



**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE  
*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P.Queiroz SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES E COMBINAÇÕES DE REGULADORES DE  
CRESCIMENTO E FONTES LUMINOSAS**

**MATHEUS DA ROCHA UCHÔA DE PAULA**

Manaus - AM

2019



**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE  
*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES E COMBINAÇÕES DE REGULADORES DE  
CRESCIMENTO E FONTES LUMINOSAS**

Monografia apresentada ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do grau de licenciado.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Astrid Rocha Liberato

**Co-orientador:** Dr. Daniel da Silva

Manaus - AM

2019

### **Ficha Catalográfica**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

278r de Paula, Matheus da Rocha Uchôa  
Regeneração in vitro de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* (Mart. ex tul.) L.P. Queiroz sob diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento e fontes luminosas. / Matheus da Rocha Uchôa de Paula.  
Manaus : [s.n], 2019.  
28 f.: color.; 7 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura  
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Dra. Maria Astrid Rocha Liberato

Coorientador: Dr. Daniel da Silva

1. Citocininas. 2. Auxinas. 3. Segmentos nodais. I. Dra. Maria Astrid Rocha Liberato (Orient.). II. Dr. Daniel da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Regeneração in vitro de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* (Mart. ex tul.) L.P. Queiroz sob diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento e fontes luminosas.



**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE  
*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P.Queiroz SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES E COMBINAÇÕES DE REGULADORES DE  
CRESCIMENTO E FONTES LUMINOSAS**

Monografia apresentada ao Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do grau de licenciado.

Aprovado em: 13/11/2019

**BANCA EXAMINADORA**

Angela M. Imakawa

Daniel da Silva

Katell Aguiar

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.....	19
TABELA 2.....	20
TABELA 3.....	22
TABELA 4.....	23

## LISTA DE SIGLAS

INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
IBA	Ácido 3-indol-butírico
KIN	Cinetina
MS	Meio de cultura (MURASHIGE & SKOOG 1962)
TDZ	Tidiazurona
UEA	Universidade do Estado do Amazonas.

Dedico este trabalho aos jovens estudantes que batalham todos os dias para mudar suas vidas e realizar seus sonhos. Que o conhecimento gerado por estes seja utilizado em prol de um mundo melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela oportunidade de trabalhar em suas instalações para o desenvolvimento deste estudo.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA) por me fornecer uma educação de ensino superior de qualidade e por me mostrar que a área de atuação de um biólogo é muito mais ampla do que eu imaginava quando iniciei a graduação.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LASTED/INPA) por me ajudarem nas horas boas e ruins, por me orientarem durante o desenvolvimento deste projeto, por me auxiliarem nas etapas difíceis que senti dificuldade e por me ensinarem a trabalhar de forma ética e profissional em um laboratório de renome internacional.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Maria Astrid Liberato por me orientar de forma exemplar durante todas as etapas da produção do meu TCC, por apontar meus erros visando meu desenvolvimento acadêmico-profissional, por me instigar a desenvolver meu próprio conhecimento de forma autônoma e independente, por contornar meus acidentes de percurso no laboratório e por me possibilitar uma experiência positiva e engrandecedora no meio acadêmico-científico.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr. Daniel da Silva, por me orientar e me auxiliar em todas as etapas práticas do projeto, por me ensinar sobre as boas práticas laboratoriais bem como as responsabilidades de se trabalhar em um laboratório de cultura de tecidos.

Agradeço aos meus pais, Ilmar Altino Uchôa de Paula e Nilda França da Rocha Paula, por estimularem meus sonhos, por me incentivarem a nunca desistir, por cederem seu tempo, paciência e sanidade para que pudesse cumprir minhas obrigações para com a faculdade e por sempre se esforçarem e em me ajudar nos momentos difíceis.



Agradeço a minha irmã, Andreza da Rocha Uchôa de Paula, por me ajudar psicologicamente durante minhas crises de estresse e por me ensinar que desistir não é uma opção.

Por fim, agradeço todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho de conclusão de curso e a graça de Deus que me deu forças em todos os momentos.

“Se uma árvore cai no meio da floresta  
e não há ninguém para ouvir, ela faz barulho?”  
Inspirado em George Berkeley

