

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOTECNIA

TESE

**Cultivo *in vitro* de *Pleroma* spp. e a Difusão de Métodos
de Propagação de Plantas na Educação Básica**

Michele Cagnin Vicente

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Pleroma* spp. E A DIFUSÃO DE MÉTODOS DE
PROPAGAÇÃO DE PLANTAS NA EDUCAÇÃO BÁSICA**

MICHELE CAGNIN VICENTE

Sob a Orientação do Professor
Dr. Rogério Gomes Pêgo

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Fitotecnia, no
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, Área de Concentração
em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Maio de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V633c Vicente, Michele Cagnin, 1986-
 Cultivo in vitro de Pleroma spp. e a Difusão de
Métodos de Propagação de Plantas na Educação Básica. /
Michele Cagnin Vicente. - Seropédica, 2024.
 166 f.: il.

 Orientador: Rogério Gomes Pêgo. Tese (Doutorado).
-- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2024.

 1. Melastomataceae. 2. Micropropagação de plantas.
3. Reprodução vegetal. 4. Educação. 5. Ensino e
aprendizado. I. Pêgo, Rogério Gomes, 1983-, orient.
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia III. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.


O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA


MICHELE CAGNIN VICENTE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração Produção Vegetal.


TESE APROVADA EM: 09 de maio de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **ROGERIO GOMES PEGO**
Data: 13/06/2024 11:04:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr. Rogério Gomes Pêgo (UFRRJ)
(Orientador/Presidente)

Documento assinado digitalmente
 **CIBELLE VILELA ANDRADE FIORINI**
Data: 13/06/2024 13:14:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Cibelle Vilela Andrade Fiorini (UFRRJ)
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 **NATANE AMARAL MIRANDA**
Data: 17/06/2024 20:02:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Natane Amaral Miranda (UFRRJ)
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 **ERIKA DA COSTA FERNANDES**
Data: 15/06/2024 10:53:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Erika da Costa Fernandes (CTUR)
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ANTONIO DOS SANTOS**
Data: 15/06/2024 18:23:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Carlos Antônio dos Santos (IFPR)
(Membro)

“Só pode ser primavera quem dá valor às flores”
(Lourival Lopes)

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder tantas bênçãos em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Rogério Gomes Pêgo, pela amizade, ensinamentos, disponibilidade, dedicação e confiança depositada em mim durante essa jornada.

A Profa. Gorete pela confiança e por fornecer todo apoio e estrutura, que foi fundamental para realização dessa pesquisa.

A Profa. Natane pelos auxílios e por todo o conhecimento compartilhado durante a realização dessa pesquisa.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, que possibilitaram e enriqueceram minha trajetória até aqui.

Aos colegas do LabEPS, em especial, ao Carlos e Talita pela colaboração, apoio, conversas e amizade durante esse período.

Aos membros da banca por aceitarem fazer parte da defesa e pelas relevantes contribuições.

Ao Instituto de Agronomia e ao Departamento de Fitotecnia e todos os seus funcionários, pela estrutura técnica e científica os quais foram essenciais em toda essa jornada.

A saudosa Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo ensino público de qualidade.

Aos meus amados pais e esposo, pelo amor, apoio, carinho, paciência, incentivo e dedicação sempre. A eles dedico inteiramente este trabalho.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês!

RESUMO GERAL

VICENTE, Michele Cagnin. **Cultivo *in vitro* de *Pleroma* spp. e a Difusão de Métodos de Propagação de Plantas na Educação Básica.** 2024. 166f. Tese (Doutorado em Fitotecnia); Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Pleroma spp., espécies de elevado interesse ornamental, apresentam sementes diminutas e frequentemente sem embrião, implicando em baixos percentuais de germinação e dificuldades de manuseio em relação a sementeira convencional. Como alternativa ao método seminal, a propagação dessas espécies vem sendo realizada através de estacas ou alporques. Contudo estes métodos apresentam alguns empecilhos como a impossibilidade de produção de mudas em escala comercial e em determinadas épocas do ano, dificuldade de manutenção fitossanitária das mudas e a necessidade do uso de fitorreguladores como auxinas. Nesse sentido, a propagação *in vitro* ou micropropagação surge como alternativa aos métodos tradicionais de propagação, principalmente daquelas de difícil propagação através dos métodos convencionais. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a aplicabilidade da técnica de propagação de plantas *in vitro* na germinação de sementes e produção de mudas de *Pleroma granulosum*, *Pleroma heteromallum* e *Pleroma mutabile*; 2) avaliar a possibilidade de produção de mudas de *Pleroma heteromallum in vitro* a partir da organogênese direta e indireta; e 3) investigar as contribuições de uma Oficina Pedagógica no processo de ensino-aprendizado dos conteúdos de botânica durante as aulas de Ciências do Ensino Fundamental. Para etapa de cultivo *in vitro* os ensaios foram organizados em delineamento inteiramente casualizado e as unidades experimentais dispostas em B.O.D., sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, por diferentes períodos de tempo. No ensaio de germinação de sementes utilizaram-se os substratos Multiplant[®], papel para germinação, vermiculita e meio MS com 25% da concentração original de sais. Para etapa de desenvolvimento das plântulas *in vitro* os meios utilizados foram o MS ou WPM com 100% ou 50% da concentração original de sais. Enquanto que para os ensaios de organogênese utilizou-se o meio MS com 100% da concentração original de sais suplementado ou não com PVP, carvão ativo e com os fitorreguladores BAP, AIB ou 2,4-D. Os ensaios de aclimatização, quando realizados, foram organizados em delineamento inteiramente casualizado. Sendo as mudas dispostas em vasos contendo substratos Multiplant[®], perlita ou vermiculita e levadas para casa de vegetação por 30 dias. A Oficina pedagógica constou-se de parte teórica e prática, com aplicação de um formulário diagnóstico aplicado antes e depois da parte prática. Os resultados indicaram que a germinação *in vitro* pode maximizar a germinação de sementes das espécies estudadas, especialmente de *P. heteromallum*. A produção de mudas de *P. heteromallum in vitro* a partir de sementes e da organogênese direta (via microestacas) e indireta (via explante foliar) é possível. Constatou-se a ocorrência de anomalias fisiológicas em plântulas de *P. granulosum* e *P. mutabile* que interferem negativamente no desenvolvimento *in vitro* dessas espécies. A utilização de oficinas pedagógicas contribuiu positivamente para o ensino e aprendizado, tornando dinâmicos os conteúdos de reprodução de plantas. Conclui-se que a técnica de propagação *in vitro* apresentou viabilidade na produção de mudas e conservação de *P. heteromallum* e que a oficina pedagógica foi capaz de beneficiar o ensino e aprendizado dos conteúdos de botânica, reforçando a importância das parcerias entre universidades e escolas através da extensão universitária.

Palavras-chave: Melastomataceae. Reprodução vegetal. Ensino e aprendizado.

GENERAL ABSTRACT

VICENTE, Michele Cagnin. ***In vitro* cultivation of *Pleroma* spp. and the dissemination of plant propagation methods in basic education.** 2024. 166f. Thesis (Ph.D. in plant science); Agronomy Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Pleroma spp., species of high ornamental interest, have tiny seeds that are often embryoless, resulting in low germination rates and handling difficulties compared to conventional sowing. As an alternative to the seed method, propagation of these species has been carried out through cuttings or air layering. However, these methods present some obstacles, such as the impossibility of producing seedlings on a commercial scale and at certain times of the year, difficulty in phytosanitary maintenance of the seedlings, and the need to use phytohormones such as auxins. In this sense, *in vitro* propagation or micropropagation emerges as an alternative to traditional propagation methods, especially for those that are difficult to propagate through conventional methods. Therefore, the objectives of this study were: 1) to evaluate the applicability of the *in vitro* plant propagation technique in seed germination and seedling production of *Pleroma granulosum*, *Pleroma heteromallum*, and *Pleroma mutabile*; 2) to evaluate the possibility of producing *Pleroma heteromallum* seedlings *in vitro* from direct and indirect organogenesis; and 3) to investigate the contributions of a Pedagogical Workshop to the teaching-learning process of botany content during Elementary School Science classes. For the *in vitro* cultivation stage, the trials were organized in a completely randomized design and the experimental units were arranged in B.O.D., at a temperature of $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ and a 16-hour photoperiod, for different periods of time. In the seed germination test, the Multiplant[®] substrates, germination paper, vermiculite and MS medium with 25% of the original salt concentration were used. For the *in vitro* seedling development stage, the media used were MS or WPM with 100% or 50% of the original salt concentration. While for the organogenesis tests, MS medium with 100% of the original salt concentration was used, supplemented or not with PVP, activated charcoal and with the phytohormones BAP, AIB or 2,4-D. The acclimatization trials, when performed, were organized in a completely randomized design. The seedlings were placed in pots containing Multiplant[®], perlite or vermiculite substrates and taken to a greenhouse for 30 days. The pedagogical workshop consisted of theoretical and practical parts, with the application of a diagnostic form applied before and after the practical part. The results indicated that *in vitro* germination can maximize the germination of seeds of the species studied, especially *P. heteromallum*. The production of *P. heteromallum* seedlings *in vitro* from seeds and direct organogenesis (via microcuttings) and indirect organogenesis (via leaf explant) is possible. The occurrence of physiological anomalies in *P. granulosum* and *P. mutabile* seedlings was observed, which negatively interfered with the *in vitro* development of these species. The use of pedagogical workshops contributed positively to teaching and learning, making the contents of plant reproduction dynamic. It is concluded that the *in vitro* propagation technique showed viability in the production of seedlings and conservation of *P. heteromallum* and that the pedagogical workshop was able to benefit the teaching and learning of botany contents, reinforcing the importance of partnerships between universities and schools through university extension.

Keywords: Melastomataceae. Plant reproduction. Teaching and learning.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 <i>Pleroma granulosum</i> (Desr.) D. Don	04
2.2 <i>Pleroma heteromallum</i> (D. Don) D. Don	05
2.3 <i>Pleroma mutabile</i> (Vell.) Triana	07
2.4 Propagação de plantas <i>in vitro</i>	08
2.4.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i>	09
2.4.2 Propagação vegetativa <i>in vitro</i> (micropropagação)	10
2.4.3 Assepsia do explante e fatores químicos, físicos e biológicos envolvidos na propagação <i>in vitro</i>	11
2.4.4 Aclimatização	14
2.5 Ensino e aprendizado de Botânica na Educação Básica	14
2.6 Referências	16
3. CAPÍTULO I - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>P. granulosum</i>, <i>P. heteromallum</i> E <i>P. mutabile</i> IN VITRO	26
3.1 RESUMO	27
3.2 ABSTRACT	28
3.3 INTRODUÇÃO	29
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.4.1 Seleção de plantas matrizes, cápsulas e sementes	31
3.4.2 Desinfestação das sementes e semeadura em diferentes substratos	31
3.4.3 Teste de germinação de sementes	32
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.6 CONCLUSÃO	40
3.7 REFERÊNCIAS	41
4. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO IN VITRO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>P. heteromallum</i> (MELASTOMATACEAE)	46
4.1 RESUMO	47
4.2 ABSTRACT	48
4.3 INTRODUÇÃO	49
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.4.1 Local de realização dos experimentos	50
4.4.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma heteromallum</i> e aclimatização das mudas nos substratos Multiplant [®] , Perlita e Vermiculita	50
4.4.3 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma heteromallum</i> e aclimatização de mudas no substrato Multiplant [®]	52
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.5.1 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma heteromallum</i> e aclimatização das mudas nos substratos Multiplant [®] , Perlita e Vermiculita	53
4.5.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma heteromallum</i> e aclimatização das mudas no substrato Multiplant [®]	59
4.6 CONCLUSÃO	65
4.7 REFERÊNCIAS	66

5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>P. granulosum</i> E <i>P. mutabile</i>	69
5.1 RESUMO.....	70
5.2 ABSTRACT	71
5.3 INTRODUÇÃO.....	72
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
5.4.1 Local de realização dos experimentos.....	73
5.4.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma mutabile</i>	73
5.4.3 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma granulosum</i>	74
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.5.1 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma mutabile</i>	76
5.5.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Pleroma granulosum</i>	80
5.6 CONCLUSÃO.....	88
5.7 REFERÊNCIAS	89
 6. CAPÍTULO IV - CALOGÊNESE E RIZOGÊNESE EM EXPLANTE FOLIAR DE <i>P. heteromallum</i>	 94
6.1 RESUMO.....	95
6.2 ABSTRACT	96
6.3 INTRODUÇÃO.....	97
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
6.4.1 Uso de PVP, carvão ativo e dos fitorreguladores AIB e BAP na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i>	98
6.4.2 Uso dos fitorreguladores AIB e 2,4-D na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i>	99
6.4.3 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i> no período de 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	99
6.4.4 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na indução da calogênese em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i> no período de 30 + 15 dias de cultivo <i>in vitro</i>	100
6.4.5 Diferentes concentrações de BAP na indução de brotações a partir de massa de calos oriundas de explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i>	101
6.5 RESULTADOS	103
6.5.1 Uso de PVP, carvão ativo e dos fitorreguladores AIB e BAP na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i>	103
6.5.2 Uso dos fitorreguladores AIB e 2,4-D na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i>	105
6.5.3 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i> no período de 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	106
6.5.4 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na indução da calogênese em explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i> no período de 30 + 15 dias de cultivo <i>in vitro</i>	108
6.5.5 Diferentes concentrações de BAP na indução de brotações a partir de massa de calos oriundas de explante foliar de <i>Pleroma heteromallum</i>	113
6.6 DISCUSSÃO	114
6.7 CONCLUSÃO.....	116
6.8 REFERÊNCIAS	117
 7. CAPÍTULO V - ORGANOGÊNESE DIRETA VIA MICROESTACAS DE <i>Pleroma heteromallum</i>	 121

7.1 RESUMO.....	122
7.2 ABSTRACT	123
7.3 INTRODUÇÃO.....	124
7.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
7.4.1 Estabelecimento de microestacas de <i>Pleroma heteromallum in vitro</i>	125
7.4.2 Subcultivo de brotações de <i>Pleroma heteromallum in vitro</i>	125
7.4.3 Rizogênese em brotações de <i>Pleroma heteromallum in vitro</i>	126
7.4.4 Alongamento de raízes e desenvolvimento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de <i>Pleroma heteromallum</i>	126
7.5 RESULTADOS	129
7.5.1 Estabelecimento de microestacas de <i>Pleroma heteromallum in vitro</i>	129
7.5.2 Subcultivo de brotações de <i>Pleroma heteromallum in vitro</i>	132
7.5.3 Rizogênese em brotações de <i>Pleroma heteromallum in vitro</i>	133
7.5.4 Alongamento de raízes e desenvolvimento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de <i>Pleroma heteromallum</i>	137
7.6 DISCUSSÃO	141
7.7 CONCLUSÃO.....	143
7.8 REFERÊNCIAS	144
 8. CAPÍTULO VI - OFICINA PEDAGÓGICA: POPULARIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DE PLANTAS NO ENSINO DE CIÊNCIAS	147
8.1 RESUMO.....	148
8.2 ABSTRACT	149
8.3 INTRODUÇÃO.....	150
8.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	151
8.4.1 Área de estudo e sujeitos envolvidos	151
8.4.2 Desenvolvimento da oficina pedagógica	151
8.4.3 Análise de dados	152
8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	153
8.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
8.7 REFERÊNCIAS	162
 9. CONSIDERAÇÕES GERAIS	166

1 INTRODUÇÃO GERAL

Melastomataceae é uma família com distribuição pantropical, incluindo 177 gêneros e aproximadamente 5.750 espécies, no Brasil é a quinta maior família entre as angiospermas, com 69 gêneros e 1.430 espécies, das quais aproximadamente 973 são endêmicas (GOLDENBERG et al., 2023). As espécies desta família distribuem-se por todo o território brasileiro, com maior riqueza nos domínios da Amazônia, do Cerrado e da Mata Atlântica, onde também se concentram a maioria dos endemismos (GOLDENBERG et al., 2012; MARTINELLI e MORAES, 2013). Os gêneros *Miconia*, *Leandra* e *Pleroma* são os mais representativos e com alto grau de endemismo (PEREIRA et al., 2015; SOUZA e LORENZI, 2012). A destruição de habitats, considerando o avanço desordenado de centros urbanos e áreas rurais, assim como o elevado número de espécies endêmicas com distribuição restrita e pontual, são os principais fatores de ameaça às Melastomataceae na natureza (MARTINELLI e MORAES, 2013).

No geral, as plantas dessa família apresentam porte herbáceo, arbustivo ou arbóreo, menos frequentemente epífitas ou lianas, folhas opostas e simples, inflorescência cimosa ou paniculada, flores vistosas e frutos do tipo cápsula ou baga (SOUZA e LORENZI, 2012). São espécies de grande importância ecológica, por estarem no grupo das pioneiras, compondo o banco de sementes do solo e sendo o principal grupo observado nas clareiras florestais. Em função disso, estudos recomendam o uso de espécies dessa família para o enriquecimento e recuperação de áreas degradadas (CAMPOS et al., 2009; SOUZA e LORENZI, 2012; SILVA et al., 2016; CUEVAS-REYES et al., 2017). A importância econômica de espécies de Melastomataceae também inclui o uso para fins ornamentais, produção de frutos comestíveis, madeira para construção, tintas e uso medicinal (PRUDENTE et al., 2016; SILVA et al., 2016; BOMFIM et al., 2022).

Espécies do gênero *Pleroma*, popularmente conhecidas por quaresmeiras, apresentam flores vistosas, o que lhes conferem alto valor ornamental, propiciando seu cultivo em locais públicos e privados, embelezando parques, jardins e áreas urbanas (SOUZA e LORENZI, 2012; MARTINELLI et al., 2018). O uso de plantas ornamentais nativas no paisagismo tem sido crescente nos últimos anos. Ressalta-se forte tendência da aplicação dessas plantas em parques e jardins como forma de valorizar os recursos genéticos nativos e/ou regionais e promover a conscientização e preservação ecológica; além disso, são menos exigentes em manutenções/cuidados, em função da rusticidade e adaptação, representando, portanto, um diferencial comparado a outras espécies (GOMES et al., 2020; GRANEMANN et al., 2017).

Pleroma spp. produzem muitas sementes, no entanto, essas são diminutas, menores que 0,5 mm, semelhantes à areia fina, e os cotilédones são foliáceos, praticamente sem reservas para garantir o início do desenvolvimento das plantas jovens (CARREIRA e ZAIDAN, 2007; LORENZI, 2008). Ademais, as espécies desse gênero costumam apresentar grande número de sementes abortadas, ausência de embriões na semente e baixa taxa de germinação (LORENZI, 2008; PEREIRA et al., 2015). Simão et al. (2007) em estudos com *Tibouchina mutabilis* (sinonímia botânica *Pleroma mutabili*) verificaram que a espécie produz grande quantidade de sementes, entretanto, com aproximadamente 60 a 80% delas sem o embrião. Zaia e Takaki (1998) observaram que, aproximadamente, 70 a 80% das sementes de *Tibouchina pulchra* (sinonímia botânica *Pleroma raddianum*) e *Tibouchina granulosa* (sinonímia botânica *Pleroma granulosum*) não completaram o desenvolvimento embrionário. Estes fatos demonstram que a propagação sexuada tradicional dessas espécies é pouco eficiente, considerando-se a exploração dessas plantas para fins comerciais.

Estudos demonstram que a propagação *in vitro* tem proporcionado algumas vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação das mais diferentes espécies. A técnica tem possibilitado maior eficiência na germinação de sementes bem como a produção de um

elevado número de plantas que podem ser obtidas a partir de um único indivíduo, em espaço físico e tempo reduzido, além de assegurar um material livre de patógenos e com alta uniformidade (PÊGO et al., 2015; PRUDENTE et al., 2016; BONFÁ, 2019; RODRIGUES et al., 2019; PLESSIS et al., 2020). Genericamente, a técnica consiste no cultivo de sementes ou porções de tecidos (explantos) de uma planta, num meio de cultura nutritivo, em condições assépticas e sob condições ambientais controladas, cuja última etapa da propagação é a aclimatização (etapa *ex vitro*) das plântulas (DALPIAZ et al., 2019; FARIA et al., 2020). Foi Knudson, em 1922, quem desenvolveu o primeiro procedimento prático descrito para germinar sementes de orquídeas *in vitro*. Knudson inoculou sementes de orquídeas de *Cattleya*, *Laelia* e *Epidendrum* sobre um meio de cultura constituído de sacarose, ágar e sais, alcançando um percentual de germinação muito superior aos 5% que geralmente ocorre na natureza. Seu experimento foi pioneiro e até hoje serve de base para a propagação *in vitro* de diferentes espécies.

Como exemplo de estudos que buscam otimizar a produção de mudas de Melastomataceae através da técnica de propagação *in vitro* temos os trabalhos de CID et al. (1997) com *Miconia* spp.; Zeng et al. (2008) com *Tigridiopalma magnifica*; Elavazhagan e Arunachalam (2010) com *Memecylon edule*; Kozak e Wnuk (2012) com *Tibouchina urvilleana*; Elinorovololona e Martial (2014) com *Medinilla mandraken*; Prudente et al. (2016) e Prudente et al. (2017) com *Miconia ligustroides*; Lawarence e Murugan (2017) com *Osbeckia áspera*; Cárdenas-Burgos et al. (2019) com *Bucquetia glutinosa*; Fernández-Sánchez et al., (2020) com *Tibouchina grossa*, *Miconia ligustrina* e *Miconia squamulosa*; Karimah et al. (2020), Nauli et al. (2020), Putri et al. (2020) e Zakiyah et al. (2020) com *Melastoma malabathricum*; Cárdenas-Burgos et al. (2023) com *Miconia ligustrina*.

Embora o cultivo *in vitro* de plantas ou micropropagação apresente uma gama de aplicabilidades, ainda é uma técnica de propagação de plantas pouco conhecida pela sociedade como um todo (ALVES et al., 2018). Em vista disso e frente ao crescente e constante avanço tecnológico, diferentes técnicas de propagação de plantas merecem ser discutidas em ambientes promotores da aprendizagem e do desenvolvimento humano, como o ambiente escolar, sobretudo por estudantes da Educação Básica (SOUZA e CONTE, 2020). A compreensão das formas de reprodução das plantas e da importância desses métodos no nosso cotidiano, adicionalmente, pode contribuir para superação da Disparidade na Consciência Botânica (DCB), tendência de não notar as plantas no ambiente, subestimando sua importância (BROWNLEE et al., 2021; SOUSA e SUDÉRIO, 2023).

Um protocolo de propagação *in vitro* para *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* é desconhecido na literatura. Logo, estudos sobre a propagação *in vitro* dessas espécies, além de oferecerem a possibilidade de produção de mudas em larga escala de forma homogênea para plantios comerciais, apresentam-se como uma opção eficaz para futura aplicação de abordagens biotecnológicas de produção e conservação dessas espécies.

Com isso, desenvolveu-se o presente trabalho de tese considerando-se as seguintes hipóteses científicas: a) A propagação *in vitro* (micropropagação) é uma técnica alternativa aos métodos convencionais de propagação sexuada e assexuada de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile*. b) Oficinas pedagógicas contribuem para o ensino e aprendizado dos diferentes métodos de propagação de plantas no ensino de Ciências Naturais na Educação Básica.

Para testar e validar estas hipóteses, o presente estudo foi estruturado em seis capítulos, com os seguintes objetivos:

I. Avaliar a eficiência da germinação de sementes de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* propagadas por métodos convencionais (*ex vitro*) e em sistema *in vitro* em diferentes substratos.

II. Investigar os aspectos morfogênicos do desenvolvimento *in vitro* e posterior aclimatização de plântulas de *P. heteromallum*.

III. Investigar os aspectos morfogênicos do desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *P. mutabile* e de *P. granulosum* e posterior aclimatização das mudas.

IV. Investigar a resposta de explantes foliares de *P. heteromallum* cultivados *in vitro* em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com diferentes combinações de BAP (6-benzilaminopurina), AIB (ácido indol-3-butírico); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); PVP (polivinilpirrolidona) ou carvão ativo.

V. Avaliar a resposta morfogênica de microestacas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* e, posteriormente, o desempenho das plântulas durante a aclimatização.

VI. Analisar as potencialidades da oficina pedagógica “Popularização dos métodos de propagação de plantas no Ensino de Ciências” no processo de ensino e aprendizado dos conteúdos de botânica durante aulas de Ciências do 7º ano do Ensino Fundamental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pleroma granulosum* (Desr.) D. Don

Pleroma granulosum (Desr.) D. Don. (sinonímia botânica *Tibouchina granulosa*) popularmente conhecido como quaresmeira (Figura 1), é nativa do Brasil, endêmica do bioma Mata Atlântica, descrita nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (ZAIA e TAKAKI, 1998; LORENZI, 2008). Apresenta características que a leva ser amplamente utilizada em paisagens urbanas, sendo recomendável em projetos paisagísticos de parques e jardins, bem como na arborização de ruas estreitas e sob redes elétricas (LOPES et al., 2005). Podendo atingir até 12 metros de altura, com tronco de 30-40 cm de diâmetro, os ramos são distais, quadrangulares e alados. As folhas são simples, opostas cruzadas, lanceoladas ou elípticas a oblongas, medindo aproximadamente 15-20 cm de comprimento, pubescentes com indumento escabro nas duas faces, mais visível na face superior (LOPES et al., 2005; LORENZI, 2008; MEYER et al., 2010; FREITAS et al., 2016).

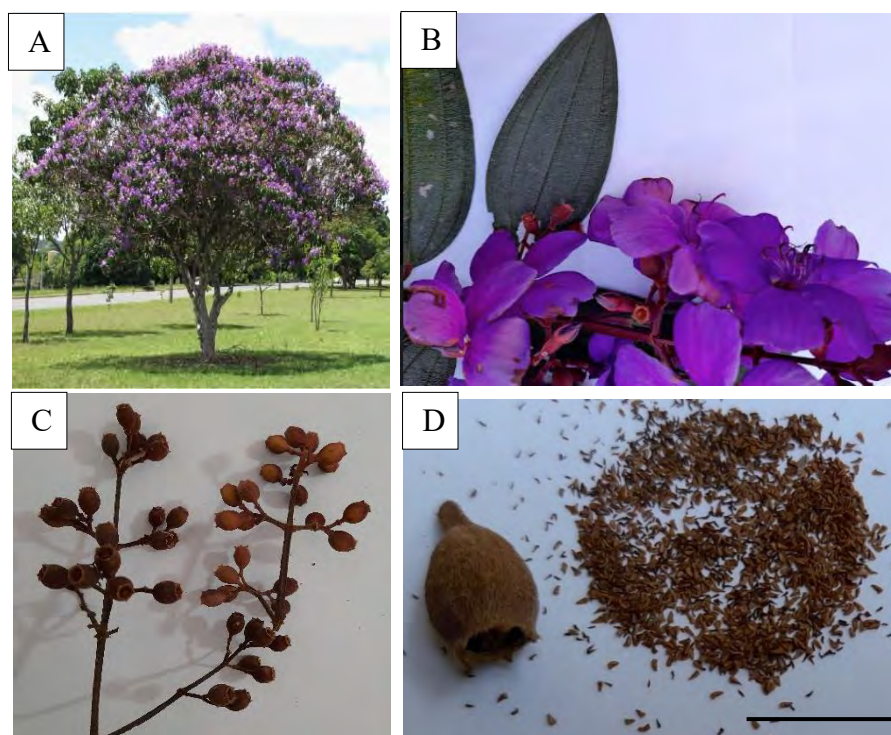


Figura 1. Exemplar da espécie *Pleroma granulosum* (Desr.) D. Don. Visão geral da planta (A); Detalhe das folhas e flores (B); Detalhe dos frutos tipo cápsula (C); Sementes (D) Barra: 1.0 cm. (Fonte: (A) Google imagens, 2023; (B), (C) e (D) Autora, 2021).

Florescem geralmente duas vezes ao ano entre junho-agosto e dezembro-março, suas flores são bissexuadas e pentâmeras, com pétalas de coloração roxas a róseas, estando dispostas em panículas terminais e axilares. O amadurecimento dos frutos se dá entre junho-agosto e abril-maio. Os frutos são do tipo cápsula deiscente, com muitas e diminutas sementes do tipo ortodoxa, em um 1 kg de semente contém aproximadamente 3.300.000 unidades (LORENZI, 2008; MOROZESK et al., 2014).

Zaia e Takaki (1998) em seu estudo com germinação de sementes de *T. granulosa* verificaram que o tempo mínimo necessário para a germinação das sementes da espécie foi de sete dias, com a percentagem máxima de germinação ocorrendo a partir do oitavo dia e percentual de germinação relativamente baixo, em torno de 15%. Esses autores verificaram, com auxílio de microscópio, que grande parte das sementes que não germinaram não possuía

embrião. Os autores também constataram que as sementes da espécie apresentavam forte dependência da luz (branca ou vermelha) para iniciarem o processo de germinação, apresentando resposta nula quando colocadas no escuro ou sob irradiação vermelho-extremo (VE), resposta típica de sementes de espécies pioneiras (ZAIA e TAKAKI, 1998).

Lato et al. (2018), ao estudarem a propagação vegetativa via estaquia caulinar de *P. granulosum* em diferentes estações do ano, verificaram que a melhor resposta de enraizamento ocorreu no verão, cujo percentual foi de 45,25%. Os autores sugeriram que o uso do ácido indolbutírico (AIB), uma auxina sintética, seja recomendado para a espécie nas concentrações de 1500 mg L⁻¹ e 3000 mg L⁻¹. Bortolini et al. (2008) utilizaram estacas caulinares semi-lenhosas de *T. granulosa* colhidas na primavera com 10 cm de comprimento e duas folhas reduzidas à metade na porção distal, sendo suas bases tratadas com diferentes concentrações de AIB (0 mg L⁻¹, 1500 mg L⁻¹ e 3000 mg L⁻¹). Esses autores verificaram que o percentual geral de enraizamento das estacas foi de 16,67% e que a concentração de 3.000 mg L⁻¹ de AIB promoveu a maior indução do sistema radicular, embora as estacas sem aplicação de AIB tenham apresentado o maior comprimento médio de raízes (BORTOLINI et al., 2008).

Levando-se em consideração os entraves da propagação convencional desta espécie, via sexuada e assexuada, estudos que permitam conhecer técnicas de propagação alternativas e que possam tornar a propagação sexuada e assexuada da espécie mais eficaz, tornam-se relevantes.

2.2 *Pleroma heteromallum* (D. Don) D. Don

Pleroma heteromallum (D. Don) D. Don (Sinonímia botânica *Tibouchina heteromalla*; *Tibouchina grandifolia*), nome popular orelha-de-onça (Figura 2), é endêmica do Brasil, presente nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, ocorrendo em Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, de forma isolada ou através de pequenas populações dispersas (GUIMARÃES, 2024). Apresenta importância ecológica, sobretudo na recuperação de áreas degradadas, uma vez que se trata de uma espécie pioneira, além do valor ornamental, neste caso sendo indicada para uso individual e na composição de renques e cercas vivas (CAMPOS et al., 2009; CÉZAR et al., 2009; KUSTER et al., 2009; CUEVAS-REYES et al., 2017).

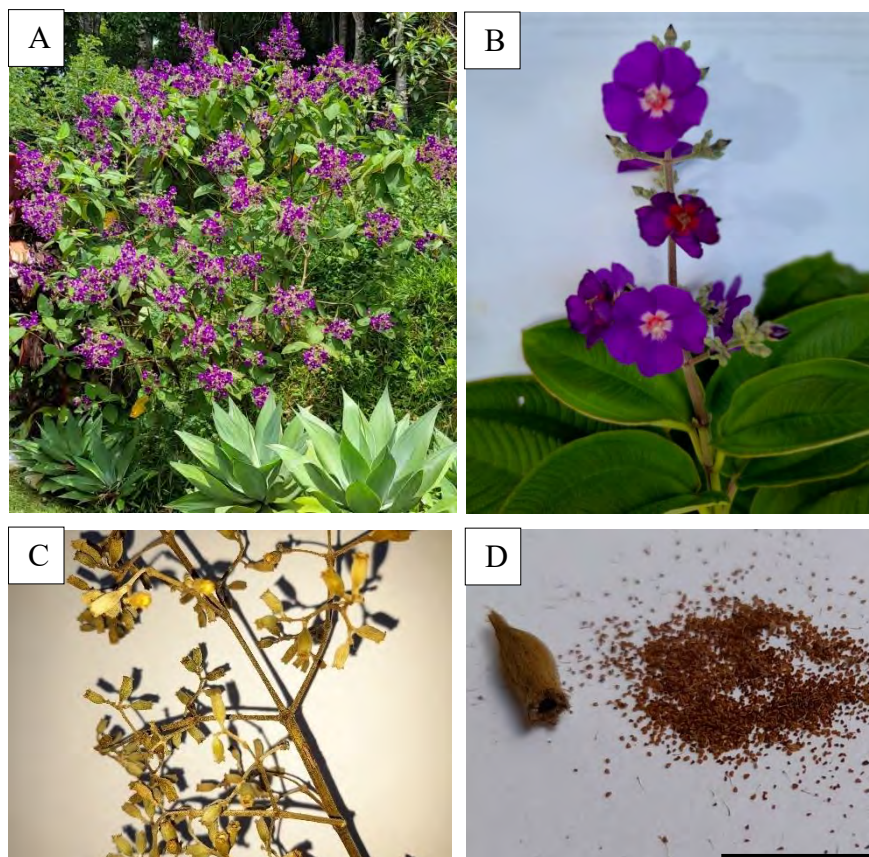


Figura 2. Exemplar da espécie *Pleroma heteromallum* (D. Don) D. Don. Visão geral da planta (A); Detalhe das folhas e flores (B); Detalhe dos frutos tipo cápsula (C); Sementes (D) Barra: 1.0 cm. (Fonte: Autora, 2021).

P. heteromallum é uma espécie perene, de porte arbustivo, variando de 1 a 3 metros de altura (LORENZI, 2015), os ramos jovens se apresentam na forma quadrangular a subcilíndricos, ramos adultos cilíndricos, ambos seríceos, as folhas são opostas, pecioladas (pecíolos de 1-2,5 cm de comprimento) com lâminas de 10-21 cm de comprimento, codiformes, pilosas, ápice agudo a obtuso, base arredondada, margem inteira discolores, face abaxial mais clara; face adaxial densamente serícea; inflorescência tirsóide, com flor terminal, composta de 15–27 flores; flores pentâmeras, com número de 10 estames, pétalas roxas; fruto do tipo cápsula, serícea; as sementes são diminutas, medindo cerca de 0,6 x 0,4 mm e são do tipo ortodoxas (CAMPOS et al., 2009; MEYER et al., 2010; LORENZI, 2015; FREITAS et al., 2016; LATOH et al., 2018). As plantas devem ser cultivadas a pleno sol, em canteiros de terra fértil, sendo sensível a geadas (LORENZI, 2015). A floração da espécie é assíncrona e ocorre entre os meses de janeiro e junho, o amadurecimento dos frutos, entre abril e setembro, sendo as abelhas da espécie *Xylocopa brasiliatorum* o principal polinizador da espécie (CAMPOS et al., 2009). Tradicionalmente, é propagada por estacas, que devem ser preparadas e postas para enraizar, preferencialmente, após o florescimento (LORENZI, 2015).

Estudos do sistema reprodutivo de *P. heteromallum* realizado por Campos et al. (2009) indicaram que a espécie é facultativa xenogâmica (polinização cruzada facultativa), com maior formação de frutos por polinização cruzada (44,6%) do que por autopolinização (12,7%). Nesse estudo Campos et al., (2009) constataram que, embora esta espécie não seja apomítica, o índice de auto-incompatibilidade (ISI) encontrado foi de 0,28, ou seja, embora autocompatível, se encontra muito próximo do limite de auto-incompatibilidade (ISI = 0,25). Logo, para uma reprodução bem sucedida, a formação de frutos é bastante dependente da visitação por seus polinizadores. Estas constatações corroboram com o exposto por Lorenzi

(2008), Simão e Takaki (2008), Cézar et al. (2009), Pereira et al. (2015) e Lato et al. (2019), quando mencionam que algumas espécies da família Melastomataceae costumam apresentar grande número de sementes abortadas, ausência de embriões na semente e baixa taxa de germinação. Campos et al. (2009) sugerem em seu trabalho que a propagação via sexual (sementes) da espécie é pouco eficiente, averiguando que a taxa total de germinação de sementes para a espécie foi de 56%, ocorrendo a partir do 6º dia estendendo-se até o 30º dias, sob temperatura de 25 ± 1 °C em estufa tipo B.O.D. e seguindo as Regras de Análise de Sementes (RAS), sendo observado para os tratamentos polinização aberta (ao acaso-controle) 68%; polinização cruzada manual 81% e autopolinização manual 20% de germinação de sementes.

Estudos realizados por e Lato et al. (2018) e Lato et al. (2019) apontaram, por exemplo, que *P. heteromallum* é uma espécie tradicionalmente propagada por estacas. Contudo, a propagação assexuada por estaquia limita a quantidade de mudas e pode propiciar a disseminação de doenças (VENTURA et al., 2017), o que seria um problema, fatos estes que sugerem a técnica de propagação *in vitro* como uma alternativa na multiplicação dessa espécie.

2.3 *Pleroma mutabile* (Vell.) Triana

Pleroma mutabile (Vell.) Triana (sinonímia botânica *Tibouchina mutabilis*), nome popular manacá-da-serra (Figura 3), é endêmica do Brasil, sendo nativa do bioma Mata Atlântica, ocorrendo principalmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (SIMÃO et al., 2007; LORENZI, 2008).

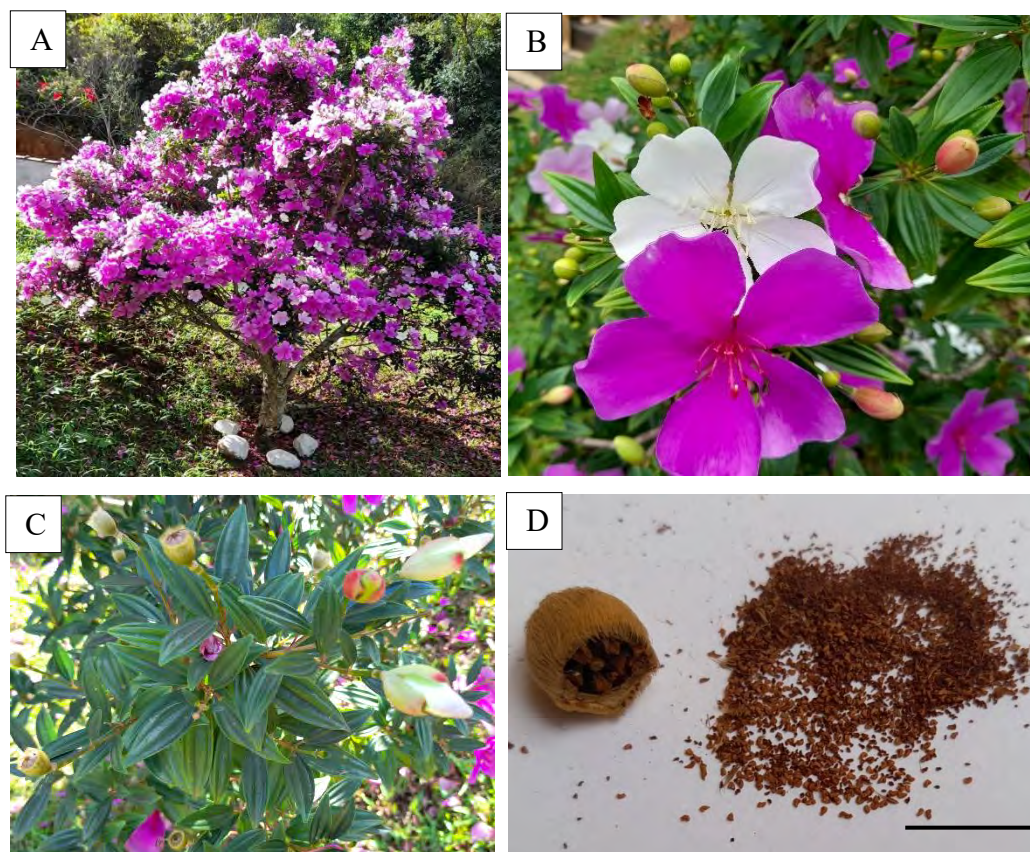


Figura 3. Exemplar da espécie *Pleroma mutabile* (Vell.) Triana. Visão geral da planta (A); Detalhe das flores (B); Detalhe das folhas e dos frutos tipo cápsula (C); Cápsulas e sementes (D) Barra: 1.0 cm. (Fonte: Autora, 2021).

É uma planta muito ramificada, podendo atingir até 10 m de altura, apresentando folhas simples, opostas cruzadas, lanceoladas ou oblongo-lanceoladas, com superfície marcada pelas nervuras, medindo 4-9 cm de comprimento e margem inteira com tricomas estrigosos (LORENZI, 2015; GUIMARÃES, 2024). Quando propagada por via vegetativa, adquire a forma arbustiva ou anã (manacá-da-serra-anão), não ultrapassando 3 m de altura e florescendo com menos de 0,5 m (LORENZI, 2015). As flores são solitárias, menos frequentemente agrupadas em ráceros axilares e apicais, pentâmeras, bissexuadas, inicialmente apresentam coloração branca, ficando lilases e finalmente adquirem coloração roxo-escuras, podendo florescer no inverno e no verão (LORENZI, 2015; GUIMARÃES, 2024). Os frutos são do tipo cápsula deiscente (1,1-1,2x1cm), com inúmeras sementes diminutas, por exemplo, um 1 kg de sementes contém aproximadamente 3.300.000 a 3.800.000 unidades (LORENZI, 2008). Além da importância ecológica, *P. mutabile* é muito utilizada em jardins, parques e na arborização urbana, devido à beleza de suas flores e pequeno porte, sendo também utilizadas na recuperação de áreas degradadas e reflorestamento (SIMÃO et al., 2007; LORENZI, 2008; SIMÃO e TAKAKI, 2008; LORENZI, 2015).

Simão et al. (2007) em estudos com germinação de sementes de *P. mutabile* verificaram que as mesmas necessitam de luz para germinar, não apresentando nenhum outro tipo de dormência e que o início da abertura natural das cápsulas e a mudança de coloração para verde amarelado claro do ápice e do pecíolo das cápsulas, são indicadores de fácil observação que podem ser utilizados para identificar o período de maturação fisiológica das sementes. Entretanto, os autores sugerem que devido às sementes serem anemocóricas e muito pequenas, que as colheitas dos frutos sejam realizadas antes da abertura das cápsulas, mantendo-as dentro do fruto para secagem e em condições ambiente. De acordo com Lorenzi (2008), embora a espécie seja do grupo das pioneiras, o desenvolvimento da espécie é moderado, sendo o desenvolvimento inicial das mudas lento e complicado, devido ao tamanho diminuto das mesmas. É uma espécie comumente propagada vegetativamente, via alporquia (LORENZI, 2015).

Assim a propagação *in vitro* ou micropropagação mostra-se como técnica interessante para suprir as dificuldades propagativas desta espécie, sobretudo para produção em grande escala.

2.4 Propagação de plantas *in vitro*

A propagação de plantas *in vitro*, também denominada micropropagação, é uma técnica recente, visto que os primeiros passos foram dados no início do século XX e os maiores avanços foram notados a partir da segunda metade desse mesmo século (CARVALHO e VIDAL, 2003). Teve início nos anos 30, sendo impulsionada nos anos 70 com um crescente interesse tanto na aplicação a nível comercial como por seu papel auxiliar em programas de melhoramento genético. Knudson (1922) foi quem desenvolveu o primeiro procedimento prático descrito para germinar sementes de orquídeas *in vitro* e a primeira aplicação comercial relatada na literatura foi feita por Georges Morel (1960) ao micropropagar orquídeas (CARVALHO et al., 2006). Desde então, a técnica vem assumindo papel importante na propagação em larga escala de espécies de interesse econômico, principalmente para aquelas caracterizadas por um longo período de maturação, baixa viabilidade de sementes e de difícil propagação através dos métodos convencionais, além de permitir a obtenção de plantas livres de fitopatógenos e o escalonamento de produção durante todo o ano e em espaço reduzido (JARDIM, 2006; PRUDENTE et al., 2016; CAMPOS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019; ALVES e NASCIMENTO 2020; FARIA et al., 2020).

As vantagens de usar a propagação *in vitro* para otimizar e até mesmo solucionar problemas de propagação e também a conservação de algumas espécies vegetais vem sendo discutidas nas últimas décadas, sobretudo no que versa espécies ornamentais e florestais

(PRUDENTE et al., 2016; CAMPOS et al., 2019; LIMA et al., 2020; VICENTE e ARAUJO, 2020). A técnica consiste no cultivo de sementes ou porções de tecidos (explantes) de uma planta, num meio de cultura nutritivo, em condições assépticas e sob condições ambientais controladas (DALPIAZ et al., 2019; FARIA et al., 2020). A técnica de propagação vegetativa *in vitro* consiste em promover a regeneração de uma parte qualquer (explante) retirada de uma planta-matriz a fim de formar um novo indivíduo, tendo como princípio fisiológico a totipotência celular (PRUDENTE et al., 2016). Sendo uma técnica muito relevante quando o objetivo é suprir as exigências do mercado por plantas uniformes, idênticas à planta matriz e de início de floração precoce, ou seja, de reduzida fase juvenil e, por isso, de grande importância quando se deseja a preservação de características agrônômicas desejáveis (NIENOW et al., 2010). As desvantagens estão relacionadas à diminuição da variabilidade genética da população, que é indesejável do ponto de vista da restauração ecológica e banco de germoplasmas (SOUSA et al., 2015).

A propagação vegetativa de espécies pode envolver condições *ex vitro* (estaquia, miniestaquia, alporquia, divisão de touceira, bulbos ou estolões) ou *in vitro* pela micropropagação, porém, ambas apresentam vantagens e desvantagens. No geral, a primeira oferece vantagens por ser de menor custo, pois exige um menor uso de tecnologias e mão de obra menos qualificada, sendo por isso mais acessível e adotada pelos viveiros e empresas do setor florestal (DIAS et al., 2012). Enquanto que a segunda permite a garantia de mudas de qualidade fitossanitária e sua produção massal a partir de um único e pequeno explante e em espaço reduzido, permitindo ganhos econômicos de produção e uma baixa razão custo-benefício, com taxa de multiplicação que pode alcançar de 100 a 1000 vezes superior que as convencionais técnicas de propagação vegetativa (ZENG et al., 2008; ELINOROVOLOLONA e MARTIAL, 2014).

Através desta revisão de literatura verificou-se que as pesquisas que tratam da propagação *in vitro* via semente ou via vegetativa de espécies Melastomataceae são escassas.

2.4.1 Germinação de sementes *in vitro*

Entende-se por germinação de sementes todos os eventos que acontecem entre o início da embebição da semente e a emergência do embrião, em geral a radícula (TAIZ et al. 2017), característica esta que marca, em nível fisiológico, o final da germinação propriamente dita e o início do crescimento da plântula (KERBAUY, 2019).

Quando falamos em embebição de sementes devemos levar em consideração o potencial osmótico (ψ_s), uma propriedade das soluções. O potencial osmótico (ψ_s) é particularmente importante em estágios iniciais de absorção de água pelas sementes secas, principalmente o de embebição, e quando se considera a água retida no solo ou substrato (KERBAUY, 2019). Este processo é fundamental e um dos mais importantes para a germinação de sementes de todas ou quase todas as espécies, uma vez que desencadeia uma série de mudanças fisiológicas, que em conjunto com outros fatores, culminará na germinação da semente (GUIMARÃES et al., 2013).

