacurizeiro

(*Platonia insignis* Mart.): na Amazon species. **Australian Journal of Crop Science**. v. 16, n. 6, p. 819-825, 2022.

MATOS, G. B de. **Valorização de produtos florestais não madeireiros: o manejo de bacurizeiros (*Platonia insignis* mart.) nativos das mesorregiões do nordeste paraense e do marajó**. Dissertação, UFP - Belém, 2008.

MAUÉS, M. M.; VENTURIERI, G. C. Ecologia da polinização do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) Clusiaceae. Embrapa-CPATU. **Boletim de Pesquisa**, Belém - PA. p. 24, 1996.

MENEZES, A. J. A. de; HOMMA, A. K. O; SCHOFFEL, E. R. **Do Extrativismo à domesticação: O caso do Bacurizeiro no Nordeste paraense e na ilha de Marajó**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém -PA. 1ª Ed. p. 66, 2012.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** [online]. v. 14, n. p. 110-121, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000100016>>. Acesso em 25 dez 2022.

MOURÃO, K. S. M. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (*Clusiaceae*). I. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento. **Acta Amazônica**, p.11-14, 1995.

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

NOGUEIRA, R. C. PAIVA, R. OLIVEIRA, L. M. SOARES, G. de A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P; D. de O. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NUÑO-AYALA, A.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; GUTIÉRREZ-MORA, A. Somatic embryogenesis in *Jarilla heterophylla* (Caricaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 33–39, 2012.

OLIVEIRA, L. B.; MELLO, T. de.; ARAUJO, C. P. de.; OLIVEIRA, J. P. B. de O. FERREIRA, A.; ZANARDO, T. É. C.; VIEIRA, L. M. OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. 299. 2022.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. 2 ed., Museu Paraense Emilio Goeldi, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, Belém – PA, 2009.

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

PINHEIRO, M. V. M.; SILVA, T. C. R. da; MAIA, C.; LIMA, B. V.; MOTOIKE, S. Y. Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática. **Ciência Rural**, v. 42, n. 11, p. 1947-1953, 2012

RODRIGUES, E.C.F.; HOMMA, A.K.O.; KATO, O.R.; MENEZES, A.J.E.A. Produção e comercialização de frutos de bacuri por pequenos produtores na Amazônia Paraense. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Embrapa Amazônia Oriental, p.36. 2021.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **HOEHNEA**. [online]. v. 36, n. 4, p. 525-550, 2009. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/hoehnea/a/ggS6wFBpkHLYJ9FNPJZz6Sd/?lang=pt#>>. Acesso em: 24 ago. 2022.

RUFINO, M. do S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. Tese, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. – Mossoró-RN, p. 237, 2008.

SANTOS, M. R. A.; CHAGAS, S. E. S.; GUIMARÃES, M. C. M. Estabelecimento de Protocolo para Descontaminação de Explantes Foliares de Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Revista Saber Científico**, Porto Velho, v. 4, n. 2, p. 10 – 16. 2015.

SARAIVA, R. V. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; GIRNOS, E. C. Floral and vegetative SEYDOUX, G.; BRAUN, R. E. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. **Cell**, v. 127, p. 891-904, 2006.

SHIRES, M. E.; FLORES, S. L.; CURTIS, W. R. Inducible somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* achieved using the DEX-activatebla transcription factor-glucocorticoid receptor fusion. **Biotechnol Lett**, v. 39, p. 1747-1755. 2017.

SILVA, A. S.; LEMOS, O. F., COSTA, L. de C. da; RODRIGUES, S. de M. Estabelecimento *in vitro* de cultura de meristema de cultivares de pimenta-do-reino. 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa. Embrapa Amazônia Oriental, Belém. 2011. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/899689/1/ArianeFINAL.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SILVA, R. G.; CHAVES, M. da C. L.; ARNHOLD, E. CRUZ, C. D. Repetibilidade e correlações fenotípicas de caracteres do fruto de bacuri no Estado do Maranhão. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 587-591, 2009.

SINIMBÚ NETO, F. de A. **Germinação *in vitro* de grãos de pólen de bacuri (*Platonia insignis* Mart.)** – Clusiaceae. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. São Paulo -SP. p. 65. 2010.

SMITH, J. **Micro-propagation of the Gynea Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Kingston: RIRDC, p. 59 2000.

SOUMARE, A.; DIÉDHIOU, A. G.; ARORA, N. K.; AL-ANI, L. K. T.; NGOM, M.; FALL, S.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y.; KOUISNI, L.; SY, M. O. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

SOUZA, J. C. de; RESCAROLLI, C. L. de S.; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

SOUZA, V. A. B.; VASCONCELOS, L. F. L.; ARAÚJO, E. C. E.; ALVES, R. E. Recursos genéticos do bacurizeiro na meio-norte do Brasil. In: LIMA, M. da C. BACURI: Agrobiodiversidade. Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. p. 210, 2007.

SOUZA, V. A. B.; VASCONCELOS, L. F. L.; ARAÚJO, E. C. E.; ALVES, R.E. Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart) (**série frutas nativas**) Jaboticabal: FUNEP, p. 72, 2000.

SUN, D-Q.; LU, X.-H.; LIANG, G-L.; GUO, Q-G.; MO, Y-W.; XIE, J.-H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, n. 1, p. 23-29, 2011

TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? *Plant, Cell and Environment*, v. 4, p. 203-228, 1981.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, Wallingford, v. 32, p. 140-147, 1996.

VONDRÁKOVÁ, Z.; ELIÁŠOVÁ, K.; FISCHEROVÁ, L.; VÁGNER, M. The role of auxins morphometrics of three *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) populations, a native tree from the Brazilian Amazon. *Plant Biosystems*, v.148, p.1-9, 2013.

YAMAGUCHI, K.K.L.; DIAS, D. S.; LAMARÃO, C. V.; CASTELO, K. F. A.; LIMA, M. S.; ANTONIO, A. S.; CONVERTI, A.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazonian Bacuri (*Platonia insignis* Mart.) Fruit Waste Valorisation Using Response Surface Methodology. *Biomolecules*, v. 11, n.12, 2021.

ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLD-TSCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 1, 1-9, 2010.