## RESUMO

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, popularmente conhecida como pau-ferro ou jucá, é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae-Caesalpinoidae que apresenta grande valor medicinal devido ao potencial de seu princípio ativo “Pau-ferrol A”, que pode ser utilizado como importante ferramenta no tratamento da leucemia HL60 humana. Entretanto esta espécie vem sofrendo um intenso processo de extrativismo praticado de maneira indiscriminada em suas populações naturais, além disso, causando a erosão genética e destruição do seu *habitat* na Amazônia, onde a irregular produção de sementes aliada à elevada dormência tegumentar tem limitado a produção de mudas visando à recomposição das populações naturais e os plantios *ex situ*. O estudo teve por objetivo avaliar as respostas fisiológicas de plântulas de pau-ferro, desenvolvidas *in vitro*, sob diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento e fontes luminosas na propagação *in vitro* de pau-ferro por meio de uma alternativa eficiente para promover a reprodução de genótipos superiores através de condições *in vitro* desta espécie. O estudo foi conduzido no Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LASTED/INPA) Manaus, Amazonas, onde segmentos nodais, oriundos do estabelecimento *in vitro* de sementes de *L. ferrea* seguindo a metodologia de Silva et al., (2018), foram inoculados em meio de cultura MS (SIGMA, M5519-50L, USA) acrescido de diferentes combinações de auxinas e citocininas nas concentrações de 0,03 + 0,06 (mgL<sup>-1</sup>) e 0,05 + 0,1 (mgL<sup>-1</sup>), respectivamente. As auxinas utilizadas foram o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido 3-indol-butírico (IBA), e as citocininas foram a 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tidiazurona (TDZ). Os resultados obtidos sugerem que a interação de ANA e BAP (0,05 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>), estimulou a maior taxa de regeneração sob LED azul-vermelha, enquanto a interação de AIA e BAP (0,05 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) estimulou maior taxa de multiplicação sob LED branca, nenhum dos tratamentos resultou no crescimento de raízes.

**Palavras Chave:** Citocininas, auxinas, segmentos nodais, fontes luminosas.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral: .....	17
2.2. Objetivos Específicos: .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Assepsia e germinação de sementes de <i>Libidibia ferrea</i> .....	17
3.2. Secção das plântulas em segmentos nodais.....	18
3.3. Concentração e combinação de reguladores de crescimento sob diferentes fontes de luz.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO .....	24
6. REFERÊNCIAS.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, popularmente conhecida como pau-ferro ou jucá, é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae-Caesalpinoideae, é de fácil reconhecimento por causa da presença de manchas claras no tronco, folíolos pequenos, flores amarelas, legumes lisos, duros e aromáticos (DROZINO et al., 2015).

É nativa da região do cerrado brasileiro cuja madeira pode ser utilizada na construção civil e na produção de móveis de alta qualidade. Os exemplares adultos apresentam uma vívida inflorescência, de coloração amarela, o que qualifica a espécie para o uso no paisagismo de jardins e vias públicas. Também prescritos para a recuperação de áreas degradadas devido a sua rápida taxa de crescimento (CARVALHO et al., 2017).

*L. ferrea* é amplamente utilizada na medicina popular principalmente na região Norte e Nordeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2010) onde diversos estudos relatam as suas propriedades terapêuticas com resultados promissores para diversas finalidades como no tratamento de bronquite, diabetes e feridas (FERNANDES et al., 2016; NAKAMURA et al., 2002; NAWWAR et al., 2015; PEREIRA et al., 2012).

Nas folhas, no tronco e na casca dos frutos de *L. ferrea*, se encontra o princípio ativo denominado de “Pau-ferrol A”, um trímero de chalcona, que atua contra a topoisomerase II humana e inibe o crescimento das células por meio da indução de apoptose e pode ser utilizado como importante ferramenta no tratamento da leucemia HL60 humana (NOZAKI et al., 2007). Por esta razão, foi incluída na lista de 71 espécies da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MEDEIROS et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014).

Esta espécie vem sofrendo um intenso processo de extrativismo praticado de maneira indiscriminada em suas populações naturais desta espécie, causando a erosão genética e destruição do seu *habitat* na Amazônia (BENEDITO et al., 2012). Estudos indicam que a propagação de *L. ferrea* é viável por sementes (SCALON et al., 2011), por micropropagação (SILVA, 2018) e por mudas de regeneração sob diferentes regimes hídricos, sombreamentos e níveis de luminosidade em condições *ex vitro* (LENHARD, et al., 2010; LIMA et al., 2008; SANTOS et al., 2013).

A obtenção de mudas de *L. ferrea* pode ser realizada através da via sexuada, com a propagação por sementes, e a assexuada por cultura *in vitro*. A técnica de propagação sexuada possibilita a germinação de muitos indivíduos com menor custo, entretanto essa técnica é limitada devido a formação de mudas pouco saudáveis e desuniformes (COELHO et al., 2010), por outro lado, as técnicas de propagação assexuadas apresentam custo mais elevado comparado com as de cultivo de sementes, vez que demandam de um ambiente controlado e mão de obra especializada para o corte e inoculação do material vegetal em meio de cultura (SILVA, 2018), entretanto estas possibilitam grande taxa de multiplicação do material vegetal em curto tempo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998) e a garantia da uniformidade de plântulas. A baixa e irregular produção de sementes aliada à elevada dormência tegumentar de *L. ferrea*, tem limitado a produção de mudas visando à recomposição das populações naturais e os plantios *ex situ* (COELHO et al., 2010).

Dentre as técnicas de propagação assexuada a mais difundida é a propagação *in vitro*, também denominada como micropropagação dado ao tamanho dos propágulos utilizados, que consiste na cultura de um tecido vegetal, como os segmentos nodais, em meio de cultura sob luz artificial. É a aplicação mais prática da cultura de tecidos pois possibilita uma propagação livre de pragas e que gera muitos indivíduos, o que acelera a produção e fornece aos produtores mudas de alta qualidade e padrão, suprimindo a demanda comercial durante todas as épocas do ano, além de contribuir para a conservação de espécies cujo ambiente natural fora demasiadamente degradado (SCHIAVINATO et al., 2008).