Entretanto, o sucesso da germinação de sementes depende de fatores intrínsecos, como a viabilidade do embrião e concentrações hormonais, e externos, como umidade, temperatura, luz, oxigênio, pH e da concentração de sais e de fitorreguladores no meio de cultura (KERBAUY, 2019).

Uma semente viável pode não germinar, mesmo se as condições ambientais forem favoráveis, devido a um fenômeno denominado dormência da semente. Este parece fornecer um período adicional para a dispersão da semente a distâncias geográficas e/ou temporal, além de permitir a sobrevivência da plântula pela inibição da germinação sob condições não favoráveis (TAIZ et al., 2017). A dormência pode ser classificada em primária ou secundária, a primeira parece estar envolvida principalmente com as concentrações endógenas de ácido

abscísico (ABA), ocorrendo ao final da maturação, ainda na planta mãe; a segunda se instala após o desligamento da semente da planta mãe, quando há um ambiente desfavorável ao processo germinativo (PRUDENTE et al., 2016; TAIZ et al., 2017; ALVES et al., 2019; KERBAUY, 2019).

Sabe-se que as concentrações endógenas de hormônios também estão envolvidas no processo de germinação de sementes, sobretudo de ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA). A razão ABA:GA, é um dos fatores endógenos determinantes na germinação/dormência de sementes, uma vez que ABA exerce um efeito inibitório, enquanto a giberelina exerce uma influência positiva sobre a germinação de sementes (TAIZ et al., 2017; KERBAUY, 2019). Prudente et al. (2016) testaram os meios de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) e MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementados com GA (0,0; 5,77; 11,54; 17,31; 23,08 μ M) na germinação *in vitro* de *Miconia ligustroides*, verificando que as concentrações de GA fornecidas não incrementaram na germinação das sementes e que, inclusive, o maior percentual de germinação foi obtido com o meio de cultura MS isento de GA. Dentre os trabalhos pesquisados durante esta revisão de literatura não foi verificado a necessidade do uso de fitorreguladores como, por exemplo, giberelinas no processo de indução de germinação de sementes de espécies de Melastomataceae.

2.4.2 Propagação vegetativa *in vitro* (micropropagação)

A propagação vegetativa *in vitro* está baseada na capacidade de totipotência celular, termo proposto em 1902 pelo botânico Gottlieb Haberlandt para descrever a potencialidade intrínseca de uma célula vegetal, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, de originar um indivíduo (planta) completo (RODRIGUES e KERBAUY, 2009). Teoricamente, todas as células são capazes de expressar totipotência, no entanto, na prática essa capacidade é influenciada pelos diferentes estados fisiológicos, bioquímicos e de desenvolvimento celular e, neste caso, esta capacidade é denominada de competência (ANDRADE, 2002). Os fenômenos morfogenéticos observados durante a propagação vegetal *in vitro* são resultantes da desdiferenciação, diferenciação ou rediferenciação de células do explante inicial que podem dar início aos processos de formação de órgãos ou embriões, respectivamente, organogênese e embriogênese somática (PAIVA e PAIVA, 2001; COUTO, 2018).

Tanto organogênese quanto a embriogênese podem ser diretas ou indiretas. Na direta o órgão vegetal é induzido e se desenvolve diretamente de um explante, isto é, sem passar por uma fase de calo; na indireta, há uma fase inicial de proliferação e crescimento de calo, seguida por indução e desenvolvimento de brotos ou raízes (ANDRADE, 2002; COUTO, 2018). Conceitualmente, calo é um aglomerado de células não diferenciadas e em contínua proliferação celular, que quando cultivados em meio de cultura apropriado, acrescido com reguladores de crescimento, propiciará a formação de brotos, raiz ou até mesmo de frutos (JARDIM, 2006). Logo, a micropropagação através da via direta tende a apresentar resultados em menor tempo, produzir elevada quantidade de plantas sem nenhuma instabilidade genética e geneticamente estáveis e idênticas à planta mãe, enquanto que a via indireta consiste em um método de cultura de tecidos vegetal dito “desvantajoso”, a depender do objetivo da pesquisa, por se tratar de um processo mais demorado e por criar variedades somaclonais morfofisiologicamente anormais (FARIA et al., 2020).

Basicamente três fatores afetam a regeneração da planta *in vitro*: o biológico (genótipo e o tipo e condição fisiológica do explante); a condição da cultura (concentrações de fitorreguladores vegetais, sacarose, pH, dentre outros) e o físico (principalmente temperatura, luminosidade e fotoperíodo) (ANDRADE, 2002; COUTO, 2018; BONFÁ, 2019). Lima et al. (2015) constataram que a germinação *in vitro* da espécie *Mouriri elliptica* não foi eficaz sob as condições experimentais aplicadas em seus estudos. Entretanto, Prudente et al. (2016) e Prudente et al. (2017), concluíram que a propagação *in vitro* se mostrou uma alternativa

adequada para a conservação e produção de mudas para fins de comercialização de *Miconia ligustroides*. Wang et al. (2015) obtiveram sucesso na cultura de ovário *in vitro* de *Medinilla formosana*. Logo, o sucesso da propagação *in vitro* depende do correto estabelecimento de todos esses fatores entre si e, para tanto, se faz necessários estudos que versam as maiores informações possíveis para plantas de uma determinada família, gênero, espécie ou até mesmo variedade.

Foi Toshio Murashige, em 1974, que desenvolveu o conceito de estádios de desenvolvimento na micropropagação, detalhando os procedimentos necessários, desde o estabelecimento *in vitro* dos explantes, até o restabelecimento das plantas em condições de campo. Desde então, um protocolo de propagação *in vitro* de plantas é comumente dividido em cinco fases, e o conjunto de todas essas fases formam um protocolo completo de propagação *in vitro* (COUTO, 2018), sendo elas:

Fase 0 – Seleção e preparo da planta matriz;

Fase I – Compreende a desinfestação e introdução do material vegetal em cultivo *in vitro*, em condições assépticas;

Fase II – Multiplicação *in vitro*, ocorrendo a indução e multiplicação de brotos com uso de diferentes fitorreguladores vegetais;

Fase III – Compreende o enraizamento dos brotos obtidos na fase anterior com uso ou não de fitorreguladores. Essa fase também pode ser realizada sob condições *ex vitro*; e

Fase IV – Aclimatização, nessa fase as plântulas obtidas são transferidas das condições *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, geralmente para condições de casa de vegetação ou estufas climatizadas. Trata-se de uma etapa crítica, representando, em muitos casos, as maiores perdas no cultivo *in vitro* de muitas espécies.

Entretanto, essas fases podem variar conforme as peculiaridades de cada espécie, podendo ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento, ou o esquema pode ser simplificado eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro*, manipulando-se as partes aéreas como microestacas, as quais enraizam diretamente no substrato de transplante (CARVALHO e VIDAL, 2003).

Do mesmo modo, o sucesso da propagação vegetativa *in vitro* de plantas depende de vários fatores, tanto intrínsecos, relacionados à própria planta, quanto extrínsecos, ligados às condições ambientais, como por exemplo, o tipo de explante, qualidade fitossanitária, componentes e suas concentrações no meio de cultura, temperatura e luminosidade (DIAS et al., 2012; KARIMAH et al., 2020). Dentre os fatores internos destaca-se como exemplo a concentração dos hormônios vegetais, que varia de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento da planta (DIAS et al., 2012). Os explantes podem possuir certa quantidade endógena de hormônios promotores ou inibidores de enraizamento, sendo necessário um balanceamento adequado entre eles para o sucesso da propagação.

2.4.3 Assepsia do explante e fatores químicos, físicos e biológicos envolvidos na propagação *in vitro*

O material cultivado *in vitro* tem que estar livre de microrganismos que possam interferir durante o processo, caso contrário, culminaria na contaminação do meio e, consequentemente, na perda de todo material propagativo (CARVALHO e VIDAL, 2003; ANDRADE, 2002). Para tanto, antes da inoculação em meio de cultura os explantes/sementes devem passar pela etapa de desinfestação. Nesta etapa os mesmos são submetidos a uma série de procedimentos e produtos que devem torná-los isentos de microrganismos em sua superfície externa (ANDRADE, 2002). Os procedimentos e agentes desinfestantes utilizados são os mais diversificados; os produtos mais utilizados são soluções à base de hipoclorito de sódio ou de cálcio, água oxigenada, cloreto de benzalcônio, coquetéis de fungicidas e

antibióticos, e até mesmo combinações dos vários produtos e com diferentes tempos de exposição (COUTO, 2018; JARDIM, 2006).

Levando-se em consideração a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, geralmente, a concentração da solução e o tempo de exposição são itens manipulados de maneira inversamente proporcional (JARDIM, 2006), uma vez que a maior dificuldade nessa fase reside na obtenção de explantes vegetais descontaminados sem conduzi-los à morte. Efetivamente, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na dificuldade de se obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e a frequente ocorrência de oxidações provocadas por compostos fenólicos (BAVARESCO et al., 2017).

O meio de cultura tem grande influência no desenvolvimento vegetal, pois é responsável por fornecer as condições ideais de nutrição e as características físico-químicas adequadas para o seu desenvolvimento (VICENTE et al., 2020). Por exemplo, as soluções de sais e açúcares do meio de cultivo influenciam o crescimento celular e a morfogênese pelas propriedades osmóticas e, conseqüentemente, o estabelecimento de plantas *in vitro* (PÊGO, 2009). Na germinação *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultivo não exercem efeito somente nutritivo, mas também influenciam osmoticamente na absorção de água durante a fase inicial de embebição (PIERINE et al., 2019).

Os meios de cultura se baseiam nas exigências nutricionais das plantas, devendo ser o mais adequado às necessidades de cada espécie e etapas *in vitro*, logo, não existe um meio de cultura padrão, que seja ideal para o balanço nutricional das diferentes espécies, mas o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de sais tem sido frequentemente utilizado para muitas espécies (VICENTE et al., 2020; CORDEIRO et al., 2014; PÊGO, 2009). É possível verificar na literatura o uso de infinitas combinações de macro e micronutrientes, vitaminas, fitorreguladores vegetais, açúcares, ágar-ágar, carvão ativo, PVP (polivinilpirrolidona), entre outros, na composição dos meios de cultura (VICENTE, 2019).

No geral, auxina e citocinina são dois grupos de fitorreguladores mais comumente utilizados em cultura de tecidos de plantas. A adição dos mesmos no meio de cultura é útil para regular a célula na divisão, alongamento e diferenciação e formação de órgãos (KARIMAH et al., 2020). A razão auxina/citocinina em meio de cultura é determinante para a resposta organogênica. Geralmente, altas razões auxina/citocinina induzem à formação de raízes adventícias, enquanto baixas razões induzem à formação de brotos. Em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada (calos) (CARVALHO et al., 2006). Em geral, explantes apicais apresentam nível de auxina mais alto que os explantes intermediários ou medianos (RIBEIRO et al., 2007).

Dentre os fatores físicos, temperatura e luz podem ser considerados uns dos mais importantes. As sementes de espécies da família Melastomataceae apresentam uma faixa de temperatura de germinação relativamente alta. Prudente et al. (2012) verificaram que a espécie *Tibouchina clavata* germina entre 15 a 35 °C, sendo que a temperatura ótima ocorre no intervalo de 20 a 30 °C, não apresentando germinação em 40 °C. De forma semelhante, Carreira e Zaidan (2007) verificaram que a maior germinabilidade das sementes das espécies *Miconia albicans*, *Miconia langosdorffii*, *Miconia rubiginosa*, *Miconia stenostachya*, *Schizocetron elegans* e *Tibouchina gracilis* foi obtida nas temperaturas entre 20 °C e 30 °C, com alterações na velocidade média de germinação, e as temperaturas de 15 °C e 35 °C afetaram negativamente a germinação das mesmas. Andrade (1995) verificou que dentre as temperaturas testadas na germinação de sementes de *Leandra breviflora*, *Tibouchina benthamiana*, *Tibouchina grandifolia* e *Tibouchina moricandiana*, a temperatura ótima para a germinação de sementes de todas as espécies foi de 30°C. O autor também verificou a

redução ou a ausência de germinação nas temperaturas de 15 e 35°C. Andrade e Pereira (1994) em estudo com *Tibouchina moricandiana* também verificaram que a temperatura ótima para a germinação de sementes desta espécie foi de 30°C, e que temperaturas de 20 e 35°C causaram o decréscimo no percentual e na velocidade de germinação.

Sabe-se que a luz é um sinal importante para quebrar a dormência nas sementes pela ativação de um pigmento fotorreceptor denominado de fitocromo. Este pigmento apresenta duas formas fotorreversíveis: a) a forma V (*Fv*) que percebe comprimentos de onda do vermelho (pico máximo de absorção 660 nm); b) a forma VE (*Fve*) que percebe o vermelho-extremo (pico máximo de absorção 730 nm) (TAIZ et al. 2017; KERBAUY, 2019). A fotoconversão da forma do fitocromo *Fv* a *Fve* é induzida por comprimento de onda no vermelho (V) e por luz azul, enquanto que a reversão de *Fve* a *Fv* é induzida por comprimento de onda no vermelho-extremo (VE) e também pelo escuro (CARREIRA e ZAIDAN, 2007; KERBAUY, 2019).

Além da qualidade da luz, as respostas ao fitocromo também podem depender da quantidade, intensidade e fotoperíodo. Este pigmento é o sensor primário para a germinação regulada por luz, por isso, em algumas espécies as sementes permanecem dormentes se estão enterradas abaixo de uma profundidade na qual a luz penetra ou até mesmo quando tais sementes estão na superfície do solo ou próximas a ela, a quantidade de sombra do dossel da vegetação (razão V:VE que a semente recebe), além disso, a forma *Fve* deste pigmento (fisiologicamente ativa) é muito instável e pequenas alterações podem afetar a germinação (CARREIRA e ZAIDAN, 2007; TAIZ et al., 2017; KERBAUY, 2019;)

Estudos com germinação de sementes de diferentes espécies de Melastomataceae demonstraram que, em geral, as mesmas apresentam fotoblastismo positivo, ou seja, não germinam ou apresentam baixo percentual de germinação na ausência de luz como, por exemplo, *Tibouchina clavata* (PRUDENTE et al., 2012); *Tibouchina heteromalla* (CAMPOS et al., 2009); *Tibouchina stenocarpa* (FAVA e ALBUQUERQUE, 2009); *Tibouchina mutabilis* (SIMÃO e TAKAKI, 2008; SIMÃO et al., 2007); *Tibouchina multiflora* (GARCIA et al., 2006); *Tibouchina pulchra* e *Tibouchina granulosa* (ZAIA e TAKAKI, 1998); *Tibouchina benthamiana*, *Tibouchina grandifolia* e *Tibouchina moricandiana* (ANDRADE, 1995); *Tibouchina moricandiana* (ANDRADE e PEREIRA, 1994); *Tibouchina urvilleana* (KRAEMER et al., 2000); *Tibouchina sellowiana* (BARBOSA et al., 1988) e *Tibouchina fothergillae* (PINTO et al., 1984).

Apesar das culturas *in vitro* apresentarem uma baixa taxa fotossintética e o carbono necessário ser fornecido através de carboidratos, tendo como principal fonte a sacarose, a luz é necessária para regular o processo de morfogênese como a formação de brotos e a iniciação de raízes. Em algumas espécies, o escuro ou a baixa intensidade luminosa durante os primeiros dias após a inoculação podem reduzir a oxidação fenólica dos explantes (MILDE, 1998). Cada espécie ou variedade se comporta de maneira diferente, e têm grande influência a idade da planta e suas condições prévias no campo, a época da coleta, o tipo de explante, a posição que este ocupa na planta e uma larga lista de aspectos, próprios do material vegetal, que dificilmente podem ser controlados em sua totalidade (CARVALHO e VIDAL, 2003). O que reafirma a necessidade de estudos que permitam conhecer os fatores inerentes a cada espécie para a obtenção de sucesso no processo de regeneração, multiplicação e estabelecimento da espécie de interesse *in vitro*.

O efeito do fotoperíodo e da temperatura sobre a germinação de sementes pode estar relacionado com a biossíntese de giberelinas, uma vez que esta biossíntese é fortemente regulada por fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura, os quais podem alterar os níveis de giberelinas bioativas por afetarem passos específicos da rota biossintética (KERBAUY, 2019).

2.4.4 Aclimatização

A fase final da propagação *in vitro* é conhecida como aclimatização, durante a qual as mudas resultantes são transferidas de condições *in vitro* para condições *ex vitro*, normalmente em casa de vegetação. Esta é uma etapa crítica que causa as maiores perdas no cultivo *in vitro* de muitas espécies. A passagem das mudas das condições *in vitro* para *ex vitro* torna-se crítica devido fatores como o estresse hídrico, taxa fotossintética, absorção de nutrientes e fitossanidade (PAIVA e PAIVA, 2001). Nessa etapa, as plantas passam por adaptações bioquímicas, anatômicas e morfológicas, alterando os processos fisiológicos até então adaptados para as condições de sobrevivência *in vitro* (VICENTE e ARAUJO, 2020).

O estresse hídrico resulta da elevada transpiração das plantas durante a transferência para a condição *ex vitro*. A baixa eficiência em regular a transpiração excessiva ocorre porque, em geral, as plantas *in vitro* possuem estômatos pouco funcionais, reduzido espessamento da cutícula e da parede das células epidérmicas, pequeno desenvolvimento do mesófilo foliar, com muitos espaços intercelulares e ausência ou reduzido número de tricomas na epiderme (LIMA-BRITO et al., 2016).

A atividade fotossintética das plantas *in vitro* é limitada principalmente pela reduzida intensidade luminosa, baixa concentração de CO₂ no recipiente de cultivo e presença de sacarose no meio de cultura que é, em geral, a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas neste ambiente (LIMA-BRITO et al., 2016). As raízes de plantas provenientes da propagação *in vitro* são fracas e pouco funcionais, uma vez que no meio de cultura as plântulas, em geral, encontram facilmente disponíveis todos os suprimentos necessários para seu desenvolvimento (ZANDONÁ et al., 2014). Além disso, plântulas propagadas em condições *in vitro*, ou seja, em condições assépticas são, portanto, privadas de potenciais microrganismos patogênicos, mas também daqueles que possam apresentar efeitos benéficos ao seu desenvolvimento (VICENTE e ARAUJO, 2020).

Dentre os trabalhos de propagação *in vitro* com Melastomataceae que elucidaram a etapa de aclimatização é citado Lawrence e Murugan (2017), que aclimatizaram plântulas de *Osbeckia aspera* sob ambiente natural em Ponmudi/Índia e terra de jardim e alcançaram 90% de sobrevivência de plantas. Prudente et al. (2016) averiguaram índice de sobrevivência em torno de 55% para *Miconia ligustroides*, atribuindo a baixa taxa de sobrevivência à fragilidade dos tecidos foliares dessa espécie, o que, possivelmente, dificultou seu estabelecimento *ex vitro*. Wang et al. (2015), em estudos com germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Medinilla formosana*, relataram que houve sucesso na aclimatização das mudas provenientes de cultivo *in vitro* a partir de sementes, entretanto, os autores não dão maiores detalhes do material e métodos utilizados nesta etapa. Zeng et al. (2008) aclimatizaram trezentas plântulas bem desenvolvidas de *Tigridiopalma magnifica* provenientes do cultivo *in vitro*; as mesmas foram dispostas em vasos de plantio contendo uma mistura de areia, turfa peneirada e perlita (1: 1: 1; v/v) e transferidas para casa de vegetação. Após 30 dias 86% das mudas sobreviveram, não demonstrando qualquer variação fenotípica em comparação com as plantas de origem. A etapa de aclimatização é fundamental nessa técnica, visto que se trata de uma das etapas mais crítica na micropropagação de plantas. Pode-se verificar que protocolos completos de micropropagação para Melastomataceae são escassos na literatura.

2.5 Ensino e aprendizado de botânica na Educação Básica

O ensino de botânica, em todos os níveis acadêmicos, tem sido motivo de preocupação em nosso país, caracterizando-se como excessivamente teórico, desestimulante e subvalorizado no conjunto das Ciências Biológicas (SALATINO e BUCKERIDGE, 2016). Nesse contexto, a escola deve promover um processo de ensino e aprendizagem apoiado em um currículo dinâmico e atual, distanciando-se do ensino tradicional baseado em currículos

lineares e de práticas meramente memorísticas, que transformam o Ensino de Ciências, não em descobertas, mas sim, em simples memorização de conteúdos (SANTOS et al., 2020).

De acordo com Ursi et al., (2018), em muitas circunstâncias, o ensino e aprendizado dos conteúdos de Botânica são ofertados de forma descontextualizada, sendo esse provavelmente um dos fatores que causam maior desinteresse e dificuldade de aprendizagem por parte dos estudantes. A “cegueira botânica” também é uma das hipóteses defendidas por Salatino e Buckeridge (2016) para explicar tais dificuldades no Ensino de Botânica. Atualmente denominada “Disparidade na Conscientização Botânica (DCB)”, trata-se da tendência de não notar as plantas no ambiente, subestimando sua importância (BROWNLEE et al., 2021).

Estudos relatam a dificuldade e, por conseguinte, o desinteresse de professores e estudantes no ensino e aprendizado desses conteúdos (SALATINO e BUCKERIDGE, 2016; URSI et al., 2018; VINHOLI JÚNIOR et al., 2018; SOUSA e SUDÉRIO, 2023). A dificuldade pode estar ligada à formação inicial e continuada dos professores ou ao pouco interesse por esses conteúdos, o que leva a uma abordagem superficial dos assuntos (OLIVEIRA et al., 2022). Nessa perspectiva, a aproximação entre universidades e a escolas através da extensão universitária desempenha um papel fundamental na formação de profissionais qualificados e na disseminação do conhecimento para a comunidade, impactando positivamente a sociedade como um todo (SOUZA e CONTE, 2020).

No Ensino Fundamental (EF), os conteúdos de Botânica estão presentes na disciplina de Ciências da Natureza desde os anos iniciais até os anos finais (BRASIL, 2018). De acordo com a Base Nacional Comum Curricular (BNCC) de 2018, os conteúdos de reprodução de plantas deverão ser ministrados no 2º e 8º ano do EF, respectivamente, onde os alunos deverão adquirir uma série de habilidades, entre elas: “(EF02CI06) Identificar as principais partes de uma planta (raiz, caule, folhas, flores e frutos) e a função desempenhada por cada uma delas, e analisar as relações entre as plantas, o ambiente e os demais seres vivos.” (BRASIL, 2018, p. 335). “(EF08CI07) Comparar diferentes processos reprodutivos em plantas e animais em relação aos mecanismos adaptativos e evolutivos” (BRASIL, 2018, p. 349).

Segundo Oliveira e Santos (2022) a aprendizagem significativa depende de duas condições: da disposição que o aluno precisa ter para aprender e da contextualização do conteúdo escolar, este que deve condizer com a realidade do aluno. Para que o processo de aprendizagem seja significativo, além da contextualização do conteúdo escolar com a realidade do aluno, também se faz necessário à aplicação de metodologias dinâmicas e interativas (MORAIS et al., 2019; SANTOS e AÑEZ, 2021; URSI et al., 2018). É fundamental propor situações educativas voltadas à promoção e construção coletiva do conhecimento, à integração de alunos e professores, que permitam a aprendizagem por meio da interação e da troca de conhecimento entre os participantes (SANTOS et al., 2020).

Estudos demonstram que o uso de material concreto em sala de aula é uma forma de apresentar ao aluno uma maneira mais fácil e palpável de aprender tornando a aula participativa e proveitosa (SILVA e SILVA, 2017). Dessa maneira, a utilização de oficinas pedagógicas mostra-se como importante estratégia metodológica, unindo teoria e prática de maneira lúdica e vivenciada, possibilitando o ensino e aprendizado mais interessante dos conteúdos de Botânica (FELICETI et al., 2021; OLIVEIRA e SANTOS, 2022), sobretudo dos diferentes métodos de propagação de plantas.

2.6 REFERÊNCIAS

- ALVES, D. S.; POLETO, R. S.; PASSOS, M. M. Dormência e germinação de sementes: uma proposta de ensino com evidências de aprendizagem. **Revista Ciências & Ideias**, v. 10, n. 3, 2019. DOI: [10.22047/2176-1477/2019.v10i3.1053](https://doi.org/10.22047/2176-1477/2019.v10i3.1053)
- ALVES, L. C.; LOPES, A. P.; ARAÚJO, T. V. M.; LIMA, R. A. Approach on vegetative propagation *in vitro* for the education of sciences in public school in the municipality of Benjamin Constant-AM, Brazil. **Experiências em Ensino de Ciências**, v.13, n.5, 2018.
- ALVES, R. C. M.; NASCIMENTO, D. D.. Cultivo *in vitro* de sorgo. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v.10, n.1, p.53-63, 2020.
- ANDRADE, A. C. S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de *Leandra breviflora* Cogn., *Tibouchina benthamiana* Cogn., *Tibouchina grandifolia* Cogn. e *Tibouchina moricandiana* (DC.) Baill. (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 1, p. 29-35, 1995. DOI: [10.17801 / 0101-3122 / rbs.v17n1p29-35](https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v17n1p29-35)
- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Germinação e desenvolvimento pós-seminal de *Tibouchina Moricandiana* (DC) Baill. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.8, n.2, p. 231-239, 1994. DOI: [10.1590/S0102-33061994000200008](https://doi.org/10.1590/S0102-33061994000200008)
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. 1ª Edição. Documentos 58. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p.
- BARBOSA, J.M.; BARBOSA, L.M.; PINTO, M.M.; AGUIAR, I.B. Efeito do substrato, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de quaresmeira. **Revista Brasileira de Sementes**, v.10, n.3, p.69-77, 1988.
- BAVARESCO, L. G.; PASQUALI, R.; FLUMINHAN, A. Cultivo *in vitro* de explantes removidos de plantas cultivadas a campo visando à micropropagação de *Eucalyptus citriodora*. **Fórum Ambiental de Alta Paulista**, v.13, n. 6, 2017. DOI: [10.17271/1980082713620171714](https://doi.org/10.17271/1980082713620171714)
- BOMFIM, E. M. S.; COELHO, A. A. O. P.; SILVA, M. C.; MARQUES, E. J.; VALE, V. L. C. Phytochemical composition and biological activities of extracts from ten species of the family Melastomataceae Juss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, e242112, 2022. DOI: [10.1590/1519-6984.242112](https://doi.org/10.1590/1519-6984.242112)
- BONFÁ, Y. S. **Propagação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. uma espécie arbórea brasileira ameaçada de extinção**. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Centro de Ciências Humanas e Naturais, 2019. 59p.

BORTOLINI, M. F.; MAYER, J. L. S.; ZUFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S.; CARPANEZZI, A. A. Enraizamento de estacas caulinares de quatro espécies do gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae Juss.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.14, n.2, p.187-192, 2008. DOI: [10.14295/rbho.v14i2.289](https://doi.org/10.14295/rbho.v14i2.289)

BRASIL. **Base Nacional Comum Curricular (BNCC): educação é a base**. Brasília, DF: MEC/CONSED/UNDIME, 2018. 595p.

BROWNLEE, K.; PARSLEY, K.; SABEL, J. An Analysis of plant awareness disparity within introductory Biology textbook images. **Journal of Biological Education**, 2021. DOI: [10.1080/00219266.2021.1920301](https://doi.org/10.1080/00219266.2021.1920301)

CAMPOS, A. S.; MELO, P. B. S.; BERTINI, C. H. C. M.; CARVALHO, A. C. P. P. Propagação *in vitro* de antúrio ‘Rubi’: estiolamento e regeneração de brotações. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** 185. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1ª edição On-line, p. 4-21, 2019.

CAMPOS, C. C. F.; DUARTE, J. F.; BORÉM, R. A. T.; CASTRO, D. M. Biologia floral e mecanismos de melhoramento de *Tibouchina heteromalla* Cong. em afloramentos rochosos no sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Ecology**, n.1, 2009.

CÁRDENAS-BURGOS, C.A.; ARAQUE-BARRERA, J.; BOHORQUEZ-QUINTERO, M.A.; HERNÁNDEZ-HERRERA, Y.; PACHECO-MALDONADO, J.C. Propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Paramos colombianos. **Rodriguésia**, v.70: e00682018, 2019 DOI: [10.1590/2175-7860201970057](https://doi.org/10.1590/2175-7860201970057)

CÁRDENAS-BURGOS, C.A.; ROMERO MURCIA, J.E.; ECHEVERRY RAMÍREZ, L.A.; PACHECO SALAMANCA, R.A. **Propagación de flora nativa: Experiencias desde el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Aplicación de técnicas tradicionales y biotecnológicas**. Bogotá, D.C.: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. 369p., 2023.

CARREIRA, R. C.; ZAIDAN, L. B. P. Germinação de sementes de espécies de Melastomataceae de Cerrado sob condições controladas de luz e temperatura. **Hoehnea** [online], v.34, n.3, p.261-269, 2007. DOI: [10.1590/S2236-89062007000300001](https://doi.org/10.1590/S2236-89062007000300001).

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Embrapa Algodão. Documentos, 116. Campina Grande, 2003. 39p.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores Inerentes à Micropropagação**. Embrapa Algodão. Documentos, 148. Campina Grande, 2006. 28p.

CÉZAR, T. M.; SOUZA, F. C.; MACIEL, R. T.; DEMBISKI, W.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Estaquia e alporquia de *Tibouchina fothergillae* (D.C.) Cogn. (Melastomataceae) com a aplicação de ácido naftaleno acético. **Scientia Agraria**, v.10, n.6, p.463-468, 2009. DOI: [10.5380/rsa.v10i6.15719](https://doi.org/10.5380/rsa.v10i6.15719)

CID, L. P. B.; GOMES, A. C. M.; COSTA, S. B. R.; TEIXEIRA, J. B. Micropropagation of *Miconia* sp. a woody Melastomataceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.1, p. 21-25, 1997.

CORDEIRO, G. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Forestali**, v. 42, n. 103, p. 337-344, 2014.

COUTO, T. R. **Diversidade morfológica e propagação *in vitro* de gérberas a partir de folhas pecioladas**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2018. 160 p.

CUEVAS-REYES, P.; NOVAIS, G. C. N.; GÉLVEZ-ZÚÑIGA, I.; FERNANDES, G. W.; VENÂNCIO, H.; SANTOS, J. C.; MALDONADO-LÓPEZ, Y. Effects of ferric soils on arthropod abundance and herbivory on *Tibouchina heteromalla* (Melastomataceae): is fluctuating asymmetry a good indicator of environmental stress? **Plant Ecology**, v. 219, p. 69-78, 2017. DOI: [10.1007/s11258-017-0778-y](https://doi.org/10.1007/s11258-017-0778-y)

DALPIAZ, E. L.; OLIVEIRA, M. F.; PAULERT, R.; ZONETTI, P. C.; STEFANELLO, S. Germinação *in vitro* e enraizamento de microestacas de espinheira santa. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.2, p.415- 425, 2019. DOI: [10.5380/rber.v8i2.65652](https://doi.org/10.5380/rber.v8i2.65652)

DIAS, P.C.; OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012. DOI: [10.4336/2012.pfb.32.72.453](https://doi.org/10.4336/2012.pfb.32.72.453)

ELINOROVOLOLONA, R. N.; MARTIAL, E. L. Effects of growth regulators 6-Benzylaminopurine and 2-Naphtalene Acetic Acid on the *in vitro* shoot multiplication from nodal segment of *Medinilla mandrakensis* (Melastomataceae), **International Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.3, n.1, p. 504-510, 2014.

ELAVAZHAGAN, T.; ARUNACHALAM, K. D. *In vitro* callus induction and shoot multiplication from nodal explants and leaves of *Memecylon edule*. *Jornal Asiático de Biotecnologia*, v.2, n.2, p.110-119, 2010. DOI: [10.3923/ajbkr.2010.110.119](https://doi.org/10.3923/ajbkr.2010.110.119)

FARIA, G. A.; OLIVEIRA, C. P. M.; LOPES, B. G.; ROCHA, P. S.; PERON, G. M.; SOUZA, K. S.; GARCIA, C. K.; FURLANI JUNIOR, E.; CAVICHIOLI, J. C.; FELIZARDO, L. M.. Establishment of a protocol for *in vitro* propagation of *Passiflora caerulea*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e157997158, 2020. DOI: [10.33448/rsd-v9i9.7158](https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7158)

FAVA, C. L. F.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Germinação de sementes de *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn. em função da temperatura e do substrato. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.15, n.1, p. 43-48, 2009. DOI: [10.14295/rbho.v15i1.434](https://doi.org/10.14295/rbho.v15i1.434)

FELICETI, M. L.; MASIERO, M. A.; GOMES, J. O.; BELUSSO, J. R. D.; LIMA, D. M. de. A produção de mudas via propagação vegetativa e a construção do conhecimento no contexto escolar. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 10, e301101018668, 2021. DOI: [10.33448/rsd-v10i10.18668](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18668)

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L., MANCIPE-MURILLO, C., CALDERÓN-HERNÁNDEZ, M. Evaluación de dos métodos de propagación para la conservación *ex situ* de tres Melastomataceas altoandinas. **Caldasia**, v.42, n.1, p.129–141, 2020. DOI: [10.15446/caldasia.v42n1.75373](https://doi.org/10.15446/caldasia.v42n1.75373)

FREITAS, J. G.; SANTOS, A. K. A.; GUIMARÃES, P. J. F.; OLIVEIRA, R. P. Flora da Bahia: Melastomataceae – Tibouchinas. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v.16, p.16-46, 2016. DOI: [10.13102/scb1111](https://doi.org/10.13102/scb1111)

GARCIA, L. C.; BARROS, F. V.; LEMOS FILHO, J. P. Comportamento germinativo de duas espécies de canga ferrífera: *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae) e *Tibouchina multiflora* Cogn. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 443-448, 2006. DOI: [10.1590/S0102-33062006000200019](https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000200019)

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; MICHELANGELI, F.A.; GUIMARÃES, P.J.F.; ROMERO, R.; VERSIANE, A.F.A.; FIDANZA, K.; VÖLTZ, R.R.; SILVA, D.N.; LIMA, L.F.G.; SILVA-GONÇALVES, K.C.; BACCI, L.F.; FONTELAS, J.C.; PACIFICO, R.; BRITO, E.S.; ROCHA, M.J.R.; CADDAD, M.K.; MEIRELLES, J.; ROSA, P.; FERREIRA-ALVES, R.; SANTOS, A.K.A.; MOREIRA, K.V.C.; REGINATO, M.; OLIVEIRA, L.F.A.; FREIRE-FIERRO, A.; AMORIM, A.M.A.; MARTINS, A.B.; ALMEDA, F.; HINOSHITA, L.K.R.; KRIEBEL, R.; MEYER, F.S. Melastomataceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB161>>. Acesso em: 24 set. 2023

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. D. R. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. **Rodriguésia**, v.63, n.1, p.145-161, 2012. DOI: [10.1590/S2175-78602012000100011](https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000100011)

GOMES, A. C.; PÊGO, R. G.; VICENTE, M. C.; FERREIRA, C. S.; BARROSO, L. T. Tecnologia para superação de dormência física de sementes de *turnerasubulata*: Uma espécie nativa com potencial para paisagismo em áreas de restinga. **A transformação da agronomia e o perfil do novo profissional [recurso eletrônico]** / Organizadores Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos, Analya Roberta Fernandes Oliveira, Kleber Veras Cordeiro. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. p.75-84 DOI: [10.22533/at.ed.0602016069](https://doi.org/10.22533/at.ed.0602016069)

GRANEMANN, F. S.; SANTOS, K. L.; GRANEMANN, F.; STEINER, N. Caracterização de espécies vegetais nativas com potencial ornamental de ocorrência na região de Curitiba, SC. **Agropecuária Catarinense**, v.30, n.1, p.79-83, 2017. DOI: [10.52945/rac.v30i1.81](https://doi.org/10.52945/rac.v30i1.81)

GUIMARÃES, M. A.; TEELO, J. P. J.; DAMASCENO, L. A.; VIANA, C. S.; MONTEIRO L. R. Pré-embebição de sementes e seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de plântulas de melância. **Revista Ceres**, v.60, n.3, p.442-446, 2013. DOI: [10.1590/S0034-737X2013000300020](https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000300020)

GUIMARÃES, P. J. F. *Pleroma in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 13 mai. 2024.

JARDIM, L. S.; **Propagação vegetativa *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae).** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais. Manaus: UEA\INPA, 2006. 53p.

KARIMAH, K., YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. *In vitro* culture from internodes of *Melastoma malabathricum* L. on Murashige and Skoog (1962) modified medium with thidiazuron and 1-naphthaleneacetic acid. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.481, n.1, 2020. DOI: [10.1088/1755-1315/481/1/012007](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012007)

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 420p.

KNUDSON, L. Non-symbiotic germination of orchid seed. **Botanical Gazette**, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

KOZAK, D.; WNUK, K. The influence of the salt composition of basal medium and growth regulators on *in vitro* growth and development of *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v.11, n.6, p. 59-68, 2012.

KRAEMER, K. H.; KAMPF, A. N.; ÁQUILA, M. E. A. Luz e temperatura na germinação de sementes de *Tibouchina urvilleana*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.6, n.1/2, p.39–45, 2000. DOI: [10.14295/rbho.v6i1.61](https://doi.org/10.14295/rbho.v6i1.61)

KUSTER, R. M.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, n.1 p.63-65, 2009. DOI: [10.1016/j.bse.2009.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.01.005)

LATOH, L. P.; DALLAGRANA, J. F.; PORTES, D. C.; MAGGIONI, R. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.. Propagação vegetativa via miniestaquia caulinar seriada e produtividade de minijardim e de espécies de *Tibouchina* spp. **REVUERGS - Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, n.3, p. 343-357, 2018. DOI: [10.21674/2448-0479.43.343-357](https://doi.org/10.21674/2448-0479.43.343-357)

LATOH, L. P.; GOMES, E. N.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Can indolebutyric and fulvic acids induce adventitious rhizogenesis on mini-cuttings from Brazilian native tibouchinas? **Ornamental Horticulture**, v. 25, n.1, p. 42-48, 2019. DOI: [10.14295/oh.v25i1.1257](https://doi.org/10.14295/oh.v25i1.1257)

LAWARENCE, B.; MURUGAN, K. *In vitro* callus induction and plant regeneration of *Osbeckia aspera* L., a dye yielding medicinal plant. **Trends in Biosciences**, v.10, n.18, p.3297-3303, 2017.

LIMA, A. P. P. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência. Rural** [online], v.50, n.2, 2020. DOI: [10.1590/0103-8478cr20180922](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180922)

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M.M.S.; RESENDE, S.V.; CARNEIRO, C.E.; SANTANA, J.R.F. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016. DOI: [10.5935/1806-6690.20160018](https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160018)

LOPES, J. C. L.; DIAS, P. C.; PEREIRA, M. D. Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p.811-816, 2005. DOI: [10.1590/S0100-204X2005000800012](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800012)

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2015. 1120p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 1. 5ª Edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 384p.

LLOYD G, MCCOWN B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARTINELLI, G.; MARTINS, E.; MORAES, M.; LOYOLA, R.; AMARO, R. (Orgs.). **Livro Vermelho da Flora Endêmica do Estado do Rio de Janeiro**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Rio de Janeiro, 2018, 456 p.

MARTINELLI, G.; MOARES, M. A. (Orgs.). **Livro vermelho da flora do Brasil - 1. ed.** - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

NAULI, R.; YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. *In vitro* culture of leaf explant *Melastoma malabathricum* L. on Murashige & Skoog (1962) modified medium with thidiazuron (TDZ) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 481, 2020. DOI: [10.1088 / 1755-1315 / 481/1/012025](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012025)

NIENOW, A. A.; CHURA, G.; PETRY, C.; COSTA, C. Enraizamento de estacas de quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.16, n.4, p.139-142, 2010.

MEYER, F. S.; GUIMARÃES, P. J. F.; GOLDENBERG, R. *Tibouchina* (Melastomataceae) do estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v.61, n. 4, p. 615-638, 2010. DOI: [10.1590/2175-7860201061405](https://doi.org/10.1590/2175-7860201061405)

MILDE, G.A. **Micropropagação de *Tibouchina urvilleana* (DC.) cogn. para a revegetação de áreas degradadas na Ilha de Santa Catarina**. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia), Universidade Federal de Santa Catarina, 65p. 1998.

MORAIS, C. S.; SIMÕES NETO, J. E.; FERREIRA, H. S. Oficina pedagógica de aprendizagem: uma proposta de ferramenta didática para museus de Ciências. **REnCiMa**

Revista de Ensino de Ciências e Matemática, v.10, n.3, p. 204-222, 2019. DOI: [10.26843/rencima.v10i3.1514](https://doi.org/10.26843/rencima.v10i3.1514)

MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, v. 29, p. 495-497, 1960.

MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; DUARTE, I. D.; ZANI, L. B.; CORTE, V. B. Longevidade de sementes nativas da Floresta Atlântica. **Natureza on line**, n.12, v.4, p.185-194, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

MURASHIGE, T. Plant propagation throught tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974. DOI: [10.1146/annurev.pp.25.060174.001031](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031)

OLIVEIRA, A. P. S.; OLIVEIRA; E. T. C. C.; QUEIROZ, L. L. G.; CRUZ, R. D. M. Principais desafios no ensino-aprendizagem de botânica na visão de um grupo de professores da educação básica. **Revista Pedagógica**, v. 24, p. 1-26, 2022. DOI: [10.22196/rp.v22i0.6566](https://doi.org/10.22196/rp.v22i0.6566)

OLIVEIRA, M. G. M.; SANTOS, I. S. Oficinas pedagógicas e aprendizagem significativa no ensino de Geografia. **Revista Ensino de Geografia**, v. 5, n. 3, 2022. DOI: [10.51359/2594-9616.2022.253710](https://doi.org/10.51359/2594-9616.2022.253710)

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de Tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.

PÊGO, R. G. **Micropropagação de sempre-vivas *Syngonanthus elegans* e *Syngonanthus eleganthulus***. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – Lavras: UFLA, 2009. 50 p.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. *In vitro* seed germination and seedlings development of *Syngonanthuselegans* and *Syngonanthuseleganthulus*. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 249-254, 2015. DOI: [10.17660/ActaHortic.2015.1083.30](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.30)

PEREIRA, M. O; GRABIAS, J.; ZUFFELATTO-RIBAS, K. C.; NAVROSKI, M. C. Enraizamento de estacas de *Tibouchina moricandiana* var. vinacea em função da forma de aplicação e concentrações de AIB. **Revistade Ciências Agroveterinárias**, v.14, n.3, p.210-216, 2015. DOI: [10.5965/223811711432015210](https://doi.org/10.5965/223811711432015210)

PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to system of point in space. **Philosophical Magazine**, v.2, p.559-572, 1901.

PIERINE, F. R.; GIANINI, P. F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Germinação e crescimento de plântulas *in vitro* de *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) submetida a diferentes meios de cultivo. **Iheringia**, Série Botânica, v. 74, 2019002, 4 p., 2019. DOI: [10.21826/2446-82312019v74e2019002](https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019002)

PINTO, M. M.; BARBOSA, J. M.; SILVEIRA, R. B. A. Contribuição à caracterização cultural de *Tibouchina fothergillae* Cogn. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura e Plantas Ornamentais, 4., 1983, Rio de Janeiro. Anais... Brasília: EMBRAPA – DDT, p.179–183, 1984.

PLESSIS, H. J.; NIKOLOVA, R. V.; KLEYNHANS, R.; EGAN, B. A. *In vitro* seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *Barnardii*. **Ornamental Horticulture**, v. 26, n. 4, 2020. DOI: [10.1590/2447-536X.v26i4.2191](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i4.2191)

PRUDENTE, C.M.; SADER, R.; BARBOSA, J.M.; SANTOS JUNIOR, N.A. Produção de sementes e comportamento germinativo de *Tibouchina clavata* (Pers.) Wurdack. (Melastomataceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 94, p. 241-248, 2012.

PRUDENTE, D. O.; DOMICIANO, D.; PAIVA, R.; NERY, F. C.; MÁXIMO, W. P. F. Cryopreservation and effect of lighting conditions and cytokinins on *in vitro* multiplication of *Miconia ligustroides* (DC.) Naudin. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n.7, p. 502-511, 2017. DOI: [10.5897/AJAR2016.12021](https://doi.org/10.5897/AJAR2016.12021)

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; PAIVA, P. D. O.; NERY, M. C. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture E Micropropagation**, Lavras, v.12, n.1, p. 13-19, 2016.

PUTRI, F.; YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. The effects of thidiazuron and 2,4-D on the regeneration of *Melastoma malabathricum* L. cultured leaves. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 481, 2020. DOI: [10.1088/1755-1315/481/1/012028](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012028)

RIBEIRO, M. N. O.; PAIVA, P. D.; SILVA, J. C. B.; PAIVA, R. Efeito do ácido indolbutírico sobre estacas apicais e medianas de quaresmeira (*Tibouchina fothergillae* Cogn.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n.1, p. 73-78, 2007. DOI: [10.14295/rbho.v14i2.289](https://doi.org/10.14295/rbho.v14i2.289)

RODRIGUES, F. A.; COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M. Crescimento de bananeiras micropropagadas em função do substrato e adubo de liberação controlada. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.18, n.1, p. 146-149, 2019. DOI: [10.5965/223811711812019146](https://doi.org/10.5965/223811711812019146)

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea** v.36, n. 4, p. 525-549, 2009. DOI: [10.1590/S2236-89062009000400001](https://doi.org/10.1590/S2236-89062009000400001)

SALATINO, A.; BUCKERIDGE, M. "Mas de que te serve saber botânica?" **Estudos Avançados**, v.30, n. 87, 2016. DOI: [10.1590/S0103-40142016.30870011](https://doi.org/10.1590/S0103-40142016.30870011)

SANTOS, R. A.; AÑEZ, R. B. S. O ensino da Botânica no Ensino Médio: o que pensam professores e alunos do município de Tangará da Serra, Mato Grosso? **REnBio - Revista de Ensino de Biologia da SBEnBio**, v.14, n.2, p. 862-882, 2021. DOI: [10.46667/renbio.v14i2.581](https://doi.org/10.46667/renbio.v14i2.581)

SANTOS, R.M.F.; SANTIAGO, M.L.A.; BENEVIDES, R. G.; OLIVEIRA, S.S.; RIBEIRO, L.O.L.; GRANJEIRO, E.M. Integrando Universidade e Escola: Relato de experiência da Oficina “Brincando de Geneticista: descobrindo o DNA”. **REVISA**, v.9, n.3, p.529-38, 2020. DOI: [10.36239/revisa.v9.n3.p529a538](https://doi.org/10.36239/revisa.v9.n3.p529a538)

SILVA, K. C. J.; SILVA, V. G.. Material concreto: uma estratégia Pedagógica no ensino e aprendizagem de Matemática. **Diversa Prática**, v. 4, n. 1, p. 16-42, 2017. DOI: [10.14393/DP-v4n1-2017-48683](https://doi.org/10.14393/DP-v4n1-2017-48683)

SILVA, M. C. M. S.; VASCONCELOS, L. P.; SOUZA, A. C. R. Levantamento da família Melastomataceae incorporadas as coleções herborizadas de Porto Velho – RO. **Revista Saber Científico**, v. 5, n. 1, p. 12-23, 2016.