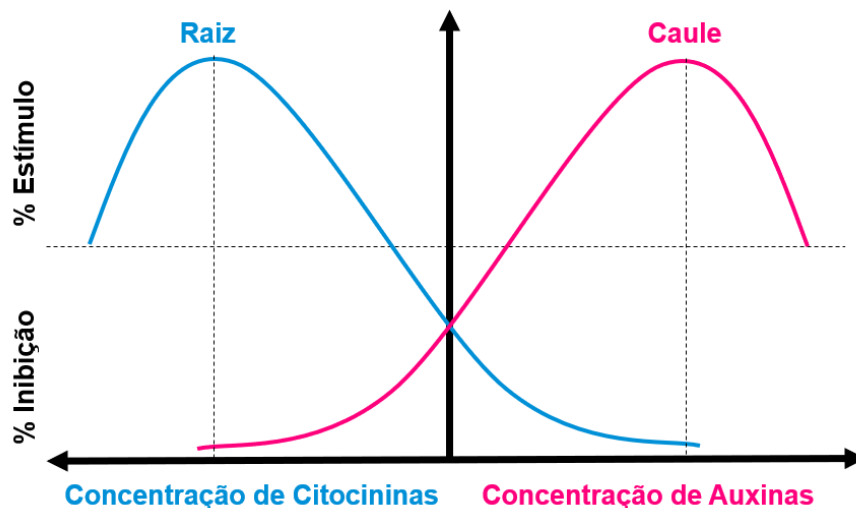
Diversos meios de cultura podem ser utilizados para a propagação *in vitro*, dos quais o mais empregado em trabalhos de cultura de tecidos é o meio MS, cuja composição é constituída de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, Fe-EDTA, sacarose e ágar. (MIYATA e PASQUAL, 2014; MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Um dos fatores que podem auxiliar no cultivo *in vitro* de plantas é o uso de reguladores de crescimento, hormônios vegetais cuja função é estimular o desenvolvimento vegetal. Os reguladores de crescimento são divididos em classes, as seis principais sendo as auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides. As auxinas são hormônios vegetais que estimulam a divisão, diferenciação e alongamento celular além de promover o crescimento da parte aérea

da planta. Quando se encontram em baixas concentrações, as auxinas promovem o desenvolvimento normal de embriões e da raiz, à medida que em concentrações maiores, elas resultam na inibição do crescimento das raízes (figura 1) (GOELZER et al., 2019). Alguns dos exemplos de auxinas mais empregadas na cultura *in vitro* de tecidos vegetais são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indol-3-acético (AIA), e o ácido 3-indol-butírico (IBA) (SILVA, 2018).

As citocininas, empregadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de plantas, auxiliando na divisão celular, alongamento do caule, dominância apical e regulação da síntese de proteínas, relacionadas diretamente com a formação das fibras do fuso mitótico bem como no crescimento e desenvolvimento de raízes (figura 1). Em contrapartida, as citocininas possuem efeito inibitório do crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas (GOELZER et al., 2019). As citocininas mais empregadas na cultura *in vitro* de tecidos vegetais são a 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (KIN), e a tidiazurona (TDZ).

Figura 1. Efeito das concentrações de citocininas e auxinas na cultura *in vitro* de tecidos vegetais.

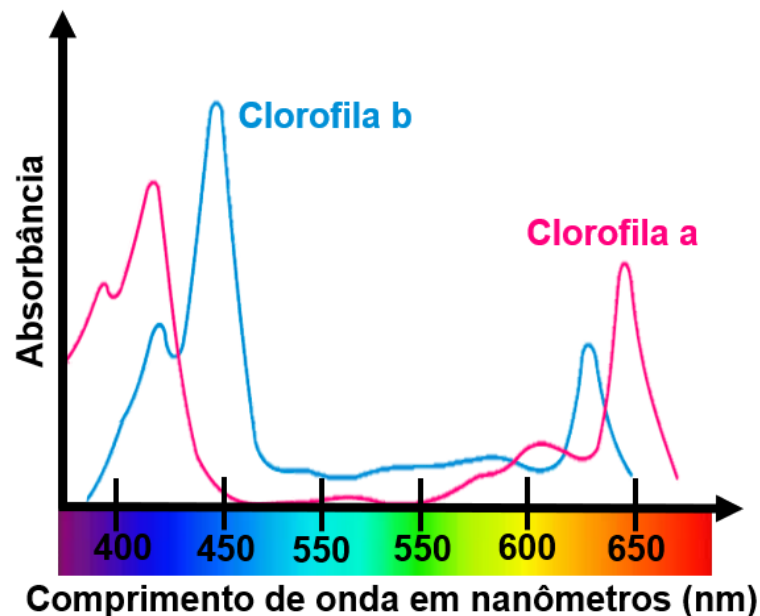


Fonte. CID e TEIXEIRA, 2014.

A luz é fator fundamental para a produção de mudas na cultura de tecidos, onde a maioria dos laboratórios utilizam lâmpadas fluorescentes como fonte luminosa artificial, cujo uso pode levar ao aumento em 67% na conta de luz, pois geram calor e exigem sistemas de refrigeração mais potentes. Os diodos emissores de luz (LEDs) se apresentam como uma alternativa para diminuir os gastos de energia, pois essas

lâmpadas geram luz de forma eficiente por longos períodos e emanam menos calor, tornando possível o uso de sistemas de refrigeração mais econômicos (ROCHA et al., 2017). As lâmpadas de LED podem ser dispostas em comprimentos de onda específicos, possibilitando utilizar a fonte de luz com comprimento de onda considerado ótimo para a realização da fotossíntese, onde a luz azul de 400- 450 nm e a luz vermelha de 600-650 nm estimulam as clorofilas “A” e “B”, conforme a figura 2 (YEH e CHUNG, 2009).

Figura 2. Espectro de absorção para clorofila e b.



Arte: De Paula, 2019.

Frente a esta realidade, a cultura de células e tecidos, constitui-se numa alternativa eficiente para promover a reprodução de genótipos superiores de *L. ferrea* através de condições *in vitro*. É uma das ferramentas biotecnológicas mais importantes que podem ser usadas nos procedimentos da engenharia celular, engenharia genética e genômica funcional, bem para a conservação de genótipos ao longo prazo (LOYOLA-VARGAS e OCHOA-ALEJO, 2012; MIROSHNICHENKO et al. 2016).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral:

- Avaliar as respostas fisiológicas de plântulas de pau-ferro, desenvolvidas *in vitro*, sob diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento e fontes luminosas.

### 2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a melhor concentração e combinação de reguladores de crescimento para a regeneração *in vitro* de pau-ferro.
- Determinar a melhor fonte luminosa para a regeneração *in vitro* de pau-ferro.
- Avaliar o efeito da luz e dos reguladores de crescimento no desenvolvimento das plântulas de pau-ferro no *meio in vitro*.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LASTED/INPA), Manaus, Amazonas.

### 3.1. Assepsia e germinação de sementes de *Libidibia ferrea*

Foram utilizadas sementes de pau-ferro (*Libidibia ferrea*), fornecidas pelo Banco de Sementes do Laboratório de Microbiologia e Fertilidade do Solo do INPA, coletadas de árvores nativas do Campus do V-8, INPA, Manaus, Brasil.

As sementes de *L. ferrea* foram submetidas aos métodos de escarificação mecânica, com auxílio de pedra de esmeril, e em seguida foi realizada a desinfestação e o estabelecimento *in vitro* das mesmas seguindo a metodologia desenvolvida por Silva et al. (2018) onde as sementes são submetidas a uma escarificação mecânica com pedra de esmeril, desinfestadas com detergente neutro e enxaguadas em água corrente por um minuto, imersas em solução de Carbendazim® 2,0% (v/v) (antifúngico) por uma hora, seguida de um banho em solução de álcool 70% por um minuto, seguida por uma imersão em hipoclorito de sódio de 0,25% (v/v) por 30

minutos em agitador magnético. Por fim, as sementes são lavadas quatro vezes com água destilada estéril no interior de uma câmara de fluxo laminar.

### 3.2. Secção das plântulas em segmentos nodais.

Após trinta dias de crescimento, as plântulas de jucá atingiram o tamanho de aproximadamente 10 cm de comprimento e foram seccionadas em segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo a gema apical ou gemas axilares. Os segmentos foram inoculados em frascos de vidro de 500ml, cinco por frasco, contendo aproximadamente 50ml de meio de cultura MS (SIGMA, M5519-50L, USA), e em seguida, submetidos a experimento com reguladores de crescimento sob diferentes fontes de luz.

### 3.3. Concentração e combinação de reguladores de crescimento sob diferentes fontes de luz

O experimento com reguladores de crescimento foi composto por dezenove tratamentos com diferentes concentrações e combinações hormonais, uma repetição sob luz LED azul-vermelha, e outra repetição sob luz LED branca.

Os reguladores de crescimento utilizados foram citocininas e auxinas, três tipos de cada, combinados dois a dois em duas diferentes concentrações.

As auxinas utilizadas foram o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indol-3-acético (AIA), e o ácido 3-indol-butírico (IBA), enquanto as citocininas utilizadas foram 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), e tidiazurona (TDZ). Foram feitas nove combinações dos regulares de crescimento em duas concentrações diferentes, conforme a tabela 1.