SIMÃO, E.; TAKAKI, M. Effect of light and temperature on seed germination in *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, v.8, n.2, 2008. DOI: [10.1590/S1676-06032008000200006](https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000200006)

SIMÃO, E.; NAKAMURA, A. T.; TAKAKI, M. Época de colheita e capacidade germinativa de sementes de *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, v.7, n.1, p.1-7, 2007. DOI: [10.1590/S1676-06032007000100009](https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000100009)

SOUSA, G. F.; SUDÉRIO, F. B. “Eu vejo plantas”: uma sequência didática para o ensino de botânica no ensino médio. **Dialogia**, v. 45, p. 1-21, e23696, 2023. DOI: [10.5585/45.2023.23696](https://doi.org/10.5585/45.2023.23696)

SOUSA, S.R.; ALBUQUERQUE, L.B.; SOUSA, A.C.; PACHÊCO, B.S.; MALAQUIAS, J.; AQUINO, F.G. Enraizamento de estacas de *Miconia* (Melastomataceae): alternativa para produção de mudas para a restauração ecológica. **Neotropical Biology and Conservation**, v.10, n. 3, p.152-158, 2015. DOI: [10.4013/nbc.2015.103.05](https://doi.org/10.4013/nbc.2015.103.05)

SOUZA, A. M.; CONTE, H. Ciência acessível: O ensino de biotecnologia para estudantes do Ensino Médio através de projetos de extensão universitária. **Saber Científico**, v.9, n.1, p.152-159, 2020. DOI: [10.22614/resc-v9-n1-1304](https://doi.org/10.22614/resc-v9-n1-1304)

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado no APG III**. 3ª edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012. p.435-444.

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

URSI, S.; BARBOSA, P.; SANO, P.; BERCHEZ, F. Ensino de Botânica: conhecimento e encantamento na educação científica. **Estudos Avançados**, v.32, n.94, p. 07-24, 2018. DOI: [10.1590/s0103-40142018.3294.0002](https://doi.org/10.1590/s0103-40142018.3294.0002)

VENTURA, J. A.; LIMA, I. M.; MARTINS, M. V. V; COSTA, H. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v.39, p. 173-194, 2017.

VICENTE, M. C. **Propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivadas em meios de cultura alternativos.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, PPGF/UFRRJ. Seropédica, 2019. 112p.

VICENTE, M. C.; ARAUJO, J. S. P. Propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Revista Agrária Acadêmica**, v.3, n.3, 2020. DOI: [10.32406/v3n32020/262-273/agrariacad](https://doi.org/10.32406/v3n32020/262-273/agrariacad)

VICENTE, M. C.; ARAUJO, J. S. P.; COUTO, T. R.; ALMEIDA, L. M.; AGUILAR, J. P. L.; SANTOS, F. B. G. Meios de cultura alternativos na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana*: orquídea em risco de extinção. **Avanços científicos e tecnológicos nas ciências agrárias 3** [recurso eletrônico] / Organizador Júlio César Ribeiro. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. Capítulo 4. DOI: [10.22533/at.ed.3442024094](https://doi.org/10.22533/at.ed.3442024094)

VINHOLI JÚNIOR, A. J.; ZANON, A. M.; VARGAS, I. A. O ensino de biologia e seus contextos com a teoria da aprendizagem significativa. **Revista e-Curriculum**, v. 16, n. 4, 2018. DOI: [10.23925/1809-3876.2018v16i4p1381-1407](https://doi.org/10.23925/1809-3876.2018v16i4p1381-1407)

WANG, Y.; FENG, D.; LI, X.; CHEN, J. An effective route for the micropropagation of *Medinilla formosana* through ovary culture *in vitro*. **Annals of Forest Research**, [S.l.], p. 235-243, 2015. DOI: [10.15287/afr.2015.409](https://doi.org/10.15287/afr.2015.409)

ZAIA, J. E.; TAKAKI, M. Estudo da germinação de sementes de espécies arbóreas pioneiras: *Tibouchina pulchra* Cogn. e *Tibouchina granulosa* Cogn. (Melastomataceae). **Acta Botânica Brasilica**, v.12, n.3 p.221-229, 1998. DOI: [10.1590/S0102-33061998000300004](https://doi.org/10.1590/S0102-33061998000300004)

ZAKIYAH, N.; YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. *In vitro* culture of *Melastoma malabathricum* (L.) from internodes on Murashige & Skoog (1962) modified medium supplemented with thidiazuron and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 481, 2020. DOI: [10.1088/1755-1315/481/1/012023](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012023)

ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T.; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Substratos alternativos ao esfagno na aclimatização de plântulas de *Arundina graminifolia* “alba” (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 1, p. 7-12, 2014. DOI: [10.14295/rbho.v20i1.481](https://doi.org/10.14295/rbho.v20i1.481)

ZENG, S. J.; LI, L. N.; WU, K. L.; CHEN, Z. L.; DUAN, J. Plant regeneration from leaf explants of *Tigridiopalma magnifica* (Melastomataceae). **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.3, p. 1179-1184, 2008.

3 CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *P. granulosum*, *P. heteromallum* E *P. mutabile*

3.1 RESUMO

Pleroma granulosum, *Pleroma heteromallum* e *Pleroma mutabile* são plantas nativas do Brasil de importância ecológica e ornamental. Essas espécies apresentam elevada produção de sementes, no entanto, estas são diminutas e frequentemente inviáveis o que incorre em baixas porcentagens de germinação por técnicas convencionais. A propagação *in vitro* surge como alternativa para aumentar a porcentagem de germinação quando outros métodos tradicionais são ineficientes. O trabalho objetivou avaliar a eficiência da germinação de sementes de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* propagadas por método convencional (*ex vitro*) e em sistema *in vitro* em diferentes substratos. As sementes utilizadas foram colhidas de plantas matrizes cultivadas na cidade de Mendes/RJ e levadas para laboratório onde se retirou, manualmente, as impurezas. Em sequência, as sementes foram dispostas em tubos criogênicos totalizando 04 frascos (repetições) contendo 0,01 g de sementes cada. Os frascos foram transferidos para câmara de fluxo onde foram realizados os procedimentos de desinfestação e semeadura para cada um dos tratamentos. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado e constituído de quatro tratamentos: vasos de polipropileno contendo o substrato Multiplant[®] (T1); dupla camada de papel tipo germitest (T2); frascos contendo vermiculita (T3) e frascos contendo meio MS com 25% da concentração original de sais (T4). Os recipientes foram levados para B.O.D., onde permaneceram por 21 dias, sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Para o tratamento *ex vitro* (T1) os procedimentos de desinfestação das sementes e semeadura foram realizados em laboratório e em sequência os vasos foram acondicionados em casa de vegetação, onde permaneceram pelo mesmo período de tempo. Após esse período realizou-se os testes de germinação de repetições pesadas. Os resultados alcançados sugerem que a germinação *in vitro* possibilita a maximização da germinação de sementes das espécies estudadas, quando comparado ao método de propagação tradicional. O uso do meio Murashige e Skoog (MS) possibilitou a obtenção do maior número de sementes germinadas em todas as espécies estudadas. A germinação *in vitro* é uma técnica alternativa e viável que poderá vir a ser utilizada para subsidiar futuras aplicações biotecnológicas para micropropagação ou conservação dessas espécies.

Palavras-chave: Melastomataceae. Produção de mudas. Micropropagação.

3.2 ABSTRACT

Pleroma granulosum, *Pleroma heteromallum* and *Pleroma mutabile* are plants native to Brazil of ecological and ornamental importance. These species have high seed production, however, these are tiny and often unviable, which results in low germination percentages using conventional techniques. *In vitro* propagation appears as an alternative to increase the germination percentage when other traditional methods are inefficient. The work aimed to evaluate the germination efficiency of *P. granulosum*, *P. heteromallum* and *P. mutabile* seeds propagated by conventional method (*ex vitro*) and *in vitro* system on different substrates. The seeds used were collected from mother plants grown in the city of Mendes/RJ and taken to the laboratory where impurities were manually removed. Next, the seeds were placed in cryogenic tubes totaling 04 vials (replications) containing 0.01 g of seeds each. The bottles were transferred to the flow chamber where the disinfection and seeding procedures were carried out for each of the treatments. The experiment was organized in a completely randomized design and consisted of four treatments: polypropylene pots containing the Multiplant[®] substrate (T1); double layer of germitest paper (T2); flasks containing vermiculite (T3) and flasks containing MS medium with 25% of the original salt concentration (T4). The containers were taken to B.O.D., where they remained for 21 days, at a temperature of $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ and a photoperiod of 16 hours. For the *ex vitro* treatment (T1), the seed disinfection and sowing procedures were carried out in the laboratory and then the pots were placed in a greenhouse, where they remained for the same period of time. After this period, heavy replication germination tests were carried out. The results achieved suggest that *in vitro* germination makes it possible to maximize seed germination of the species studied, when compared to the traditional propagation method. The use of Murashige and Skoog (MS) medium made it possible to obtain the largest number of germinated seeds in all species studied. *In vitro* germination is an alternative and viable technique that could be used to support future biotechnological applications for micropropagation or conservation of these species.

Keywords: Melastomataceae. Seedling production. Micropropagation.

3.3 INTRODUÇÃO

Pleroma é um gênero da família Melastomataceae de grande valor ecológico e ornamental, cuja algumas espécies são popularmente conhecidas como quaresmeira (LATO et al., 2022; SANTOS et al., 2022). No geral, espécies deste gênero produzem muitas sementes por planta. Entretanto, as sementes são diminutas, fato que dificulta a coleta e manuseio, além de existir grande número de sementes sem embrião, conferindo baixa taxa de germinabilidade ou ainda baixa sobrevivência de plântulas após a germinação (BORTOLINI et al., 2008; CÉZAR et al., 2009; NIENOW et al., 2010; NICKNICH et al., 2013; DUARTE et al., 2019; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2020). O pequeno tamanho das sementes e a ausência ou tamanho reduzido do endosperma tornam o embrião mais suscetível, praticamente sem reservas para garantir o início do desenvolvimento das plântulas (CARREIRA e ZAIDAN, 2007; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2020).

Como alternativa ao método seminal, a propagação dessas espécies vem sendo realizada através da propagação vegetativa, via estaquia, miniestaquia caular ou alporquia (FRAGOSO et al., 2017; LATO et al., 2018; DUARTE et al., 2019; LATO et al., 2019; BASTOS et al., 2020; LATO et al., 2022). Essas são técnicas, geralmente, mais rápidas que a produção de mudas por sementes, além de viabilizarem a obtenção de plantas idênticas à planta matriz (LATO et al., 2022). Contudo, em alguns casos também apresentam empecilhos, como por exemplo, a impossibilidade de produção de mudas em escala comercial e em determinadas épocas do ano (LATO et al., 2022), a dificuldade de manutenção fitossanitária das estacas ou alporques e a necessidade do uso de fitorreguladores como auxinas (SILVA et al., 2019; BASTOS et al., 2020).

Nesse sentido, a propagação *in vitro* surge como alternativa aos métodos tradicionais de propagação, apresentando uma gama de aplicações para culturas de interesse agrônomo ou florestal, principalmente daquelas de difícil propagação através dos métodos convencionais (AFONSO et al., 2018; HASNAIN et al., 2022; SOARES et al., 2023).

Após a germinação *in vitro* as mudas obtidas podem ser utilizadas como explantes na morfogênese *in vitro* e na multiplicação massal para aplicação comercial ou de conservação *ex situ* visando a conservação de recursos naturais (APÓSTOLO et al., 2016; PÊGO et al., 2015a). A germinação *in vitro* permite alcançar altos índices de germinação de sementes, quando comparada com outras técnicas de semeadura, por exemplo, utilizando substratos como papel (PÊGO et al., 2015b). Essa técnica também permite, simultaneamente, produção de mudas em larga escala, em qualquer época do ano, num pequeno espaço e com qualidade fitossanitária, além de permitir a conservação de recursos genéticos e servir de subsídio ao melhoramento de plantas (AFONSO et al., 2018; FARIA et al., 2020; PLESSIS et al., 2020; SILVA et al., 2021; HASNAIN et al., 2022; SOARES et al., 2023). A germinação *in vitro*, no entanto, apresenta certas limitações como, dificuldade na assepsia do explante, surgimento de anomalias fisiológicas ou genéticas nas plantas, alta mortalidade de mudas durante a etapa de adaptação às condições *ex vitro*, custos com o material de cultura, eletricidade e mão de obra (ALBINO et al., 2019; SILVA et al., 2021; HASNAIN et al., 2022; SOARES et al., 2023).

Mediante a estratégia reprodutiva de espécies de Melastomataceae, em produzir grande quantidade de diminutas sementes, entretanto com baixa taxa de germinação e baixa probabilidade de estabelecimento das plântulas através dos métodos tradicionais de propagação (PRUDENTE et al., 2016; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2020; SILVA et al., 2022).

Estudos da germinação de sementes de *Pleroma* spp. *in vitro* poderão contribuir para ampliar a taxa de germinação de sementes dessas espécies e, adicionalmente, possibilitará a produção de mudas *in vitro*, em escala comercial e com qualidade fitossanitária, além de

fornecer subsídio para futuras aplicações biotecnológicas e de conservação dessas espécies florestais nativas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da germinação *in vitro* de sementes de *Pleroma granulosum*, *Pleroma heteromallum* e *Pleroma mutabile* em diferentes substratos, visando ampliar as taxas de germinação de sementes dessas espécies.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Seleção de plantas matrizes, cápsulas e sementes

As plantas matrizes de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* utilizadas nesta pesquisa encontram-se disponíveis no município de Mendes/RJ (22°31'36" S; 43°43'58" W). O clima da região, segundo dados oficiais da Prefeitura Municipal de Mendes (2024), é classificado como Tropical de Altitude-Cwa, com temperatura média anual de 24°C, pluviosidade média anual de 1395 mm e a altitude média de 446 m.

As cápsulas de sementes foram coletadas manualmente de cinco plantas matrizes de cada espécie, no ano de 2020, entre os meses de abril-junho para *P. granulosum* e *P. heteromallum* e maio-julho para *P. mutabile*. Utilizou-se como parâmetro o período de abertura natural das cápsulas. Após a coleta, as mesmas foram colocadas dentro de sacos de papel e secas à sombra em temperatura ambiente. Posteriormente, foram levadas para o Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes (LabEPS) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) - Seropédica/RJ para condução dos experimentos.

3.4.2 Desinfestação das sementes e semeadura em diferentes substratos

No laboratório as cápsulas de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* foram agitadas manualmente sobre papel sulfite branco para que as sementes pudessem se desprender do interior das cápsulas. Retiraram-se, manualmente, as impurezas e procedeu-se com a homogeneização das sementes. Em sequência, as sementes foram dispostas em tubos plásticos com tampa tipo parafuso com capacidade de 1,8 mL (Tubos criogênicos IMEC[®]), totalizando 04 frascos (repetições) contendo 0,01 g de sementes cada, adaptado de Fava e Albuquerque (2009). Os frascos foram transferidos para câmara de fluxo laminar e, com auxílio de seringas descartáveis com agulhas acopladas, as sementes foram submetidas à desinfestação em solução comercial de hipoclorito de sódio (Qboa[®]) a 1% contendo três gotas de Tween[®] 20, por 1 minuto. Em seguida, estas foram enxaguadas três vezes em água destilada e autoclavada antes da semeadura nos diferentes tratamentos. Durante o processo de desinfestação, as sementes que ficavam sobre a solução desinfetante e sobre a água de tríplice lavagem eram descartadas juntamente com a solução e com a água residual, antes de serem inoculadas sobre os diferentes substratos.

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e constituído de quatro tratamentos: vasos de polipropileno (80 mL) contendo o substrato comercial Multiplant[®] (60% de casca de pinus, 15% de vermiculita e 25% de húmus e terra vegetal) – controle negativo (T1); dupla camada de papel tipo germitest embebido com água destilada autoclavada 2,5 vezes a sua própria massa e dispostos em placas de Petri – controle positivo (T2); frascos de vidro (40 mL) contendo vermiculita embebida com água destilada autoclavada 2,5 vezes a sua própria massa (T3); e em frascos de vidro (40 mL) contendo meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera[®]) (meio MS) com 25% da concentração original de sais (T4). Ao meio de cultura foram adicionados 15 g L⁻¹ de sacarose (Neon P.A. Laderquímica) e 8 g L⁻¹ de Agar (MicroMED ISO FAR). O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1, antes da adição do ágar e a autoclavagem foi realizada por 20 minutos a 121°C e 1,2 atm.

Os procedimentos de desinfestação das sementes e semeadura foram realizados em câmara de fluxo laminar. Os frascos e as placas de Petri tiveram as bordas protegidas com filme transparente de PVC, sendo mantidos por 21 dias em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas. Houve exceção para o controle negativo (T1), cujos procedimentos de

desinfestação das sementes e semeadura foram realizados em laboratório e em sequência os vasos foram acondicionados em casa de vegetação, onde permaneceram pelo mesmo período de tempo.

A unidade experimental foi constituída dos vasos de polipropileno, placas de Petri ou frascos de vidro, conforme o tratamento, com quatro repetições cada, totalizando 16 unidades experimentais. Os experimentos de *P. granulosum* e *P. heteromallum* foram realizados simultaneamente, o experimento com *P. mutabile* em data posterior. Na Figura 4 tem-se o aspecto da semeadura sobre meio de cultura (T4).

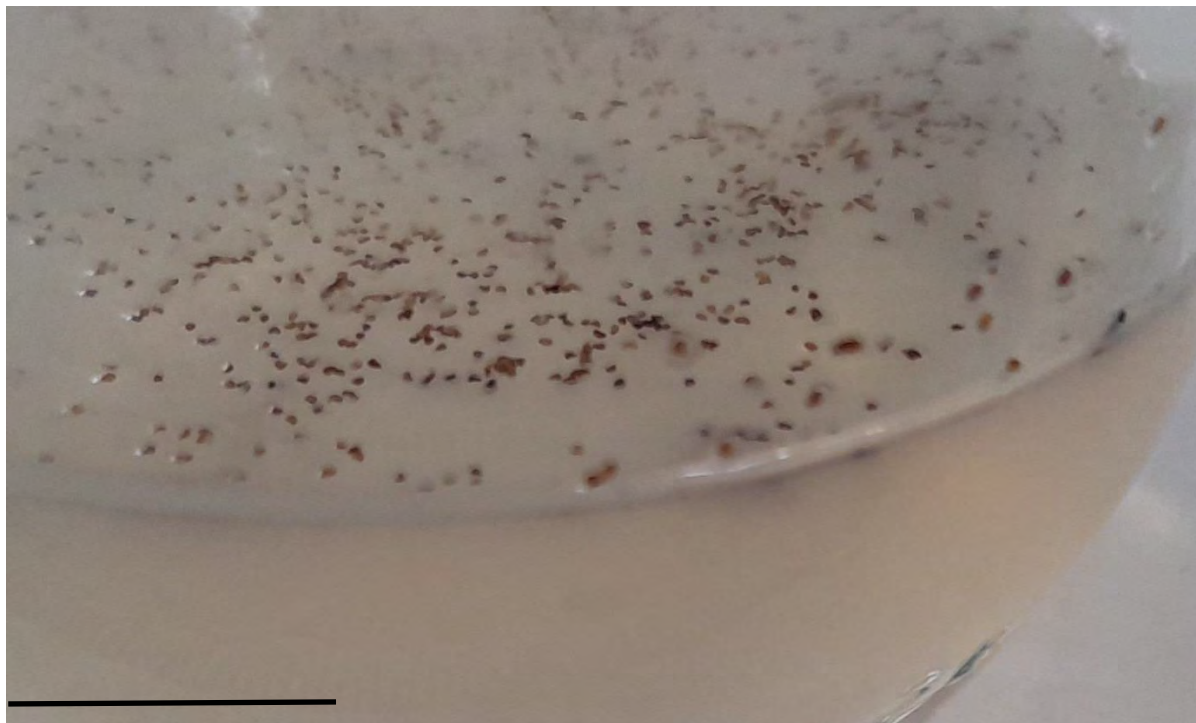


Figura 4. Aspecto das sementes de *P. heteromallum* sobre meio de cultura no 7º dia após a inoculação. Barra: 1 cm (Fonte: Autora, 2021).

3.4.3 Teste de germinação de sementes

Aos 21 dias após semeadura (DAS), foi realizado o teste de germinação das sementes, considerando como germinadas as sementes que apresentaram a emissão de raiz primária e a abertura da plúmula ao fim do período do teste. O teste de germinação utilizado foi o de repetições pesadas, com uso de tabela de tolerância, conforme Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2013).

O teste de repetições pesadas consiste em calcular o número total de sementes germinadas (soma das sementes germinadas nas quatro repetições) e, em sequência, calcula-se a diferença entre o maior e o menor valor de sementes germinadas entre as repetições. Faz-se a interpretação na tabela de tolerância (Tabela 1).

A tolerância deve ser verificada através do resultado da diferença entre o maior e o menor valor de sementes germinadas entre as repetições. Se o valor encontrado for menor ou igual ao valor de tolerância da tabela, o teste é considerado válido, sendo este resultado superior à tolerância indicada, o teste de germinação deverá ser repetido (BRASIL, 2009). O resultado do teste é considerado confiável se a diferença entre a maior e menor contagem total das repetições estiver dentro dos limites de tolerância conforme tabela de tolerância.

Tabela 1. Tabela de tolerância para testes de germinação em repetições pesadas (número de sementes germinadas) (BRASIL, 2009 p.387).

Número total de sementes germinadas nas quatro repetições	Tolerância *	Número total de sementes germinadas nas quatro repetições	Tolerância *
A (0-160)	B	A (maior que 160)	B
0 - 6	4	161 – 174	27
7 - 10	6	175 – 188	28
11 - 14	8	189 – 202	29
15 - 18	9	203 – 216	30
19 - 22	11	217 – 230	31
23 - 26	12	231 – 244	32
27 - 30	13	245 – 256	33
31 - 38	14	257 – 270	34
39 - 50	15	271 – 288	35
51 - 56	16	289 – 302	36
57 - 62	17	303 – 321	37
63 - 70	18	322 – 338	38
71 - 82	19	339 – 358	39
83 - 90	20	359 – 378	40
91 - 102	21	379 – 402	41
103 - 112	22	403 – 420	42
113 - 122	23	421 – 438	43
123 - 134	24	439 – 460	44
135 - 146	25	> 460	45
147 - 160	26	----	

*Tolerâncias máximas admitidas para comparação de resultados relativos a cada repetição de um mesmo teste, a 5% de probabilidade.

O número de sementes germinadas por tratamento foi submetido ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade. Em seguida foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que os resultados de germinação, para todas as espécies de *Pleroma* estudadas, se mantiveram dentro da tolerância máxima admitida pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2013). No entanto, não houve germinação das sementes dispostas sobre o substrato comercial Multiplant[®] (T1) para nenhuma das espécies testadas.

Os valores médios do número de sementes germinadas em 0,01 g de sementes de *P. granulosum* considerando os diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 2. Observou-se a germinação total de 11, 66 e 120 sementes germinadas sobre papel germitest (T2), sobre vermiculita (T3) e sobre meio de cultura MS (T4), respectivamente. O teste de comparação de médias demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo a germinação *in vitro* sobre meio de cultura MS superior aos demais. A germinação *in vitro* sobre vermiculita mostrou ser superior a germinação sobre papel germitest.

Tabela 2. Número de sementes germinadas em 0,01g de sementes de *Pleroma granulosum* aos 21 dias após semeadura sobre substrato comercial Multiplant[®] (T1); sobre papel germitest disposto em placa de Petri (T2); *in vitro* sobre vermiculita (T3) e *in vitro* sobre meio de cultura MS (T4) (Seropédica/RJ, 2021).

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Total	Diferença entre repetições	Tolerância da Tabela	Média *
						Unidade		
Multiplant [®] (T1)	0	0	0	0	0	0	-	0,0 c
Papel (T2)	1	0	5	5	11	4	8	2,75 c
Vermiculita (T3)	16	16	20	14	66	6	18	16,50 b
Meio MS (T4)	34	27	29	30	120	7	23	30,00 a

*médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (%) = 19,01.

Pesquisas demonstraram que a germinação das espécies *T. pulchra* (sinonímia *Pleroma raddianum*) e *T. granulosa* (sinonímia *P. granulosum*), embebidas em água e dispostas sobre papel de filtro, ocorreram a partir do 8º e 15º dia, respectivamente (Zaia e Takaki, 1998). Esses autores observaram a germinação máxima em torno de 30% para *T. pulchra* e 15% para *T. granulosa*, sendo que as sementes não germinadas apresentavam ausência de embrião, conforme verificado visualmente com o uso de microscópio óptico nas sementes que não germinaram.

Para a espécie *P. heteromallum*, os valores médios para número de sementes germinadas em 0,01 g de sementes para os diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 3. Observou-se a germinação total de 101, 72 e 413 sementes para os tratamentos T2, T3 e T4, respectivamente. O teste de comparação de médias demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo T4 (sobre meio MS) superior aos demais, seguido de T2 (sobre papel germitest) e de T3 (sobre vermiculita).

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que a germinação de sementes de *P. heteromallum in vitro*, sobre meio de cultura MS, pode incrementar em até quatro vezes o percentual médio de germinação de sementes, quando comparado com a germinação sobre papel germitest dispostos em placa Petri.

Tabela 3. Número de sementes germinadas em 0,01g de sementes de *Pleroma heteromallum* aos 21 dias após semeadura sobre substrato comercial Multiplant[®] (T1); sobre papel germitest disposto em placa de Petri (T2), *in vitro* sobre vermiculita (T3) e *in vitro* sobre meio de cultura MS (T4) (Seropédica/RJ, 2021).

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Total	Diferença entre repetições unid.	Tolerância da Tabela	Média*
Multiplant [®] (T1)	0	0	0	0	0	0	-	0,00 d
Papel (T2)	26	20	27	28	101	8	21	25,25 b
Vermiculita (T3)	19	18	15	20	72	5	19	18,00 c
Meio MS (T4)	105	109	96	103	413	13	42	103,25 a

*médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (%) = 9.38.

Os resultados encontrados para o tratamento T2 corroboram com o trabalho de Fava e Albuquerque (2009), que observaram o número médio de 32 sementes germinadas em 0,01g de sementes de *Tibouchina stenocarpa* (nome popular quaresmeirinha). A semeadura foi realizada em caixas de plástico transparente (tipo gerbox), sobre papel mata borrão, sendo utilizadas quatro subamostras, cada uma com 0,01g de sementes, espalhadas sobre o substrato. As caixas foram mantidas fechadas e colocadas em câmaras de germinação sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 8 horas.

Campos et al. (2009) relataram baixa eficiência na propagação via sexual de *P. heteromallum*, com taxa total de germinação de sementes de 56%. Entretanto, diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, Campos et al. (2009) constataram 68% de sementes germinadas para o tratamento controle, isto é, sementes provenientes da polinização natural, postas para germinar sobre folhas de papel filtro dispostos em placas de Petri e armazenadas em estufa tipo B.O.D., sob temperatura de 25°C ± 1.

Prudente et al. (2012) avaliaram o poder germinativo de sementes de *Tibouchina clavata*, dispostas sobre papel filtro, na presença e ausência de luz, constituindo dois tratamentos com quatro repetições de 0,01 g de sementes. Os experimentos foram conduzidos sob diferentes temperaturas constantes (15, 20, 25, 30, 35 e 40°C) em germinadores com luz branca fluorescente e fotoperíodo de 12 h e também na presença e ausência de luz sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h. Os autores constataram que sob temperatura de 25°C ocorreu o melhor desempenho germinativo (63%), considerando a porcentagem e a velocidade da germinação. Na presença de luz, houve germinação de 46% das sementes de *T. clavata*, enquanto que na ausência de luz não houve germinação. Levando em consideração a produtividade de sementes por planta, esses pesquisadores consideram uma boa porcentagem de germinação.

Para *P. mutabile* observou-se a germinação total de 123 sementes em T4. Para os demais tratamentos não houve germinação de sementes (Tabela 4).

Tabela 4. Número de sementes germinadas em 0,01g de sementes de *Pleroma mutabile* aos 21 dias após semeadura sobre substrato comercial Multiplant[®] (T1); sobre papel germitest disposto em placa de Petri (T2), *in vitro* sobre vermiculita (T3) e *in vitro* sobre meio de cultura MS (T4) (Seropédica/RJ, 2021).

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Total	Diferença entre repetições unid.	Tolerância da Tabela	Média*
Multiplant [®] (T1)	0	0	0	0	0	0	-	0,0

Papel (T2)	0	0	0	0	0	0	-	0,0
Vermiculita (T3)	0	0	0	0	0	0	-	0,0
Meio MS (T4)	25	40	30	28	123	15	24	30,75

*mediante aos resultados obtidos, não foi realizada análise estatística.

Simão et al. (2007) avaliaram a eficiência de germinação de sementes frescas e de sementes secas de *T. mutabilis* (sinonímia *P. mutabile*) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a antese. Os mesmos verificaram que nas sementes secas, conforme metodologia utilizada neste trabalho, o tempo de germinação foi menor e a distribuição da mesma ocorreu de forma acumulada, com a maioria germinando do 7º ao 15º dia e alcançando 87% de sementes germinadas aos 21 dias. Para germinação das sementes, quatro placas de Petri foram forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada, com 25 sementes por placa. Entretanto, os autores realizaram uma pré-seleção de sementes, passando as mesmas por peneira de malha de 0,35 cm de diâmetro e em sequência embebendo-as em água destilada por 24 horas na presença de luz, para então selecionar aquelas que apresentavam embrião visível e só então realizarem o teste de germinação de sementes. Esses fatores possivelmente justificam as diferenças entre os resultados aqui observados e os observados por esses autores.

Simão e Takaki (2008) constataram que do lote de sementes utilizado em pesquisa de germinação de sementes de *T. mutabilis* sobre dupla camada de papel filtro, embebido em água e dispostos em placa de Petri, apenas 20 a 40% das sementes apresentavam embrião. As sementes germinaram em ampla faixa de temperatura (15 a 35 °C), porém as maiores porcentagens de germinação, 76,7 e 61,4%, ocorreram na faixa de 25 a 30 °C, respectivamente. Esses autores também selecionaram as sementes utilizando uma peneira de malha de 0,35 cm de diâmetro antes da realização do teste de germinação.

O aspecto da germinação de sementes para as espécies *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* nos tratamentos T2, T3 e T4 encontram-se nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

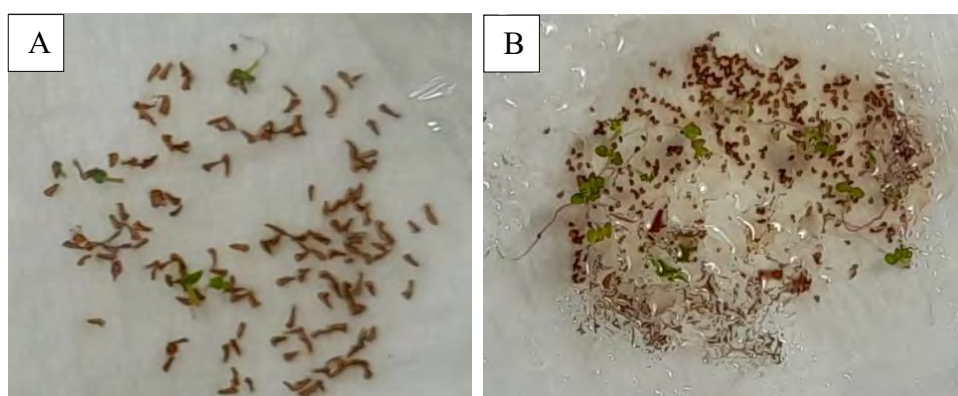


Figura 5. Aspecto da germinação de sementes de *P. granulosum* (A) e *P. heteromallum* (B) sobre dupla camada de papel germitest dispostos em placas de Petri (Fonte: Autora, 2021).

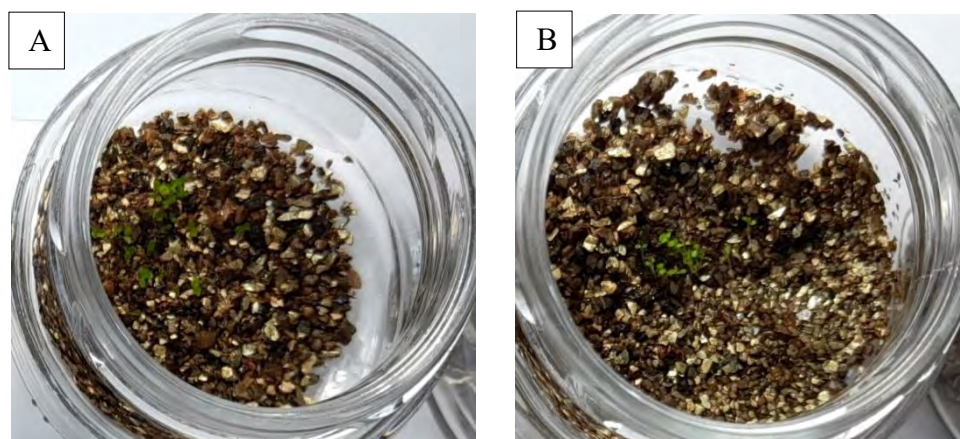


Figura 6. Aspecto da germinação de sementes de *P. granulosum* (A) e *P. heteromallum* (B) *in vitro* sobre vermiculita (Fonte: Autora, 2021).

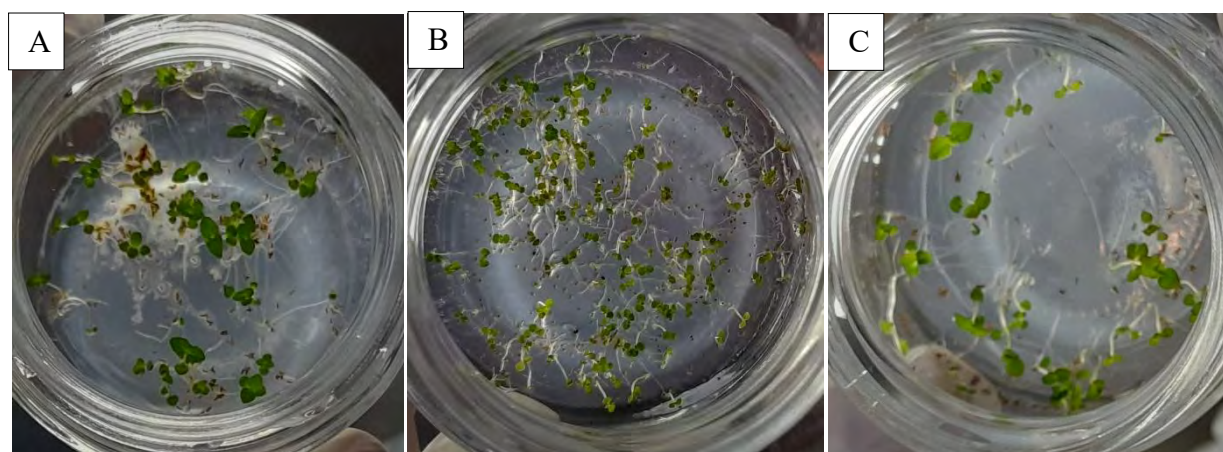


Figura 7. Aspecto da germinação de sementes de *P. granulosum* (A); *P. heteromallum* (B); e *P. mutabile* (C) *in vitro* sobre meio MS (Fonte: Autora, 2021).

Constatou-se que plântulas de *P. granulosum* e *P. heteromallum* germinadas sobre meio de cultura (T4) e sobre vermiculita (T3) apresentaram maior desenvolvimento quando comparadas àquelas germinadas sobre papel germitest disposto em placa de Petri (T2).

A germinação de sementes resulta da interação de fatores genéticos, ambientais e tecnológicos (WENNECK et al., 2021). Sementes de *Pleroma* spp. são diminutas, com pouco ou nenhum endosperma, este que, além de atuar como tecido de reserva, confere proteção ao embrião (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2020.) Dentre os fatores ambientais que exercem influência na germinação de sementes podemos considerar a temperatura, luz, profundidade de sementeira, pH, concentração de sais, umidade e tipo de solo/substrato (REZVANI et al., 2018).

Visto que pequenas variações ambientais podem interferir na capacidade germinativa de sementes, sugere-se que as condições ambientais de casa de vegetação, bem como as características do substrato Multiplant[®] podem não ter sido adequadas na promoção do processo de germinação de sementes sob as condições estabelecidas. Mendes-Rodrigues et al. (2010) avaliaram o potencial germinativo de sementes de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) provenientes de diferentes altitudes e verificaram que a germinabilidade de sementes produzidas entre 795 e 861 m foi inferior a 8%, enquanto que sementes produzidas entre 876 e 905 m apresentaram germinabilidade acima de 31%. Segundo esses

autores os gradientes altitudinais determinam alterações na temperatura, umidade do ar e do solo, iluminação, velocidade do vento, profundidade e natureza dos solos e que essas diferenças podem influenciar o desenvolvimento das plantas na produção e germinação de sementes. Os autores ainda sugeriram que o efeito altitudinal na germinação de sementes de *M. ferruginata* parece estar ligado às condições do solo, indicando alta correlação entre germinação de sementes e teores de alumínio contidos no mesmo.

Fernández-Sánchez et al. (2020) em estudos com *Tibouchina grossa* obtiveram o percentual de germinação de sementes de 21 e 44% para aquelas germinadas sobre papel filtro em condições de laboratório e sobre substrato (turfa, terra e casca de arroz) em casa de vegetação, respectivamente. Segundo esses autores, possivelmente, a maior germinação de sementes foi obtida em casa de vegetação uma vez que em condições de laboratório, houve variação de temperatura de 20/10°C dia/noite que afetou o metabolismo fisiológico das sementes com redução de atividade enzimática. Contudo, as mudas de *T. grossa* provenientes de germinação em laboratório morreram no primeiro mês de monitoramento e aquelas que germinaram da forma tradicional morreram no segundo mês de acompanhamento.

Estudos apontam que as sementes de Melastomataceae, sobretudo *Pleroma* spp., são fotoblásticas positivas, estando a taxa de germinação de sementes influenciada pela quantidade e qualidade de luz disponível e a faixa de temperatura entre 20 e 30°C a mais eficiente na germinação de sementes para maior parte das espécies (LOPES et al., 2005; GARCIA et al., 2006; CARREIRA e ZAIDAN, 2007; SIMÃO et al., 2007; SIMÃO e TAKAKI, 2008; FAVA e ALBUQUERQUE, 2009; PRUDENTE et al., 2012; SILVA et al., 2022). Salienta-se que grande parte dos estudos de germinação de sementes de *Pleroma* spp. são realizados em condições de laboratório, sendo as mesmas postas para germinar sobre papel filtro dispostos em caixas tipo gerbox ou placas de Petri e mantidas sob condições controladas através de câmara de germinação (ZAIA e TAKAKI, 1998; LOPES et al., 2005; GARCIA et al., 2006; SIMÃO et al., 2007; SIMÃO e TAKAKI, 2008; CAMPOS et al., 2009; FAVA e ALBUQUERQUE, 2009; PRUDENTE et al., 2012).

Pesquisas envolvendo diferentes espécies vegetais indicam que o cultivo *in vitro* promoveu maior taxa de germinação de sementes, pois além das condições ambientais controladas, possivelmente os nutrientes presentes no meio de cultura contribuíram para o estabelecimento das plântulas após o processo de germinação.

De acordo com Afonso et al. (2018), a germinação de sementes *in vitro* geralmente é mais eficiente que em condições *ex vitro*, possivelmente em função das condições do cultivo *in vitro* oferecer maior controle do ambiente do que em condições de casa de vegetação. Nery et al. (2008) realizaram estudos comparando a germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Tabebuia serratifolia* (Bignoniaceae) e observaram que o maior percentual de germinação de sementes foi obtido através do método *in vitro*, independente do meio de cultura (MS e WPM) testado. Ademais, esses autores constataram que a capacidade germinativa *in vitro* ocorreu aos 39 dias após a antese, enquanto a máxima germinação *ex vitro* ocorreu aos 53 dias, sugerindo a maior eficiência na germinação de sementes pelo sistema *in vitro*. O mesmo foi observado por Coelho et al. (2001) com sementes de *Pterodon pubescens* (Fabaceae) apresentando o tegumento removido, cuja germinação *in vitro* sobre meio MS líquido com metade da concentração original de sais foi de 95%, enquanto na *ex vitro* de 55%.

Santos et al. (2011), em estudo da germinação de sementes de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) em condições *in vitro* e *ex vitro* sobre papel filtro, também observaram o maior percentual de germinação e maior índice de velocidade de germinação naquelas cultivadas *in vitro* sobre meio WPM. Abbade et al. (2010) estudando a germinação de *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae) também obtiveram melhores porcentagens de sementes germinadas no cultivo *in vitro* sobre meio MS, quando comparadas com o *ex vitro* sobre diferentes substratos (areia, terra, terra + areia e Plantmax[®]).

Diferentemente, Apóstolo et al. (2016) não observaram diferença significativa entre os métodos de germinação de sementes *ex vitro* (substrato solo: turfa: perlita - 1:1:1) e *in vitro* (sobre meio WPM) na propagação de *Handroanthus impetiginosus* e *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae), exceto para *Handroanthus lapacho* cujo percentual de germinação *in vitro* foi significativamente superior ao *ex vitro*.

Flores et al. (2018) obtiveram sucesso na propagação de *Dyckia vicentensis* (Bromeliaceae) *in vitro* utilizando meio MS com 50% da concentração original de sais ou, alternativamente, *ex vitro* usando substrato comercial. No entanto, esses autores constataram que a germinação *in vitro* apresentou vantagens sobre o método convencional *ex vitro*, como maior velocidade e uniformidade durante a germinação, além de produção de mudas mais vigorosas, com maior número de folhas e biomassa, juntamente com maior taxa de sobrevivência das plantas em casa de vegetação. Resultados estes que corroboram com os observados por Bhattacharya e Khuspe (2001), os quais constataram que sob condições de cultivo *in vitro* ocorre incremento no percentual de germinação e no índice de velocidade de germinação de sementes de diferentes cultivares de *Carica papaya*, comparada à condição *ex vitro*.

Plessis et al. (2020) observaram que o melhor desempenho em termos de parâmetros de germinação de *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii* (Malvaceae) ocorreu para sementes germinadas em papel filtro, meio Gelrite® sólido e em concentrações mais baixas de meio MS ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$), entretanto, esses tratamentos se mostraram insustentáveis para o estabelecimento das mudas *in vitro*. Assim, Plessis et al. (2020) constataram que o meio MS com 100% da concentração original de sais é o tratamento mais adequado para a produção *in vitro* de mudas de *H. coddii*, devido ao melhor desempenho de crescimento das mudas.

Zambrano-Arteaga et al. (2022) avaliaram a eficiência de germinação de sementes de *Carludovica palmata* (Cyclanthaceae) *in vitro* em meio MS semissólido; e *ex vitro*, em três diferentes substratos (solo, turfa e mistura 1:1 solo-turfa). Esses autores verificaram que a técnica de germinação de sementes *in vitro* proporcionou os maiores percentuais de germinação, mostrando que este método é mais eficiente para a produção de mudas da palmeira em comparação aos protocolos convencionais. Zambrano-Arteaga et al. (2022) sugeriram que em condições *ex vitro* é mais difícil controlar variáveis como luz, temperatura e até níveis de oxigênio, fatores que de uma forma ou de outra poderiam afetar os processos de germinação das sementes de *C. palmata*.

Sementes pequenas e leves possuem pouca energia armazenada por isso, geralmente, são dependentes de luz para a sua germinação e produção de biomassa, ou seja, para realização de fotossíntese e crescimento da plântula (SALOMÃO et al., 2023). Logo, sementes pequenas como as de Melastomataceae, que possuem pouca reserva de nutrientes, quando cultivadas em meio de cultura como o MS, podem ter o processo de estabelecimento das plântulas beneficiado pela disponibilidade de macro e micronutrientes, vitaminas e aminoácidos no meio (BURGOS et al., 2023).

3.6 CONCLUSÃO

A germinação *in vitro* de sementes de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile* sobre meio MS foi superior aos demais tratamentos testados.

A germinação *in vitro* de sementes de *Pleroma* spp. é uma técnica alternativa promissora, por permitir um incremento no percentual médio de germinação de sementes, quando comparada aos métodos convencionais de propagação.

O estudo serve de base para pesquisas que visem o desenvolvimento de outras técnicas biotecnológicas para *Pleroma* spp.

3.7 REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, v. 22, n. 3,4 p. 162-167, 2010.
- AFONSO, M. V.; PARANHOS, J. T.; TABALDI, L. A.; SORIANI, H. H. Germinação *in vitro* de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Iheringia**. Série botânica, v.73, n.1, p.39-45, 2018. DOI: [10.21826/2446-8231201873105](https://doi.org/10.21826/2446-8231201873105)
- ALBINO, B. É. S.; CANATTO, R. A.; CORDEIRO, A. T.; FUKUSHIMA, C. H.; PILON, A. M. Propagação *in vitro* de "jequitibá-branco" (*Cariniana estrellensis*): uma alternativa para programas de reflorestamento. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 2, p. 88-99, 2019. DOI: [10.18011/bioeng2019v13n2p88-99](https://doi.org/10.18011/bioeng2019v13n2p88-99)
- APÓSTOLO, N. M.; LARRABURU, E. E.; GIL, M. N.; ZAPATER, M. A.; LLORENTE, B. E. *In vitro* and *ex vitro* germination of three *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Bonplandia**, v.25, n.1, p.5-15, 2016. DOI: [10.30972/bon.251126](https://doi.org/10.30972/bon.251126)
- BASTOS, F. E. A.; GRIMALDI, F.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFAT, L. Propagation of native plants with ornamental potential from Serra do Oratório, Santa Catarina State, Brazil. **Ornamental Horticulture**, v.26, n.2, p.298-305, 2020. DOI: [10.1590/2447-536X.v26i2.2155](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i2.2155)
- BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 91, p. 39-49, 2001. DOI: [10.1016/S0304-4238\(01\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00237-0)
- BORTOLINI, M. F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S.; CARPANEZZI, A. A.; DESCAHMPS, C.; OLIVEIRA, M. C.; BONA, C.; MAYER, J. L. S. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: enraizamento, anatomia e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal**, v.18, n.2, p.159-171, 2008. DOI: [10.5902/19805098454](https://doi.org/10.5902/19805098454)
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**, 2013. 97 p.
- BURGOS, C. A. C.; MURCIA, J. E. R.; RAMÍREZ, L. A. E.; SALAMANCA, R. A. P. **Propagación de flora nativa: Experiencias desde el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis: Aplicación de técnicas tradicionales y biotecnológicas**. Primera edición. – Bogotá, D. C.: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, 2023. 369 p.
- CAMPOS, C. C. F.; DUARTE, J. F.; BORÉM, R. A. T.; CASTRO, D. M. Biologia floral e mecanismos de melhoramento de *Tibouchina heteromalla* Cong. em afloramentos rochosos no sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Ecology**, n.1, 2009.
- CARREIRA, R. C.; ZAIDAN, L. B. P. Germinação de sementes de espécies de Melastomataceae de Cerrado sob condições controladas de luz e

temperatura. **Hoehnea** [online], v.34, n.3, p.261-269, 2007. DOI: [10.1590/S2236-89062007000300001](https://doi.org/10.1590/S2236-89062007000300001)

CÉZAR, T. M.; SOUZA, F. C.; MACIEL, R. T.; DEMBISKI, W.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Estaquia e alporquia de *Tibouchina fothergillae* (D.C.) Cogn. (Melastomataceae) com a aplicação de ácido naftaleno acético. **Scientia Agraria**, v.10, n.6, p.463-468, 2009. DOI: [10.5380/rsa.v10i6.15719](https://doi.org/10.5380/rsa.v10i6.15719)

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.) *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 01, p. 38-48, 2001.