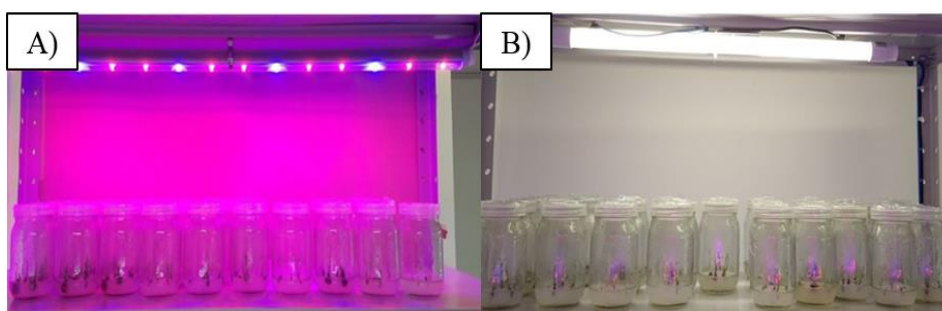
Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C e intensidade luminosa fornecida por diferentes fontes de luz (LED azul, 450 nm, e vermelho, 650 nm, Tecnal® TEC-LAMP-060 e Tachiba® LED branca T8-TUBE LAMP, 400-750 nm), durante um período de 30 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e cinco repetições cada, com uma repetição exposta as luzes de LED azul-vermelha e outra exposta as luzes de LED branca (figura 3).

Após 30 dias, os segmentos foram avaliados quanto o número de brotações, raízes e gemas formadas por explante, comprimento médio da brotação, taxa de multiplicação ( $N^0$  de brotos vezes o  $N^0$  de gemas), regeneração e oxidação. A análise de variância e as médias dos tratamentos obtidas foram analisadas e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa MINITAB® versão 18.

Tabela 1. Concentrações e combinações de reguladores de crescimento testados no meio MS para regeneração de segmentos nodais de *L. ferrea*.

Tratamentos	Combinações hormonais	Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )
T1	Controle	0
T2	ANA + TDZ	0,03 + 0,06
T3	ANA + TDZ	0,05 + 0,1
T4	IBA + TDZ	0,03 + 0,06
T5	IBA + TDZ	0,05 + 0,1
T6	AIA + TDZ	0,03 + 0,06
T7	AIA + TDZ	0,05 + 0,1
T8	ANA + BAP	0,03 + 0,06
T9	ANA + BAP	0,05 + 0,1
T10	IBA + BAP	0,03 + 0,06
T11	IBA + BAP	0,05 + 0,1
T12	AIA + BAP	0,03 + 0,06
T13	AIA + BAP	0,05 + 0,1
T14	ANA + KIN	0,03 + 0,06
T15	ANA + KIN	0,05 + 0,1
T16	IBA + KIN	0,03 + 0,06
T17	IBA + KIN	0,05 + 0,1
T18	AIA + KIN	0,03 + 0,06
T19	AIA + KIN	0,05 + 0,1

Figura 3. A) Repetição dos tratamentos expostos a luz de LED azul-vermelho. B) Repetição dos tratamentos expostos a luz de LED branca.



Fonte. DE PAULA, 2018

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de variância demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todas as variáveis analisadas. A interação de ANA+BAP (0,05 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>), estimulou a maior taxa de regeneração, comprimento e número de brotos cultivados sob LED azul-vermelha (tabela 2). Foi possível observar que as combinações de IBA+TDZ, AIA+TDZ (0,05+0,1 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente) não apresentam regeneração de brotos. Esse resultado também foi observado nas interações IBA+BAP e IBA+KIN em diferentes concentrações utilizadas. Nenhum dos tratamentos induziram a formação de raízes.

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *L. ferrea* sob a luz LED azul-vermelha. As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Reguladores de crescimento (mgL <sup>-1</sup> )	Nº de brotos	Comprimento dos brotos (cm)	Nº de gemas	Nº de raízes	Regeneração de brotos (%)	Taxa de multiplicação	Oxidação (%)
Controle	1,2 c	1,30 ab	1,8 bc	0,0 a	60,00 b	2,2 d	40,00 b
ANA + TDZ							
0,03 + 0,06	4,8 ab	1,20 ab	2,2 ab	0,0 a	60,00 b	10,6 bc	40,00 b
0,05 + 0,1	2,0 c	0,30 c	1,0 cd	0,0 a	40,00 bc	2,0 d	60,00 b
IBA + TDZ							
0,03 + 0,06	1,0 cd	0,24 c	0,4 de	0,0 a	20,00 c	0,4 e	80,00 ab
0,05 + 0,1	0,0 d	0,00 c	0,0 e	0,0 a	0,00 d	0,0 e	100,00 a
AIA + TDZ							
0,03 + 0,06	1,8 c	1,40 ab	3,0 ab	0,0 a	60,00 b	5,4 cd	40,00 b
0,05 + 0,1	0,0 d	0,00 c	0,0 e	0,0 a	0,00 d	0,0 e	100,00 a
ANA + BAP							
0,03 + 0,06	3,2 bc	1,28 ab	2,8 ab	0,0 a	40,00 bc	9,0 bc	60,00 b
0,05 + 0,1	8,2 a	1,62 a	3,8 ab	0,0 a	100,00 a	31,2 a	00,00 c
IBA + BAP							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 c	0,0 e	0,0 a	0,00 d	0,0 e	100,00 a
0,05 + 0,1	0,0 d	0,00 c	0,0 e	0,0 a	0,00 d	0,0 e	100,00 a
AIA + BAP							
0,03 + 0,06	1,2 c	1,16 ab	2,2 ab	0,0 a	20,00 c	2,6 d	80,00 ab
0,05 + 0,1	7,4 ab	2,54 a	4,4 a	0,0 a	60,00 b	32,6 a	40,00 b
ANA + KIN							
0,03 + 0,06	1,0 cd	0,20 c	0,2 e	0,0 a	20,00 c	0,3 e	80,00 ab
0,05 + 0,1	2,2 bc	1,12 b	2,4 ab	0,0 a	60,00 b	5,3 cd	40,00 b
IBA + KIN							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 c	0,0 e	0,0 a	0,00 d	0,0 e	100,00 a
0,05 + 0,1	0,0 d	0,00 c	0,0 e	0,0 a	0,00 d	0,0 e	100,00 a
AIA + KIN							
0,03 + 0,06	8,0 ab	2,18 ab	2,2 ab	0,0 a	60,00 b	17,6 a	40,00 b
0,05 + 0,1	0,8 cd	0,06 c	0,4 de	0,0 a	20,00 c	0,0 e	80,00 ab

Silva et al. (2018) ao desenvolver o protocolo de micropropagação, observaram altas taxas de brotações quando o meio MS foi suplementado com a citocinina BAP, e enraizamento quando suplementado com a auxina IBA sob a luz fluorescente. Entretanto, com base nos resultados do experimento, a combinação desses dois reguladores de crescimento, juntos, em meios MS mostrou não ser a melhor combinação hormonal e sim ANA+BAP sob a luz de LED azul-vermelha, o que de acordo com Cid e Teixeira (2014) pode ser resultado dos efeitos das interações entre os diferentes tipos de reguladores de crescimento com os comprimentos de onda específicos da lâmpada de LED azul-vermelha que estimulam a realização da fotossíntese, resultando em um crescimento apical maior que o observado nos tratamentos com luz de LED branca (tabela 4).

De acordo com Cid e Teixeira (2014) concentrações inferiores de citocininas em relação as auxinas resultam em mais altas taxas de emissão de raízes. Os dados obtidos também comprovam que, para certos tipos de combinações hormonais, as concentrações iguais ou inferiores a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , em meio MS, estimulam o aumento da taxa de brotamento e regeneração, e menor efeito na taxa de enraizamento que as concentrações utilizadas nos estudos realizados por Silva et al. (2018).

Ao avaliar a luz de LED branca em combinações de ANA+TDZ, ANA+BAP e AIA+BAP ( $0,05$  e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentaram a maior taxa de regeneração de brotos (80%). No entanto, a interação de AIA+BAP ( $0,05$  e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) estimulou o maior número de brotos, de gemas e taxa de multiplicação quando comparado com os demais tratamentos. Por outro lado, a combinação de BAP+TDZ, bem como a de AIA+IBA, nas concentrações de  $0,03$  e  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, não promoveram a regeneração de brotos. Esses resultados foram similares aos observados na interação de KIN com IBA e AIA nas duas concentrações testadas (tabela 3).

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *L. ferrea* sob a luz LED branca. As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Reguladores de crescimento (mgL <sup>-1</sup> )	Nº de brotos	Comprimento dos brotos (cm)	Nº de gemas	Nº de raízes	Regeneração de brotos (%)	Taxa de multiplicação	Oxidação (%)
Controle	6,2 b	1,12 ab	2,8 c	0,0 a	60,00 ab	29,2 bc	40,00 bc
ANA + TDZ							
0,03 + 0,06	0,8 c	0,40 d	0,8 c	0,0 a	20,00 c	3,2 c	80,00 ab
0,05 + 0,1	6,8 b	1,00 ab	2,4 c	0,0 a	80,00 a	20,2 bc	20,00 c
IBA + TDZ							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a
0,05 + 0,1	0,4 c	0,20 d	0,4 c	0,0 a	20,00 c	0,8 cd	80,00 ab
AIA + TDZ							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a
0,05 + 0,1	2,2 c	0,48 d	0,6 c	0,0 a	20,00 c	6,6 c	80,00 ab
ANA + BAP							
0,03 + 0,06	1,8 c	0,74 bc	1,6 c	0,0 a	60,00 ab	4,6 c	40,00 bc
0,05 + 0,1	8,8 b	1,54 ab	6,0 bc	0,0 a	80,00 a	84,4 bc	20,00 c
IBA + BAP							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a
0,05 + 0,1	1,2 c	0,50 cd	0,6 c	0,0 a	20,00 c	3,6 c	80,00 ab
AIA + BAP							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a
0,05 + 0,1	15,4 a	1,96 a	9,4 a	0,0 a	80,00 a	226,0 a	20,00 c
ANA + KIN							
0,03 + 0,06	1,6 c	0,70 bc	1,0 c	0,0 a	40,00 bc	5,2 c	60,00 b
0,05 + 0,1	1,6 c	0,50 cd	0,8 c	0,0 a	20,00 c	6,4 c	80,00 ab
IBA + KIN							
0,03 + 0,06	1,6 c	0,50 cd	0,8 c	0,0 a	20,00 c	6,4 c	80,00 ab
0,05 + 0,1	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a
AIA + KIN							
0,03 + 0,06	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a
0,05 + 0,1	0,0 d	0,00 d	0,0 d	0,0 a	0,00 d	0,0 d	100,00 a

Os resultados diferem dos obtidos por Silva et al. (2018), em que os reguladores de crescimento foram trabalhados individualmente, sob luz fluorescente, e não em combinações no meio MS, onde os reguladores IBA e BAP resultaram em melhores respostas tanto na regeneração quanto na formação de raízes. Já quando trabalhados em conjunto no mesmo meio de cultura e sob luz de LED branca, tais reguladores não resultaram no mesmo efeito, o que sugere que *L. ferrea* responde de forma diferente a combinações de reguladores, e fonte luminosa.