DUARTE, M. M., MARTIN, D. M., MORAES, R. F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Efeito de *Azospirillum brasilense* e ácido indolbutírico no enraizamento de miniestacas de *Tibouchina fothergillae*. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.5, n.3, p.289-295, 2019. DOI: [10.21674/2448-0479.53.289-295](https://doi.org/10.21674/2448-0479.53.289-295)

FARIA, G. A.; OLIVEIRA, C. P. M.; LOPES, B. G.; ROCHA, P. S.; PERON, G. M.; SOUZA, K. S.; GARCIA, C. K.; FURLANI JUNIOR, E.; CAVICHIOLI, J. C.; FELIZARDO, L. M. Establishment of a protocol for *in vitro* propagation of *Passiflora caerulea*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v.9, n. 9, p. e157997158, 2020. DOI: [10.33448/rsd-v9i9.7158](https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7158)

FAVA, C. L. F.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Germinação de sementes de *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn. em função da temperatura e do substrato. **Ornamental Horticulture**, v.15, n.1, p.43-48, 2009. DOI: [10.14295/rbho.v15i1.434](https://doi.org/10.14295/rbho.v15i1.434)

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L., MANCIPE-MURILLO, C., CALDERÓN-HERNÁNDEZ, M. Evaluación de dos métodos de propagación para la conservación *ex situ* de tres melastomáceas altoandinas. **Caldasia**, v.42, n.1, p.129–141, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: [10.1590/S1413-70542011000600001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001)

FLORES, R.; KRAETZIG, L. C.; FLÔRES, P. Z.; PEREIRA, D. N.; BÜNEKER, H. M.; MALDANER, J.; VIERO, C. L.; STRAHL, M. A. Propagation of *Dyckia vicentensis*, an endemic bromeliad of the Pampa biome, Brazil. **Rodriguésia**, v.69, n.4, p.2229-2235, 2018. DOI: [10.1590/2175-7860201869447](https://doi.org/10.1590/2175-7860201869447)

FRAGOSO, R. O.; STUEPP, C. A.; SÁ, F. P.; KRATZ, D.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Vegetative rescue and *ex vitro* system production of *Tibouchina sellowiana* clonal plants by cutting and mini-cutting. **Ciência Rural**, v.47, n.11, 2017. DOI: [10.1590/0103-8478cr20160098](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160098)

GARCIA, L. C.; BARROS, F. V.; LEMOS FILHO, J. P. Comportamento germinativo de duas espécies de canga ferrífera: *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae) e *Tibouchina multiflora* Cogn. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.2, p. 443-448, 2006. DOI: [10.1590/S0102-33062006000200019](https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000200019)

- HASNAIN, A.; NAQVI, S. A. H.; AYESHA S. I.; KHALID, F.; ELLAHI, M.; IQBAL, S.; HASSAN, M. Z.; ABBAS, A.; ADAMSKI, R.; MARKOWSKA, D.; BAAZEEM, A.; MUSTAFA, G.; MOUSTAFA, M.; HASAN, M. E.; ABDELHAMID, M. M. A. Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 1009395, 2022. DOI: [10.3389/fpls.2022.1009395](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395)
- LATOH, L. P.; DALLAGRANA, J. F.; PORTES, D. C.; MAGGIONI, R. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa via miniestaquia caulinar seriada e produtividade de minijardim de espécies de *Tibouchina* spp. **REVUERGS - Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, n.3, p. 343-357, 2018. DOI: [10.21674/2448-0479.43.343-357](https://doi.org/10.21674/2448-0479.43.343-357)
- LATOH, L. P.; GOMES, E. N.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Can indolebutyric and fulvic acids induce adventitious rhizogenesis on mini-cuttings from Brazilian native tibouchinas? **Ornamental Horticulture**, v.25, n.1, p.42-48, 2019. DOI: [10.14295/oh.v25i1.1257](https://doi.org/10.14295/oh.v25i1.1257)
- LATOH, L. P.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa, produtividade de minicepas e determinações metabolômicas de 4 espécies do gênero *Tibouchina*. **Ciência Florestal**, v.32, p.1640-1658, 2022. DOI: [10.5902/1980509836951](https://doi.org/10.5902/1980509836951)
- LOPES, J. C.; DIAS, P. C.; PEREIRA, M. D. Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p.811-816, 2005. DOI: [10.1590/S0100-204X2005000800012](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800012)
- MENDES-RODRIGUES, C.; ARAÚJO, F. P.; BARBOSA-SOUZA, C.; BARBOSA-SOUZA, V.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G.; OLIVEIRA, P. E. Multiple dormancy and maternal effect on *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) seed germination, Serra de Caldas Novas, Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.1, p.93-105, 2010. DOI: [10.1590/S0100-84042010000100009](https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000100009)
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p.473-497, 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
- NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M.; NERY, F. C.; SILVA, D. G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. **CERNE**, v.14, n.1, p.1-8, 2008.
- NICKNICH, R.; WEISER, A. H.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de quaresmeira. **Scientia Agraria**, v.14, n.2, p.65-67, 2013. DOI: [10.5380/rsa.v14i2.40931](https://doi.org/10.5380/rsa.v14i2.40931)
- NIENOW, A. A.; CHURA, G.; PETRY, C.; COSTA, C. Enraizamento de estacas de quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.16, n.4, p.139-142, 2010.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. *In vitro* establishment of *Syngonanthus paepalophyllus* in different culture media. **Acta Horticulturae**, n.1083, p.255-260, 2015a. DOI: [10.17660/ActaHortic.2015.1083.31](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.31)

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. *In vitro* seed germination and seedlings development of *Syngonanthus elegans* and *Syngonanthus elegantulus*. **Acta Horticulturae**, v.31, n.1083 p. 249-254, 2015b. DOI: [10.17660/ActaHortic.2015.1083.30](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.30)

PLESSIS, H. J.; NIKOLOVA, R. V.; KLEYNHANS, R.; EGAN, B. A. *In vitro* seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*. **Ornamental Horticulture**, v.26, p. 598-606, 2020. DOI: [10.1590/2447-536X.v26i4.2191](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i4.2191)

PREFEITURA MUNICIPAL DE MENDES (PMM). Dados Oficiais. Disponível em:< <https://www.mendes.rj.gov.br/63>> Acesso em: 20 maio 2024.

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; PAIVA, P. D. O.; NERY, M. C. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 1. p. 13-19, 2016.

PRUDENTE, C. M.; SADER, R.; BARBOSA, J. M.; SANTOS JUNIOR, N. A. Produção de sementes e comportamento germinativo de *Tibouchina clavata* (Pers.) Wurdack. (Melastomataceae). **Scientia Forestalis**, v.40, n.94, p.241-248, 2012.

REZVANI, M.; SADATIAN, S. A.; NIKKHAHKOUCHEKSARAEI, H. Factors affecting seed dormancy and germination of greater bur-parsley (*Turgenia latifolia*). **Planta Daninha**, v.36, e018172841, 2018. DOI: [10.1590/S0100-83582018360100125](https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100125)

SALOMÃO, A. T.; SANTOS, I. R. I.; GIMENES, M. A.; SANTANA, D. G.; CAVALCANTI, T. B. Sementes. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. EMBRAPA. Brasília: DF, p.108-132, 2023.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; AQUINO, S. O. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de pequi [*Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae)]. **Naturalia**, v.34, p.43-47, 2011.

SANTOS, P. M. L. A.; GOLDENBERG, R.; FRAGA, C. N. Melastomataceae of the Parque Natural Municipal de São Lourenço, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia**, v.73, e00822021, 2022. DOI: [10.1590/2175-7860202273113](https://doi.org/10.1590/2175-7860202273113)

SILVA, K. B.; REINIGER, L. R. S.; RABAIOLLI, S. M. S.; ZIEGLER, A. C. F.; STEFANEL, C. M. Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de brotações de *Luehea divaricata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.41, e201901921, p.1-6, 2021. DOI: [10.4336/2021.pfb.41e201901921](https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201901921)

SILVA, T. T. S.; SPADA, G.; FARIA, M. F.; GOULART, L. M. L.; FURTADO, E. L.; PASSOS, J. R. S.; GUERRINI, I. A. Fitossanidade e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função da aplicação de fosfito e silício. **Summa Phytopathologica**, v.45, p.332-336, 2019. DOI: [10.1590/0100-5405/184112](https://doi.org/10.1590/0100-5405/184112)

SILVA, P. M.; MOREIRA, J. W.; BARREIRA, S. Maturidade fisiológica e morfológica de sementes de quaresmeira (*Tibouchina granulosa* Cogn.). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.19, n.41, p.169-182, 2022.

SIMÃO, E.; TAKAKI, M. Effect of light and temperature on seed germination in *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, v.8, n.2, 2008. DOI: [10.1590/S1676-06032008000200006](https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000200006)

SIMÃO, E.; NAKAMURA, A. T.; TAKAKI, M. Época de colheita e capacidade germinativa de sementes de *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, v.7, n.1, p.1-7, 2007. DOI: [10.1590/S1676-06032007000100009](https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000100009)

SOARES, I. A.; MENEZES FILHO, A. C. P.; VENTURA, M. V. A. Biofábricas no cenário atual agrícola brasileiro: revisão. **Brazilian Journal of Science**, v.2, n. 1, p.16-33, 2023. DOI: [10.14295/bjs.v2i1.246](https://doi.org/10.14295/bjs.v2i1.246)

WENNECK, G. S.; VILLA E VILA, V.; SAATH, R.; REZENDE, R. Germination of weed seeds submitted to the accelerated aging test. **Revista Brasileira de Engenharia De Biosistemas**, v.15, n.4, p.660–671, 2021. DOI: [10.18011/bioeng2021v15n4p660-671](https://doi.org/10.18011/bioeng2021v15n4p660-671)

ZAIA, J. E.; TAKAKI, M. Estudo da germinação de sementes de espécies arbóreas pioneiras: *Tibouchina pulchra* Cogn. e *Tibouchina granulosa* Cogn. (Melastomataceae). **Acta Botânica Brasílica**, v.12, n.3 p.221-229, 1998. DOI: [10.1590/S0102-33061998000300004](https://doi.org/10.1590/S0102-33061998000300004)

ZAMBRANO-ARTEAGA, J. C.; HOYOS-SÁNCHEZ, R. A.; CHICAIZA-FINLEY, D. Evaluación de la germinación de semillas de palma de iraca (*Carludovica palmata*) en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. **Caldasia**, v.44, n.2, p.221-230, 2022. DOI: [10.15446/caldasia.v44n2.86282](https://doi.org/10.15446/caldasia.v44n2.86282)

4 CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Pleroma heteromallum*

4.1 RESUMO

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don. é endêmica do Brasil e se caracteriza por suas flores roxas e folhas cordiformes bastante pilosas, muito ornamentais, sendo popularmente conhecida como orelha-de-onça. Estudos sobre a propagação dessa espécie limitam-se à propagação vegetativa tradicional por estaquia. Assim, a micropropagação da espécie pode ser considerada um importante avanço técnico científico que possibilitará a produção de mudas em escala comercial, com qualidade fitossanitária, além de fornecer subsídios para futuras aplicações biotecnológicas. O objetivo deste trabalho foi investigar os aspectos do desenvolvimento *in vitro* e posterior aclimatização de plântulas micropropagadas de *P. heteromallum*. Para tanto, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, plântulas de *P. heteromallum* obtidas a partir da germinação *in vitro* foram transferidas para diferentes meios de cultivo (MS100; MS50; WPM100 e WPM50) e cultivadas durante 60 dias. As plântulas obtidas foram aclimatizadas nos substratos Mutiplant[®], Vermiculita e Perlita durante 30 dias. No segundo experimento, as plântulas obtidas a partir da germinação *in vitro* foram transferidas para diferentes meios de cultivo (MS100; MS50; WPM100 e WPM50) e cultivadas durante 60 dias. As plântulas obtidas foram aclimatizadas no substrato Mutiplant[®] durante 30 dias. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Após 60 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas a massa fresca total (MF), o número de folhas (NF), o comprimento da parte aérea (CPA), o número de raiz (NR), o comprimento da maior raiz (CMR) e o número de nós (NN) das plântulas. Ao final da aclimatização das mudas avaliou-se o percentual de sobrevivência (PS), a massa fresca total (MF), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), comprimento da parte aérea (CPA), o comprimento da maior raiz (CMR) e o número de nós (NN) das mudas. Para ambos os experimentos, todos os meios de cultivo mostraram-se adequados para o desenvolvimento das plântulas *in vitro*. O percentual geral de sobrevivência de mudas durante a aclimatização foi de 54% e 92%, respectivamente, para o primeiro e segundo experimento. Os resultados observados indicam que o cultivo *in vitro* de *P. heteromallum* pode ser uma técnica de propagação alternativa promissora aos métodos tradicionais de propagação desta espécie.

Palavras-chave: *Tibouchina heteromalla* (sin.). Produção de Mudas. Micropropagação.

4.2 ABSTRACT

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don. It is endemic to Brazil and is characterized by its purple flowers and very hairy cordiform leaves, very ornamental, being popularly known as jaguar ear. Studies on the propagation of this species are limited to traditional vegetative propagation by cuttings. Thus, micropropagation of the species can be considered an important scientific technical advance that will enable the production of seedlings on a commercial scale, with phytosanitary quality, in addition to providing subsidies for future biotechnological applications. The objective of this work was to investigate aspects of the *in vitro* development and subsequent acclimatization of micropropagated *P. heteromallum* seedlings. To this end, two experiments were carried out. In the first experiment, *P. heteromallum* seedlings obtained from *in vitro* germination were transferred to different culture media (MS100; MS50; WPM100 and WPM50) and cultivated for 60 days. The seedlings obtained were acclimatized in Mutiplant®, Vermiculite and Perlite substrates for 30 days. In the second experiment, the seedlings obtained from *in vitro* germination were transferred to different culture media (MS100; MS50; WPM100 and WPM50) and cultivated for 60 days. The seedlings obtained were acclimatized in the Mutiplant® substrate for 30 days. The experiments were carried out in a completely randomized design. After 60 days of *in vitro* cultivation, total fresh mass (MF), number of leaves (NF), length of shoot (CPA), number of roots (NR), length of the longest root (CMR) were evaluated. and the number of nodes (NN) of the seedlings. At the end of seedling acclimatization, the percentage of survival (PS), total fresh mass (MF), number of leaves (NF), length of the largest leaf (CMF), length of the aerial part (CPA), the length of the longest root (CMR) and the number of nodes (NN) of the seedlings. For both experiments, all culture media were suitable for *in vitro* seedling development. The overall percentage of seedling survival during acclimatization was 54% and 92%, respectively, for the first and second experiments. The results observed indicate that the *in vitro* cultivation of *P. heteromallum* can be a promising alternative propagation technique to traditional propagation methods for this species.

Keywords: *Tibouchina heteromalla* (syn.). Seedlings production. Micropropagation.

4.3 INTRODUÇÃO

Melastomataceae é uma família com distribuição pantropical, incluindo 177 gêneros e 5.750 espécies, sendo a quinta maior família dentre as angiospermas no Brasil, com cerca de 70 gêneros e mais de 1.400 espécies, das quais aproximadamente 915 são endêmicas (SANTOS et al., 2022). Dentre os gêneros que ocorrem no Brasil destaca-se o *Pleroma*, que apresenta grande importância ecológica e valor ornamental, abrangendo as espécies popularmente conhecidas como quaresmeiras, devido ao seu florescimento ocorrer próximo ao período religioso da Quaresma (LORENZI, 2015; LATOH et al., 2022). Dentre as espécies desse gênero destaca-se a *Pleroma heteromallum* (D.Don) D.Don, um arbusto semilenhoso, perene, nativo do Brasil, que se caracteriza por suas flores roxas e folhas cordiformes bastante pilosas, muito ornamentais, sendo popularmente conhecido como orelha-de-onça (CAMPOS et al., 2009; LORENZI, 2015).

O interesse em identificar plantas nativas que possam ser produzidas comercialmente vem aumentando entre os produtores de plantas ornamentais. As principais vantagens do uso de espécies nativas incluem melhor adaptação, maior resistência a pragas e doenças e manutenção do ecossistema local por meio da preservação da fauna e flora nativas de cada região (STUMPF et al., 2015). No entanto, o sucesso da comercialização de determinada espécie depende da eficiência na produção de mudas (BASTOS et al., 2020). Espécies do gênero *Pleroma* produzem grande número de sementes por planta, entretanto, além do tamanho diminuto, o poder germinativo das sementes pode ser bastante variável e irregular (CARVALHO, 2010). Por isso, a propagação vegetativa via estaquia vem sendo a opção comumente utilizada na propagação dessas espécies (PEREIRA et al., 2015; LATOH et al., 2018; LATOH et al., 2019; BASTOS et al., 2020; LATOH et al., 2022). A produção de mudas por estacas, no entanto, também apresenta entraves, como a limitação de produção de mudas em larga escala, sazonalidade de produção, além de propiciar a disseminação de doenças (SILVA et al., 2019), fatores que se tornam problema quando o objetivo é a produção de mudas de qualidade fitossanitária e em escala comercial.

Nesse contexto, a produção de mudas *in vitro* constitui um avanço em relação aos métodos convencionais de propagação, possibilitando maior eficiência na germinação de sementes (PLESSIS et al., 2020; PRUDENTE et al., 2017), produção de um elevado número de plantas que podem ser obtidas a partir de um único indivíduo, em espaço físico e tempo reduzido, além de assegurar um material livre de patógenos e com alta uniformidade (SILVA et al., 2021; SOARES et al., 2023).

Destaca-se, no entanto, que os estudos sobre a propagação de *P. heteromallum* têm se limitado à propagação vegetativa tradicional por estaquia (LATO et al., 2018; LATOH et al., 2019; LATOH et al., 2022). Logo, estabelecer um protocolo para a micropropagação de *P. heteromallum* tornam-se um importante avanço técnico-científico que poderá impulsionar a produção de mudas, servindo ainda de subsídio para futuras aplicações biotecnológicas como, por exemplo, multiplicação *in vitro*, melhoramento e transformação genética, conservação e preservação da espécie.

O objetivo deste trabalho foi investigar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *P. heteromallum* e posterior aclimatização das mudas, com o intuito de ampliar os métodos de propagação da espécie.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes (LabEPS) do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os experimentos de aclimatização foram conduzidos no município de Mendes/RJ (22°31'36" S; 43°43'58" W). Durante o período de aclimatização registrou-se a temperatura e a umidade relativa do ar local com auxílio de termo-higrômetro digital (Import HTC-1) e a intensidade luminosa local com auxílio de luxímetro digital (Instrutherm LD-400).

4.4.2 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma heteromallum* e aclimatização das mudas nos substratos Multiplant[®], Perlita e Vermiculita

Plântulas de *P. heteromallum* provenientes da sementeira *in vitro* em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera[®]) (MS) com 25% da concentração original de sais, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose (NEON P.A. Laderquímica) e 8 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISO FAR), após 21 dias da sementeira, foram transferidas para os meios de cultura MS ou WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) (Phygenera[®]), ambos com 100% ou 50% da concentração original de sais. Todos os meios de cultura foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativo em pó e solidificado com 7,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1,2 atm.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo os tratamentos constituídos de quatro meios de cultura: meio MS com 100% da concentração original de sais (MS100); meio MS com 50% da concentração original de sais (MS50), meio WPM com 100% da concentração original de sais (WPM100) e meio WPM com 50% da concentração original de sais (WPM50), com quatro repetições por tratamento. A unidade experimental foi constituída de frascos de vidro de 200 mL, contendo aproximadamente 20 mL do meio de cultivo e cinco plântulas por frasco. Os frascos foram mantidos em B.O.D. sob temperatura de 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular e fotoperíodo de 16 horas (Figura 8).

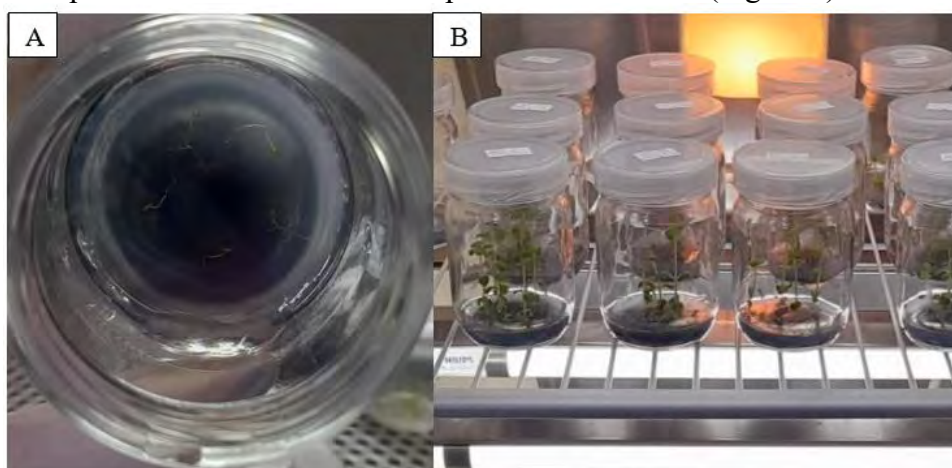


Figura 8. Repicagem de plântulas de *Pleroma heteromallum* (D.Don) D.Don sobre meio de cultivo para desenvolvimento *in vitro* (A); Frascos em B.O.D. contendo plântulas de *P. heteromallum* (B) na etapa de desenvolvimento *in vitro* (Seropédica/RJ, 2021).

Após 60 dias de cultivo *in vitro* as plântulas obtidas foram retiradas do meio de cultura e tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a completa eliminação do meio de cultura.

Foi avaliada a massa fresca total (MF), o número de folhas (NF), o comprimento da parte aérea (CPA), o número de raiz (NR), o comprimento da maior raiz (CMR) e o número de nós (NN).

As plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas para vasos de polietileno (nº6 – 80 mL), mantendo os tratamentos iniciais (MS100; MS50; WPM100 e WPM50) combinados com três diferentes tipos de substrato: comercial Mutiplant® (C), Perlita (P) e Vermiculita (V), em todas as combinações possíveis, resultando em 12 tratamentos, com quatro repetições cada. Posteriormente, os vasos foram levados para aclimatização em casa de vegetação cuja cobertura era composta por telhas de polipropileno translúcidas. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado e cada unidade experimental (vaso) foi composta por uma planta vaso⁻¹ (Figura 9). Os substratos das plantas foram molhados manualmente, em dias alternados, com auxílio de proveta graduada, de modo a fornecer o mesmo volume de água por vaso.



Figura 9. Aclimatização de plântulas de *Pleroma heteromallum* (D.Don) D.Don provenientes de cultivo *in vitro* em meio MS e WPM, ambos com 50% e 100% da concentração original de sais, combinados com três diferentes tipos de substrato (comercial Mutiplant®, Perlita e Vermiculita) (Mendes/RJ, 2021).

Durante o período de aclimatização registrou-se a temperatura média de 25,9°C (máxima 34,3°C - mínima 20,4°C), umidade relativa do ar média de 52% (máxima 72% - mínima 34%) e intensidade luminosa média local de 77143,15 lux. Após 30 dias de aclimatização, foi avaliado o percentual de sobrevivência (PS), a massa fresca total (MF), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), comprimento da parte aérea (CPA), o comprimento da maior raiz (CMR) e o número de nós (NN) das mudas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade e quando significativos foram transformados $[(x + 1)^{0.5}]$. A análise de variância (ANAVA) foi realizada ao nível de 5% de probabilidade e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do *software* estatístico Sisvar 5.8 (FERREIRA, 2011).

Além da ANAVA e do teste de comparação de médias, utilizou-se a técnica de principal component analysis (PCA) a fim de avaliar o comportamento das variáveis respostas em função dos tratamentos aplicados. Para tanto foi feito o escalonamento das médias obtidas

de cada um dos tratamentos, a fim de uniformizar as unidades das variáveis. O estimador utilizado foi $(x_i - \mu_{xi}) / \sigma_{xi}$. Utilizou-se a correlação de Pearson (1901) para estimativa da matriz de similaridade. Para realização dessas análises estatísticas utilizou-se o *software* R (R CORE TEAM, 2021).

4.4.3 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma heteromallum* e aclimatização de mudas no substrato Multiplant®

A etapa *in vitro* do experimento anterior foi repetida, tendo sido considerado o número de repetições igual a cinco para cada um dos tratamentos desta etapa.

Para a etapa de aclimatização, diante dos resultados anteriormente observados, utilizou-se apenas o substrato comercial Multiplant® para aclimatização das mudas, sendo mantidos os quatro tratamentos *in vitro* (plântulas provenientes do cultivo *in vitro* nos meios MS 50% e 100% e WPM 50% e 100%), sendo 12 repetições cada, totalizado 48 observações (Figura 10).



Figura 10. Aclimatização de plântulas de *Pleroma heteromallum* (D.Don) D.Don provenientes do cultivo *in vitro* em meio MS e WPM, ambos com 50% e 100% da concentração original de sais, em substrato comercial Multiplant® (Mendes/RJ, 2022).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma heteromallum* e aclimatização das mudas nos substratos Multiplant[®], Perlita e Vermiculita

O teste de normalidade foi significativo para as variáveis número de folhas, comprimento de parte aérea e número de nós, de modo que as mesmas foram transformadas antes da realização da análise de variância. A análise de variância mostrou resultado significativo para as variáveis NR, CMR e NN. O número de raiz foi maior nos tratamentos MS50 e WPM50, enquanto que comprimento da maior raiz foi superior para WPM50 e número de nós inferior para WPM100 (Tabela 5) pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Resultado do teste de comparação de médias para massa fresca total (MF), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento da maior raiz (CMR) após 60 dias de desenvolvimento *in vitro* de *P. heteromallum* em diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	MF	NF	NR	NN	CPA	CMR
	g		un			cm
MS100	0.11ns	5.40ns	4.16b	2.71ab	1.87ns	2.52b
MS50	0.06ns	7.74ns	6.49a	3.25ab	2.02ns	2.41b
WPM100	0.06ns	4.77ns	2.65b	2.13b	1.75ns	1.48b
WPM50	0.07ns	8.05ns	6.53a	3.98a	2.19ns	4.26a
Média Geral	0.07	6.49	4.96	3.02	1.96	2.67
CV (%)	41.99	25.06	20.52	24.45	12.69	21.69

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns – não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$); CV: Coeficiente de variação.

O resultado obtido a partir da PCA para a fase de cultivo *in vitro* das plântulas indicou que os dois primeiros componentes explicam 94,67% da variabilidade existente entre os tratamentos aplicados (meios de cultura) e as variáveis analisadas, sendo que o primeiro componente principal (PC1) explica 77,74% e a segundo componente principal (PC2) 16,93% dessa variabilidade.

Pode-se observar que o tratamento MS100 apresentou correlação positiva com a variável MF e negativa com todas as demais. Para o tratamento com meio MS50 pode-se observar correlação positiva para as variáveis NF, NR, e CMR. O meio WPM contendo 100% da concentração de sais mostrou correlação negativa para todas as variáveis analisadas. Para as variáveis NF e NR os tratamentos MS50 e WPM50 foram semelhantes entre si. (Figura 11).

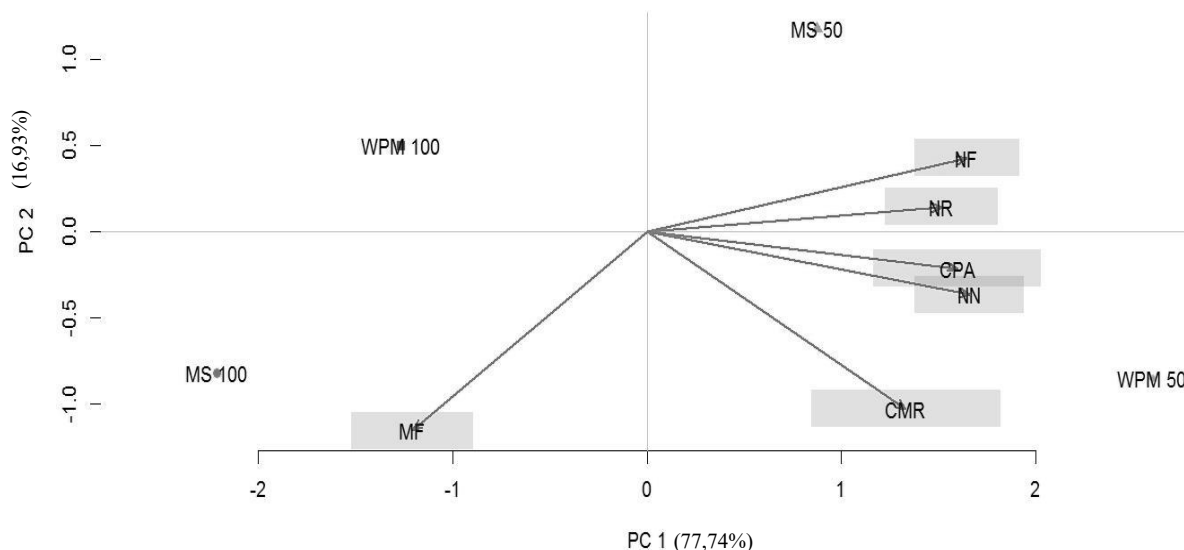


Figura 11. Gráfico obtido a partir da técnica de principal component analysis (PCA) que descreve a relação entre os tratamentos aplicados e as variáveis analisadas durante a etapa de desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma heteromallum*. PC1 e PC2 correspondem aos componentes principais. O posicionamento de cada variável no gráfico representa seu comportamento em relação às demais e aos tratamentos aplicados, de modo que uma maior proximidade entre as variáveis indica uma maior correlação entre elas, bem como aos tratamentos aplicados.

Legenda: Meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais (MS100); Meio de cultura MS com 50% da concentração original de sais (MS50); Meio de cultura WPM com 100% da concentração original de sais (WPM100); Meio de cultura WPM com 50% da concentração original de sais (WPM50).

O meio de cultura exerce influência no estabelecimento e desenvolvimento das plântulas *in vitro*, refletindo também na etapa de aclimatização. Meios de cultura que contêm altos níveis de sais, como, por exemplo, o MS, frequentemente inibem a indução e o crescimento de raízes, comprimento de parte aérea, número de folhas e de brotações (LEMES et al., 2016). Plessis et al. (2020) observaram maior número médio de nós por plântula em meio MS diluído ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$) em comparação ao meio MS com 100% da concentração original de sais no cultivo *in vitro* de *Hibiscus coddii*. Oliveira et al. (2023) observaram desenvolvimento superior das plântulas de *Cyrtopodium aliciae* cultivadas em meio Vacin e Wendt, entretanto, as mudas mais resistentes e com melhor desempenho durante a etapa de aclimatização foram as que apresentaram maior massa fresca em meio MS com metade da concentração de sais.

Após o período de aclimatização, constatou-se efeito significativo do meio de cultura sobre as variáveis NF e CPA e efeitos do substrato para a variável CMR. Foi observada interação significativa (meio de cultura x substrato) para as variáveis MF, CMF e NN. Não houve diferença significativa para a variável PS (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para massa fresca total (MF), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de nós (NN) e percentual de sobrevivência (PS) das mudas de *P. heteromallum* após 30 dias de aclimatização em casa-de-vegetação (Seropédica/RJ, 2022).

Quadrado médio

Fonte de Variação (FV)	PS %	MF g	CPA	CMF cm	CMR	NF un	NN
Meio de Cultura	0.1001ns	0.0874*	1.2377*	0.5920*	1.6226ns	1.8639*	0.5203*
Substrato	0.08936ns	0.0293*	0.3828ns	0.1266ns	2.4995*	0.9870ns	0.2770ns
Interação	0.04647ns	0.0287*	0.5910ns	0.2016*	1.1533ns	1.1112ns	0.3566*
Média Geral	1.2244	1.0960	1.6251	1.3364	1.9606	1.8240	1.4545
CV (%)	15.44	8.27	31.12	19.45	42.16	37.76	26.12

*Significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$); ns – não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$); CV: Coeficiente de variação.

O teste de comparação de médias (Tabela 7) indicou que não houve diferença significativa para a variável CPA entre as mudas provenientes dos tratamentos MS100 e WPM100, contudo, este último também não diferiu dos tratamentos MS50 e WPM50. Para a variável CMR as mudas cultivadas em substrato Vermiculita apresentaram as maiores médias quando comparadas àquelas cultivadas no substrato Perlita. No entanto, o comprimento médio de raízes das mudas aclimatizadas em substrato Comercial não diferiu significativamente dos tratamentos Vermiculita e Perlita. Por sua vez, realizando o desdobramento das médias para as variáveis MFT e CMF, constatou-se a superioridade das mudas provenientes do tratamento MS100 quando cultivadas em substrato Comercial. Quanto a variável NN verificou-se que mudas provenientes do tratamento WPM100 e cultivadas em substrato Vermiculita foram as que apresentaram as maiores médias em relação aos substratos Comercial e Perlita. Enquanto que as mudas provenientes do tratamento MS100 e cultivadas em substrato Comercial apresentaram as maiores médias para a variável NN em relação aos demais tratamentos cultivados nesse mesmo substrato.

Tabela 7. Resultado do teste de comparação de médias para massa fresca total (MF), comprimento da maior folha (CMF), número de nós (NN), número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento da maior raiz (CMR), em função da fonte de variação (FV), após 30 dias de aclimatização de mudas de *P. heteromallum* em casa-de-vegetação (Seropédica/RJ, 2022).

Fonte de Variação: Interação				
Massa fresca total (g) ⁽¹⁾				
Meio de Cultura	Substrato			Média Geral
	Vermiculita	Perlita	Comercial	
MS100	1.11aB	1.17aB	1.39aA	1.22
MS50	1.09aA	1.04aA	1.00bA	1.04
WPM100	1.10aA	1.01aA	1.09bA	1.07
WPM50	1.05aA	1.02aA	1.09bA	1.05
Média Geral	1.09	1.06	1.14	1.10
Comprimento da maior folha (g) ⁽¹⁾				
Meio de Cultura	Substrato			Média Geral
	Vermiculita	Perlita	Comercial	
MS100	1.45aB	1.50aB	2.02aA	1.66
MS50	1.43aA	1.21aA	1.00bA	1.21

WPM100	1.48aA	1.10aA	1.35bA	1.31
WPM50	1.22aA	1.12aA	1.16bA	1.17
Média Geral	1.39	1.23	1.38	1.34

Número de nós (un)⁽¹⁾

Meio de Cultura	Substrato			Média Geral
	Vermiculita	Perlita	Comercial	
MS100	1.55aA	1.55aA	2.06aA	1.72
MS50	1.62aA	1.43aA	1.00bA	1.35
WPM100	1.87aA	1.10aB	1.56abAB	1.51
WPM50	1.29aA	1.18aA	1.25bA	1.24
Média Geral	1.58	1.32	1.47	1.45

Fonte de Variação: Meio de cultura

Meio de Cultura	Número de folhas (un) ⁽²⁾	Comprimento de parte aérea (cm) ⁽²⁾
MS100	2.33a	2.08a
MS50	1.63ab	1.46b
WPM100	1.91ab	1.61ab
WPM50	1.42b	1.35b
Média Geral	1.82	1.63

Fonte de Variação: Substrato

Substrato	Comprimento da maior raiz (cm) ⁽²⁾
Comercial	1.80ab
Perlita	1.67b
Vermiculita	2.41a
Média Geral	1.9606

⁽¹⁾médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ⁽²⁾médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa para a variável percentual de sobrevivência. A porcentagem média geral de sobrevivência das mudas foi de 54%. Entretanto, pode-se observar que o percentual de sobrevivência para mudas provenientes de cultivo *in vitro* em meio MS com 100% da concentração original de sais foi de 83%, independentemente do substrato utilizado na fase de aclimatização (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de sobrevivência (PS) em função dos meios de cultura utilizados na etapa de cultivo *in vitro* e do substrato de aclimatização, após 30 dias de aclimatização de *P. heteromallum*.

Tratamento	Substrato			Média Geral
	Vermiculita	Perlita	Comercial	
	%			
MS 100	75	75	100	83
MS 50	75	50	0	42
WPM 100	100	25	50	58
WPM 50	50	25	25	33

Média Geral	75	44	44	54
-------------	----	----	----	----

Observou-se que mudas cultivadas em meio MS com 100% da concentração original de sais apresentaram caule de coloração verde e com diâmetro maior, quando comparadas às hastes das mudas cultivadas nos demais tratamentos, cujos caules eram brancos e com aspecto estiolado (Figura 12).

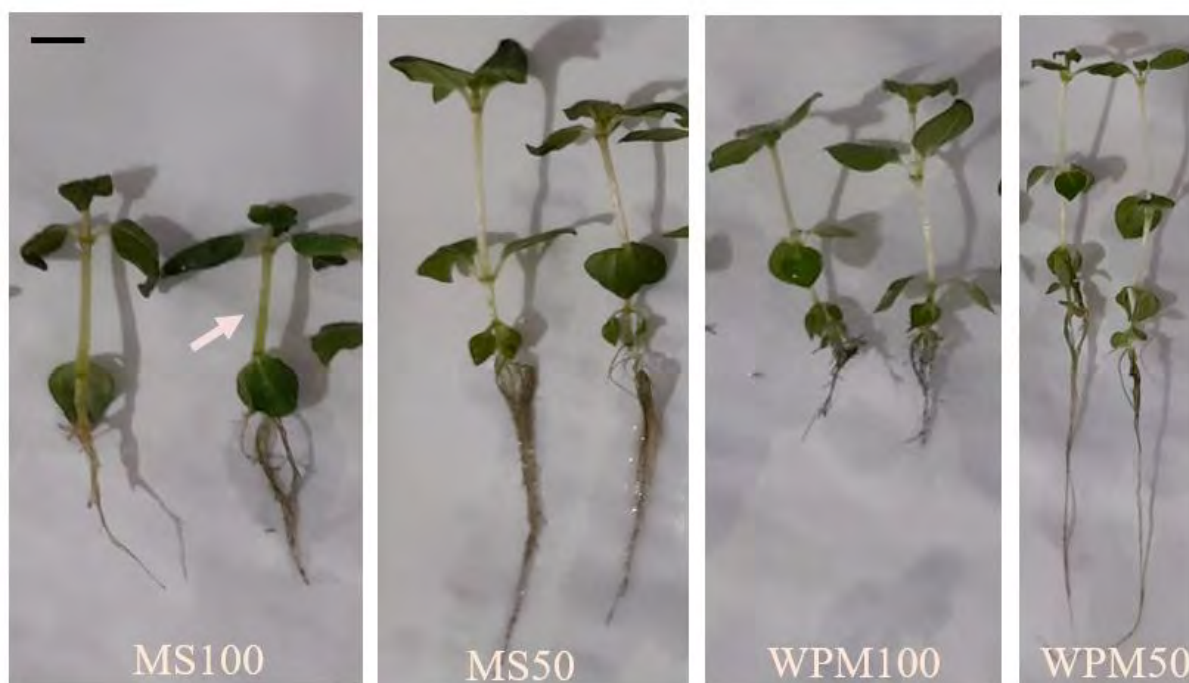


Figura 12. Plântulas de *Pleroma heteromallum* obtidas após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais (MS100); em meio MS com 50% da concentração original de sais (MS50); em meio de cultura WPM com 100% da concentração original de sais (WPM100) e em meio de cultura WPM com 50% da concentração original de sais (WPM50) Barra: 1.0 cm (Seropédica/RJ, 2021).

Para a fase de aclimatização das plântulas o resultado obtido a partir da PCA indicou que os dois primeiros componentes explicam 85,23% da variabilidade existente entre os tratamentos aplicados (meios de cultura e substratos) e as variáveis analisadas, sendo que o primeiro componente principal (PC1) explica 75,94% e o segundo componente principal (PC2) 9,28% dessa variabilidade. Com exceção ao tratamento MS50, todos os tratamentos contendo substrato comercial apresentaram correlação positiva com as variáveis CMF e MF, sobretudo o tratamento MS100C. Os tratamentos contendo o substrato vermiculita apresentaram correlação positiva com a variável percentual de sobrevivência (PS), sobretudo o tratamento WPM100 (Figura 13).



Figura 14. Mudas de *Pleroma heteromallum* após 30 dias de aclimatização nos diferentes substratos. Barras: 1.0 cm (Seropédica/RJ, 2021).

Meio de cultura MS com 100% da concentração de sais (MS 100); Meio MS com 50% da concentração de sais (MS 50); Meio de cultura WPM com 100% da concentração de sais (WPM 100); Meio de cultura WPM com 50% da concentração de sais (WPM 50); Substrato Comercial (C); Perlita (P); Vermiculita (V) (Seropédica/RJ, 2021).

4.5.2 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma heteromallum* e aclimatização das mudas no substrato Multiplant®

O teste de normalidade foi significativo para a variável comprimento da maior raiz, de modo que a mesma foi transformada antes da realização da análise de variância. A análise de variância mostrou resultado significativo apenas para as variáveis NF e NN. Pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, o número médio de folhas foi maior para o tratamento MS50. Os tratamentos MS100 e WPM50 não diferiram entre si. Enquanto que o menor número de folhas foi observado no tratamento WPM100. Para a variável NN a média do tratamento WPM100 mostrou-se inferior à dos demais tratamentos. Os tratamentos MS50, WPM50 e MS100 apresentaram os maiores valores e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 9).

Tabela 9. Médias de massa fresca (MF), número de folhas (NF), número de raiz (NR), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de maior folha (CMF) e comprimento de maior raiz (CMR) após 60 dias de desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma heteromallum* em diferentes meios de cultura (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	MF	NF	NR	NN	CPA	CMF	CMR
	g		un			cm	
MS100	0.50ns	9.08b	8.50ns	4.03a	4.77ns	1.18ns	4.15ns
MS50	0.64ns	13.55a	10.35ns	5.20a	5.01ns	1.10ns	5.44ns
WPM100	0.66ns	2.70c	9.33ns	2.14b	4.12ns	1.08ns	4.53ns
WPM50	0.40ns	10.04b	7.56ns	4.65a	6.04ns	1.00ns	6.83ns
Média Geral	0.55	8.84	8.94	4.00	4.99	1.09	5.24
CV (%)	51.46	17.72	29.62	16.65	23.82	25.89	29.83

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ns – não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$). Meio de cultura MS com 100% da concentração de sais (MS 100); Meio MS com 50% da concentração de sais (MS 50); Meio de cultura WPM com 100% da concentração de sais (WPM 100); Meio de cultura WPM com 50% da concentração de sais (WPM 50).

Na Figura 15 têm-se as plântulas de *P. heteromallum* obtidas após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais (MS100); em meio MS com 50% da concentração original de sais (MS50); em meio de cultura WPM com 100% da concentração original de sais (WPM100) e em meio de cultura WPM com 50% da concentração original de sais (WPM50).

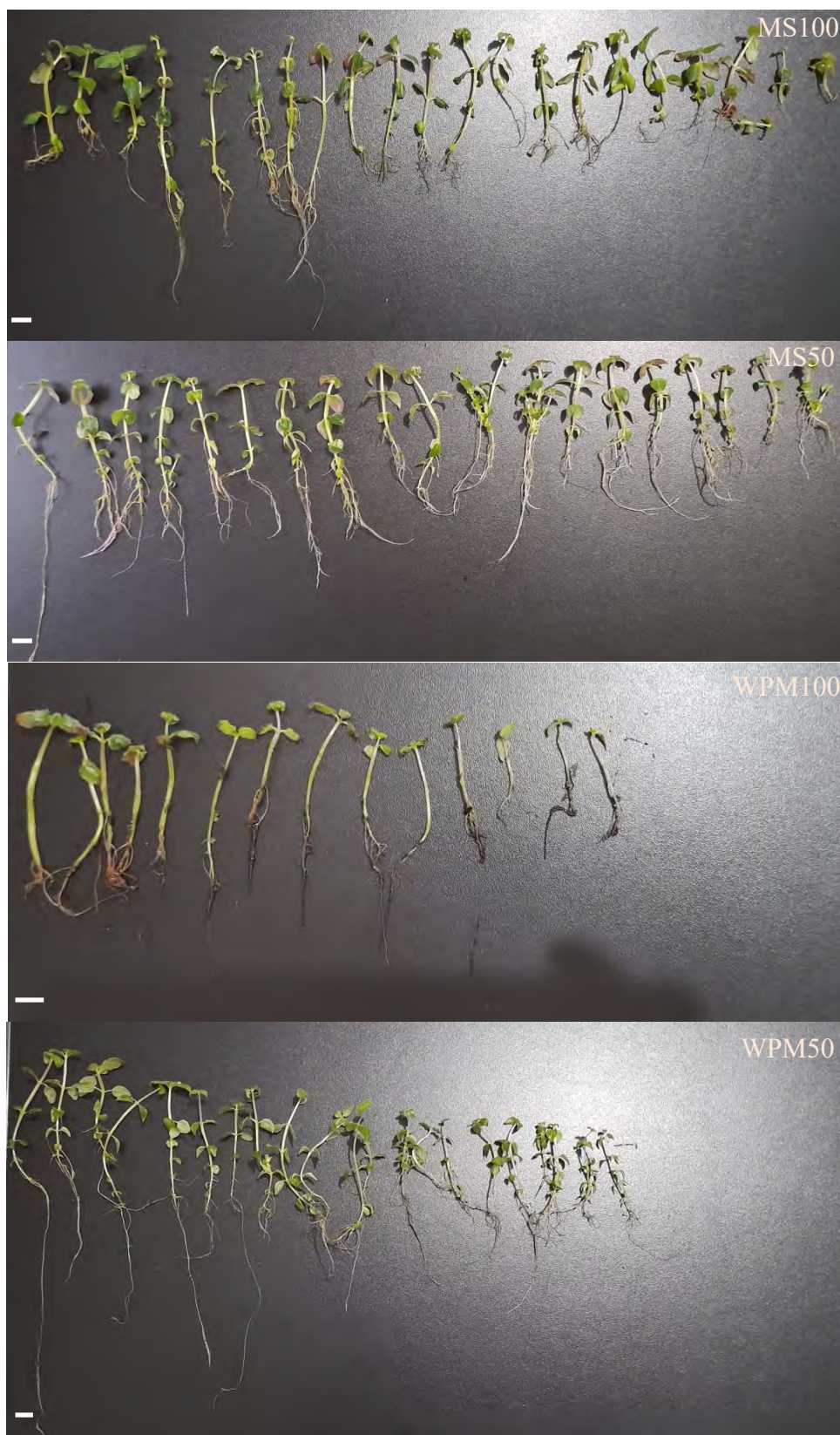


Figura 15. Plântulas de *Pleroma heteromallum* obtidas após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais (MS 100); em meio MS com 50% da concentração original de sais (MS 50); em meio de cultura WPM com 100% da concentração original de sais (WPM 100) e em meio de cultura WPM com 50% da concentração original de sais (WPM 50) Barras: 1 cm (Seropédica/RJ, 2022).

Na etapa de aclimatização das mudas observou-se a morte de 75% e 100% das plântulas oriundas do cultivo *in vitro* nos tratamentos WPM100 e WPM50, respectivamente, logo esses tratamentos foram desconsiderados para a análise estatística. Para os tratamentos MS100 e MS50, obteve-se o percentual de 100% e 83% de sobrevivência das mudas, respectivamente.

O teste de normalidade foi significativo para as variáveis NF, NR, NN, CMR e PS, de modo que as mesmas foram transformadas antes da realização da análise de variância. A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa entre as variáveis analisadas (Tabela 10).