De acordo com Rocha et al. (2017), o uso de LEDs brancas podem exercer um efeito positivo na multiplicação, ou seja, aumento no número de brotações por explante, entretanto, tal aumento pode variar não só de acordo com a espécie estudada, mas também com as características genéticas que variam entre as cultivares de uma mesma espécie. Como a luz de LED branca possui todas as faixas do espectro de cor visível, ela estimula diferentes carotenoides foliares, não só as

clorofilas como no caso da LED azul-vermelha, o que altera a forma como a planta reage às diferentes combinações de reguladores de crescimento.

De modo geral, a utilização dos reguladores de crescimento na cultura de células e tecidos vegetais desencadeiam uma série de reações diversas, tais como: divisão celular, diferenciações dos tecidos, indução de gemas adventícias. Entretanto quando utilizados sob diferentes concentrações e combinações no mesmo meio de cultura, e sob diferentes fontes luminosas, tais reguladores desencadeiam efeitos nas plantas que diferem dos observados quando utilizados separadamente. Em nenhuma das combinações hormonais avaliadas, em ambos os tratamentos luminosos, foi possível visualizar a formação de raízes o que vai de acordo com os resultados obtidos por Silva et al (2018) para *L. ferrea*, e Lencina et al. (2018) para *Apuleia leiocarpa*, onde os pesquisadores observaram que espécies lenhosas da família Fabaceae possuem grande dificuldade em emitir raízes em ambiente *in vitro*, necessitando de concentrações mais elevadas de reguladores de crescimento do que as utilizadas no presente estudo.

Tabela 4. Médias gerais do N° de brotos, N° de gemas, comprimento dos brotos (Comp. Brot.), N° de raízes, taxa de multiplicação (Tax. Mult.), regeneração e taxa de oxidação (Tax. Oxi.) em plântulas de *Libidibia ferrea* em função dos reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura e a exposição a luz de LED branca ao final do período experimental (30 dias). Média  $\pm$  desvio padrão (n=5).

Médias gerais	(LED azul-vermelha)	(LED branca)
N° de brotos	2,25 $\pm$ 2,79	2,50 $\pm$ 4,00
N° de gemas	1,41 $\pm$ 1,45	1,40 $\pm$ 2,40
Comp. Brot. (cm)	0,77 $\pm$ 0,82	0,50 $\pm$ 0,60
N° raízes	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Tax. Mult.	6,28 $\pm$ 10,16	12,70 $\pm$ 34,04
Regeneração (%)	37,70 $\pm$ 30,59	27,00 $\pm$ 30,00
Oxidação (%)	62,11 $\pm$ 33,26	73,00 $\pm$ 30,00

O estudo demonstrou ainda que as concentrações dos reguladores de crescimento utilizados apresentam altas de oxidação (tabela 4). Plantas injuriadas, como os segmentos nodais seccionados com bisturi, tendem a secretar compostos fenólicos como uma resposta a ação que resultou na injúria, no intuito de se

protegerem da entrada de patógenos em seus tecidos onde tais compostos tendem a reagir com o meio de cultura, resultando em oxidação ao entrar em contato com o O<sub>2</sub>, resultando na eventual morte do explante Cid e Teixeira (2014). Essa interação de compostos fenólicos com oxidação do meio de cultura pode explicar a alta taxa de oxidação observada em ambos os tratamentos luminosos.

O uso do carvão ativo adicionado ao meio de cultura prolonga o período de cultivo em espécies lenhosas cujo estabelecimento e crescimento *in vitro* são dificultados ou limitados pelas substâncias fenólicas e taninos eliminados pelo explante (LENCINA et al., 2018), exatamente o mesmo que fora observado em *L. ferrea* sendo uma boa alternativa para diminuir a taxa de oxidação nos segmentos nodais em experimentos futuros.

## 5. CONCLUSÃO

A interação dos hormônios ANA e BAP nas concentrações de 0,05 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, foi a que estimulou a maior taxa de regeneração nos segmentos nodais cultivados de *L. ferrea* sob condições *in vitro*. Quanto as fontes luminosas, as LEDs azul-vermelha proporcionaram um maior desenvolvimento longitudinal da parte aérea das plântulas em comparação com as LEDs brancas que estimularam a brotação. Nenhum dos diferentes tratamentos contendo combinações de reguladores de crescimento e fontes luminosas resultou na formação de raízes, dificultando a realocação das mudas do meio *in vitro* para o *ex vitro*.



## 6. REFERÊNCIAS

BENEDITO, Clarisse et al. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, p. 508–513, 2012.