Tabela 10. Médias de massa fresca (MF), número de folhas (NF), número de raiz (NR), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento da maior folha (CMF), comprimento de maior raiz (CMR) e percentual de sobrevivência (PS) após 30 dias de aclimatização de plântulas de *Pleroma heteromallum*, oriundas de cultivo *in vitro* em meio MS com 100% e 50% da concentração original de sais (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	MF	NF	NR	NN	CPA	CMF	CMR	PS
	g	un			cm			%
MS100	0.46ns	7.50ns	13.08ns	3.17ns	5.07ns	2.43ns	6.17ns	100ns
MS50	0.41ns	5.90ns	9.10ns	2.80ns	5.00ns	2.09ns	5.80ns	83ns
Média Geral	0.43	6.70	11.09	2.98	5.03	2.26	5.98	92
CV (%)	46.70	32.44	54.83	26.03	24.70	25.18	46.89	30.03

ns - não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$). CV: coeficiente de variação. Meio de cultura MS com 100% da concentração de sais (MS 100); Meio MS com 50% da concentração de sais (MS 50).

Na Figura 16 têm-se as mudas de *P. heteromallum* oriundas dos tratamentos MS100, MS50 e WPM100, após 30 dias de aclimatização em substratos comercial Mutiplant[®].



Figura 16. Mudanças de *Pleroma heteromallum* após 30 dias de aclimatização em substrato comercial Multiplant® Barras: 1.0 cm (Seropédica/RJ, 2022). Cultivo *in vitro* em meio de cultura MS com 100% da concentração de sais (MS100); Meio MS com 50% da concentração de sais (MS50); Meio de cultura WPM com 100% da concentração de sais (WPM100).

A aclimação é uma etapa crítica na propagação *in vitro* de plantas, podendo haver alta taxa de mortalidade das mudas, embora pesquisas indiquem que é possível obter sucesso durante essa etapa (NADAL et al., 2022). Pêgo et al. (2014) registraram apenas 25,6% de sobrevivência das plantas de *Syngonanthus elegans* (Eriocaulaceae) no processo de aclimação. O índice de sobrevivência de plântulas de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) oriundas de cultivo *in vitro* foi de aproximadamente 55% em condições *ex vitro* (PRUDENTE et al., 2016). Diferentemente, Lawrence e Murugan (2017) verificaram 90% de sobrevivência de mudas de *Osbeckia aspera* (Melastomataceae) aclimatizadas em ambiente natural. Logo, a realização de experimentos é de suma importância para aumentar a eficiência do processo para diferentes gêneros e espécies.

Os resultados obtidos neste trabalho servem de subsídios para futuras abordagens de cultivo *in vitro* de *P. heteromallum*, sobretudo com vista à propagação vegetativa *in vitro*, o que possibilitaria a produção de mudas de qualidade fitossanitária, em escala comercial e em qualquer época do ano.

4.6 CONCLUSÃO

O cultivo *in vitro* das plântulas de *P. heteromallum* em meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais e, posteriormente, aclimatização das mesmas em substrato comercial Multiplant[®], mostrou-se o tratamento mais adequado, sob as condições deste experimento.

A técnica de propagação *in vitro* pode vir a ser uma alternativa futura ao método de propagação via estaquia para *P. heteromallum*.

4.7 REFERÊNCIAS

- BASTOS, F.E.A.; GRIMALDI, F.; KRETZSCHMAR, A.A.; RUFATO, L. Propagação de plantas nativas com potencial ornamental da Serra do Oratório, Santa Catarina, Brasil. **Ornamental Horticulture**, v.26, p.298-305, 2020. DOI: [10.1590/2447-536X.v26i2.2155](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i2.2155)
- CAMPOS, C.C.F.; DUARTE, J.F.; BORÉM, R.A.T.; CASTRO, D.M. de. Floral biology and breeding mechanisms of *Tibouchina heteromalla* Cong. in rocky outcrops in the south of Minas Gerais. **Brazilian Journal of Ecology**, v.13, p.18-28, 2009. Available at: <https://www.seb-ecologia.org.br/revistas/n109/index.html>> Accessed on: May 15 2022.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras, v.4**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas. 2010. 644p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: [10.1590/S1413-70542011000600001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001)
- LATOH, L.P.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; KOEHLER, H.S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Propagação vegetativa, produtividade de minicepas e determinações metabolômicas de 4 espécies do gênero *Tibouchina*. **Ciência Florestal**, v.32, p.1640-1658, 2022. DOI: [10.5902/1980509836951](https://doi.org/10.5902/1980509836951)
- LATOH, L.P.; DALLAGRANA, J.F.; PORTES, D.C.; MAGGIONI, R.A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Propagação vegetativa via miniestaquia caulinar seriada e produtividade de minijardim de espécies de *Tibouchina* spp. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, p.343-357, 2018. DOI: [10.21674/2448-0479.43.343-357](https://doi.org/10.21674/2448-0479.43.343-357)
- LATOH, L.P.; GOMES, E.M.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Can indolebutyric and fulvic acids induce adventitious rhizogenesis on mini-cuttings from Brazilian native tibouchinas? **Ornamental Horticulture**, v.25, p.42-48, 2019. DOI: [10.14295/oh.v25i1.1257](https://doi.org/10.14295/oh.v25i1.1257)
- LAWARENCE, B.; MURUGAN, K. *In vitro* Callus Induction and Plant Regeneration of *Osbeckia aspera* L., a dye yielding medicinal plant. **Trends in Biosciences**, v.10, n.18, p.3297-3303, 2017.
- LEMES, C.S.R.; SORGATO, J.C.; SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavesce*ns. **Ciência Rural**, v.46, p.499-505, 2016. DOI: [10.1590/0103-8478cr20150368](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150368)

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2015. 1120p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

NADAL, M.C.; ASSIS, A.M.; SCHUCH, M.W.; FARIA, R.T. Grape-based residue as a substrate in *Oncidium baueri* Lindl. acclimatization. **Ornamental Horticulture**, v.28, p.239-245, 2022. DOI: [10.1590/2447-536X.v28i2.2477](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v28i2.2477)

OLIVEIRA, J.; MORAES, M.C.; CUSTÓDIO, C.C.; NETO, N.B.M. *In vitro* development and acclimatization of *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe, an endemic species of the Chapada Diamantina. **Ciência Rural**, v.53, e20210599, 2023. DOI: [10.1590/0103-8478cr20210599](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210599)

PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to system of point in space. **Philosophical Magazine**, v.2, p.559-572, 1901. Available at: <http://pca.narod.ru/pearson1901.pdf> Accessed on: Jul 18 2023.

PÊGO, R.G.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R. Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.36, p.347-353, 2014. DOI: [10.4025/actasciagron.v36i3.17946](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i3.17946)

PEREIRA, M.O.; GRABIAS, J.; ZUFFELATTO-RIBAS, K.C.; NAVROSKI, M.C. Enraizamento de estacas de *Tibouchina moricandiana* var. *vinacea* em função da forma de aplicação e concentrações de AIB. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, p.210-216, 2015. DOI: [10.5965/223811711432015210](https://doi.org/10.5965/223811711432015210)

PLESSIS, H.J.; NIKOLOVA, R.V.; KLEYNHANS, R.; EGAN, B.A. *In vitro* seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*. **Ornamental Horticulture**, v.26, p. 598-606, 2020. DOI: [10.1590/2447-536X.v26i4.2191](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i4.2191)

PRUDENTE, D.O.; DOMICIANO, D.; PAIVA, R.; NERY, F.C.; MÁXIMO, W.P.F. Cryopreservation and effect of lighting conditions and cytokinins on *in vitro* multiplication of *Miconia ligustroides* (DC.) Naudin. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, p.502-511, 2017. DOI: [10.5897/AJAR2016.12021](https://doi.org/10.5897/AJAR2016.12021)

PRUDENTE, D.O.; NERY, F.C.; PAIVA, R.; REIS, M.V.; PAIVA, P.D.O.; NERY, M.C. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.12, p.13-19, 2016. Disponível em: <http://pccm.ufla.br/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/83>

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2022. Available at: <<https://www.R-project.org/>> Accessed on: Jul 17 2022.

SANTOS, P.M.L.A.; GOLDENBERG, R.; FRAGA, C.N. Melastomataceae of the Parque Natural Municipal de São Lourenço, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia**, v.73, e00822021, 2022. DOI: [10.1590/2175-7860202273113](https://doi.org/10.1590/2175-7860202273113)

SILVA, K.B.; REINIGER, L.R.S.; RABAIOLLI, S.M.S.; ZIEGLER, A.C.F.; STEFANEL, C.M. Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de brotações de *Luehea divaricata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.41, e201901921, p.1-6, 2021. DOI: [10.4336/2021.pfb.41e201901921](https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201901921)

SILVA, T.T.S.; SPADA, G.; FARIA, M.F.; GOULART, L.M.L.; FURTADO, E.L.; PASSOS, J.R.S.; GUERRINI, I.A. Fitossanidade e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função da aplicação de fosfito e silício. **Summa Phytopathologica**, v.45, p.332-336, 2019. DOI: [10.1590/0100-5405/184112](https://doi.org/10.1590/0100-5405/184112)

SOARES, I.A.; MENEZES FILHO, A.C.P.; VENTURA, M.V.A. Biofactories in the current Brazilian agricultural scenario: review. *Brazilian Journal of Science*, v.2, p.16-33, 2023. DOI: [10.14295/bjs.v2i1.246](https://doi.org/10.14295/bjs.v2i1.246)

STUMPF, E.R.T.; SILVA, P.S.; ROMAGNOLI, I.D.; FISCHER, S.Z.; MARIOT, M.P. Espécies nativas que podem substituir as exóticas no paisagismo. *Ornamental Horticulture*, v.21, p.165-172, 2015. DOI: [10.14295/aohl.v21i2.663](https://doi.org/10.14295/aohl.v21i2.663)

5 CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE *Pleroma granulosum* e *Pleroma mutabile* (MELASTOMATACEAE)

5.1 RESUMO

Espécies do gênero *Pleroma*, popularmente conhecidas por quaresmeiras, apresentam flores vistosas que lhes conferem alto valor ornamental. Espécies dessa família costumam apresentar grande número de sementes, contudo essas são diminutas e geralmente muitas delas são inviáveis, tornando o sucesso da propagação sexuada limitado ao considerar a exploração de mudas para fins comerciais. A propagação *in vitro* é uma alternativa para otimizar o processo de produção de mudas em larga escala, com qualidade fitossanitária, em pequeno espaço físico e qualquer época do ano. O objetivo deste trabalho foi investigar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Pleroma granulosum* e *Pleroma mutabile* como alternativa para produção de mudas dessas espécies. Plântulas de *P. granulosum* foram cultivadas *in vitro* durante 60 dias, o delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2, sendo dois meios de cultura (MS100 e MS50) combinados com dois sistemas de cultivo *in vitro* (autotrófico e fotoautotrófico). Ao final desse período as mudas obtidas foram levadas para aclimatização por 30 dias. O experimento com as plântulas de *P. mutabile* foi constituído em delineamento inteiramente casualizado, sendo essas cultivadas *in vitro* durante 60 dias, em quatro meios de cultura (MS 100, MS50; WPM100 e WPM50). Ao final dos 60 dias devido às condições debilitadas das plântulas não foi possível prosseguir para a etapa de aclimatização. O meio MS com metade da concentração original de sais demonstrou-se o mais adequado para o desenvolvimento das plântulas de *P. mutabile* e *P. granulosum* *in vitro*. Plântulas de *P. granulosum* cultivadas sob sistema autotrófico apresentaram médias superiores para o percentual de sobrevivência de mudas, massa fresca total e comprimento da maior raiz. Constatou-se o surgimento de pretuberâncias brancas no limbo foliar de ambas as espécies, sendo essas mais acentuadas em *P. mutabile*. Ao final da aclimatização constatou-se morte de 100% das mudas de *P. granulosum*. Outros estudos precisam ser realizados a fim de compreender as eventuais transformações morfofisiológicas que possam ocorrer com essas espécies em condições de cultivo *in vitro* de modo a viabilizar o sucesso dessa técnica como alternativa para a produção de mudas de *P. mutabile* e *P. granulosum*.

Palavras-chave: *Tibouchina* (sin.). Propagação *in vitro*. Produção de mudas.

5.2 ABSTRACT

Species of the genus *Pleroma*, popularly known as lentils, have showy flowers that give them high ornamental value. Species in this family usually have a large number of seeds, however these are tiny and many of them are generally unviable, making the success of sexual propagation limited when considering the exploitation of seedlings for commercial purposes. *In vitro* propagation is an alternative to optimize the process of producing seedlings on a large scale, with phytosanitary quality, in a small physical space and at any time of the year. The objective of this work was to investigate the *in vitro* development of *P. mutabile* and *P. granulosum* seedlings as an alternative for producing seedlings of these species. *P. granulosum* seedlings were cultivated *in vitro* for 60 days, the design was completely randomized in a 2 x 2 factorial scheme, with two culture media (MS100 and MS50) combined with two *in vitro* culture systems (autotrophic and photoautotrophic). At the end of this period, the seedlings obtained were taken for acclimatization for 30 days. The experiment with *P. mutabile* seedlings was a completely randomized design, cultivated *in vitro* for 60 days, in four culture media (MS100, MS50; WPM100 and WPM50). At the end of 60 days, due to the weakened condition of the seedlings, it was not possible to proceed to the acclimatization stage. The MS medium with half the original salt concentration proved to be the most suitable for the development of *P. mutabile* and *P. granulosum* seedlings *in vitro*. *P. granulosum* seedlings grown under an autotrophic system showed higher averages for the percentage of seedling survival, total fresh mass and length of the largest root. It was noted the appearance of white protuberances on the leaf blade of both species, these being more pronounced in *P. mutabile*. At the end of acclimatization 100% of *P. granulosum* seedlings died. Other studies need to be carried out in order to understand the possible morphophysiological transformations that may occur with these species under *in vitro* cultivation conditions in order to enable the success of this technique as an alternative for the production of *P. mutabile* and *P. granulosum* seedlings.

Keywords: *Tibouchina* (syn.). *In vitro* propagation. Seedling production.

5.3 INTRODUÇÃO

No Brasil, o gênero *Pleroma* engloba 159 espécies das quais 156 são endêmicas, de porte arbustivo ou arbóreo, destacando-se pela produção de flores vistosas de pétalas lilases, roxas, róseas ou brancas reunidas numa inflorescência, cuja emissão ocorre geralmente no período da quaresma, motivo pelo qual são popularmente chamadas de quaresmeiras (GUIMARÃES, 2023). *Pleroma granulosum* (Desr.) D. Don (sin.: *Tibouchina granulosa*) e *Pleroma mutabile* (Vell.) Triana (sin.: *Tibouchina mutabilis*) ocorrem naturalmente no bioma Mata Atlântica e, além da importância ecológica, destacam-se pelo potencial ornamental (LORENZI, 2008; LORENZI, 2015).

No geral, sementes de *Pleroma* spp. são diminutas, fato que dificulta a coleta e manuseio, além de existir grande número de sementes abortadas, conferindo baixa taxa de germinabilidade e, consequentemente, inviabilizando a produção escalonada de mudas via sexuada a partir dos métodos convencionais (BORTOLINI et al., 2008; CÉZAR et al., 2009; CARVALHO, 2010; NIENOW et al., 2010; NICKNICH et al., 2013; PEREIRA et al., 2015; DUARTE et al., 2019; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2020; LATOH et al., 2022). Mediante o exposto, *Pleroma* spp. são comumente propagadas assexuadamente, via técnica de estaquia ou alporquia (CÉZAR et al., 2009; RIBEIRO et al., 2007; NIENOW et al., 2010; NICKNICH et al., 2013; LORENZI, 2015; FRAGOSO et al., 2017; LATOH et al., 2022). Entretanto, a produção de mudas via estaquia ou alporquia apresentam algumas limitações como, por exemplo, a impossibilidade de produção de mudas em escala comercial, a sazonalidade de produção de mudas, a necessidade do uso de fitorreguladores em determinadas situações e a dificuldade na manutenção da qualidade fitossanitária e da variabilidade genética das mudas (DIAS et al., 2012; SILVA et al., 2019).

A propagação *in vitro* ou micropropagação surge como alternativa tanto para a multiplicação de genótipos de interesse quanto para a conservação de recursos genéticos pela germinação *in vitro* de sementes, independente da época do ano, além de garantir a produção de mudas com alta qualidade fitossanitária e em larga escala (ANSILIERO et al., 2020; SILVA et al., 2021; HASNAIN et al., 2022). Contudo, a técnica também apresenta alguns entraves, dentre eles, o surgimento de desordens morfofisiológicos, ou seja, formação de plântulas de morfologia, anatomia e fisiologia anormais e altas taxas de mortalidade das mudas durante a etapa de aclimatização (HAZARIKA, 2006; AL-KHAYRI e NAIK, 2017; SOUZA et al., 2023). Diferentes estratégias estão sendo investigadas para eliminar ou amenizar esses problemas, como controle e ajuste de variáveis que incluem a umidade relativa no interior dos frascos de cultivo; trocas com o ambiente de vapor d'água e gases, como etileno; espectro luminoso; concentração e tipo do agente gelificante; concentração e tipo de fitorreguladores (VASCONCELOS et al., 2012; AL-KHAYRI e NAIK, 2017; POLIVANOVA e BEDAREV, 2022).

Frente à dificuldade de obtenção de mudas de *P. granulosum* (nome popular quaresmeira) e *P. mutabile* (nome popular manacá da serra) a partir de sementes por métodos convencionais. Visto que a propagação de *Pleroma* spp. têm se limitado à propagação vegetativa tradicional (BORTOLINI et al., 2008; CÉZAR et al., 2009; NIENOW et al., 2010; PEREIRA et al., 2015; LATOH et al., 2018; LATOH et al., 2019; LATOH et al., 2022). A propagação *in vitro* dessas espécies torna-se uma alternativa interessante, além de possibilitar futuras aplicações biotecnológicas como, por exemplo, a multiplicação *in vitro*, o melhoramento vegetal e a conservação *in vitro* dessas espécies.

O objetivo deste trabalho foi investigar o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *P. granulosum* e *P. mutabile* e posterior aclimatização das mudas.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes (LabEPS) do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante a etapa de desenvolvimento das plântulas *in vitro*, os frascos do experimento com *Pleroma granulosum* foram mantidos em sala de crescimento vegetal do Departamento de Silvicultura, Instituto de Floresta da UFRRJ.

O experimento de aclimatização com *Pleroma granulosum* foi conduzido no município de Mendes/RJ (22°31'36" S; 43°43'58" W). Durante o período de aclimatização registrou-se a temperatura e a umidade relativa do ar local com auxílio de termo-higrômetro digital (Import HTC-1) e a intensidade luminosa local com auxílio de luxímetro digital (Instrutherm LD-400).

5.4.2 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma mutabile*

Aos 21 dias após a semeadura (DAS), plântulas de *P. mutabile* provenientes da semeadura *in vitro* foram transferidas para os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Phygenera[®]) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) com vitaminas - Woody Plant Basic Medium (Phygenera[®]), ambos com 50 e 100% da concentração original de sais. Todos os meios de cultura foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose (NEON[®] P.A. Laderquímica), 1 g L⁻¹ de carvão ativo em pó (NEON[®] P.A. Laderquímica) e 7,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (MicroMED ISO FAR). O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1,2 atm.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os tratamentos foram compostos por quatro meios de cultura: MS com 50% da concentração original de sais (MS50); MS com 100% da concentração original de sais (MS100); WPM com 100% da concentração original de sais (WPM100) e WPM com 50% da concentração original de sais (WPM50), com cinco repetições por tratamento. A unidade experimental foi constituída de frascos de vidro de 200 mL, contendo aproximadamente 20 mL do meio de cultivo e cinco plântulas por frasco, totalizando 25 plântulas para cada tratamento e 100 plântulas no experimento.

Os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC e mantidos em B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas (Figura 17).



Figura 17. Frascos em B.O.D. contendo plântulas de *Pleroma mutabile* na etapa de desenvolvimento *in vitro* (Seropédica/RJ, 2021).

Após 60 dias de cultivo *in vitro* as plântulas obtidas foram retiradas do meio de cultura e tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a completa eliminação do meio de cultura. Foi avaliada a massa fresca total (MFT), o número de folhas (NF), o comprimento da parte aérea (CPA), o número de raízes (NR), o comprimento da maior raiz (CMR) e o número de nós (NN). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, a 5% de probabilidade e quando significativo os dados foram transformados $[(x + 1)^{0,5}]$ antes de realização da análise de variância. Em seguida foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

Devido às condições debilitadas das plântulas, ao final das avaliações biométricas, não foi possível prosseguir para a etapa de aclimatização das mudas.

5.4.3 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma granulosum*

Plântulas de *P. granulosum* provenientes da sementeira *in vitro* foram transferidas para o meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (Phygenera®) (MS) com 50 e 100% da concentração original de sais. Os meios de cultura foram suplementados com 1 g L⁻¹ de carvão ativo em pó (NEON® P.A. Laderquímica) e 8 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (MicroMED ISO FAR). O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1,2 atm.

Os tratamentos foram constituídos por duas concentrações do meio de cultura MS (100% ou 50% da concentração original de sais) combinados com 30 g L⁻¹ ou 0 g L⁻¹ de sacarose (NEON® P.A. Laderquímica). Os frascos contendo meio de cultura MS que foram combinados com 30 g L⁻¹ de sacarose foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (sistema autotrófico). Enquanto que os frascos contendo meio de cultura MS que foram combinados com 0 g L⁻¹ de sacarose continham uma perfuração de diâmetro de 1.0 cm na tampa e foram cobertos com curativo adesivo (Band-Aid – Johnson & Johnson® – 2.2 x 2.2 cm) como adaptação às membranas desenvolvidas por SALDANHA et al. (2012) (sistema fotoautotrófico).

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 2 sendo dois meios de cultura (MS100 e MS50) combinados com dois sistemas de cultivo *in vitro* (autotrófico e fotoautotrófico). Cada tratamento teve cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais. A unidade experimental foi constituída de frascos de vidro de 200 mL, contendo aproximadamente 20 mL do meio de cultivo e duas plântulas por frasco.

Os mesmos foram mantidos em sala de crescimento vegetal do Departamento de Silvicultura, Instituto de Floresta da UFRRJ, sob temperatura de aproximadamente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, irradiância de aproximadamente $35\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas LED tubular brancas – potência 18W-6500K (ASUS® Modelo T8W18W) e fotoperíodo de 16 horas (Figura 18).

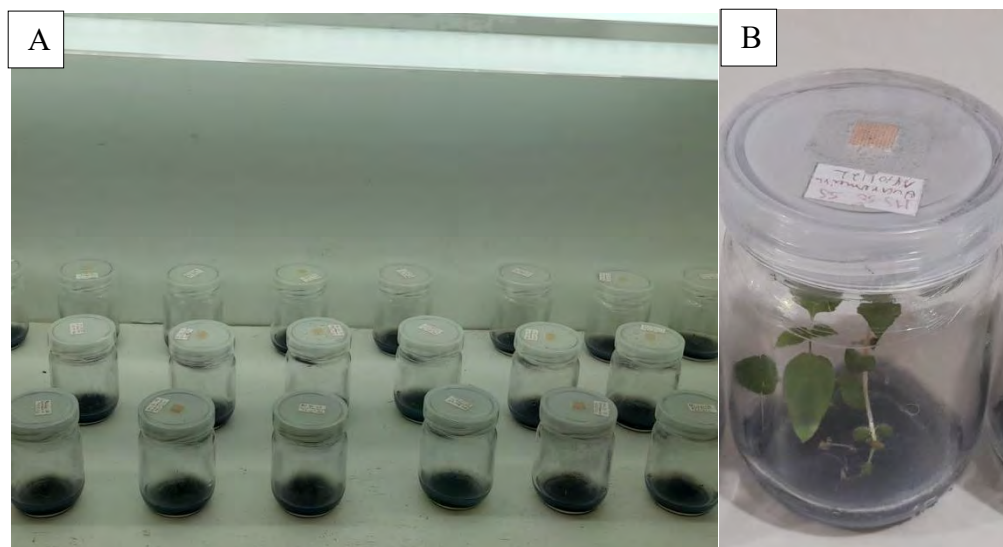


Figura 18. Frascos em sala de crescimento vegetal contendo plântulas de *Pleroma granulatum* na etapa de desenvolvimento *in vitro* (A); em destaque frasco com perfuração de 1.0 cm de diâmetro na tampa coberto com curativo adesivo Band-Aid® (B) (Seropédica/RJ, 2022).

Após 60 dias de cultivo *in vitro* as plântulas obtidas foram retiradas do meio de cultura e tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a completa eliminação do meio de cultura. Foi avaliada a massa fresca total (MF), o número de folhas (NF), o número de raízes (NR), o número de nós (NN), o comprimento da parte aérea (CPA), o comprimento da maior folha (CMF), a largura da maior folha (LMF) e o comprimento da maior raiz (CMR). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade e quando significativo os dados foram transformados $[(x + 1)^{0.5}]$ antes de realização da análise de variância. Em seguida foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

Um total de 21 plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas ao acaso para vasos de polietileno (nº6 – 80 mL) preenchidos com substrato comercial Mutiplant®, cada unidade experimental (vaso) foi composta por uma planta. Os vasos foram levados para aclimatização em casa de vegetação, cuja cobertura era composta por telhas de polipropileno translúcidas. O substrato das mudas foi molhado manualmente, em dias alternados, com auxílio de proveta graduada, de modo a fornecer o mesmo volume de água por vaso. O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Não foi realizada análise estatística devido à morte de 100% das mudas ao final do período de aclimatização.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma mutabile*

O teste de normalidade foi significativo para a variável NR, de modo que a mesma foi transformada antes da realização da análise de variância. A análise de variância mostrou resultado significativo para as variáveis MF, NF e NN. O teste de comparação de médias indicou que a massa fresca total das plântulas do tratamento MS50 foi estatisticamente superior aos demais tratamentos, enquanto que a menor massa fresca total encontrada foi daquelas cultivadas sobre meio WPM50. A massa fresca total das plântulas cultivadas nos tratamentos MS100 e WPM100 não diferiram estatisticamente daquelas cultivadas em meio MS50 e WPM50. Quanto às variáveis NF e NN o tratamento MS50 mostrou-se superior ao tratamento MS100. Os tratamentos WPM100 e WPM50 não diferiram estatisticamente dos tratamentos MS50 e MS100 (Tabela 11).

Tabela 11. Médias de massa fresca total (MF), número de folhas (NF), número de raiz (NR), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento da maior folha (CMF) e comprimento da maior raiz (CMR) de *Pleroma mutabile* após 60 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes meios de cultura (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	MF	NF	NR	NN	CPA	CMF	CMR
	g						
MS100	0.30 ab	7.16 b	3.45 ns	2.40 b	1.95 ns	0.54 ns	4.51 ns
MS50	0.57 a	10.96 a	5.17 ns	3.68 a	3.13 ns	0.67 ns	5.63 ns
WPM100	0.33 ab	8.40 ab	3.46 ns	3.09 ab	2.15 ns	0.45 ns	3.89 ns
WPM50	0.24 b	8.68 ab	4.16 ns	3.39 ab	2.74 ns	0.44 ns	2.95 ns
Média Geral	0.36	8.80	4.06	3.14	2.49	0.53	4.24
CV(%)	41.28	18.73	29.84	22.10	26.95	27.60	41.85

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns – não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$). MS100, meio de cultura MS com 100% da concentração de sais; MS50, meio MS com 50% da concentração de sais; WPM100, meio de cultura WPM com 100% da concentração de sais e WPM50, meio de cultura WPM com 50% da concentração de sais.

Durante a etapa de desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *P. mutabile* observou-se o surgimento de “estruturas brancas” no limbo foliar de todas as plântulas, além do nanismo das mesmas. Essas estruturas surgiram aproximadamente no 30º dia de cultivo das plântulas *in vitro*, estando presentes tanto na face adaxial quanto na abaxial e principalmente nas margens das folhas. (Figura 19).



Figura 19. Frasco com plântulas de *Pleroma mutabile* e imagens do limbo foliar através de microscopia eletrônica (Seropédica/RJ, 2022). Barras: 1.0 cm.

Foi realizado o corte histológico das estruturas brancas (Figura 20 - A) e, com auxílio de microscópio, foi averiguado que essas são proliferações celulares da planta. As células presentes nessas estruturas são ricas de uma substância aparentemente oleaginosa (Figura 20 - B). Verificou-se também a presença de tricomas (Figura 20 - C).



Figura 20. Corte histológico da estrutura branca presente no limbo das folhas de *P. mutabilis* cultivadas *in vitro* (A); Células presentes nessas estruturas apresentando gotículas oleaginosas (B); Presença de tricoma (C) (Imagens: Luiz Ricardo Tozin – Seropédica/RJ, 2022).

Na Figura 21 é possível observar a presença das pretuberâncias brancas e o aspecto de nanismo nas plântulas de *P. mutabile* independentemente do meio de cultura testado.

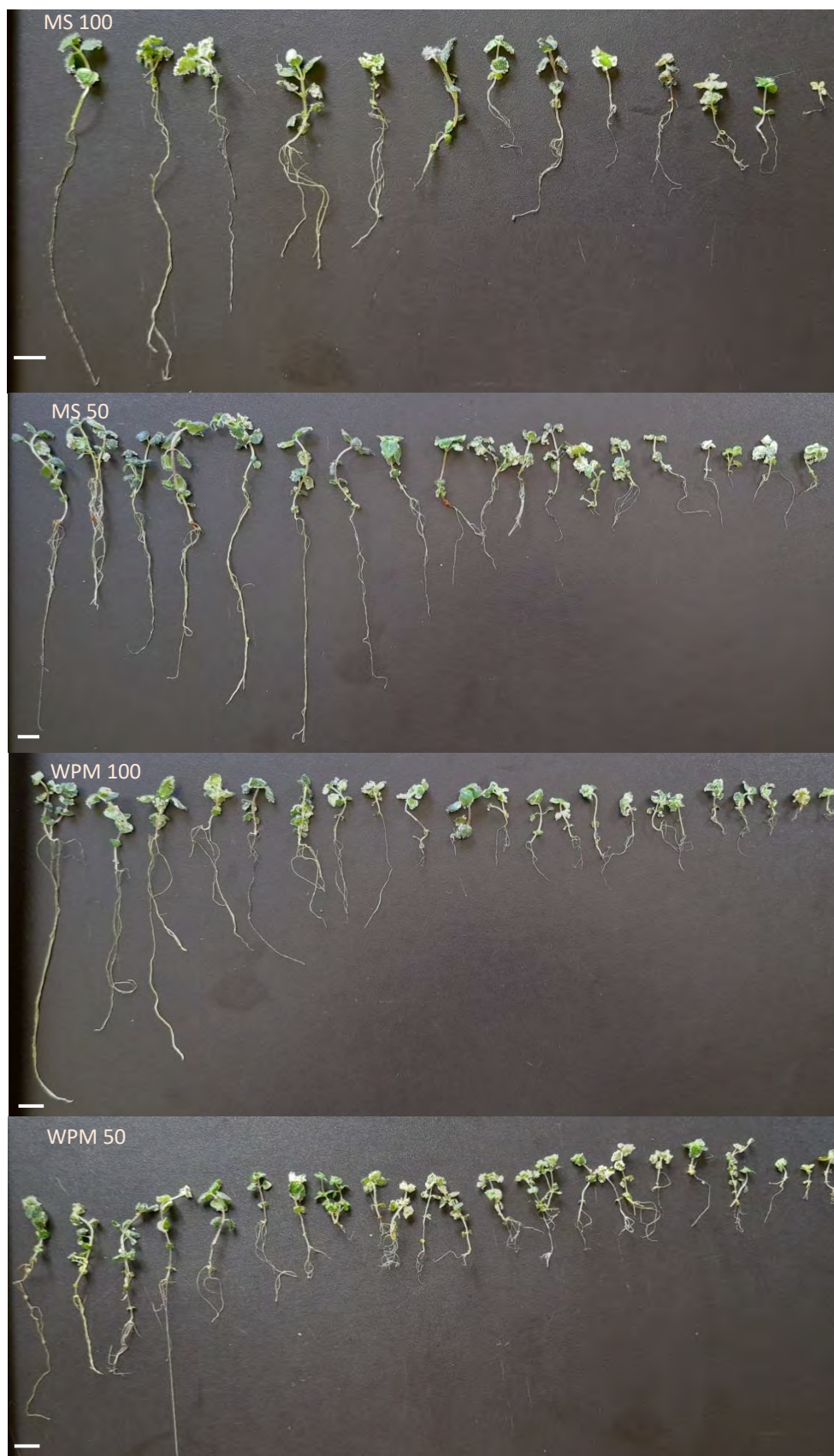


Figura 21. Plântulas de *Pleroma mutabile* obtidas após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais (MS 100); em meio MS com 50% da

concentração original de sais (MS 50); em meio de cultura WPM com 100% da concentração original de sais (WPM 100) e em meio de cultura WPM com 50% da concentração original de sais (WPM 50) Barras: 1.0 cm (Seropédica/RJ, 2022).

Dentre os meios de cultivo testado, o meio MS com metade da concentração original de sais, mostrou-se o mais adequado para o desenvolvimento das plântulas de *P. mutabile*, entretanto, fazem-se necessários ajustes nas condições de cultivo a fim de promover com sucesso a produção de mudas dessa espécie *in vitro*.

5.5.2 Desenvolvimento *in vitro* de *Pleroma granulosum*

Durante o cultivo *in vitro*, verificou-se a contaminação de um frasco do tratamento T2 (MS50CS), porém, este não foi descartado.

O teste de normalidade foi significativo para as variáveis percentual de sobrevivência e número de nós. Constatou-se efeito significativo do meio de cultura sobre as variáveis PS, NF, NR, NN, CPA e CMR e efeito significativo do sistema de cultivo para as variáveis PS, MF, e CMR. Foi observada interação significativa (meio de cultura \times sistema de cultivo) para a variável LMF. Não houve diferença significativa para a variável CMF (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo da análise de variância para percentual de sobrevivência (PS), massa fresca total (MF), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento da maior folha (CMF), largura da maior folha (LMF) e comprimento da maior raiz (CMR) de mudas de *Pleroma granulosum* após 60 dias de cultivo em diferentes meios de cultura e sistemas de cultivo *in vitro* (Seropédica/RJ, 2022).

Fonte de Variação (FV)	PS %	MF g	NF	NR un	NN	CPA	CMF cm	LMF	CMR
Meio de Cultura	80.0000*	0.0001ns	46.5125*	38.3645*	7.8125*	7.6261*	0.4805ns	0.2101ns	26.7961*
Sistema de Cultivo	45.0000*	0.0294*	7.8125ns	7.5645ns	2.1125ns	4.0051ns	0.0845ns	0.0101ns	33.6701*
Interação	20.0000ns	0.0068ns	2.8125ns	0.5445ns	0.3125ns	4.8511ns	1.7405ns	0.5611*	11.0261ns
Média Geral	75.0000	0.1172	6.1250	5.1650	2.6750	2.9175	1.3750	0.8525	4.8775
CV (%)	6.91	3.16	20.19	20.24	15.65	17.84	15.32	10.39	21.15

CV: coeficiente de variação.

O resultado de teste de comparação de médias para o fator meio de cultura indicou as maiores médias para o tratamento MS50 em relação às variáveis PS, NF, NR, NN, CPA e CMR (Tabela 13). O fator sistema de cultivo *in vitro* apresentou as maiores médias para as variáveis PS, MF e CMR para o sistema autotrófico (Tabela 14). Enquanto que a variável largura da maior folha apresentou a maior média para plântulas cultivadas em meio MS50 e sistema fotoautotrófico (Figura 15).

Tabela 13. Teste de comparação de médias para percentual de sobrevivência (PS), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento da maior raiz (CMR) em função do meio de cultura após 60 dias de cultivo *in vitro* de plântulas de *Pleroma granulorum* (Seropédica/RJ, 2022).

Meio de Cultura	Média das variáveis					
	PS	NF	NR	NN	CPA	CMR
	%	un			cm	
MS100	55.00 b	4.60 b	3.78 b	2.05 b	2.30 b	3.72 b
MS50	95.00 a	7.65 a	6.55 a	3.30 a	3.54 a	6.04 a
Média Geral	75.00	6.13	5.17	2.68	2.92	4.88

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 14. Teste de comparação de médias para percentual de sobrevivência (PS), massa fresca total (MF) e comprimento da maior raiz (CMR) em função do sistema de cultivo após 60 dias de cultivo *in vitro* de plântulas de *Pleroma granulorum* (Seropédica/RJ, 2022).

Sistema de Cultivo	Média das variáveis		
	PS	MF	CMR
	%	g	cm
Autotrófico	90.00 a	0.16 a	6.18 a
Fotoautotrófico	60.00 b	0.08 b	3.58 b
Média Geral	75.00	0.12	4.88

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 15. Teste de comparação de médias para largura da maior folha (LMF) da interação (meio de cultura x sistema de cultivo) para largura da maior folha (LMF) após 60 dias de cultivo *in vitro* de plântulas de *Pleroma granulorum* (Seropédica/RJ, 2022).

Largura da maior folha (cm)			
Meio de Cultura	Sistema de Cultivo		Média Geral
	Autotrófico	Fotoautotrófico	
MS100	0.94 aA	0.56 bA	0.75
MS50	0.81 aA	1.10 aA	0.96
Média Geral	0.88	0.83	0.85

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No tratamento composto de meio MS com 100% da concentração original de sais e 0 g L⁻¹ de sacarose (T3) apenas três plântulas se desenvolveram, as demais apresentaram aspecto “albinas”. O aspecto das plântulas de *P. granulosum* após 60 dias de cultivo podem ser observados na Figura 22.

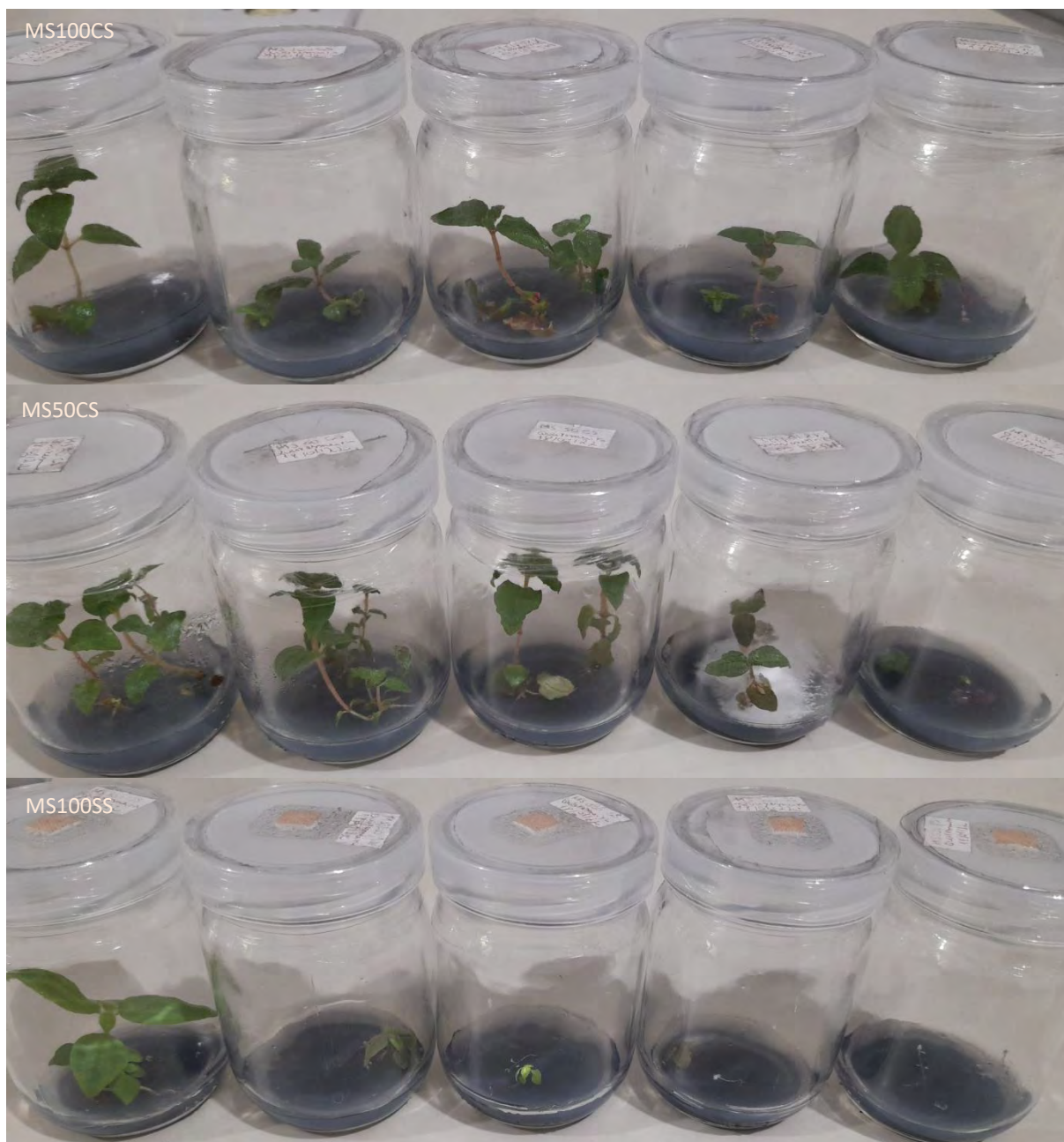




Figura 22. Plântulas de *P. granulosum* obtidas após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 100% da concentração original de sais e 30 g L⁻¹ de sacarose (MS100CS); meio MS com 50% da concentração original de sais e 30 g L⁻¹ de sacarose (MS50CS); meio MS com 100% da concentração original de sais e 0 g L⁻¹ de sacarose (MS100SS); e meio MS com 50% da concentração original de sais e 0 g L⁻¹ de sacarose (MS50SS) (Seropédica/RJ, 2022).

Assim como *P. mutabile*, verificou-se a presença de protuberâncias brancas nas folhas de *P. granulosum*, porém a anomalia mostrou-se menos acentuada (Figura 23 - A). Após 24 horas de transferência das plântulas das condições *in vitro* para condições *ex vitro*, verificou-se que no local da anomalia ocorria necrose foliar e, posteriormente, a senescência da folha (Figura 23 - B).

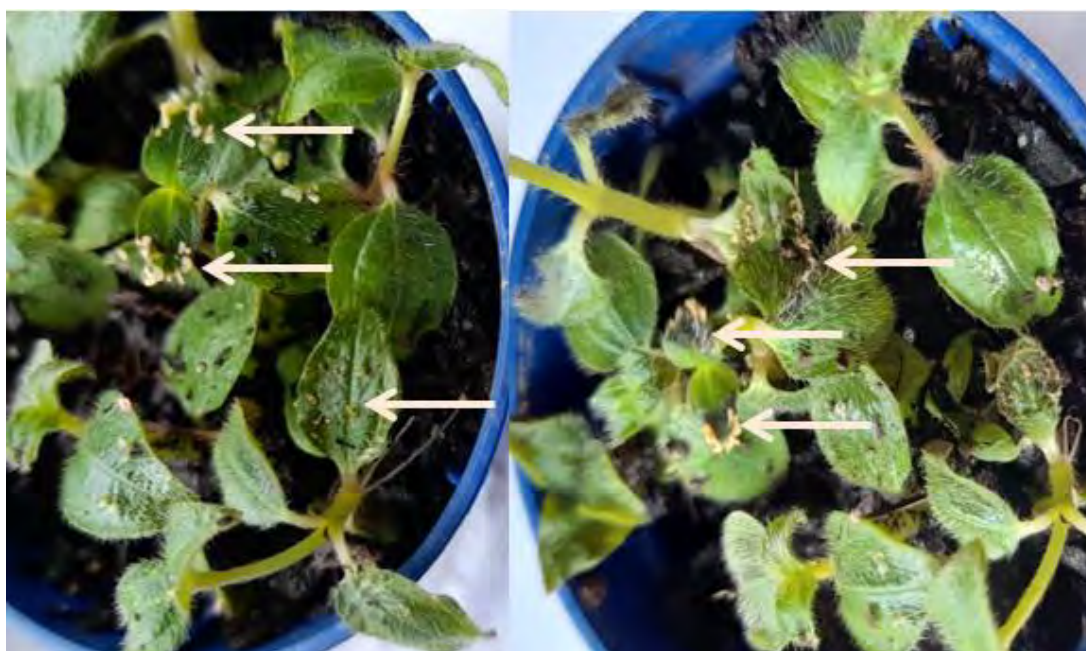


Figura 23. Protuberâncias em folhas de *P. granulosum* cultivadas *in vitro*. Momento de transferência das condições *in vitro* para condições *ex vitro* em substrato comercial (A); Detalhe do limbo foliar com necrose após 24 horas de transferência das plântulas das condições *in vitro* para condições *ex vitro* (B).

A presença das protuberâncias brancas no limbo foliar prejudicou o desenvolvimento das plântulas *in vitro*, sobretudo na etapa de aclimatização das mudas. Após 15 dias de

aclimatização observou-se a morte de aproximadamente 50% das mudas e ao final dos 30 dias de aclimatização observou-se 100% de morte das mesmas (Figura 24).

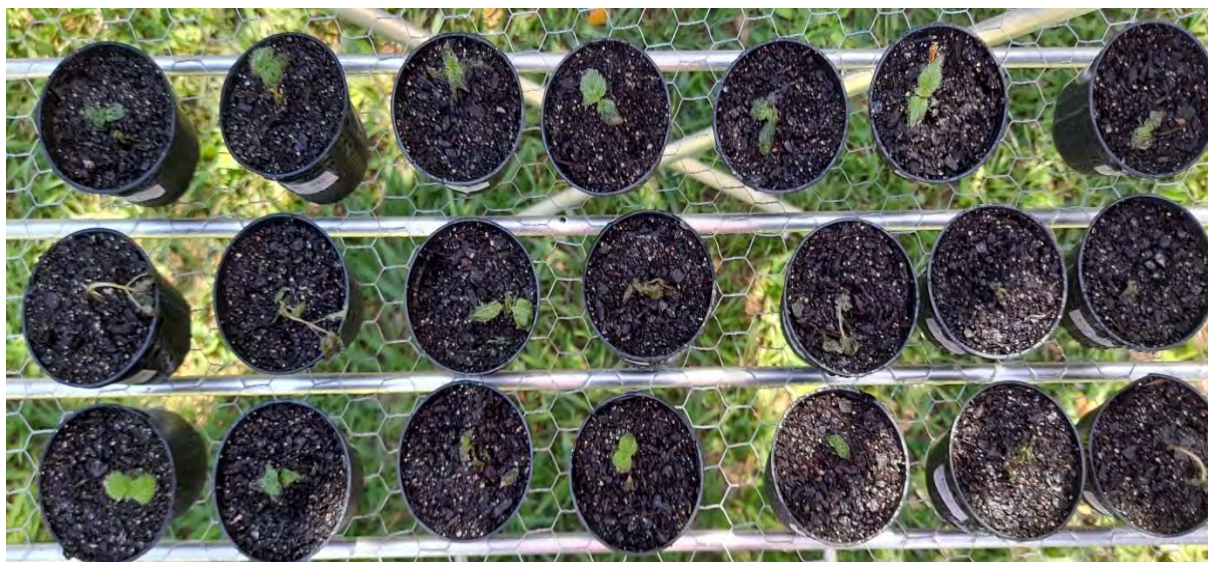


Figura 24. Plântulas de *Pleroma granulatum* oriundas de cultivo *in vitro* no 15º dia de aclimatização (Mendes/RJ, 2022).

A heterogeneidade de respostas vegetais durante o cultivo *in vitro* é promovida não só por fatores genéticos, mas também por modificações das condições de cultivo *in vitro* (FOGAÇA et al., 2007). Plantas cultivadas *in vitro* estão sob contínua condição de estresse (VASCONCELOS et al., 2012; GAO et al., 2018).

A presença de moléculas de lipídios observadas nas células de *P. mutabile* possivelmente é uma resposta ao estresse do cultivo *in vitro*. Metabólitos secundários, como óleos essenciais, são produzidos com objetivo de proteção a estresses abióticos e bióticos, conferindo vantagens adaptativas aos vegetais. Sob condições de estresse esses metabólitos combatem radicais livres (MIRANDA et al., 2016; BORGES e AMORIM, 2020).

De acordo com Taiz et al. (2017), tricomas glandulares armazenam metabólitos secundários específicos, como fenóis e terpenos, em uma bolsa formada entre a parede celular e a cutícula. Relatos da composição química de tecidos de *Pleroma* spp. são escassos na literatura e, apesar dos poucos estudos, há relato da presença de óleos essenciais, taninos, terpenoides, flavonoides, fenólicos solúveis e antocianina (MACIEL, 2021).

Conforme Guimarães et al. (1999), a presença de tricomas em folhas é comum na família Melastomataceae, sobretudo no gênero *Tibouchina* (sin. *Pleroma*). Estes apresentam uma grande importância ecológica para essas espécies, embora estas relações sejam pouco conhecidas, supõe-se que estes constituem um fator de proteção contra a intensa radiação solar, proteção ao ataque de insetos e microorganismos, dentre outros fatores (TAIZ et al., 2017). As funções e valor adaptativo dos tricomas em vegetais incluem também o controle fisiológico, como troca de materiais e regulação metabólica (JOHNSON, 1975).

P. granulatum apresenta tricomas dendríticos na face abaxial do limbo foliar e *P. mutabile* apresenta tricomas tipo estrigosos situados nas margens do limbo foliar (GUIMARÃES, 2023). Suspeita-se que as estruturas brancas presentes no limbo foliar das plântulas de *P. granulatum* e *P. mutabile* resultam de alterações nas células desses tricomas, porventura das condições de cultivo *in vitro*.

Distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são desencadeados por fatores físicos relacionados ao ambiente dos recipientes de cultivo e da consistência e composição

química do meio de cultura (VASCONCELOS et al., 2012). O crescimento sob condições de estresse leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro das células vegetais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (OH^\cdot) e superóxido (O_2^\cdot), que atuam nos lipídios da membrana, nos ácidos nucleicos, nas enzimas e em outras estruturas celulares (VASCONCELOS et al., 2012; WEREMCZUK-JEŻYNA et al., 2021; POLIVANOVA e BEDAREV, 2022).

A hiper-hidricidade é um problema encontrado com frequência na micropropagação das espécies e caracteriza-se por distúrbios anatômicos, morfológicos, fisiológicos e metabólicos (VASCONCELOS et al., 2012; POLIVANOVA e BEDAREV, 2022), sendo comum a hidratação excessiva, baixa lignificação, reduzida resistência mecânica dos tecidos vegetais, função estomática prejudicada, baixo teor de clorofila e massa seca e, consequentemente, redução da capacidade de sobrevivência das plantas na aclimatização (BARBOSA et al., 2013; MACHADO et al., 2013), há também deformação significativa dos tricomas epidérmicos e glandulares (POLIVANOVA e BEDAREV, 2022).

Barbosa et al. (2013) constataram mudanças morfológicas e bioquímicas em plantas hiper-hídricas de morango cultivadas *in vitro*. Estas apresentaram estômatos anormais caracterizados por células-guarda hipertrofiadas e deformadas e menor deposição de cera epicuticular em plantas hiper-hídricas do que nas plantas normais. De acordo com Polivanova e Bedarev (2022) os principais fatores que influenciam o nível de hiper-hidricidade das plantas *in vitro* são a composição mineral e hormonal do meio de cultivo e as condições de cultivo, em particular aeração dos recipientes e a iluminação.

A utilização de sistemas fotoautotrófico e fotomixotrófico podem melhorar a qualidade morfofisiológica de plantas cultivadas *in vitro* (SALDANHA et al., 2012; SOARES et al., 2023; SOUZA et al., 2023). A maior troca gasosa, concomitantemente, com a eliminação total ou parcial de sacarose do meio de cultura e o aumento da intensidade luminosa, pode estimular a capacidade fotossintética das plântulas *in vitro*, favorecendo a produção de plantas morfofisiologicamente mais adaptadas ao processo de aclimatização (GRIS et al., 2021), além da redução da perda de planta por contaminação biológica e distúrbios genéticos (JEONG et al., 1993). A alta concentração de etileno no interior do recipiente de cultivo pode afetar a diferenciação, o desenvolvimento, a morfologia e o crescimento das plantas (ERIG e SCHUCH, 2005).

A qualidade e quantidade da luz também exercem efeito direto nas respostas morfofisiológicas do vegetal, sobretudo a qualidade espectral na anatomia das folhas (FERRARI et al., 2016). As plantas podem utilizar determinada faixa do espectro eletromagnético como sinais que desencadeiam em diferentes processos morfofisiológicos. A luz tem influência chave na atividade de genes e enzimas e no crescimento das mesmas (MILER et al., 2019). O uso de luzes díodos emissores (LEDs) em vez de lâmpadas fluorescentes brancas surge como inovação na cultura de tecidos vegetais e tem mostrado melhorias no desenvolvimento e na qualidade das mudas (CHAVES et al., 2020; WEREMCZUK-JEŻYNA et al., 2021).

Os vários tipos de respostas morfofisiológicas *in vitro* apresentadas por diferentes espécies fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições específicas para um eficiente processo de estabelecimento *in vitro* da cultura (RADMANN et al., 2009). Até o momento, não há consenso sobre as causas da hiper-hidricidade e as medidas para eliminá-la são específicas da espécie (POLIVANOVA e BEDAREV, 2022).

Não foram encontrados dados sobre o efeito da troca gasosa, qualidade ou quantidade luminosa sobre respostas morfofisiológicas no cultivo *in vitro* de mudas de Melastomataceae, sobretudo de *Pleroma* spp. Há uma lacuna de investigações científicas que possam corroborar para o desenvolvimento de potencialidades do cultivo *in vitro* dessas espécies e,

consequentemente, melhorar os aspectos agronômicos e tecnológicos garantindo o sucesso do cultivo *in vitro* dessas espécies.

Os resultados ora encontrados sugerem que o meio MS com metade da concentração original de sais é o mais adequado para o desenvolvimento das plântulas de *P. mutabile* e *P. granulosum in vitro*. Entretanto, fazem-se necessários outros estudos a fim de esclarecer o motivo do surgimento das pretuberâncias brancas no limbo foliar dessas espécies de modo a garantir a produção de mudas de qualidade morfofisiológica e capazes de se adaptar as condições de aclimatização de mudas. Haja vista a complexa influência e efeitos do ambiente *in vitro* sobre as respostas morfofisiológicas apresentadas por *P. granulosum* e *P. mutabili*, experimentos envolvendo variações das condições de cultivo como, por exemplo, qualidade e quantidade de luz, trocas gasosas, diferentes meios de cultivo, dentre outros fatores, são relevantes e precisam ser explorados a fim de potencializar o sucesso do cultivo *in vitro* dessas espécies.

5.6 CONCLUSÃO

O meio MS com metade da concentração original de sais demonstrou-se o mais adequado para o desenvolvimento das plântulas de *P. mutabile* e *P. granulosum in vitro* quando comparado ao meio MS com a concentração original de sais.

No caso de *P. granulosum* plântulas cultivadas sob sistema autotrófico apresentaram médias superiores para o percentual de sobrevivência de mudas, massa fresca total e comprimento da maior raiz. O sistema fotoautotrófico beneficiou no comprimento de folha em plântulas de *P. granulosum* cultivadas em meio MS com metade da concentração original de sais.

A elucidação da anomalia fisiológica que surgem nas folhas de plântulas de *P. mutabile* e *P. granulosum* cultivadas *in vitro* torna-se um passo fundamental para o sucesso do desenvolvimento *in vitro* de mudas de qualidade morfofisiológicas e que superem a etapa de aclimatização.

Os resultados experimentais aqui observados, embora incipientes, podem contribuir para o avanço da propagação *in vitro* de espécies de *Pleroma spp.*

5.7 REFERÊNCIAS

- AL-KHAYRI, J. M.; NAIK, P. M. Date palm micropropagation: Advances and applications. **Ciência e Agrotecnologia**, v.41, n.4, p.347-358, 2017. DOI: [10.1590/1413-70542017414000217](https://doi.org/10.1590/1413-70542017414000217)
- ANSILIERO, R.; CANDIAGO, N. T.; MINOTTO, E. ALMEIDA, C. A.; BARATTO, C. M. Avaliação do potencial de desenvolvimento *in vitro* de sementes de *Calendula officinalis* em meio de cultura MS. **Evidência**, v. 20, n. 2, p. 103-110, 2020. DOI: [10.18593/eba.25134](https://doi.org/10.18593/eba.25134)
- BARBOSA, L. M. P.; PAIVA NETO, V. B.; DIAS, L. L. C.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; ALEXANDRE, R. S.; LAREMA, L.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Biochemical and morpho-anatomical analyses of strawberry vitroplants hyperhydric tissues affected by BA and gelling agentes. **Revista Ceres**, v.60, n.2, p.152-160, 2013. DOI: [10.1590/S0034-737X2013000200002](https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200002)
- BORGES, L. P.; Amorim, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- BORTOLINI, M. F.; MAYER, J. L. S.; ZUFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S.; CARPANEZZI, A. A. Enraizamento de estacas caulinares de quatro espécies do gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae Juss.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.14, n.2, p.187-192, 2008. DOI: [10.14295/rbho.v14i2.289](https://doi.org/10.14295/rbho.v14i2.289)
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**, v.4. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas. 2010. 644p.
- CÉZAR, T. M.; SOUZA, F. C.; MACIEL, R. T.; DEMBISKI, W.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Estaquia e alporquia de *Tibouchina fothergillae* (D.C.) Cogn. (Melastomataceae) com a aplicação de ácido naftaleno acético. **Scientia Agraria**, v.10, n.6, p.463-468, 2009. DOI: [10.5380/rsa.v10i6.15719](https://doi.org/10.5380/rsa.v10i6.15719)
- CHAVES, M. C.; FREITAS, J. C. E.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; PRUDENTE, D. O.; COSTA, B. G. P.; DAUBERMANN, A. G.; BERNARDES, M. M.; GRAZUL, R. M. Influence of colorful light-emitting diodes on growth, biochemistry, and production of volatile organic compounds *in vitro* of *Lippia filifolia* (Verbenaceae). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 212, 2020. DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2020.112040](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112040)
- DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012. DOI: [10.4336/2012.pfb.32.72.453](https://doi.org/10.4336/2012.pfb.32.72.453)
- DUARTE, M. M., MARTIN, D. M., MORAES, R. F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Efeito de *Azospirillum brasilense* e ácido indolbutírico no enraizamento de miniestacas de *Tibouchina fothergillae*. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.5, n.3, p.289-295, 2019. DOI: [10.21674/2448-0479.53.289-295](https://doi.org/10.21674/2448-0479.53.289-295)

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

FERRARI, M. P. S.; ANTONIAZZI, D.; NASCIMENTO, A. B.; FRANZ, L. F.; BEZERRA, C. S.; MAGALHÃES, H. M. Espectros luminosos no desenvolvimento de plântulas de *Curcuma longa* cultivadas *in vitro*. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.19, n.4, p. 247-251, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: [10.1590/S1413-70542011000600001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001)

FOGAÇA, L. A.; DORTZBACH, D.; ALVES, A. C.; PEDROTTI, E. L. Características morfofisiológicas de brotos micropropagados de *Agapantho* sob diferentes intensidades luminosas e concentrações de sacarose. **Scientia agraria**, v.8, n.4, p.371-378, 2007.

FRAGOSO, R. O.; STUEPP, C. A.; SÁ, F. P.; KRATZ, D.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Vegetative rescue and *ex vitro* system production of *Tibouchina sellowiana* clonal plants by cutting and mini-cutting. **Ciência Rural**, v.47, n.11, 2017. DOI: [10.1590/0103-8478cr20160098](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160098)

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L., MANCIPE-MURILLO, C., CALDERÓN-HERNÁNDEZ, M. Evaluación de dos métodos de propagación para la conservación *ex situ* de tres Melastomataceas altoandinas. **Caldasia**, v.42, n.1, p.129–141, 2020. DOI: [10.15446/caldasia.v42n1.75373](https://doi.org/10.15446/caldasia.v42n1.75373)

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, p.109-112, 2014. DOI: [10.1590/S1413-70542014000200001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001)

GAO, H.; LI, J.; JI, H.; AN, L.; XIA, X. Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium* spp.). **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.133, p.65-76, 2018. DOI: [10.1007/s11240-017-1361-x](https://doi.org/10.1007/s11240-017-1361-x)

GRIS, T.; PINHEIRO, M. V. M.; THIESEN, L. A.; WEBLER, A. R.; JUNGES, D. L.; HOLZ, E.; NAIBO, I.; BATISTA, D. S.; OTONI, W. C.; SCHMIDT, D. Light quality and sealing type affect *in vitro* growth and development of *Capsicum frutescens* cultivars. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.93, n.3, 2021. DOI: [10.1590/0001-3765202120190061](https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190061)

GUIMARÃES, P. J. F. *Pleroma in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023.

GUIMARÃES, P. J. F.; RANGA, N. T.; MARTINS, A. B. Morfologia dos tricomas em *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D. Don) cogn. (Melastomataceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, n.4, 1999. DOI: [10.1590/S1516-89131999000400015](https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000400015)

HASNAIN, A.; NAQVI, S. A. H.; AYESHA S. I.; KHALID, F.; ELLAHI, M.; IQBAL, S.; HASSAN, M. Z.; ABBAS, A.; ADAMSKI, R.; MARKOWSKA, D.; BAAZEEM, A.;

MUSTAFA, G.; MOUSTAFA, M.; HASAN, M. E.; ABDELHAMID, M. M. A. Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**. v.13:1009395, 2022. DOI: [10.3389/fpls.2022.1009395](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395)

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, n.2, p.105-120, 2006. DOI: [10.1016/j.scienta.2006.01.038](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038)

JEONG, B. K.; FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Carbon Dioxide Enrichment in Autotrophic Micropropagation: Methods and Advantages. **Hort&Technology**, v.3, n.3, p.332-334, 1993.

JOHNSON, H. B. Plant pubescence: An ecological perspective. **The Botanical Review**, v.41, n.3, p. 233-258, 1975. DOI: [10.1007/BF02860838](https://doi.org/10.1007/BF02860838)

LATOH, L. P.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa, produtividade de minicepas e determinações metabólicas de 4 espécies do gênero *Tibouchina*. **Ciência Florestal**, v.32, p.1640-1658, 2022. DOI: [10.5902/1980509836951](https://doi.org/10.5902/1980509836951)

LATOH, L. P.; DALLAGRANA, J. F.; PORTES, D. C.; MAGGIONI, R. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa via miniestaquia caulinar seriada e produtividade de minijardim de espécies de *Tibouchina* spp. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, p.343-357, 2018. DOI: [10.21674/2448-0479.43.343-357](https://doi.org/10.21674/2448-0479.43.343-357)

LATOH, L. P.; GOMES, E. M.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Can indolebutyric and fulvic acids induce adventitious rhizogenesis on mini-cuttings from Brazilian native tibouchinas? **Ornamental Horticulture**, v.25, p.42-48, 2019. DOI: [10.14295/oh.v25i1.1257](https://doi.org/10.14295/oh.v25i1.1257)

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 1. 5ª Edição Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 384p.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2015. 1120p.

MACHADO, M. P.; CIOTTA, M. N.; DESCHAMPS, C.; ZANETTE, F.; CÔCCO, L. C.; BIASI, L. A. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.43, n.2, p. 283-289, 2013. DOI: [10.1590/S0103-84782013000200015](https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000200015)

MACIEL, V. S. **Análise da composição do óleo essencial e da fração hexânica do extrato das folhas de *Tibouchina aspera* Aubl.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, 42p., 2021.

MILER, N.; KULUS, D.; WOŻNY, A.; RYMARZ, D.; HAJZER, M.; WIERZBOWSKI, K.; NELKE, R.; SZEFFS, L. Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost

reduction. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.55, 99-108, 2019. DOI: [10.1007/s11627-018-9939-5](https://doi.org/10.1007/s11627-018-9939-5)

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n.1, p. 213-220, 2016. DOI: [10.5935/1806-6690.20160025](https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160025)

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

NICKNICH, R.; WEISER, A. H.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de quaresmeira. **Scientia Agraria**, v.14, n.2, p.65-67, 2013. DOI: [10.5380/rsa.v14i2.40931](https://doi.org/10.5380/rsa.v14i2.40931)

NIENOW, A.A.; CHURA, G.; PETRY, C.; COSTA, C. Enraizamento de estacas de quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira Agrocência**, v.16, n.1-4, p.139-142, 2010.

PEREIRA, M. O.; GRABIAS, J.; ZUFFELATTO-RIBAS, K. C.; NAVROSKI, M. C. Enraizamento de estacas de *Tibouchina moricandiana* var. *vinacea* em função da forma de aplicação e concentrações de AIB. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, p.210-216, 2015. DOI: [10.5965/223811711432015210](https://doi.org/10.5965/223811711432015210)

POLIVANOVA, O. B.; BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, v.11, n.23, 2022. DOI: [10.3390/plants11233313](https://doi.org/10.3390/plants11233313)

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. ‘GXN-9’. **Scientia Agraria**, v.10, n.2, p. 95-101, 2009. DOI: [10.5380/rsa.v10i2.13573](https://doi.org/10.5380/rsa.v10i2.13573)

RIBEIRO, M. N. O.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, J. C. B.; PAIVA, R. Efeito do ácido indolbutírico sobre estacas apicais e medianas de quaresmeira (*Tibouchina cf. moricandiana*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n.1, p. 73-78, 2007. DOI: [10.14295/rbho.v13i1.206](https://doi.org/10.14295/rbho.v13i1.206)

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p.413–422, 2012. DOI: [10.1007/s11240-012-0162-5](https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5)

SILVA, K. B.; REINIGER, L. R. S.; RABAIOLLI, S. M. S.; ZIEGLER, A. C. F.; STEFANEL, C. M. Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de brotações de *Luehea divaricata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.41, e201901921, p.1-6, 2021.

SILVA, T. T. S.; SPADA, G.; FARIA, M. F.; GOULART, L. M. L.; FURTADO, E. L.; PASSOS, J. R. S.; GUERRINI, I. A. Fitossanidade e qualidade de mudas de *Eucalyptus*

urophylla x *Eucalyptus grandis* em função da aplicação de fosfito e silício. **Summa Phytopathologica**, v.45, p.332-336, 2019. DOI: [10.1590/0100-5405/184112](https://doi.org/10.1590/0100-5405/184112)

SOARES, J. S.; RAMOS, J. C. M.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M.; REIS, L. C. *Brassavola tuberculata* Hook.: *in vitro* growth and *ex vitro* establishment as a function of the micropropagation system and sucrose. **Brazilian Journal of Biology**, v.83, e270892, 2023. DOI: [10.1590/1519-6984.270892](https://doi.org/10.1590/1519-6984.270892)

SOUZA, L. M.; BARBOSA, M. R.; NASCIMENTO, K. R. P.; FONSECA, P. T.; HOULLOU, L. M. Cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico de plantas *in vitro*: uma revisão sistemática sobre o uso da técnica e suas implicações na produção de mudas de espécies arbóreas. **Multidisciplinary Sciences Reports**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 1–20, 2023. DOI: [10.54038/ms.v3i3.42](https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42)

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

VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012. DOI: [10.1590/S0103-84782012000500013](https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000500013)

WEREMCZUK-JEŻYNA, I.; KUŹMA, L.; GRZEGORCZYK-KAROLAK, I. The effect of different light treatments on morphogenesis, phenolic compound accumulation and antioxidant potential of *Dracocephalum forrestii* transformed shoots cultured *in vitro*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.224, 2021. DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2021.112329](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112329)

6 CAPÍTULO IV

CALOGÊNESE, RIZOGÊNESE E ORGANOGENESE INDIRETA EM EXPLANTE FOLIAR DE *Pleroma heteromallum* CULTIVADOS *IN VITRO* (MELASTOMATACEAE)

6.1 RESUMO

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don é uma planta endêmica do Brasil com potencial ornamental, medicinal e fitorremediador. A propagação via sexuada de *P. heteromallum* apresenta alguns entraves, sendo comumente propagada por estaquia caular. A micropropagação dessa espécie possibilitaria a produção massal de mudas com qualidade fitossanitária, em pequeno espaço e qualquer época do ano. Objetivou-se investigar o potencial da calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explantes foliares de *P. heteromallum* cultivados *in vitro*. Foram testadas, em cinco experimentos, combinações do meio MS suplementado com diferentes combinações de BAP (6-benzilaminopurina), AIB (ácido indol-3-butírico), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), PVP (polivinilpirrolidona) e carvão ativo. Os resultados demonstraram que tanto PVP quanto carvão ativo não inibiu o processo de oxidação dos explantes e interferiu negativamente na formação de calos. O meio MS isento de fitorreguladores não induziu calogênese, resultando na oxidação e morte dos explantes. No meio MS suplementado apenas com BAP o percentual de calos foi estatisticamente inferior aos tratamentos suplementados com BAP:AIB ou BAP:2,4-D. No 20º dia de cultivo ocorre o pico da calogênese e rizogênese e, a partir de então, a massa de calos começa a apresentar sinais de oxidação culminando na morte dos explantes. Um único explante crescendo em meio MS contendo BAP (4.4 µM) e AIB (4.9 µM) formou calos, raízes e brotos, indicando a possibilidade da mediação de processos de organogênese indireta a partir de explantes foliares de *P. heteromallum*.

Palavras-chave: Micropropagação. Meios de cultura. Orelha-de-onça.

6.2 ABSTRACT

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don is an endemic plant of Brazil with ornamental, medicinal and phytoremediation potential. Sexual propagation of *P. heteromallum* presents some obstacles, and is commonly propagated by stem cuttings. Micropropagation of this species would allow the mass production of seedlings with phytosanitary quality, in a small space and at any time of the year. The objective of this study was to investigate the potential of callogenesis, rhizogenesis and indirect organogenesis in leaf explants of *P. heteromallum* cultivated *in vitro*. Combinations of MS medium supplemented with different combinations of BAP (6-benzylaminopurine), IBA (indole-3-butyric acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), PVP (polyvinylpyrrolidone) and activated carbon were tested in five experiments. The results demonstrated that neither PVP nor activated carbon inhibited the oxidation process of the explants and negatively interfered in callus formation. The MS medium without plant growth regulators did not induce callus formation, resulting in oxidation and death of the explants. In the MS medium supplemented only with BAP, the percentage of callus was statistically lower than in the treatments supplemented with BAP:IBA or BAP:2,4-D. On the 20th day of culture, the peak of callus formation and rhizogenesis occurs, and from then on, the callus mass begins to show signs of oxidation, culminating in the death of the explants. A single explant growing in MS medium containing BAP (4.4 μM) and IBA (4.9 μM) formed callus, roots and shoots, indicating the possibility of mediation of indirect organogenesis processes from leaf explants of *P. heteromallum*.

Keywords: Micropropagation. Culture mediums. Jaguar ear.

6.3 INTRODUÇÃO

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don, nome popular orelha-de-onça, é endêmica do Brasil, estando presente nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste, abrangendo os biomas Cerrado e Mata Atlântica (GUIMARÃES, 2024). Naturalmente, ocorre isoladamente ou na forma de pequenas populações (CAMPOS et al., 2009). De porte arbustivo, apresenta flores roxas que se formam principalmente durante a primavera-verão, folhagem cordiforme com pilosidade branco-acinzentada, bastante vistosa, o que justifica o nome popular da espécie (LORENZI, 2015). Por se tratar de uma espécie pioneira com tolerância a solos com metais pesados, apresenta considerada importância ecológica, sobretudo na recuperação de áreas degradadas (CUEVAS-REYES et al., 2018). A espécie também apresenta propriedades medicinais (KUSTER et al., 2009) e potencial na ornamentação de parques e jardins, sendo indicada para uso individual e na composição de renques e cercas vivas (LORENZI, 2015; LATOH et al., 2019).

O uso de plantas ornamentais nativas no paisagismo tem sido crescente nos últimos anos, uma forte tendência da aplicação dessas plantas em parques e jardins tem sido uma forma de valorizar os recursos genéticos nativos (GRANEMANN et al., 2017; GOMES et al., 2020; CORREA et al., 2023). Além disso, essas plantas exigem menos manutenções e cuidados em função da rusticidade e adaptação ao meio e o uso contribui para a popularização e conservação dessas espécies (PRESTES et al., 2020).

O tamanho reduzido das sementes, o baixo poder germinativo e a desuniformidade das plantas de *P. heteromallum* restringe o sucesso via propagação sexuada, considerando sua exploração para fins comerciais (NIENOW et al., 2010; FRAGOSO et al., 2017). Lato et al. (2018) e Lato et al. (2019) averiguaram que *P. heteromallum* é uma espécie facilmente propagada por estacas. Contudo, a propagação via estaquia limita-se à quantidade de mudas e sazonalidade, além de propiciar a disseminação de doenças (SILVA et al., 2019).

Outro método de propagação de plantas é o cultivo *in vitro* ou micropropagação. Este consiste no cultivo de sementes ou partes vegetativas da planta denominadas de explante em um meio de cultura nutritivo, sob condições assépticas e ambientais controladas, cuja última etapa da propagação é a aclimatização das plantas (DALPIAZ et al., 2019; FARIA et al., 2020).

Uma das principais vantagens da micropropagação é o potencial que ela apresenta em relação a eficiência na produção de mudas em escala comercial, com alto padrão fitossanitário e genético e em curto espaço de tempo (SOARES et al., 2023). A técnica comumente usada para cultivo do explante é a organogênese, que por sua vez pode ser direta ou indireta (FARIA et al., 2020). Na organogênese direta ocorre a regeneração da planta a partir de órgãos ou tecidos, enquanto que na organogênese indireta a regeneração da planta ocorre a partir de células desdiferenciadas denominadas de calos (HASNAIN et al., 2022).

Assim, a micropropagação de *P. heteromallum* mostra-se como uma alternativa para a produção de mudas em larga escala, de forma homogênea para plantios comerciais e, adicionalmente, possibilitando futuras abordagens biotecnológicas da espécie.

Diante disso, este estudo teve por objetivo investigar a resposta de explantes foliares de *P. heteromallum* cultivados *in vitro* em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com diferentes combinações de BAP (6-benzilaminopurina), AIB (ácido indol-3-butírico), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyiacético), PVP (polivinilpirrolidona) e carvão ativo no processo de calogênese e rizogênese indireta, visando a regeneração de plantas *in vitro*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Uso de PVP, carvão ativo e dos fitorreguladores AIB e BAP na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de *Pleroma heteromallum*

Folhas apresentando cerca de 1 cm² provenientes de plântulas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura (Figura 25).



Figura 25. Aspecto do explante (folhas) de *P. heteromallum* provenientes de plântulas cultivadas *in vitro* em meio de cultura para promoção de organogênese indireta (Seropédica/RJ, 2022). Barra 1.0 cm.

O meio de cultura utilizado foi o Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera[®]) (MS) com 100% da concentração original de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica) e 7,0 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISO FAR), constituindo-se no tratamento controle (T1).

Os demais tratamentos foram constituídos do mesmo meio acrescido de 4.9 µM de AIB, 4.4 µM de BAP e 1 g.L⁻¹ de PVP (T2); 4.9 µM de AIB, 4.4 µM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); 4.9 µM de AIB e 4.4 µM de BAP (T4); e 4.4 µM de BAP (T5).

O pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121 °C.

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio, contendo um explante por tubo.

Os tubos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas.

Após 42 dias avaliou-se o percentual de sobrevivência (PS), o percentual de oxidação (PO), o percentual de formação de calos (PC), o percentual de indução de brotos (PB) e o percentual de indução de raiz (PR) dos explantes.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, sendo transformados para as variáveis significativas através da equação [(x + 1)^{0,5}]. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

6.4.2 Uso dos fitorreguladores AIB e 2,4-D na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de *Pleroma heteromallum*

Folhas apresentando cerca de 1 cm² provenientes de plântulas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o MS com 100% da concentração original de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica) e 7,0 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISO FAR). Os tratamentos foram constituídos do meio MS acrescido de 4.4 µM de BAP e 4.9 µM de AIB (T1) e do meio MS acrescido de 4.4 µM de BAP e 4.5 µM de 2,4-D (T2).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dez repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio, contendo um explante por tubo.

Os tubos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias de cultivo os explantes foram repicados para tubos contendo os estes mesmos tratamentos, onde permaneceram por mais 30 dias, totalizando 60 dias de cultivo *in vitro*.

Após esse período avaliou-se o percentual de sobrevivência (PS), o percentual de oxidação (PO), o percentual de formação de calos (PC), o percentual de indução de brotos (PB) e o percentual de indução de raiz (PR) dos explantes.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, sendo que para as variáveis significativas os dados foram transformados [(x + 1)^{0.5}]. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

6.4.3 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de *Pleroma heteromallum* no período de 40 dias de cultivo *in vitro*

Folhas apresentando cerca de 1 cm² provenientes de plântulas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* foram inoculados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi o Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera[®]) (MS) com 100% da concentração original de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica) e 7,0 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISO FAR), sendo este o tratamento controle (T1).

Os demais tratamentos foram constituídos do mesmo meio acrescido de 2.2 µM de BAP (T2); 4.4 µM de BAP (T3); 2.2 µM de BAP e 4.9 µM de AIB (T4); e 4.4 µM de BAP e 4.9 µM de AIB (T5).

O pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121 °C. O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dez repetições. A unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio contendo um explante por tubo (Figura 26).

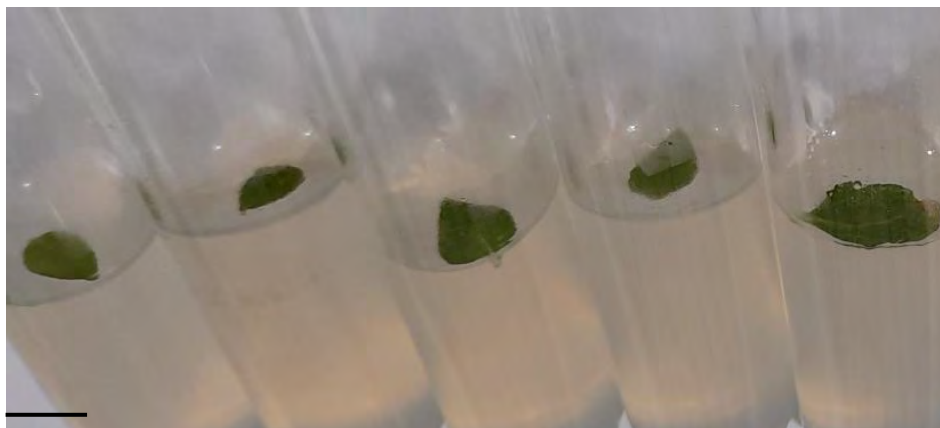


Figura 26. Aspecto do explante foliar de *Pleroma heteromallum* inoculado em meio contendo diferentes combinações de BAP e AIB para indução da calogênese em explante foliar de *Pleroma heteromallum* (Seropédica/RJ, 2022). Barra: 1.0 cm.

Legenda (da esquerda para a direita): meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); e meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5).

Os frascos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de aproximadamente $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas pelo período de 40 dias.

Ao final do experimento foram avaliados o percentual de sobrevivência (PS), o percentual de oxidação (PO), o percentual de formação de calos (PC), o percentual de indução de brotos (PB) e o percentual de indução de raiz (PR) dos explantes.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, sendo que para as variáveis significativas os dados foram transformados $[(x + 1)^{0.5}]$. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

6.4.4 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na indução da calogênese em explante foliar de *Pleroma heteromallum* no período de 30 + 15 dias de cultivo *in vitro*

Folhas apresentando cerca de 1 cm^2 provenientes de plântulas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera[®]) (MS) com 100% da concentração original de sais, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica) e $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (MicroMED ISOFAR), utilizado no experimento como tratamento controle (T1). Os demais tratamentos foram constituídos do mesmo meio acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); 4.4 μM de BAP (T3); 2.2 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T4); 4.4 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T5); e 6.6 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T6).

O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121°C . O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dez repetições, totalizando 60 unidades de observação. A unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio contendo um explante portubo (Figura 27).



Figura 27. Aspecto dos explantes foliares de *Pleroma heteromallum* inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações de BAB e AIB para indução da calogênese em explante foliar de *Pleroma heteromallum* (Seropédica/RJ, 2023). Barra: 1.0 cm.

Legenda (da esquerda para a direita): meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5); e meio MS acrescido de 6.6 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T6).

Os frascos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de aproximadamente $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas. No 30º dia todos os tratamentos e repetições foram repicados para um novo tubo contendo o mesmo meio de cultura (tratamento), onde permaneceram por mais 15 dias, totalizando 45 dias de cultivo.

Avaliou-se o percentual de explante oxidado (PO), o percentual de explante induzido (folha com curvatura) (PI), o percentual de explante com calo (PC), o percentual de explante com raiz (PR) e o percentual de explante com brotação (PB) aos 15, 20, 30 e 45 dias após a inoculação dos mesmos em meio de cultivo.

Os dados referentes ao 30º dia de cultivo foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, para as variáveis significativas os dados foram transformados $[(x + 1)^{0.5}]$. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

6.4.5 Diferentes concentrações de BAP na indução de brotações a partir de massa de calos oriundas de explante foliar de *Pleroma heteromallum*

Massa de calos oriundas do experimento anterior (Experimento IV) foram transferidas, ao acaso, para meios de cultura contendo diferentes concentrações de BAP a fim de induzir brotações. Os tratamentos foram constituídos do meio Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera[®]) (MS) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica), 7,0 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISOFAR) e diferentes concentrações de BAP: 1.1 μM de BAP (T1); 2.2 μM de BAP (T2); 4.4 μM de BAP (T3); 6.6 μM de BAP (T4) e 8.8 μM de BAP (T5). O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121°C .

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, totalizando 20 unidades de observação. A unidade experimental foi composta por frascos de vidro com capacidade de 40 mL contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultivo e um explante (massa de calos) por frasco (Figura 28).



Figura 28. Massa de calos oriundas de explante foliar de *Pleroma heteromallum* inoculados em meio de cultivo com adição de diferentes concentrações de BAP para indução de brotação (Seropédica/RJ, 2023). Barra: 1.0 cm.

Legenda: meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP (da esquerda para a direita): 1.1 μM de BAP (T1); 2.2 μM de BAP (T2); 4.4 μM de BAP (T3); 6.6 μM de BAP (T4) e 8.8 μM de BAP (T5).

Os frascos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de aproximadamente $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas durante 30 dias. Momento em que foi avaliado o percentual de sobrevivência (PS) e o percentual de indução de brotações (PB) na massa de calos.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Uso de PVP, carvão ativo e dos fitorreguladores AIB e BAP na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de *Pleroma heteromallum*

Não houve indução de brotação e de raiz em nenhum dos tratamentos de modo que essas variáveis foram desconsideradas nas análises estatísticas.

O teste de normalidade e a análise de variância foram significativos para todas as demais variáveis analisadas. O teste de comparação de médias constatou que T4 apresentou as maiores e as menores médias para as variáveis PS e PO, respectivamente, em relação aos demais tratamentos. Esses que não diferiram entre si. Quanto a variável PC o tratamento controle (T1) apresentou a menor média em relação aos demais tratamentos, esses que não diferiram entre si (Tabela 16).

Observou-se a oxidação total de todos os explantes de T1, resultando em 0% de sobrevivência dos mesmos, bem como de indução de calos. Em T2 observou-se a oxidação total de 71,43% dos explantes, dois explantes permaneceram com cerca de 10% de sua área não oxidada, resultando em 28,57% de sobrevivência.

Resultado semelhante foi observado em T3, que apresentou 85,72% de oxidação dos explantes e um explante permaneceu com cerca de 60% de sua área não oxidada, resultando em 14,28% de sobrevivência. Observou-se que em T4 houve indução de calos em 100% dos explantes, com a sobrevivência de 85,72% dos mesmos e oxidação de 14,28%. Um leve escurecimento dos explantes foi observado, aproximadamente, após o 30º dia neste tratamento. Em T5, constatou-se a oxidação total em 100% dos explantes, 28,57% dos explantes chegaram a induzir calos, porém, posteriormente os mesmos oxidaram.

Considerando o percentual de sobrevivência dos explantes em T4 sugere-se a superioridade deste tratamento em relação aos demais.

Tabela 16. Médias do percentual de sobrevivência (PS), percentual de explante oxidado (PO) e percentual de explante com calo (PC) de *Pleroma heteromallum* (D.Don) D.Don aos 42 dias da inoculação de folhas em diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	PS	PO	PC
	(%)		
MS (Controle)	0.00b	100.00b	0.00c
MS + 4.9 µM de AIB + 4.4 µM de BAP + PVP	28.57b	71.43b	71.43ab
MS + 4.9 µM de AIB + 4.4 µM de BAP + carvão ativo	14.29b	85.71b	42.86abc
MS + 4.9 µM de AIB + 4.4 µM de BAP	85.71a	14.29a	100.00a
MS + 4.4 µM de BAP	0.00b	100.00b	28.57ab
Média Geral (%)	25.71	74.29	48.57
Coeficiente de variação (%)	12.12	10.25	13.46

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Detalhes dos explantes foliares de *P. heteromallum* após 30 e 42 dias podem ser observados nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

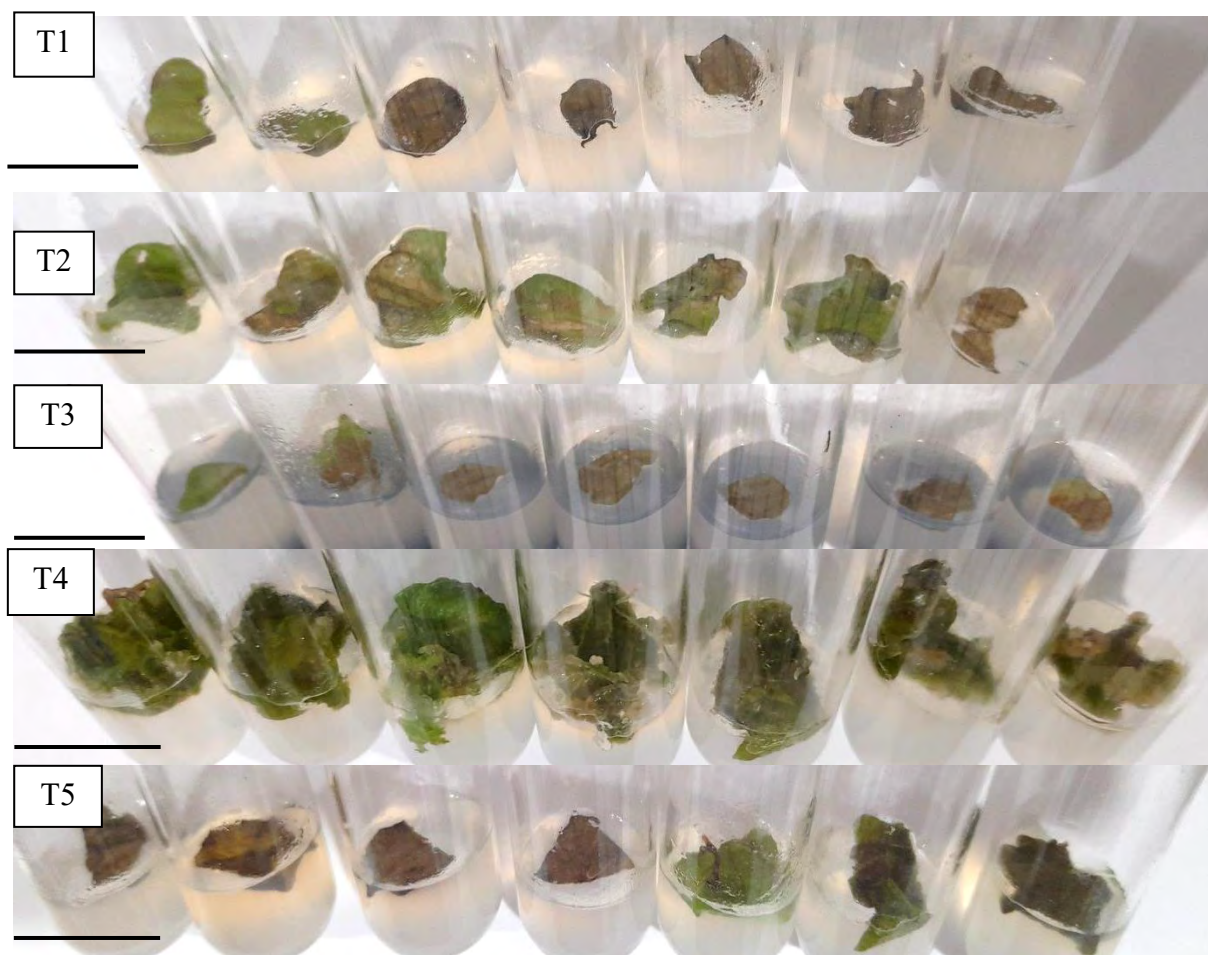


Figura 29. Explantes foliares de *Pleroma heteromallum* após 30 dias de inoculação nos diferentes meios de cultura testados Barra: 2.0 cm (Seropédica/RJ, 2022).

Legenda: Meio MS (T1 - controle); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de PVP (T2); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB e 4.4 μM de BAP (T4); e Meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T5).

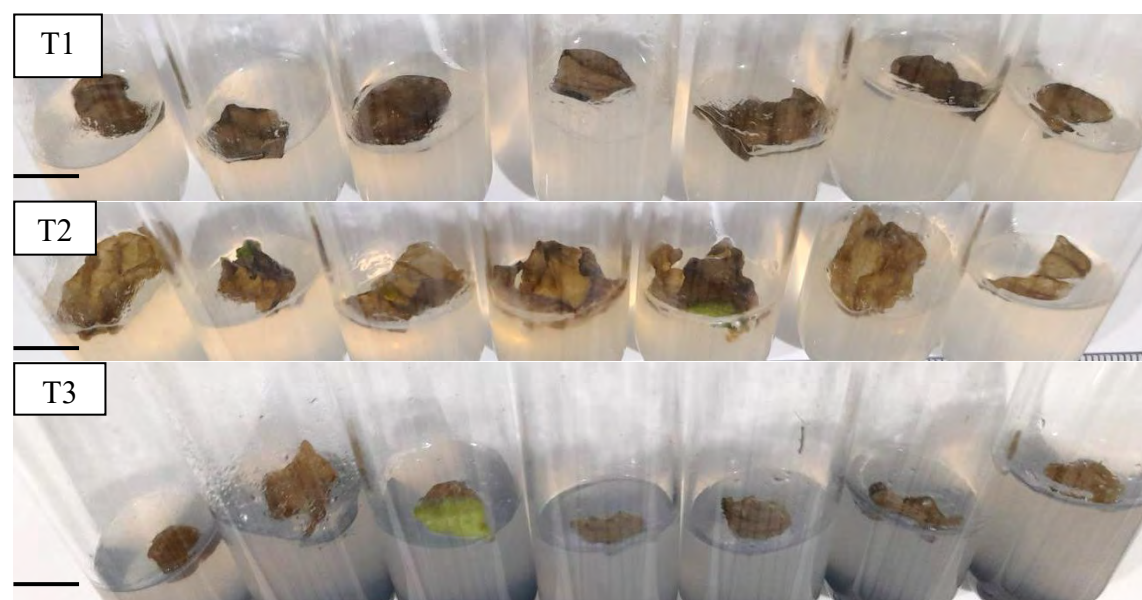




Figura 30. Explantes foliares de *Pleroma heteromallum* após 42 dias de inoculação nos diferentes meios de cultura testados (Seropédica/RJ, 2022) Barras: 1.0 cm.

Meio MS (T1 - controle); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de PVP (T2); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB e 4.4 μM de BAP (T4); e Meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T5).

6.5.2 Uso dos fitorreguladores AIB e 2,4-D na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de *Pleroma heteromallum*

Após 20 dias do início do experimento, para ambos os tratamentos, observou-se a sobrevivência de 100% dos explantes, bem como 100% de resposta da indução dos explantes aos tratamentos aplicados, fenômeno que pode ser constatado a partir da curvatura das folhas (Figura 31).



Figura 31. Explante foliar de *Pleroma heteromallum* após 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com 4.4 μM de BAP e 4.9 μM de AIB – T1 (A) e 4.4 μM de BAP e 4.5 μM de 2,4-D - T2 (B) Barras: 1.0 cm (Seropédica, 2022).

Não houve indução de brotação para ambos os tratamentos testados, de modo que essa variável foi desconsiderada durante as análises estatísticas. O teste de normalidade foi significativo para todas as variáveis analisadas, de modo que os dados foram transformados antes da realização da análise de variância. Na Tabela 2 têm-se os resultados observados após 60 dias de cultivo dos explantes para T1 e T2.

Com exceção ao percentual de indução de raiz, a análise de variância indicou que não houve diferença significativa entre os tratamentos. De acordo com o teste de comparação de médias o percentual de indução de raiz foi superior em T1 (Tabela 17).

Tabela 17. Médias do percentual de sobrevivência (PS), percentual de oxidação (PO), percentual de indução de calos (PC) e o percentual de indução de raiz (PR) em explantes foliares de *Pleroma heteromallum* aos 60 dias de cultivo *in vitro* (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	PS	PO	PC	PR
	%			
MS + 4.4 μ M de BAP + 4.9 μ M de AIB	90.00ns	10.00ns	90.00ns	70.00a
MS + 4.4 μ M de BAP + 4.5 μ M de 2,4-D	90.00ns	10.00ns	80.00ns	10.00b
Média Geral (%)	90.00	10.00	85.00	40.00
Coeficiente de Variação (%)	9.54	12.58	11.42	14.51

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns: não significativo pelo teste f a 5%.

Para ambos os tratamentos observou-se a oxidação total de 10% dos explantes, resultando na sobrevivência de 90% dos mesmos. A calogênese ocorreu em 100% dos explantes que permaneceram vivos, entretanto, o fenômeno foi mais vigoroso em T1, que apresentou uma massa de calos maior, com calos compactos verdes ou brancos (Figura 32). Houve indução de raiz em 70% dos explantes que também induziram calos em T1, enquanto que para T2 esse percentual foi de 10%. O que demonstra a superioridade da combinação de BAP com AIB em relação ao 2,4-D na rizogênese de *P. heteromallum* a partir explantes foliares.