BHOJWANI, Sant Saran; DANTU, Prem Kumar. **Plant Tissue Culture: An Introductory Text**. 1. ed. Springer India: New Delhi, India,. 2013.

CARVALHO, Sara et al. Viabilidade de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea*) por teste de tetrazólio. **Journal of Seed Science**, v.39, n.1, p. 7-12, 2017.

CID, Luis; TEIXEIRA, João Batista. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: Cid, Luis. (Ed.). **Cultivo in Vitro de Plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014. p.17–52.

COELHO, Maria et al. Superação da dormência tegumentar em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul [Overcoming of dormancy coats of *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. seeds]. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 74–79, 2010.

DROZINO, Ricardo et al. Minirrevisão: Bioativos de *Libidibia ferrea* e suas ações em odontologia. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 21, n.1, p. 39-47, 2017.

FERNANDES, Ciciane et al. Repellent Action of *Carapa guianensis* and *Caesalpinia ferrea* for flies species of Calliphoridae family. **Ciência Rural**, v. 46, p. 867–870, 2016.

GEORGE, Edwin; HALL, Michael; KLERK, Geert-Jan. 2008. Plant Tissue Culture Procedure - Background. *In*: George, Edwin; Hall, Michael; Klerk, Geert. (Eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 1. ed. Dordrecht: Springer Science + Business Media BV, 2018. p.1–28.

GOELZER, Ademir et al. Reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae)/Growth regulators in vitro multiplication of *Campomanesiaadamantium* (Cambess.) O. Berg

(Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.

GRATTAPAGLIA, Dario; MACHADO, Marcos Antonio. Micropropagation. *In*: Torres, Antônio; Caldas, Linda; Buso, Jose. (Eds.). **Tissue Culture and Genetic Transformation of Plants**. Brasília: Embrapa, 1998. p.183–260.

LENCINA, Kelen Haygert et al. Produtividade de microcepas de grápia (*Apuleia Leiocarpa*) mantidas *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 150-159, 2018.

LENHARD, Nádia Regina; SCALON, Silvana; NOVELINO, José Oscar. Crescimento inicial de mudas de pau ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Var. *leiostachya* Benth.) sob diferentes regimes hídricos. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, p. 870–877, 2010.

LIMA, Juliana Domingues et al. Efeitos da luminosidade no crescimento de mudas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). **Acta Amazonica**, v. 38, p. 5–10, 2008.

LOYOLA-VARGAS, Víctor; OCHOA-ALEJO, Neftalí. An Introduction to Plant Cell Culture: The Future Ahead. *In*: Loyola-Vargas, Víctor; Ochoa-Alejo, Neftalí. (Eds.). **Plant Cell Culture Protocols**. 3. ed. New Delhi, India: Humana Press, 2012. p.1–8.

MEDEIROS, Patrícia; LADIO, Ana; ALBUQUERQUE, Ulysses. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729–746, 2013.

MIROSHNICHENKO, Dmitry.; CHERNOBROVKINA, Mariya; DOLGOV, Sergey. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Triticum timopheevii* Zhuk. and *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch, wheat species with G genome. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, p. 495–508, 2016.

MIYATA, Luzia; VILLA, Fabíola; PASQUAL, Moacir. Culture media used in the micropropagation of orchids hybrids. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p.1731-1738, 2014.

MORAIS, Tâmara et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 14, p. 110–121, 2012.

NAKAMURA, Eliane et al. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 135–137, 2002.

NAWWAR, Mahmoud et al. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: Antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, v. 70, p. 553–558, 2015.

NOZAKI, Hiroshi et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8290–8292, 2007.

OLIVEIRA, Fábio; BARROS, Roseli; MOITA NETO, José. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 282–301, 2010.

PEREIRA, Livia et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, p. 642–648, 2012.

RIBEIRO, D. A. et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.

ROCHA, Gomes et al. Uso de LEDs na multiplicação in vitro de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11.2, p. 247-252, 2017.

SANTOS, Laércio; COELHO, Maria; AZEVEDO, Rodrigo. Qualidade de mudas de pau-ferro produzidas em diferentes substratos e condições de luz [Quality of *Caesalpinia ferrea* seedlings produced on different substrates and light condition]. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, p. 151–158, 2013.

SCALON, Silvana et al. Germinação e crescimento de *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tull. em diferentes substratos [Germination and Growth of *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex

Tul. in different substrat]. **Revista Árvore**, v. 35, p. 633–639, 2011.

SCHIAVINATO, Yara et al. Micropropagação de *Anthurium plowmanii* Croat. Micropropag. **Plant Cell**, Lavras, v4, n1, p. 15-20, 2008.

SILVA, Daniel et al. In vitro propagation and seedling acclimatization of *Caesalpinia ferrea* Mart ., a valuable medicinal plant in the Amazon (Fabaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 13, p. 57–65, 2018.

YEH, Naichia; CHUNG, Jen-Ping. LEDs de alto brilho - fontes de iluminação com eficiência energética e seu potencial no cultivo de plantas em ambientes fechados. **Revisões sobre energia renovável e sustentável**, v. 13, n8, p. 2175-2180, 2009.