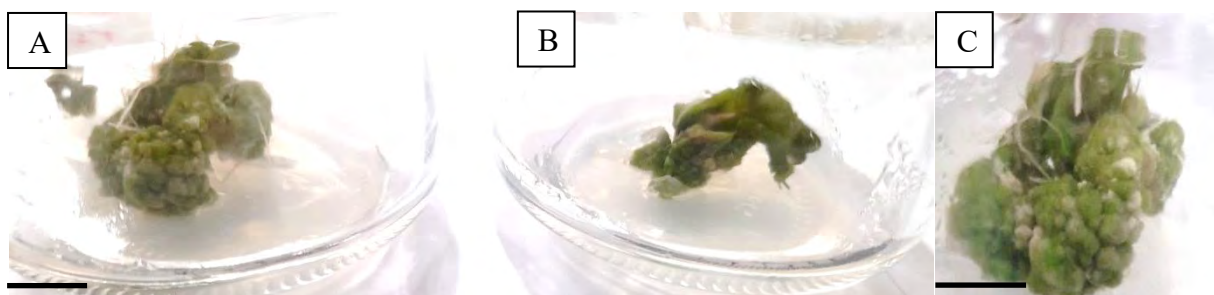


Figura 32. Aspecto da massa de calos oriunda de explante foliar de *Pleroma heteromallum* cultivados em meio MS suplementado com 4.4 μ M de BAP e 4.9 μ M de AIB (A) e 4.4 μ M de BAP e 4.5 μ M de 2,4-D (B) aos 45 dias de subcultivo *in vitro*. Destaque para massa de calos compactos verdes ou brancos e a presença de raízes em T1 (C) (Seropédica/RJ, 2022). Barras: 1.0 cm.

6.5.3 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na calogênese, rizogênese e organogênese indireta em explante foliar de *Pleroma heteromallum* no período de 40 dias de cultivo *in vitro*

Observou-se a contaminação por microorganismos de 100% das repetições do tratamento T2, de modo que este tratamento foi desconsiderado para fins estatísticos.

O teste de normalidade foi significativo para todas as variáveis analisadas, assim as mesmas foram transformados antes da realização da análise de variância.

Na Tabela 18 têm-se os resultados observados após 40 dias de cultivo dos explantes foliares de *P. heteromallum* nos diferentes tratamentos.

Tabela 18. Médias do percentual de sobrevivência (PS), percentual de oxidação (PO), percentual de indução de calos (PC), percentual de indução de brotos (PB) e do percentual de indução de raiz (PR) em explante foliar de *Pleroma heteromallum* aos 40 dias de cultivo *in vitro* (Seropédica/RJ, 2023).

Tratamento	PS	PO	PC	PB	PR
	(%)				
MS (controle)	30ab	70ab	0b	0ns	30a
MS + 4.4 µM de BAP	0b	100b	0b	0ns	0b
MS + 2.2 µM de BAP + 4.9 µM de AIB	60a	40a	60a	0ns	0b
MS + 4.4 µM de BAP + 4.9 µM de AIB	70a	30a	70a	10ns	0b
Média Geral (%)	40	60	32.5	2.5	7.5
Coeficiente de variação (%)	15.21	14.21	12.91	6.48	9.70

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns: não significativo pelo teste f a 5%.

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, constatou-se a oxidação de 70% dos explantes do tratamento controle (T1). Os 30% de explantes que não oxidaram emitiram raízes, sugerindo concentrações endógenas de auxinas nesses explantes.

Nesse mesmo período, 100% dos explantes do tratamento T3 estavam oxidados, embora os explantes tenham apresentado uma curvatura durante esse período, sugerindo início da indução da calogênese, esse processo não se completou. Provavelmente a concentração utilizada do fitoregulador BAP no meio de cultivo e/ou as possíveis concentrações hormonais endógenas dos explantes não foram suficientes para continuidade de tal processo.

Para o percentual de indução de brotações não houve diferença significativa entre todos os tratamentos. Entretanto, 10% dos explantes do tratamento T5, ou seja, um único explante emitiu brotações.

Os tratamentos T4 e T5 não diferiram entre si para todas as variáveis analisadas, entretanto, visualmente a massa de calos foi mais vigorosa nas repetições de T5.

Abaixo é possível observar detalhes da curvatura e emissão de raízes em explantes de T1 (controle); curvatura de explante foliar (início de indução da calogênese) em T3; calogênese em T4 e T5 (Figura 33 A) e detalhe da emissão de brotos em explante de T5 (Figura 33 B).

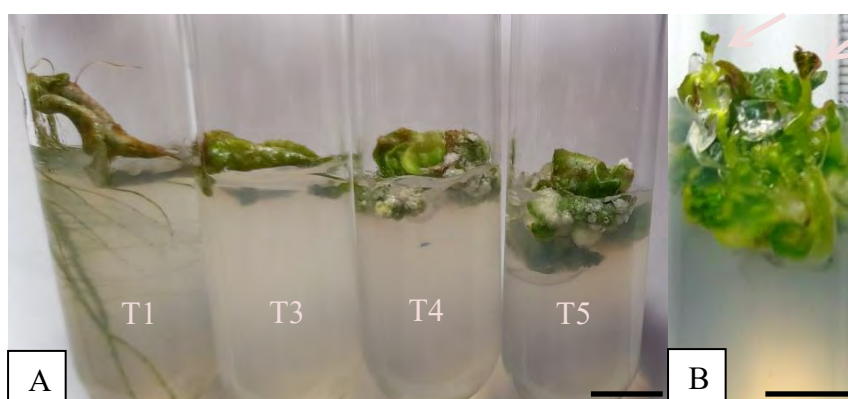


Figura 33. Detalhe de explantes foliares de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de cultivo *in vitro*: curvatura e emissão de raízes em explante em T1; curvatura de explante foliar em T3; calogênese em T4 e T5 (A); Destaque para indução de brotos em explante cultivado em T5 (B). (Seropédica/RJ, 2022). Barras: 1.0 cm.

Meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); e meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5).

As massas de calos foram transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com 8.8 μM de BAP. Verificou-se o desenvolvimento de brotações e a emissão de raízes a partir da massa de calos provenientes de apenas uma das repetições de T5 (Figura 34). Contudo, os demais explantes (massa de calos), oriundos tanto de T4 e T5, oxidaram até a morte.



Figura 34. Organogênese indireta a partir de massa de calos orinda de explante foliar de *Pleroma heteromallum*. Setas indicando o desenvolvimento de brotações e emissão de raízes em massa de calos subcultivadas em meio MS suplementado com 8.8 μM de BAP (Seropédica/RJ, 2023). Barra: 1.0 cm.

6.5.4 Uso dos fitorreguladores BAP e AIB na indução da calogênese em explante foliar de *Pleroma heteromallum* no período de 30 + 15 dias de cultivo *in vitro*

Os resultados para o percentual de explante oxidado (PO), percentual de explante induzido (PI), percentual de explante com calo (PC) e percentual de explante com raiz (PR) aos 15, 20, 30 e 45 dias após inoculação nos diferentes meios de cultivo encontram-se discriminados na Tabela 19.

Tabela 19. Médias do percentual de explante oxidado (PO), percentual de explante induzido (PI), percentual de explante com calo (PC) e percentual de explante com raiz (PR) aos 15, 20, 30 e 45 dias após inoculação de explante foliar de *Pleroma heteromallum* em diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2023).

Tratamento	PO (%)	PI (%)
------------	--------	--------

Tratamento	Dias							
	PC (%)				PR (%)			
	15	20	30	45	15	20	30	45
T1 - MS (Controle)	90	100	100	100	0	0	0	0
T2 - MS + 2.2 μ M de BAP	10	20	90	100	80	80	10	0
T3 - MS + 4.4 μ M de BAP	20	30	60	90	80	70	40	10
T4 - MS + 2.2 μ M de BAP + 4.9 μ M de AIB	10	10	20	50	90	90	80	50
T5 - MS + 4.4 μ M de BAP + 4.9 μ M de AIB	10	10	30	40	90	90	70	60
T6 - MS + 6.6 μ M de BAP + 4.9 μ M de AIB	20	20	30	50	70	80	70	50

Observou-se que o pico de explante oxidado para T1 (controle) foi de 100% no 20º dia. A partir do 20º dia observou-se a oxidação acentuada para os demais tratamentos, que alcançaram no 45º dia o percentual de 100% (T2); 90% (T3); 50% (T4 e T6) e 40% (T5) (Figura 35).

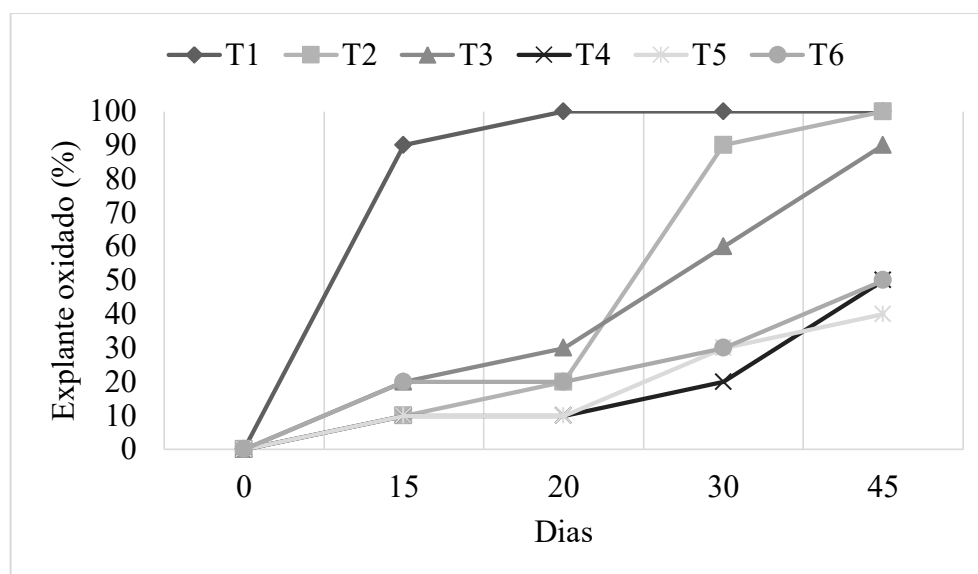


Figura 35. Pico de explante oxidado (%) para os diferentes tratamentos aos 15, 20, 30 e 45 dias após inoculação de explante foliar de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2023).

Legenda: meio MS acrescido de 0.0 μ M de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μ M de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μ M de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μ M de BAP e de 4.9 μ M de AIB (T4); meio MS acrescido de 4.4 μ M de BAP de 4.9 μ M de AIB (T5); e meio MS acrescido de 6.6 μ M de BAP e 4.9 μ M de AIB (T6).

Quanto ao percentual de explante induzido (curvatura da folha) não houve indução de explante para o tratamento T1. Para os demais tratamentos observou-se que o pico de indução de explante ocorreu no 15º dia após inoculação dos mesmos, apresentando T2 e T3 80% de explantes induzidos; T4 e T5 com 90% de explantes induzidos e T6 com 70% de explantes induzidos. Esses percentuais se mantiveram até o 20º dia, quando ocorreu a morte de alguns explantes por oxidação (Figura 36).

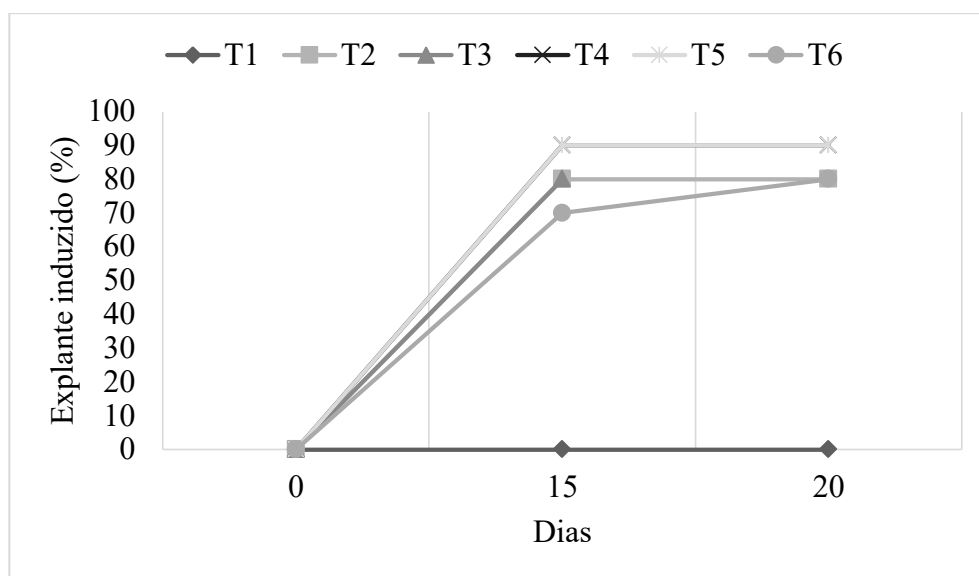


Figura 36. Pico de explante induzido (%) para os diferentes tratamentos aos 15 e 20 dias após inoculação de explante foliar de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2023).

Legenda: meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5); e meio MS acrescido de 6.6 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T6).

Quanto ao percentual de explante com calos observou-se que o pico varia em função do meio de cultura utilizado, ocorrendo entre o 20º e o 30º dia após a inoculação dos explantes.

Os tratamentos T2 e T3 o pico foi de apenas 10% de explantes com calos, respectivamente, no 15º e no 20º dia. Enquanto que o pico para T4 foi de 80% de explantes com calos no 30º dia; T5 com 90% de explantes com calos no 20º dia; e T6 com 70% de explantes com calos no 20º dia (Figura 37).

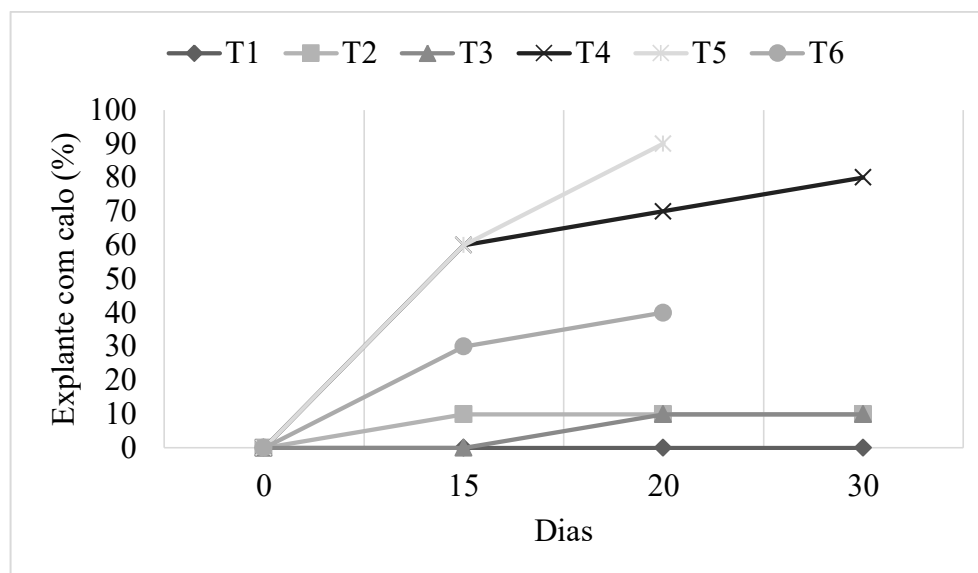


Figura 37. Pico de explante com calo (%) para os diferentes tratamentos aos 15, 20 e 30 dias após inoculação de explante foliar de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2023).

Legenda: meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5); e meio MS acrescido de 6.6 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T6).

Assim como para o percentual de explantes com calos, o pico para o percentual de explantes com raízes variou em função do meio de cultura utilizado, ocorrendo entre o 15º e o 30º dia após a inoculação dos explantes.

Os tratamentos T1 e T2 apresentaram um pico de 10% de explantes com raízes no 15º dia. T2 manteve esse percentual até o 30º dia. T3 não apresentou explantes com raízes.

Enquanto que o pico de explantes com raízes para T4 foi de 20% no 20º dia; T5 foi de 40% no 20º dia; e T6 foi de 20% de explantes com raízes no 30º dia (Figura 38).

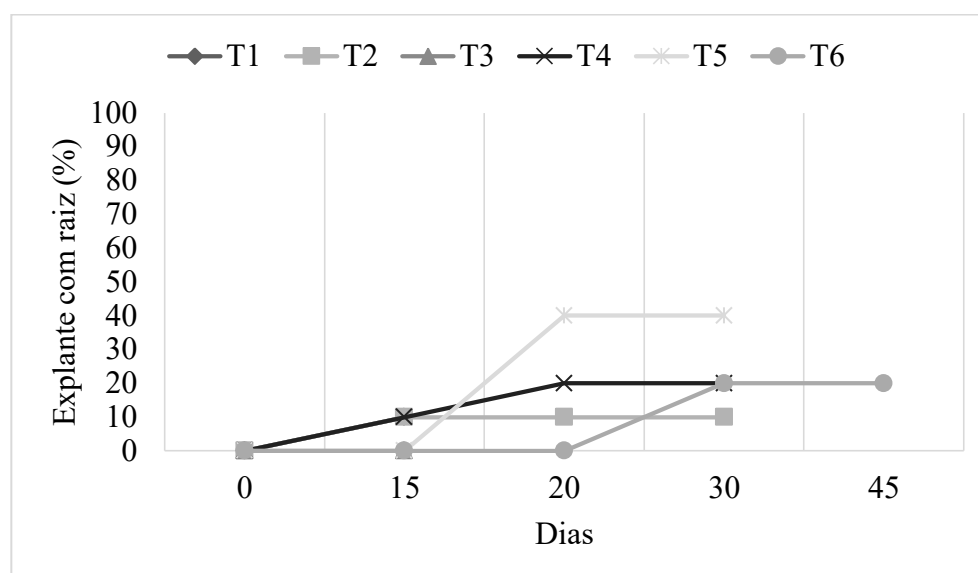


Figura 38. Pico de explante com raiz (%) para os diferentes tratamentos aos 15, 20, 30 e 45 dias após inoculação de explante foliar de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2023).

Legenda: meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5); e meio MS acrescido de 6.6 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T6).

O teste de normalidade foi significativo para todas as variáveis analisadas, de modo que os dados foram transformados antes da realização da análise de variância. A análise de variância foi significativa para as variáveis percentual de explante oxidado, percentual de explante induzido e percentual de explante com calo. O teste de comparação de médias, realizado a partir dos resultados observados no 30º dia após inoculação dos explantes, encontra-se na Tabela 20.

Tabela 20. Médias para percentual de explante oxidado (PO), percentual de explante induzido (PI), percentual de explante com calo (PC) e percentual de explante com raiz (PR) no 30º dia após a inoculação de explante foliar de *Pleroma heteromallum* nos diferentes tratamentos.

Tratamento	PO	PI	PC	PR
	%			
MS (Controle)	100b	0b	0b	0ns
MS + 2.2 μM de BAP	90b	10b	10b	10ns
MS + 4.4 μM de BAP	60ab	40ab	10b	0ns
MS + 2.2 μM de BAP + 4.9 μM de AIB	20a	80a	80a	20ns
MS + 4.4 μM de BAP + 4.9 μM de AIB	30a	70a	70a	40ns
MS + 6.6 μM de BAP + 4.9 μM de AIB	30a	70a	70a	20ns
Média Geral (%)	55	45	40	15
Coeficiente de variação (%)	13.85	14.33	13.33	13.53

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns: não significativo pelo teste f a 5%.

Para a variável percentual de explante oxidado (PO) percentual de explante induzido (PI) e percentual de explante com calo (PC), os tratamentos T1 e T2 mostraram-se estatisticamente iguais entre si e inferiores aos tratamentos T4, T5 e T6, estes que não diferiram entre si.

Enquanto que T3 mostrou-se estatisticamente igual aos demais tratamentos para a variável percentual de explante oxidado (PO) e percentual de explante induzido (PI).

Para o percentual de explante com calo (PC) T3 mostrou-se estatisticamente igual aos tratamentos T1 e T2 e inferior aos tratamentos T4, T5 e T6.

O percentual de explante com raiz (PR) mostrou-se estatisticamente igual para todos os tratamentos.

Os calos formados tendem a serem verdes friáveis ou compactos. O escurecimento indicando oxidação tende a ocorrer em explantes cultivados em meio MS isento de fitorreguladores ou acrescido apenas com BAP.

A evolução da calogênese de explantes no 15° e no 20° dia, comprovando a necessidade da adição de fitorreguladores BAP e AIB ao meio de cultivo no processo de calogênese de explantes foliares de *P. heteromallum* pode ser observada na Figura 39.

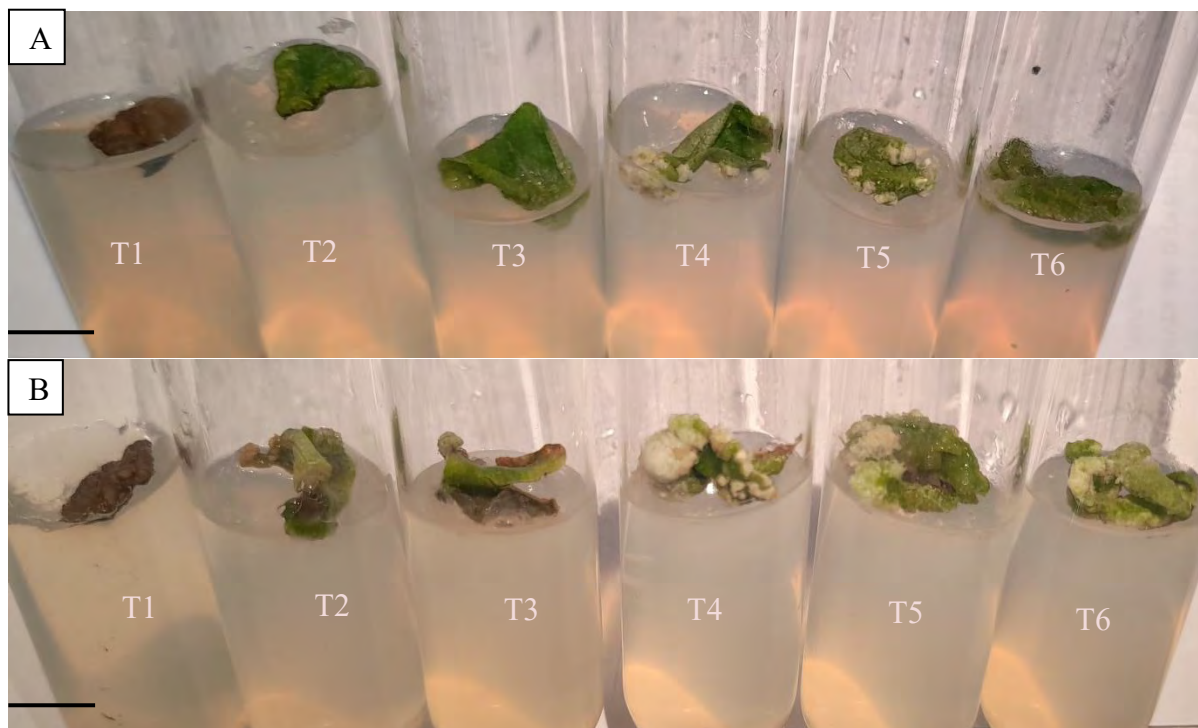


Figura 39. Calogênese a partir de explantes foliares de *Pleroma heteromallum* no 15° (A) e no 20° (B) dia após inoculação em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e AIB (Seropédica/RJ, 2023). Barras: 1.0 cm.

Legenda (da esquerda para a direita): meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB e de BAP - controle (T1); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP (T2); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T3); meio MS acrescido de 2.2 μM de BAP e de 4.9 μM de AIB (T4); meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP de 4.9 μM de AIB (T5); e meio MS acrescido de 6.6 μM de BAP e 4.9 μM de AIB (T6).

6.5.5 Diferentes concentrações de BAP na indução de brotações a partir de massa de calos oriundas de explante foliar de *Pleroma heteromallum*

Após 30 dias de cultivo *in vitro* constatou-se a oxidação de 100% dos explantes de todos os tratamentos. Resultado que sugere que as concentrações e/ou o uso exclusivo de BAP no meio de cultivo MS não é suficiente para indução de organogênese indireta (indução de brotações) a partir de calos provenientes de explante foliar de *P. heteromallum*.

6.6 DISCUSSÃO

O PVP e o carvão ativo são conhecidos pela capacidade de adsorver do meio de cultivo substâncias inibitórias e tóxicas liberadas pelos explantes, evitando a oxidação e eventual morte dos tecidos (RONDON et al., 2019; VERDE et al., 2021), porém a presença desses compostos pode inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizado (MENEGUZZI et al., 2020).

No Experimento I constatou-se efeito negativo da adição de PVP e carvão ativo ao meio de cultivo. Esses compostos, além de não inibirem a oxidação dos explantes, parecem impedir o processo de indução de calos dos mesmos. Miranda et al. (2019) também constataram que PVP e carvão ativo foram ineficientes na inibição da oxidação de explantes de *Eremanthus incanus* (Asteraceae).

Werner et al. (2009) constataram que o melhor tratamento no controle da oxidação de explantes de *Caesalpinia echinata* (Fabaceae) foi o carvão ativo, em que 40% dos explantes apresentaram oxidação baixa a moderada, porém sem formação de calos, devido ao efeito adsorvente deste composto, que imobiliza parte dos elementos que compõem o meio, inclusive os fitorreguladores.

Schwalbert et al. (2015) constataram efeito inibitório no crescimento de *Desmodium incanum* (Fabaceae) pela adição de carvão ativo ao meio de cultivo. Os autores sugeriram que esse efeito ocorra devido à propriedade adsorvente deste composto; assim, ao mesmo tempo em que o carvão ativo adsorve compostos tóxicos ao crescimento vegetal ele também adsorve nutrientes fundamentais para o crescimento vegetal.

As respostas iniciais de indução de calos são marcadas pela curvatura e depois pela intumescência dos explantes até a formação dos calos. A partir dos resultados observados no presente trabalho, foi notado que a ausência e/ou a diminuição na concentração dos fitorreguladores BAP e AIB no meio de cultivo, seja pela não adição ou pela adsorção destes por PVP ou carvão ativo, seja o fator que suprime o processo de calogênese e, por consequência, ocasiona a oxidação e morte dos explantes foliares de *P. heteromallum*.

Os resultados indicam a necessidade da adição dos fitorreguladores BAP e AIB ou BAP e 2,4-D ao meio de cultura para que ocorra o processo de calogênese via explantes foliares de *P. heteromallum*, uma vez que na ausência desses fitorreguladores não há indução do processo de calogênese, resultando em rápida oxidação e morte dos explantes. Quando o meio de cultivo é suplementado apenas com BAP, embora se observe o processo de indução de calogênese (curvatura da folha) em alguns explantes, com o tempo verifica-se a oxidação e morte dos mesmos.

A ocorrência de oxidação fenólica em explantes é um dos maiores desafios à aplicação das técnicas de cultivo *in vitro*, principalmente para espécies lenhosas, dificultando o processo de estabelecimento da cultura (SANTOS et al., 2019).

Karimah et al. (2020) verificaram calogênese em explantes de *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) cultivados em meio MS isento de fitorreguladores, sugerindo que concentrações de hormônios endógenos aos explantes sejam adequados para indução e formação de calos na espécie.

No geral, auxina e citocinina são dois grupos de fitorreguladores mais comumente utilizados em cultura de tecidos de plantas. A adição das mesmas no meio de cultura é útil para regular a célula durante a divisão, alongamento, diferenciação e formação de órgãos (NETA et al., 2022). A razão auxina/citocinina em meio de cultura é determinante para a resposta organogênica. Geralmente, maiores concentrações de auxina induz a formação de raízes, enquanto maiores concentrações de citocinina induz a formação de gemas adventícias

e razões intermediárias de auxina/citocinina induz a proliferação celular desorganizada (calos) (JARDIM et al., 2010).

Os calos podem abrigar células com centros ativos responsáveis pela divisão celular, sob concentrações adequadas de citocinina e auxina esses centros são estimulados e se diferenciam em órgãos. As células competentes, capazes de reagir a estímulos específicos, têm potencial para se diferenciar e dar origem a brotos ou raízes. (SANTOS et al., 2022).

Observou-se a ocorrência de calos embriogênicos e não embriogênicos dentro do mesmo tratamento, desde que haja a combinação de BAP e AIB ao meio de cultivo. Resultados semelhantes foram observados por Costa et al. (2015). Esses autores consideraram que essa variação na formação de calos dentro de um mesmo tratamento pode ser em decorrência dos gradientes hormonais presentes no explante.

O escurecimento dos calos pode indicar o início da morte do explante, ocasionada pela diminuição dos nutrientes do meio ou pela degradação de clorofila (KARIMAH et al., 2020). No que se refere à transferência da massa de calos no 30º dia de cultivo para um mesmo meio de cultivo, isto é, contendo as mesmas concentrações de fitorreguladores BAP + AIB, não surtiu o efeito esperado. O processo de oxidação da massa de calos continuou mesmo após transferência para um meio de cultivo novo. Do mesmo modo, as massas de calos transferidas para meio de cultivo contendo apenas a citocinina BAP não regeneraram brotações, ocorrendo suas oxidações e mortes com o tempo.

O processo de organogênese *in vitro* é complexo, sendo influenciado por fatores externos e internos, incluindo a fonte do explante, o meio de cultura, a ação de fitorreguladores, especialmente auxina e citocinina e da capacidade do tecido em responder às alterações hormonais e aos fatores ambientais (qualidade e quantidade de luz, temperatura, umidade, etc.) durante o cultivo (OLIVEIRA et al., 2013).

Prudente et al. (2016) observaram formação de calos e posterior regeneração de brotações em explantes foliares de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) cultivados em 54 µM de BAP e 13,5 µM de 2,4-D, respectivamente.

Lawarence e Murugan (2017) inferiram que na propagação *in vitro* de *Osbeckia aspera* (Melastomataceae) calos verdes compactos e friáveis são induzidos utilizando meio MS suplementado com as combinações hormonais ANA (0,5 mg L⁻¹) + BAP (0,5 mg L⁻¹) e 2,4-D (0,5 mg L⁻¹) + BAP (0,5 mg L⁻¹), respectivamente. A regeneração de plantas foi possível usando a combinações de ANA e BAP, contudo o número máximo de brotos foi produzido combinando-se ANA (0,5 mg L⁻¹) + BAP (2,5 mg L⁻¹), onde foram obtidos em média 21,28 brotos por explante.

Nauli et al. (2020) em estudos com *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) constataram que o meio contendo ANA (1,0 mg L⁻¹) e TDZ (0,1 mg L⁻¹) promoveram os melhores resultados no processo de calogênese (100%). Tanto calos quanto raízes adventícias se formaram em meio contendo apenas ANA (1,0 mg L⁻¹). Esses pesquisadores também verificaram que um único explante formou calos e brotos em meio contendo TDZ (2 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹).

Resultados que refletem a necessidade de se desenvolver novos testes, com outras concentrações bem como combinações de fitorreguladores, buscando obter melhores respostas e determinar um protocolo mais eficiente na regeneração de plantas de *P. heteromallum*.

6.7 CONCLUSÃO

Os resultados observados sugerem que o processo de calogênese a partir de explante foliar de *P. heteromallum* é possível, sendo necessária a adição de fitorreguladores como BAP e AIB ou BAP e 2,4-D ao meio de cultivo.

Levando-se em consideração o aspecto dos calos e a rizogênese, considera-se que a combinação BAP:AIB pode ser mais promissora para micropropagação de *P. heteromallum* a partir de explantes foliares, quando comparada a combinação dos fitorreguladores BAP:2,4-D.

A regeneração de planta via organogênese indireta de *P. heteromallum* a partir de explante foliar foi alcançada, entretanto outros estudos tornam-se necessários a fim de desvendar e concluir quais as possíveis variáveis endógenas e/ou exógenas para obtenção de resultado padrão e sucesso da micropropagação dessa espécie.

Frente à complexidade de fatores envolvidos na regeneração de plantas *in vitro* a partir da organogênese indireta, os resultados ora encontrados sugerem que a propagação *in vitro* de *P. heteromallum* é possível e pode ser uma alternativa promissora na produção de mudas dessa espécie.

6.8 REFERÊNCIAS

- CAMPOS, C. C. F.; DUARTE, J. F.; BORÉM, R. A. T.; CASTRO, D. M. Biologia floral e mecanismos de melhoramento de *Tibouchina heteromalla* Cong. em afloramentos rochosos no sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Ecology**, n.1, 2009.
- CORREA, E. J. O.; KNAUF, J. M. C.; SANTOS, K. N. L.; SILVA, M. J. C.; MARINHO, L. C.; FERREIRA, A. W. C. Plantas nativas e naturalizadas com potencial ornamental do campus Dom Delgado, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.18, n.2, p.60-76, 2023. DOI: [10.5380/revsbau.v18i2.90621](https://doi.org/10.5380/revsbau.v18i2.90621)
- COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA, J. H. S.; TORRES, M. F.; SANTOS, O. N. A.; BLANK, A. F. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjerição. **Scientia Plena**, v.11, n.1, 010201, 2015.
- CUEVAS-REYES, P.; PEREIRA, G. C. N.; GÉLVEZ-ZÚÑIGA, I.; FERNANDES, G. W.; VENÂNCIO, H.; SANTOS, J. C.; MALDONADO-LÓPEZ, Y. Effects of ferric soils on arthropod abundance and herbivory on *Tibouchina heteromalla* (Melastomataceae): is fluctuating asymmetry a good indicator of environmental stress? **Plant Ecology**, v.219, p.69-78, 2018. DOI: [10.1007/s11258-017-0778-y](https://doi.org/10.1007/s11258-017-0778-y)
- DALPIAZ, E. L.; OLIVEIRA, M. F.; PAULERT, R.; ZONETTI, P. C.; STEFANELLO, S. Germinação *in vitro* e enraizamento de microestacas de espinheira santa. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.2, p.415- 425, 2019. DOI: [10.5380/rber.v8i2.65652](https://doi.org/10.5380/rber.v8i2.65652)
- FARIA, G. A.; OLIVEIRA, C. P. M.; LOPES, B. G.; ROCHA, P. S.; PERON, G. M.; SOUZA, K. S.; GARCIA, C. K.; FURLANI JUNIOR, E.; CAVICHIOLI, J. C.; FELIZARDO, L. M. Establishment of a protocol for *in vitro* propagation of *Passiflora caerulea*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v.9, n. 9, p. e157997158, 2020. DOI: [10.33448/rsd-v9i9.7158](https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7158)
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: [10.1590/S1413-70542011000600001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001)
- FRAGOSO, R. O.; STUEPP, C. A.; SÁ, F. P.; KRATZ, D.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Vegetative rescue and *ex vitro* system production of *Tibouchina sellowiana* clonal plants by cutting and mini-cutting. **Ciência Rural**, v.47, n.11, 2017. DOI: [10.1590/0103-8478cr20160098](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160098)
- GOMES, A. C.; PÊGO, R. G.; VICENTE, M. C.; FERREIRA, C. S.; BARROSO, L. T. Tecnologia para superação de dormência física de sementes de *Turnera subulata*: Uma espécie nativa com potencial para paisagismo em áreas de restinga. **A transformação da agronomia e o perfil do novo profissional [recurso eletrônico]** / Organizadores Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos, Analya Roberta Fernandes Oliveira, Kleber Veras Cordeiro. – Ponta Grossa, PR: Atena, p.75-84, 2020. DOI: [10.22533/at.ed.0602016069](https://doi.org/10.22533/at.ed.0602016069)

GRANEMANN, F. S.; SANTOS, K. L.; GRANEMANN, F.; STEINER, N. Caracterização de espécies vegetais nativas com potencial ornamental de ocorrência na região de Curitiba, SC. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.30, n.1, p.79-83, 2017. DOI: [10.52945/rac.v30i1.81](https://doi.org/10.52945/rac.v30i1.81)

GUIMARÃES, P. J. F. *Pleroma in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB603036>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

HASNAIN, A.; NAQVI, S. A. H.; AYESHA, S. I.; KHALID, F.; ELLAHI, M.; IQBAL, S.; HASSAN, M. Z.; ABBAS, A.; ADAMSKI, R.; MARKOWSKA, D.; BAAZEEM, A.; MUSTAFA, G.; MOUSTAFA, M.; HASAN, M. E.; ABDELHAMID, M. M. A. Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**.13:1009395, 2022. DOI: [10.3389/fpls.2022.1009395](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395)

JARDIM, L. S.; SAMPAIO, P. T. B.; COSTA, S. S.; GONÇALVES, C. Q. B.; BRANDÃO, H. L. M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v.40, n.2, p. 275-280, 2010. DOI: [10.1590/S0044-59672010000200005](https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000200005)

KARIMAH, K., YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. *In vitro* culture from internodes of *Melastoma malabathricum* L. on Murashige and Skoog (1962) modified medium with thidiazuron and 1-naphthaleneacetic acid. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.481, n.1, 2020. DOI: [10.1088/1755-1315/481/1/012007](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012007)

KUSTER, Ricardo Machado; ARNOLD, Norbert; WESSJOHANN, Ludger. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, n.1 p.63-65, 2009. DOI: [10.1016/j.bse.2009.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.01.005)

LATOH, L. P.; DALLAGRANA, J. F.; PORTES, D. C.; MAGGIONI, R. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.. Propagação vegetativa via miniestaquia caulinar seriada e produtividade de minijardim e de espécies de *Tibouchina* spp. **REVUERGS - Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, n.3, p. 343-357, 2018. DOI: [10.21674/2448-0479.43.343-357](https://doi.org/10.21674/2448-0479.43.343-357)

LATOH, L. P.; GOMES, E. N.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Can indolebutyric and fulvic acids induce adventitious rhizogenesis on mini-cuttings from Brazilian native tibouchinas? **Ornamental Horticulture**, v. 25, n.1, p. 42-48, 2019. DOI: [10.14295/oh.v25i1.1257](https://doi.org/10.14295/oh.v25i1.1257)

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2015. 1120p.

LAWARENCE, B.; MURUGAN, K. *In vitro* Callus Induction and Plant Regeneration of *Osbeckia aspera* L., a dye yielding medicinal plant. **Trends in Biosciences**, v.10, n.18, p.3297-3303, 2017.

MENEGUZZI, A.; CAMARGO, S. S.; NAVROSKI, M. C.; PEREIRA, M. O.; SOUZA, P. F.; RUFATO, L. Ágar e carvão ativo influenciam no desenvolvimento *in vitro* da parte aérea

e radicular de sequoia. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.18, n.5, p.20-24, 2020. DOI: [10.5965/2238117118e2019020](https://doi.org/10.5965/2238117118e2019020)

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTOS, M. M. Estabelecimento *in vitro* de *Eremanthus incanus*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, e201701525, p. 1-7, 2019. DOI: [10.4336/2019.pfb.39e201701525](https://doi.org/10.4336/2019.pfb.39e201701525)

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

NAULI, R.; YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. In vitro culture of leaf explant *Melastoma malabathricum* L. on Murashige & Skoog (1962) modified medium with thidiazuron (TDZ) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA). **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v.481, n.1, 2020. DOI: [10.1088/1755-1315/481/1/012025](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012025)

NETA, T. R.; SANTIAGO, D. B.; SANTOS, W. M.; OLIVEIRA, J. D. S.; GALLO, C. M.; LEMOS, E. E. P. Micropropagação e aclimatização de duas espécies de pitaya sob diferentes concentrações de reguladores de crescimento e substratos. **Research, Society and Development**, v.11, n.17, e176111738756, 2022. DOI: [10.33448/rsd-v11i17.38756](https://doi.org/10.33448/rsd-v11i17.38756)

NIENOW, A. A.; CHURA, G.; PETRY, C.; COSTA, C. Enraizamento de estacas de quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.16, n.4, p.139-142, 2010.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. DOI: [10.4336/2013.pfb.33.76.481](https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481)

PRESTES, R. D.; DIEL, V. B. N.; GHELLAR, N. T. Potencial paisagístico de plantas nativas de Santo Ângelo-RS. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v.4, n.2, p. 27-39, 2020. DOI: [10.31512/ricsb.v4i2.280](https://doi.org/10.31512/ricsb.v4i2.280)

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; PAIVA, P. D. O.; NERY, M. C. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.12, n.1, p. 13-19, 2016.

RONDON, M. J. P.; SOUSA, T. I.; ARAUJO, D. A. A.; ARAUJO, I. S.; FERNANDES, D. A. Benefícios do carvão ativado no meio de cultura para os explantes de banana prata, nanica e terra. **Connectionline - Revista Eletrônica do Univag**, n.21, 2019. DOI: [10.18312/1980-7341.n21.2019.1391](https://doi.org/10.18312/1980-7341.n21.2019.1391)

SANTOS, J.; PINHEIRO, M. V. M.; SCHMIDT, D.; FONTANA, D. C.; PRETTO, M. M. Estabelecimento *in vitro* de oliveira ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’. **Ciência Florestal**, v. 29, n.2, p. 508-518, 2019. DOI: [10.5902/1980509831305](https://doi.org/10.5902/1980509831305)

SANTOS, S. C.; PINTO, F.; REZENDE, R. K. S.; DAMIANI, C. R. Germinação de sementes, indução e Análise morfo-histológica de calos de *Myrciraria glomerata* (O. Berg)

Amshoff. **Desenvolvimento da pesquisa científica, tecnologia e inovação na agronomia 3.** Capítulo 3. Ponta Grossa - PR: Atena, p.19-37, 2022. DOI: [10.22533/at.ed.7772223063](https://doi.org/10.22533/at.ed.7772223063)

SCHWALBERT, R.; MALDANER, J.; AMARAL, G. A.; AITA, M. F.; TAROUÇO, A. K. Multiplicação *in vitro* de *Desmodium incanum* em presença de carvão ativo. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.21, p. 1365-1373, 2015.

SILVA, T. T. S.; SPADA, G.; FARIA, M. F.; GOULART, L. M. L.; FURTADO, E. L.; PASSOS, J. R. S.; GUERRINI, I. A. Fitossanidade e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função da aplicação de fosfito e silício. **Summa Phytopathologica**, v.45, p.332-336, 2019. DOI: [10.1590/0100-5405/184112](https://doi.org/10.1590/0100-5405/184112).

SOARES, I. A.; MENEZES FILHO, A. C. P.; VENTURA, M. V. A. Biofábricas no cenário atual agrícola brasileiro: revisão. **Brazilian Journal of Science**, v.2, n. 1, p.16-33, 2023. DOI: [10.14295/bjs.v2i1.246](https://doi.org/10.14295/bjs.v2i1.246)

VERDE, D. S. V.; MENDES, M. I. S.; SOUZA, A. S.; PINTO, C. R.; NOBRE, L. V. C., MELO, J. E. S.; LEDO, C. A. S. Ácido ascórbico e polivinilpirrolidona no cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, e10510917812, 2021. DOI: [10.33448/rsd-v10i9.17812](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.17812)

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v.33, n.6, p.987-996, 2009. DOI: [10.1590/S0100-67622009000600001](https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000600001)

7 CAPÍTULO V

ORGANOGENESE DIRETA VIA MICROESTACAS DE *Pleroma heteromallum* (MELASTOMATACEAE)

7.1 RESUMO

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don, pertencente à família Melastomataceae, é uma espécie endêmica do Brasil que possui potencial ornamental. No geral, *Pleroma* spp. apresentam dificuldades de propagação via seminal, sendo propagadas vegetativamente por estaquia caular. A micropropagação surge como alternativa para produção de mudas em larga escala, em qualquer época do ano e com qualidade sanitária. O presente trabalho teve por objetivo investigar a resposta morfogênica de microestacas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* e, posteriormente, o desempenho das plântulas durante a aclimatização. Foram realizados quatro ensaios *in vitro*, durante os quais as microestacas foram subcultivadas em meio MS contendo diferentes combinações de BAP, AIB, PVP e carvão ativo para fins de indução de brotações e de raízes. O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado, sendo os frascos mantidos em estufa tipo B.O.D. sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, irradiância de $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Ao final dos ensaios foram avaliados o percentual de sobrevivência de microestacas, o percentual de microestacas oxidadas, o número de folhas das brotações, o comprimento de parte aérea, o comprimento da maior raiz, o número de raízes e o número de nós. As plântulas obtidas na etapa *in vitro* foram transferidas para vasos contendo substrato comercial Multiplant[®] e conduzidas para aclimatização em casa de vegetação. Após 30 dias de aclimatização avaliou-se o percentual de sobrevivência de mudas. O antioxidante PVP proporcionou efeito antagônico, uma vez que ocorreu a oxidação dos explantes deste tratamento. Meio MS contendo AIB inibe o alongamento de raízes. Considerando o custo-benefício na produção de mudas, sugere-se que o estabelecimento e o desenvolvimento *in vitro* das microestacas de *P. heteromallum* sejam feitos em meio MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores. A aclimatização das mudas em casa de vegetação resultou em 67% de sobrevivência. Resultados que indicam que a micropropagação é uma técnica alternativa promissora para produção de mudas de *P. heteromallum*.

Palavras-chave: Orelha-de-onça. Micropropagação. Aclimatização.

7.2 ABSTRACT

Pleroma heteromallum (D.Don) D.Don, belonging to the Melastomataceae family, is an endemic species of Brazil with ornamental potential. In general, *Pleroma* spp. are difficult to propagate via seed, and are propagated vegetatively by stem cuttings. Micropropagation has emerged as an alternative for large-scale seedling production at any time of the year and with sanitary quality. The present study aimed to investigate the morphogenic response of *P. heteromallum* microcuttings grown *in vitro* and, subsequently, the performance of the seedlings during acclimatization. Four *in vitro* assays were performed, during which the microcuttings were subcultured in MS medium containing different combinations of BAP, AIB, PVP and activated charcoal for the purpose of inducing shoots and roots. The experiment was conducted in a completely randomized design, with the flasks kept in a B.O.D. type greenhouse at a temperature of $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, irradiance of $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16 hours. At the end of the tests, the percentage of microcutting survival, the percentage of oxidized microcuttings, the number of shoot leaves, the length of the aerial part, the length of the largest root, the number of roots and the number of nodes were evaluated. The seedlings obtained in the *in vitro* stage were transferred to pots containing Multiplant[®] commercial substrate and acclimatized in a greenhouse. After 30 days of acclimatization, the percentage of seedling survival was evaluated. The antioxidant PVP provided an antagonistic effect, since oxidation of the explants from this treatment occurred. MS medium containing IBA inhibits root elongation. Considering the cost-benefit of seedling production, it is suggested that the establishment and *in vitro* development of *P. heteromallum* microcuttings be performed in MS medium with 100% of the original salt concentration and free of phytohormones. The acclimatization of seedlings in a greenhouse resulted in 67% survival. These results indicate that micropropagation is a promising alternative technique for the production of *P. heteromallum* seedlings.

Keywords: Jaguar ear. Micropropagation. Acclimatization.

7.3 INTRODUÇÃO

A família Melastomataceae compreende 177 gêneros e cerca de 5.750 espécies. Nativos no Brasil são descritos 69 gêneros e cerca de 1.430-40 espécies, presentes em todos os domínios fitogeográficos, com destaque na Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (GOLDENBERG et al., 2024). As espécies dessa família são úteis na restauração de ecossistemas, alimentação da avifauna, produção de fármacos, cercas, cabos de ferramentas, postes e na ornamentação (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2020; NAULI et al., 2020; BURGOS et al., 2023).

Dentre essas espécies, *Pleroma heteromallum* (D.Don) D.Don é um arbusto perene, de flores roxas e folhas cordiformes bastante pilosas, que, além da importância ecológica, possui potencial ornamental (LORENZI, 2015), fitorremediador (CUEVAS-REYES et al., 2018) e medicinal (KUSTER et al., 2009).

Estudos denotam que *Pleroma* spp., popularmente conhecidas por quaresmeiras, apresentam dificuldades de propagação via seminal, seja pela baixa taxa de germinação ou pela dificuldade no manuseio das diminutas sementes, sendo comumente propagadas vegetativamente, via estaquia ou alporquia (LORENZI, 2015; FRAGOSO et al., 2017; LATOH et al., 2022). Contudo, a propagação vegetativa tradicional também apresenta alguns entraves, como a sazonalidade de produção, demanda de grandes quantidades de material vegetativo e a sanidade das mudas (SILVA et al., 2019; LATOH et al., 2022).

Uma técnica alternativa de propagação de plantas é o cultivo *in vitro* ou micropropagação, que oferece amplas possibilidades para a produção de diferentes espécies vegetais (ALBINO et al., 2019). Em síntese, a técnica consiste no cultivo de sementes ou partes vegetativas denominadas de explantes em meio de cultura, sob condições assépticas e ambientais controladas, geralmente, qualidade e quantidade de luz, fotoperíodo e temperatura (HASNAIN et al., 2022). A última fase da propagação *in vitro* é conhecida por aclimatização; nesta fase as plântulas obtidas *in vitro* são transferidas para o ambiente *ex vitro* com a finalidade de corrigir alterações anatômicas e fisiológicas induzidas durante o cultivo *in vitro* (RODRIGUES et al., 2019). Trata-se de uma etapa crítica, representando, em muitos casos, as maiores perdas no cultivo de plantas *in vitro* (VICENTE e ARAUJO, 2020).

Vários métodos estão disponíveis para cultivo *in vitro* de plantas. A escolha do melhor método a ser utilizado depende da finalidade e objetivo de produção. Um dos métodos comumente utilizado é a organogênese direta, em que os órgãos são formados a partir de meristemas. Já na organogênese indireta a formação de órgãos ocorre a partir de células desdiferenciadas chamadas calos (HASNAIN et al., 2022).

Dentre as vantagens da propagação de plantas *in vitro*, destaca-se a produção de mudas em larga escala, em pequeno espaço e em qualquer época do ano; a garantia de mudas com qualidade fitossanitária; subsídios para estudos de melhoramento genético ou molecular; banco de germoplasmas e maior eficiência na germinação de sementes, neste caso, possibilitando a manutenção da variabilidade genética, produção de clones, dentre outros (PÊGO et al., 2015; PRUDENTE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019; PLESSIS et al., 2020).

Até o presente momento, não foram encontradas ou ainda são escassas pesquisas com regeneração de plantas de *P. heteromallum* através de cultivo *in vitro*. Estabelecer um método eficiente de micropropagação pode ser uma alternativa para tornar as mudas amplamente disponíveis, atendendo às demandas comerciais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfogênica de microestacas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro* e, posteriormente, o desempenho das plântulas durante a aclimatização.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 Estabelecimento de microestacas de *Pleroma heteromallum in vitro*

Microestacas apresentando cerca de 1.5 cm de altura, provenientes de plântulas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro*, foram inoculadas em tubos de ensaio.

O meio de cultura utilizado foi Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera®) com 100% da concentração original de sais (MS), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica) e 7,0 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISO FAR), sendo utilizado como tratamento controle (T1).

Os demais tratamentos foram constituídos do mesmo meio acrescido de 4.9 µM de AIB, 4.4 µM de BAP e 1 g L⁻¹ de PVP (T2); 4.9 µM de AIB, 4.4 µM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); 4.9 µM de AIB e 4.4 µM de BAP (T4) e 4.4 µM de BAP (T5).

O pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121 °C.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições. A unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio com aproximadamente 10 mL de meio de cultura contendo um explante por tubo.

Os frascos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas.

Após 42 dias de cultivo, avaliou-se o percentual de sobrevivência (PS), o percentual de explante oxidado (PO), o percentual de explante com calo (PC), o percentual de explante com broto (PB), o percentual de explante com raiz (PR), o número de brotos (NB), o número de raiz (NR), o comprimento do maior broto (CMB) e o comprimento da maior raiz (CMR) dos explantes.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, para as variáveis significativas os dados foram transformados [(x + 1)^{0,5}]. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

7.4.2 Subcultivo de brotações de *Pleroma heteromallum in vitro*

Estacas apresentando brotações oriundas dos tratamentos T1 e T3 do experimento anterior (Experimento I) foram transferidas para frascos contendo o meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições. A unidade experimental foi composta por frascos de vidro de 200 mL, contendo aproximadamente 20 mL do meio de cultivo e um explante (estaca com brotações) por frasco.

Os frascos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. (EletroLab Modelo EL 212) sob temperatura de aproximadamente 25±1°C, irradiância de aproximadamente 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente tubular (Philips TL-D 15W/75-6) e fotoperíodo de 16 horas.

Após 35 dias de cultivo *in vitro* foi avaliado o percentual de sobrevivência (PS), o número de brotos (NB), o comprimento do maior broto (CMB), o número de folhas da maior brotação (NFMB) e o número de raiz (NR) das plântulas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, sendo que para as variáveis significativas os dados foram transformados $[(x + 1)^{0.5}]$. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

7.4.3 Rizogênese em brotações de *Pleroma heteromallum in vitro*

Brotações com aproximadamente 3.0 cm de comprimento do experimento anterior (Experimento II) foram individualizadas e transferidas ao acaso para o meio de cultura MS suplementado com a auxina sintética ácido indol-3-butírico (AIB) nas seguintes concentrações: 0.0 μM (T1 - controle), 2.5 μM (T2), 4.9 μM (T3), 7.4 μM (T4) e 9.8 μM (T5).

Aos meios também foram adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 \pm 0,1 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos.

Os tubos foram mantidos na mesma B.O.D. e sob as mesmas condições ambientais do experimento anterior.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e oito repetições. A unidade experimental foi composta por um tubo de vidro com aproximadamente 20 mL de meio de cultura contendo uma brotação por tubo.

Após 42 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de sobrevivência de brotações (PS), o percentual de brotações oxidadas (PO), o número de folhas das brotações (NF), o comprimento de parte aérea (CPA), o comprimento da maior raiz (CMR), o número de raiz (NR), o número de raiz superficial (NRS) e o número de nós (NN).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, para as variáveis significativas os dados foram transformados $[(x + 1)^{0.5}]$. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram submetidas à regressão polinomial ao nível de 5% com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011). Os gráficos da regressão cúbica foram elaborados com o programa Microsoft Excel® 2010.

Além disso, foi utilizada a técnica PCA (Análise de Componentes Principais) para avaliar o comportamento das variáveis respostas em função dos tratamentos aplicados. As médias obtidas de cada um dos tratamentos foram escalonadas, de forma a padronizar as unidades das variáveis. O estimador utilizado foi $(x_i - \mu_{xi})/\sigma_{xi}$. A correlação de Pearson (1901) foi utilizada para estimar a matriz de similaridade. Para realizar essas análises estatísticas foi utilizado o *software* R (R CORE TEAM, 2021).

7.4.4 Alongamento de raízes e desenvolvimento *in vitro* e aclimatização de mudas de *Pleroma heteromallum*

A fim de promover o alongamento de raízes (gravitropismo positivo) das plântulas do experimento anterior, cujos tratamentos aplicados não às propiciou, foi realizado seu subcultivo durante 60 dias em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com vitaminas (Phygenera®) com 100% da concentração original de sais (MS), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose P.A. (Neon P.A. Laderquímica) e 7,0 g L⁻¹ de ágar (MicroMED ISO FAR).

O pH do meio foi ajustado para 5,8 \pm 0,1 antes da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121 °C.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Como tratamento considerou-se o histórico de cultivo das plântulas do experimento anterior (Experimento III) nos meios contendo as diferentes concentrações de AIB: 0.0 μM (T1 - controle), 2.5 μM (T2), 4.9 μM (T3), 7.4 μM (T4) e 9.8 μM (T5).

A unidade experimental composta de frascos de vidro de 200 mL, contendo aproximadamente 20 mL do meio de cultivo com duas plântulas por frasco, quatro repetições por tratamento, totalizando 20 unidades de observação.

Os frascos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC. Os mesmos foram mantidos em B.O.D. sob as mesmas condições ambientais do experimento anterior (Figura 40).



Figura 40. Frascos em B.O.D. contendo brotações de *Pleroma heteromallum* subcultivadas antes de serem aclimatizadas (Seropédica/RJ, 2022). Barra: 2.5 cm.

Após 60 dias de subcultivo as plântulas foram retiradas dos frascos e tiveram suas raízes lavadas em água corrente até a completa eliminação do meio de cultivo. Foi avaliado a massa fresca total (MF), o comprimento de parte aérea (CPA), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF), o número de raiz (NR), o comprimento da maior raiz (CMR) e número de nós (NN) das plântulas.

Para avaliação da MF foi utilizada balança eletrônica digital de precisão com quatro casas decimais. O CPA, CMF e CMR foram avaliados manualmente com uso de régua graduada, em milímetros. As avaliações para NF, NR e NN foram feitas manualmente por contagem e em todos os casos as avaliações foram feitas planta por planta.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, sendo que para as variáveis significativas os dados foram transformados segundo a equação $[(x + 1)^{0.5}]$. Em seguida, foi realizada a análise de variância a 5% e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* SISVAR 5.8 (FERREIRA, 2011).

As plântulas obtidas foram transferidas para vasos de polietileno (nº6 – 80 mL) contendo substrato comercial Mutiplant® (Figura 41) e posteriormente levadas para aclimatização em casa de vegetação, cuja cobertura era composta por telhas de polipropileno translúcidas.

O experimento foi constituído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 30 unidades de observação. Sendo cada unidade experimental composta por uma planta por vaso.

O substrato das plantas foi molhado manualmente, em dias alternados, com auxílio de proveta graduada, de modo a fornecer o mesmo volume (70 mL) de água por vaso.

Após 30 dias de aclimatização das mudas avaliou-se o percentual de sobrevivência das mesmas.



Figura 41. Plântulas de *Pleroma heteromallum* prontas para aclimatização Barra: 1.0 cm (Seropédica/RJ, 2023).

7.5 RESULTADOS

7.5.1 Estabelecimento de microestacas de *Pleroma heteromallum* *in vitro*

O teste de normalidade foi significativo para todas as variáveis, de modo que as mesmas foram transformadas antes da realização da análise de variância, esta que também foi significativa para todas as variáveis analisadas. Os resultados do teste de comparação de médias da propagação vegetativa de *P. heteromallum* via microestacas encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21. Médias do percentual de sobrevivência (PS), percentual de explante oxidado (PO), percentual de explante com calo (PC), percentual de explante com brotos (PB), percentual de explante com raiz (PR), número de brotos (NB), número de raiz (NR), comprimento do maior broto (CMB) e comprimento da maior raiz (CMR) em microestacas de *P. heteromallum* após 42 dias de inoculação em diferentes meios de cultivo (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	PS	PO	PC	PB	PR	NB	NR	CMB	CMR
	%					un		cm	
T1 (Controle)	100.00a	0.00a	0.00a	100.00a	85.71a	5.43a	2.43b	1.73ab	0.71ab
T2 (AIB + BAP + PVP)	28.57b	71.43b	14.28b	42.86b	0.00b	1.43b	0.00b	0.26b	0.00b
T3 (AIB + BAP + CA)	100.00a	0.00a	0.00a	100.00a	100.00a	3.43ab	6.71a	2.50a	1.29a
T4 (AIB + BAP)	28.57b	71.43b	42.86c	28.57b	28.57b	1.14b	1.57b	1.24ab	0.41b
T5 (BAP)	71.43ab	28.57ab	0.00a	100.00a	14.28b	2.43ab	0.14b	0.93ab	0.11b
Média Geral	65.71	34.29	11.43	74.29	45.71	2.77	2.17	1.33	0.51
CV (%)	12.31	13.71	11.58	10.25	11.27	37.53	35.64	24.56	17.29

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns: não significativo pelo teste F a 5%; CV: coeficiente de variação.

Meio MS (T1 - controle); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de PVP (T2); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB e 4.4 μM de BAP (T4); e Meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T5).

Pode-se observar que não houve oxidação em T1 (controle) e T3 (meio suplementado com carvão ativo), sendo o percentual de sobrevivência desses tratamentos estatisticamente superiores aos demais. Os tratamentos com adição de PVP (T2) e com adição de BAP e AIB (T4) ao meio de cultura apresentaram cerca de 71% de explantes oxidados. Enquanto que para o tratamento com adição de AIB (T5) observou-se 28,57% de explantes oxidados, este que estatisticamente não diferiu de nenhum dos demais tratamentos.

A calogênese, aqui não desejada, foi observada nos tratamentos T2 e T4, com o percentual de 14,28 e 42,86 de explantes com calos, respectivamente. A depender do objetivo do cultivo *in vitro*, esses tratamentos podem ser interessantes como, por exemplo, para regeneração de plantas via organogênese indireta.

Observou-se 100% de explantes com brotações para T1, T3 e T5, sendo estes tratamentos estatisticamente superiores aos tratamentos T2 (42,86%) e T4 (28,57%), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Contudo, posteriormente, em T5, houve a oxidação de aproximadamente 29% dos explantes.

Quanto a variável número de brotos, T1 foi estatisticamente superior aos demais tratamentos, com uma média de 5,43 brotações por microestaca.

Para T3 observou-se 100% de explantes com raiz, enquanto que para T1, T2, T4 e T5 esse percentual foi de 85,71%; 0%; 28,57%; e 14,28%, respectivamente. Estatisticamente T1 e T3 foram superiores aos demais tratamentos no percentual de raiz e ambos não diferiram

entre si. Em se tratando do número de raízes, T3 foi estatisticamente superior em relação aos demais tratamentos, com uma média de 6,71 raízes por microestaca.

Os resultados obtidos sugerem que houve um efeito negativo ou nulo da adição de BAP na indução e no número de brotações e um efeito benéfico da adição de AIB na indução e no número de raízes em microestacas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro*. T3 foi significativamente superior para as variáveis comprimento do maior broto e comprimento da maior raiz, sugerindo efeito benéfico da combinação de AIB, BAP e carvão ativo para estas variáveis.

Para a propagação vegetativa *in vitro* de *P. heteromallum* a partir de microestacas, pode-se constatar que o antioxidante PVP proporcionou efeito antagônico, uma vez que ocorreu a oxidação dos explantes deste tratamento. No tratamento com carvão ativo não houve oxidação das microestacas bem como a promoção da calogênese, o mesmo parece inibir este processo.

Os tratamentos T1 e T3 mostraram-se os mais promissores para obtenção de brotações e enraizamento a partir de microestacas de *P. heteromallum* cultivadas *in vitro*, assim o produtor deve levar em consideração o custo-benefício na escolha desses tratamentos.

Nas Figuras 42 e 43 têm-se as microestacas de *P. heteromallum* aos 21 e 42 dias de inoculação nos diferentes tratamentos.

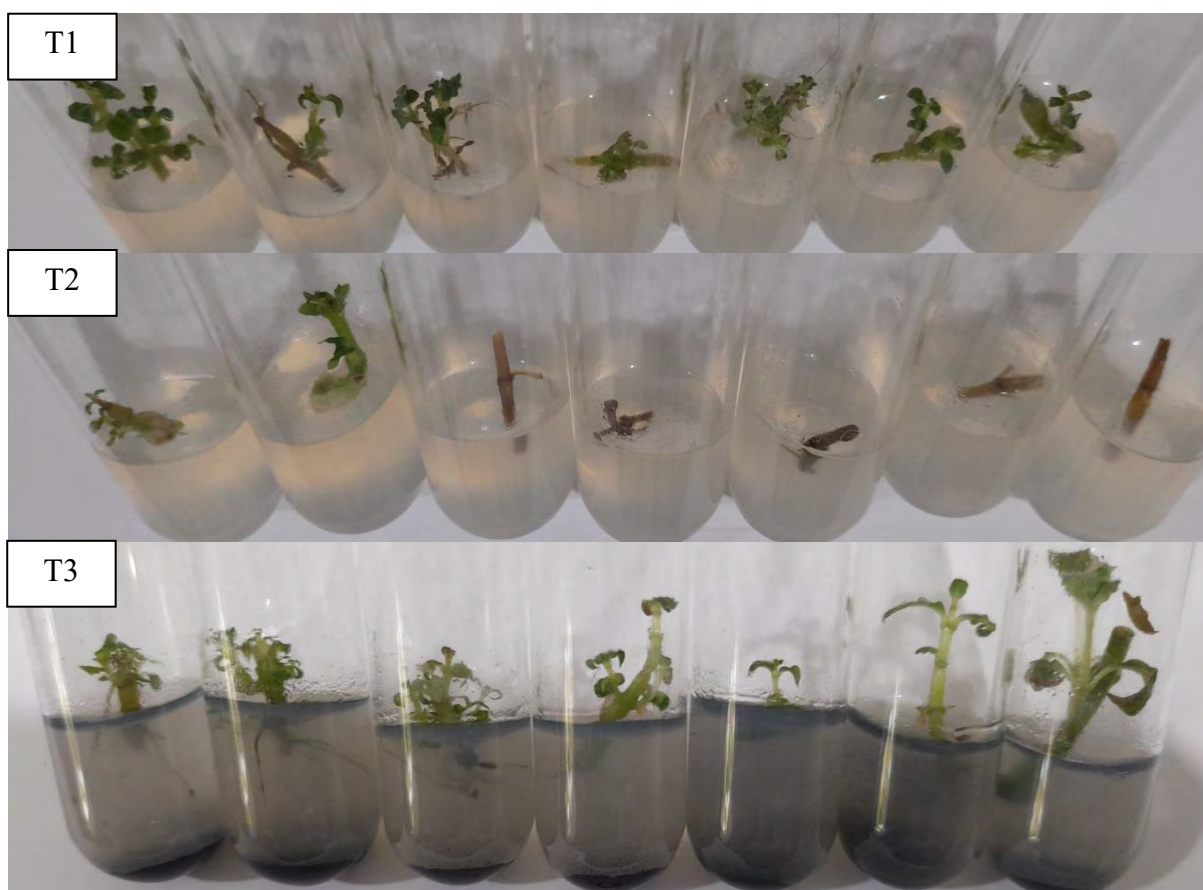
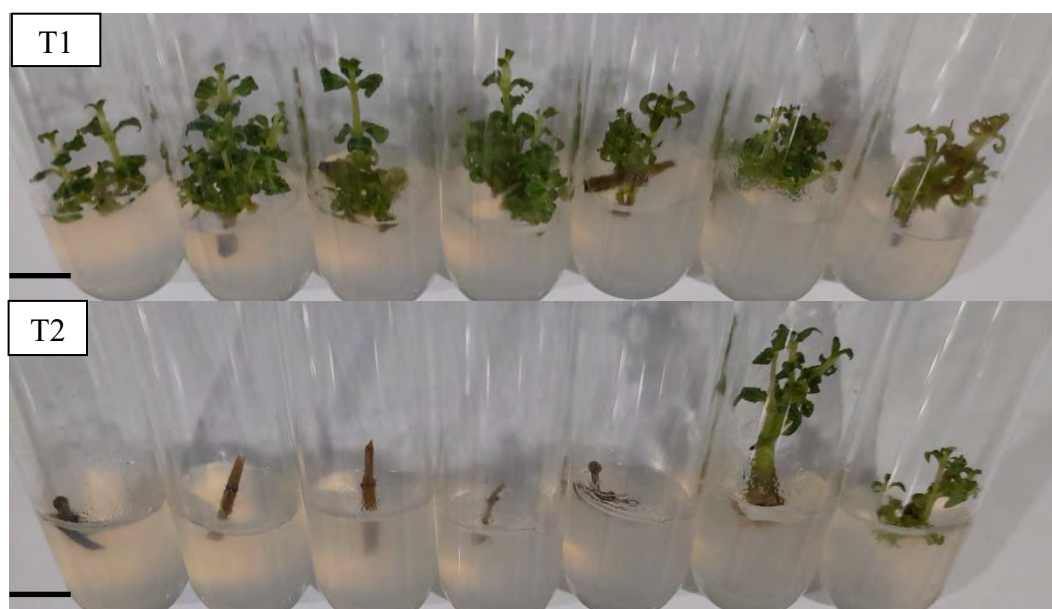




Figura 42. Microestacas de *Pleroma heteromallum* após 21 dias de inoculação em diferentes tratamentos (Seropédica/RJ, 2022).

Legenda: Meio MS (T1 - controle); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de PVP (T2); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB e 4.4 μM de BAP (T4); e Meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T5).



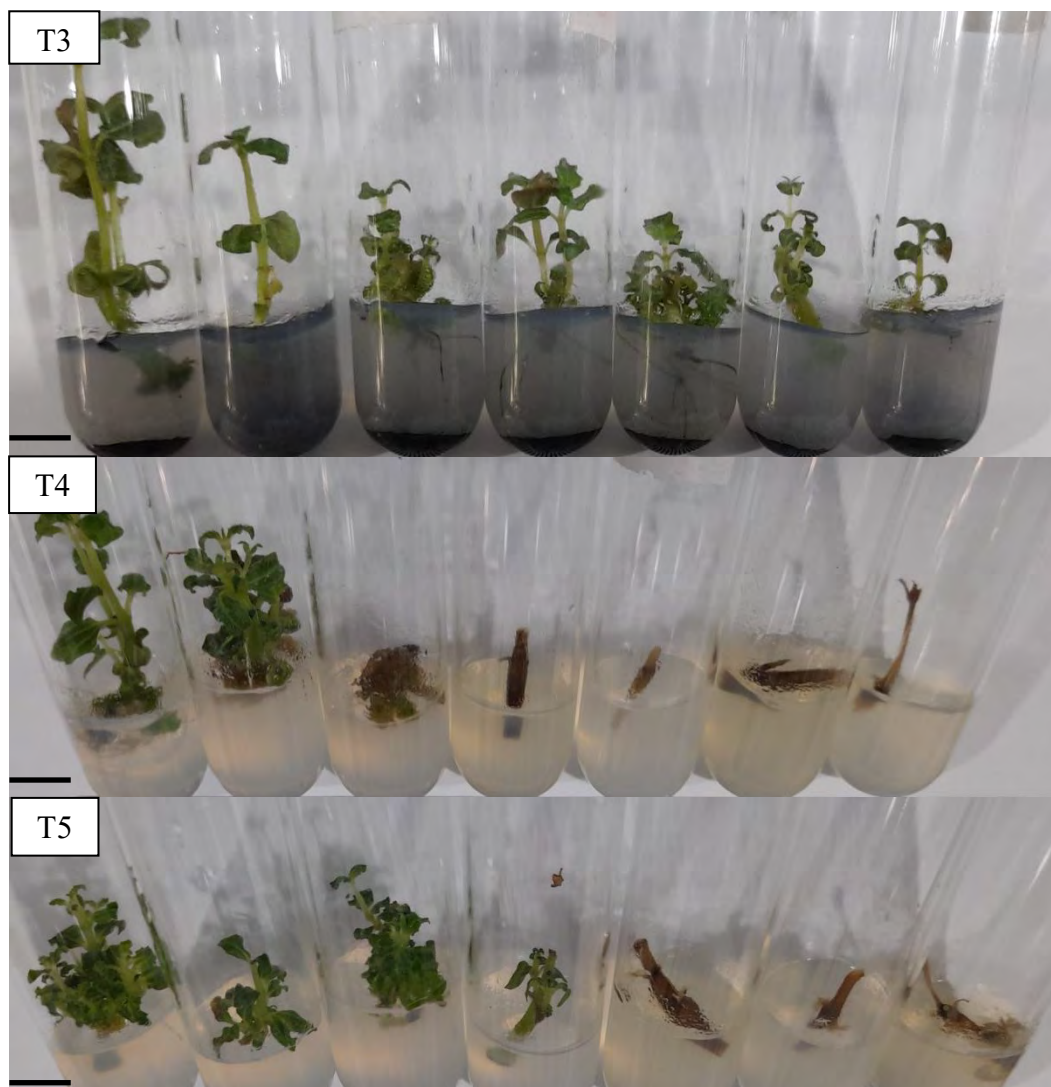


Figura 43. Microestacas de *Pleroma heteromallum* após 42 dias de inoculação nos diferentes tratamentos (Seropédica/RJ, 2022). Barra de 1.0 cm.

Legenda: Meio MS (T1 - controle); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de PVP (T2); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3); Meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB e 4.4 μM de BAP (T4); e Meio MS acrescido de 4.4 μM de BAP (T5).

7.5.2 Subcultivo de brotações de *Pleroma heteromallum in vitro*

O teste de normalidade foi significativo para as variáveis NB e NFMB, de modo que as mesmas foram transformadas antes da realização da análise de variância.

De acordo com a análise de variância, não houve diferenças significativas entre os tratamentos T1 e T3 para as características avaliadas (Tabela 22), durante a etapa de subcultivo das plântulas em meio MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores e antioxidantes. Obteve-se 100% de sobrevivência das plântulas em ambos os tratamentos.

Tabela 22. Médias do percentual de sobrevivência de explante (PS), número de brotos (NB), número de raiz (NR), número de folhas da maior brotação (NFMB) e comprimento da maior brotação (CMB), após 35 dias de subcultivo *in vitro* de plântulas de *P. heteromallum* em meio MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores.

Tratamento	PS	NB	NR	NFMB	CMB
	%		un		cm

T1 (Controle)	100.00 ns	6.71 ns	5.86 ns	8.14 ns	4.01 ns
T3 (AIB + BAP + CA)	100.00 ns	3.86 ns	7.00 ns	8.29 ns	5.20 ns
Média Geral	100.00	5.29	6.43	8.21	4.61
CV (%)	0.00	31.02	26.36	8.83	16.03

ns: não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$); CV: coeficiente de variação; plântulas oriundas de cultivo *in vitro* em meio MS com 100% da concentração original de sais (T1); plântulas oriundas de cultivo *in vitro* em meio MS com 100% da concentração original de sais acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo (T3).

O desenvolvimento das plântulas pode ser observado na Figura 44.



Figura 44. Microestacas de *Pleroma heteromallum* provenientes dos tratamentos T1 (meio MS-controle) (A) e T3 (meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB, 4.4 μM de BAP e 1 g L⁻¹ de carvão ativo) (B) aos 35 dias de subcultivo em meio MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores e antioxidantes. Barra: 2.0 cm (Seropédica/RJ, 2022).

7.5.3 Rizogênese em brotações de *Pleroma heteromallum in vitro*

O teste de normalidade foi significativo para todas as variáveis analisadas, de modo que as mesmas foram transformadas antes da realização da análise de variância.

Os resultados médios da etapa de enraizamento *in vitro* das brotações de *P. heteromallum* encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23. Média do percentual de sobrevivência (PS), percentual de oxidação (PO), número de folhas (NF), número de raiz (NR), número de raiz superficial (NRS), número de nós (NN), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento da maior raiz (CMR) em brotos de *P. heteromallum* após 60 dias de inoculação em diferentes meios de enraizamento *in vitro* (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	PS	PO	NF	NR	NRS	NN	CPA	CMR
	%	%						
T1 (controle)	100.00	0.00	17.38	6.63	4.75	5.00	4.98	3.63
T2 (2.5 μM de AIB)	50.00	50.00	6.50	0.89	3.50	2.75	2.46	0.11
T3 (4.9 μM de AIB)	50.00	50.00	8.25	0.00	4.25	2.00	2.39	0.00
T4 (7.4 μM de AIB)	100.00	0.00	23.38	0.00	16.50	4.00	4.51	0.00
T5 (9.8 μM de AIB)	62.50	37.50	8.88	0.00	7.38	3.38	4.81	0.00
Média Geral	72.50	27,50	12.88	1.50	7.28	3.43	3.83	0.75

De acordo com a análise de variância não houve diferença significativa para comprimento de parte aérea e número de nós das microestacas brotadas. Na Figura 45 têm-se a análise de regressão para as variáveis significativas em relação às diferentes concentrações de AIB testadas. Observaram-se curvas de regressão polinomial de terceiro grau para todas essas variáveis.

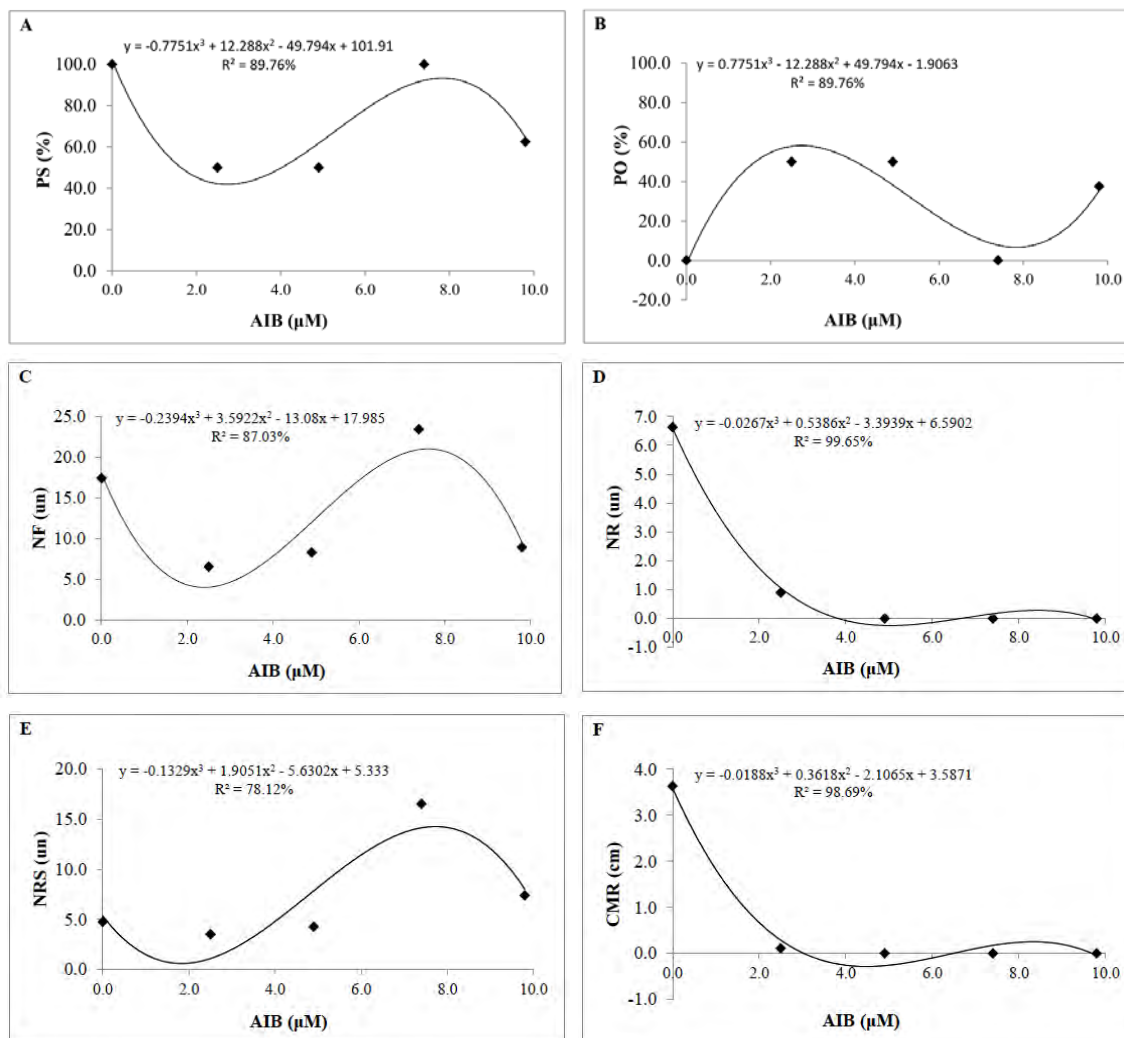


Figura 45. Regressão polinomial dos valores médios do percentual de sobrevivência (A), percentual de oxidação (B), número de folhas (C), número de raízes (D), número de raízes superficiais (E) e comprimento da maior raiz (CMR) em microestacas de *Pleroma heteromallum* cultivadas *in vitro* por 42 dias em meio MS contendo diferentes concentrações de AIB.

O maior percentual de sobrevivência de microestacas (100%) foi observado na ausência de AIB ao meio de cultura (T1) e no tratamento contendo 7.4 μM de AIB (T4) (Figura 45A). De modo que o percentual de oxidação foi menor (0%) nestes mesmos tratamentos (Figura 45B). O maior número de folhas e de raízes superficiais ocorreu na concentração de 7.4 μM de AIB (T4) (Figura 45C e 45E). Entretanto, durante as avaliações biométricas notaram-se plantas com excessivo número de brotos, tamanho das folhas reduzidas, encurtamento dos entrenós, sugerindo características de plântulas hiper-hídricas neste tratamento (Figuras 46 e 47). O número de raízes e o comprimento da maior raiz

apresentaram as maiores médias em meio MS isento de AIB (T1), com média de 6,63 e 3,63, respectivamente (Figura 45D e Figura 45F).



Figura 46. Brotações de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de enraizamento aos 42 dias de cultivo *in vitro* (Seropédica/RJ, 2022). Barra 1.0 cm.

Legenda: meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB – controle (T1); meio MS acrescido de 2.5 μM de AIB (T2); meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB (T3); meio MS acrescido de 7.4 μM de AIB (T4); e meio MS acrescido de 9.8 μM de AIB (T5).

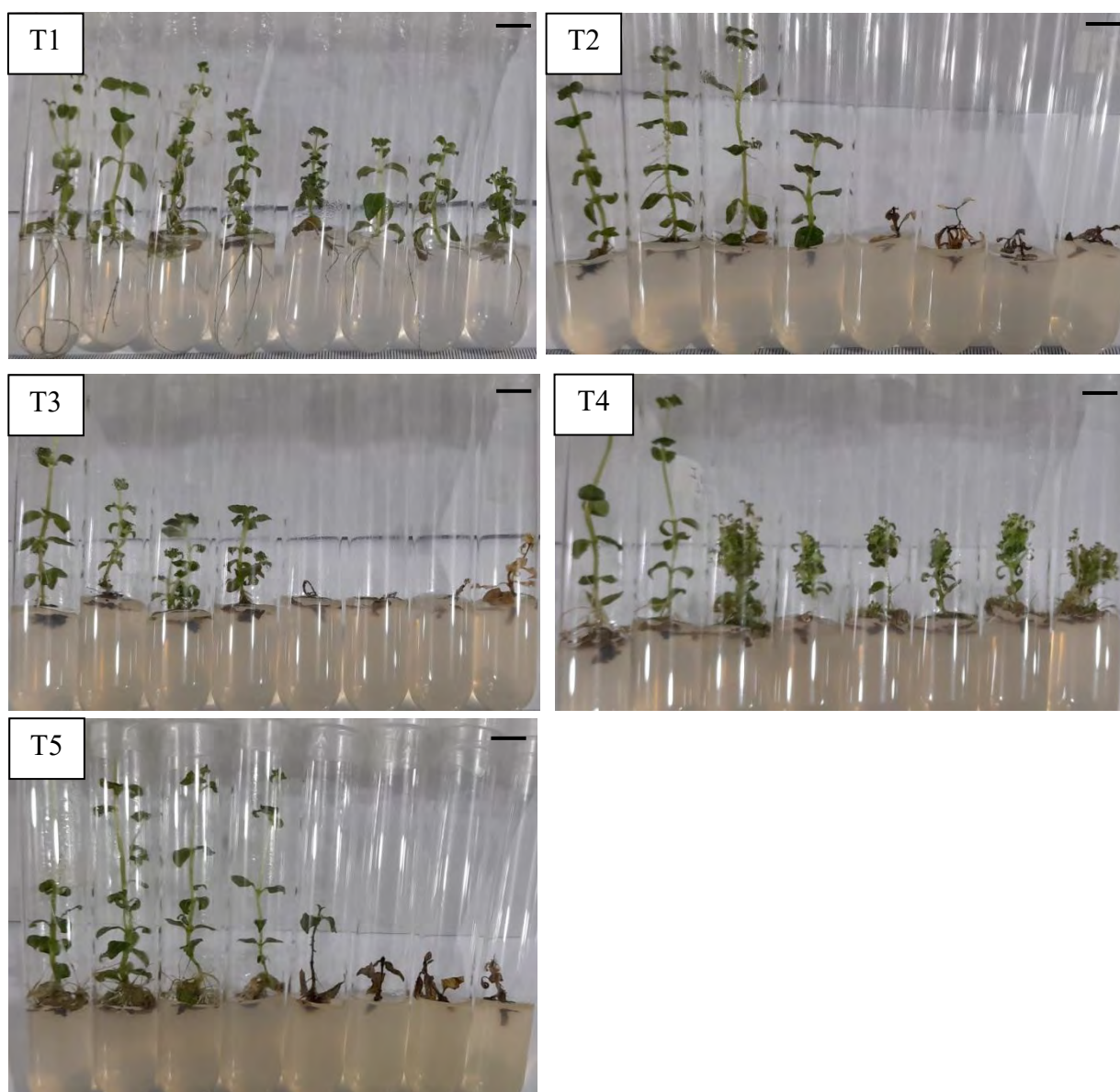


Figura 47. Brotações de *Pleroma heteromallum* nos diferentes meios de enraizamento aos 42 dias de cultivo *in vitro* Barras: 1.0 cm (Seropédica/RJ, 2022).

Legenda: meio MS (T1 - controle); meio MS acrescido de 2.5 μM de AIB (T2); meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB (T3); meio MS acrescido de 7.4 μM de AIB (T4); e meio MS acrescido de 9.8 μM de AIB (T5).

O resultado obtido a partir da Análise de Componentes Principais (PCA) indicou que não houve problema de multicolinearidade e que os dois primeiros componentes explicam 94,38% da variabilidade existente entre os tratamentos (meios de cultura) aplicados e as variáveis analisadas, sendo que o primeiro componente principal explica 68,53% e o segundo 25,85% dessa variabilidade.

A análise de dispersão de dados (Figura 48) demonstrou que T2 e T3 apresentaram correlação positiva para percentual de oxidação das brotações. Enquanto que T1 (controle) apresentou correlação positiva para número de raiz, comprimento de maior raiz e número de nós; T4 correlação positiva para número de raízes superficiais, número de folhas, comprimento de parte aérea e percentual de sobrevivência e T5 apresentou resultados intermediários dentre os tratamentos testados, mas com tendência de oxidação de explantes.

Ressalta-se que em T4 as brotações apresentaram aspecto de hiper-hidricidade, anomalia não desejada no cultivo de plantas *in vitro*.

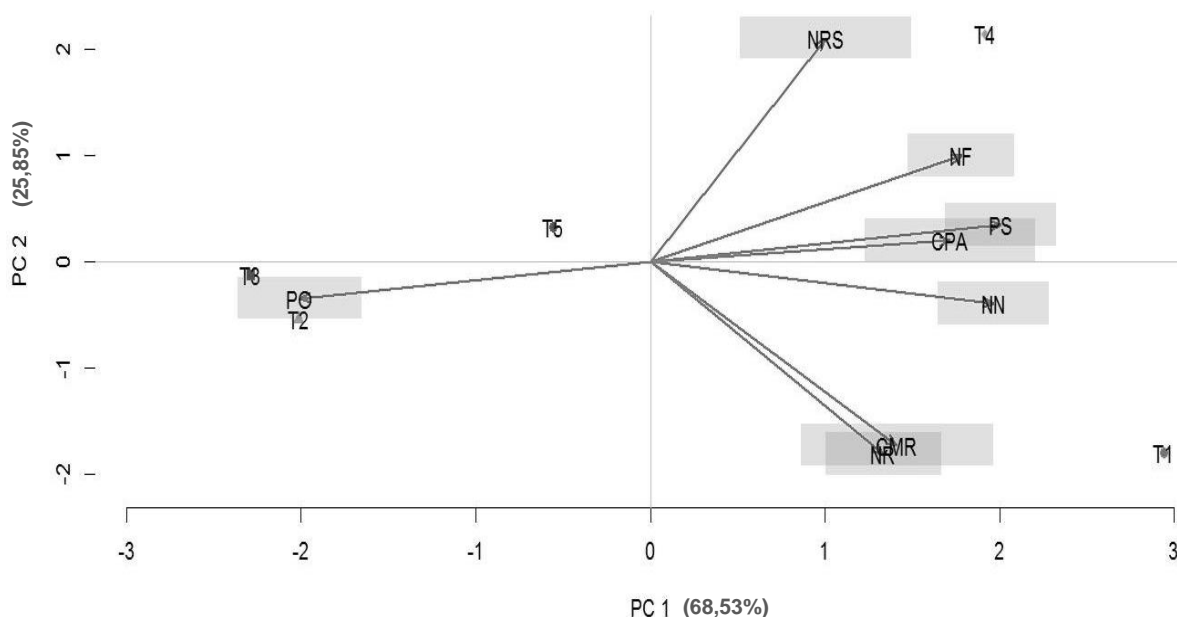


Figura 48. Gráfico obtido a partir da Análise de Componentes Principais (PCA) descrevendo a relação entre os tratamentos (meios de cultura) aplicados e as variáveis analisadas durante a etapa de enraizamento *in vitro* de brotações de *Pleroma heteromallum*. O posicionamento de cada variável no gráfico representa seu comportamento em relação às demais e aos tratamentos aplicados, de modo que uma maior proximidade entre as variáveis indica uma maior correlação entre elas, bem como aos tratamentos aplicados (Seropédica/RJ, 2022).

Legenda: Percentual de sobrevivência (PS); Percentual de oxidação (PO); Número de folhas (NF); Comprimento de parte aérea (CPA); Comprimento da maior raiz (CMR); Número de raiz (NR); Número de raízes superficiais (NRS); Número de nós (NN); Meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB – controle (T1); meio MS acrescido de 2.5 μM de AIB (T2); meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB (T3); meio MS acrescido de 7.4 μM de AIB (T4); meio MS acrescido de 9.8 μM de AIB (T5).

7.5.4 Alongamento de raízes e desenvolvimento das plântulas de *Pleroma heteromallum in vitro*

Após 60 dias de subcultivo das plântulas, observou-se o crescimento da parte aérea, como folhas e caule e o crescimento de raízes em direção ao meio de cultivo MS isento de fitorreguladores e antioxidantes (Figura 49), processo que não ocorreu com as brotações de *P. heteromallum* cultivadas em meio MS contendo AIB. Este fato sugere o efeito antagônico da adição deste fitorregulador ao meio de cultivo no desenvolvimento de raízes das plântulas.

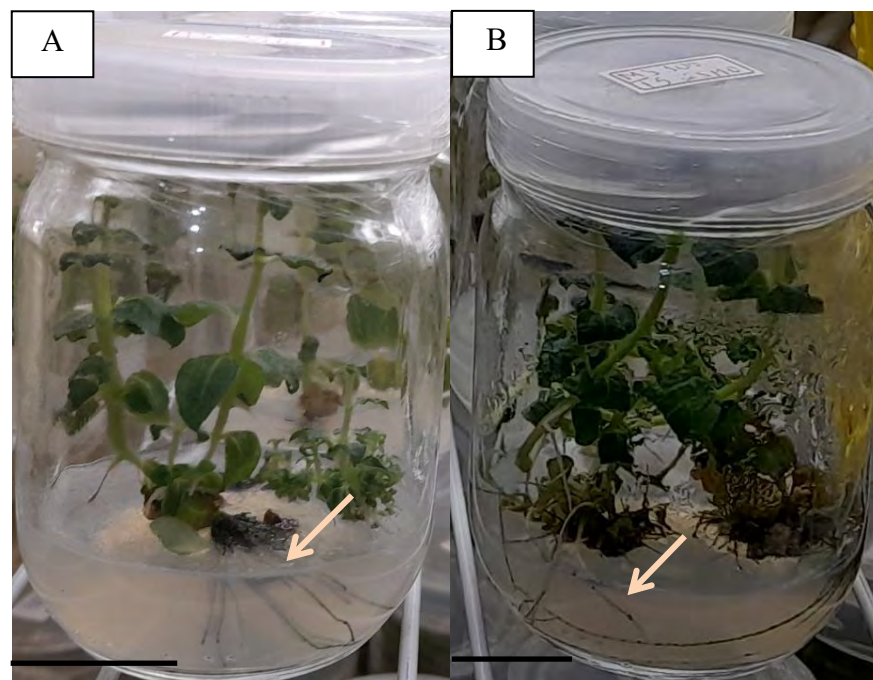


Figura 49. Brotações de *Pleroma heteromallum* após 60 dias de subcultivo em meio MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores. Setas indicando raízes que se desenvolveram durante o subcultivo de brotações em T3 (A) e em T5 (B) (Seropédica/RJ, 2022). Barras: 2.5 cm.

O teste de normalidade foi significativo para as variáveis CMF e CMR, de modo que as mesmas foram transformadas antes da realização da análise de variância. A análise de variância foi significativa para todas as variáveis analisadas e o resultado do teste de médias encontra-se na Tabela 24.

Tabela 24. Médias para massa fresca total (MF), comprimento de parte aérea (CPA), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de raiz (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e número de nós (NN) em brotos de *P. heteromallum* após 60 dias de subcultivo em meio MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores e antioxidantes (Seropédica/RJ, 2022).

Tratamento	MF	CPA	CMF	CMR	NF	NR	NN
	g	cm	cm	cm		un	
T1 (oriundas de T1 - controle)	1.17ab	9.45b	1.18a	7.18a	42.50b	13.75b	10.25ab
T2 (oriundas de 2.5 μ M de AIB)	0.45b	9.35b	1.53a	1.38b	17.25c	11.00b	8.75bc
T3 (oriundas de 4.9 μ M de AIB)	0.99ab	8.18bc	1.28a	3.78ab	30.50bc	12.75b	10.00ab
T4 (oriundas de 7.4 μ M de AIB)	1.78a	2.53c	0.01b	1.95b	69.75a	10.00b	2.75c
T5 (oriundas de 9.8 μ M de AIB)	1.70a	18.50a	1.60a	3.38ab	35.50bc	24.75a	16.75a
Média Geral	1.22	9.60	1.12	3.53	39.10	14.45	9.70
CV (%)	37.09	31.53	6.28	22.55	21.61	34.66	33.78

CV: coeficiente de variação; médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 0.0 μ M de AIB – controle (T1); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 2.5 μ M de AIB (T2); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 4.9 μ M de AIB (T3); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 7.4 μ M de AIB (T4); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 9.8 μ M de AIB (T5).

Plântulas oriundas dos tratamentos T4 e T5 apresentaram as maiores médias para a variável MF. O teste de média demonstrou que as plântulas provenientes de T5 apresentaram médias estatisticamente superiores para as variáveis CPA, NR e NN quando comparado aos demais tratamentos. Quanto ao parâmetro CMF, T4 foi inferior aos demais tratamentos, esses que não apresentaram diferença significativa entre si. Para CMR T1, T3 e T5 apresentaram média estatisticamente superior aos demais tratamentos. Entretanto, T3 e T5 também não diferiram do tratamento T2. Enquanto que T4 foi estatisticamente inferior aos demais tratamentos para essa variável.

Após 30 dias de aclimatização das plântulas observou-se o percentual de sobrevivência de 67% das mudas. Observou-se que mudas provenientes dos tratamentos T1, T2 e T5 estavam mais vigorosas ao final desse período (Figuras 50 e 51).



Figura 50. Mudanças de *Pleroma heteromallum* após 30 dias de aclimatização em substrato Multiplant[®]. Barra: 1 cm (Seropédica/RJ, 2023).

Legenda: plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB – controle (T1); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 2.5 μM de AIB (T2); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB (T3); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 7.4 μM de AIB (T4); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 9.8 μM de AIB (T5).



Figura 51. Mudas de *Pleroma heteromallum* após 30 dias de aclimatização em substrato Multiplant[®]. Barra: 1 cm (Mendes/RJ, 2023).

Legenda: plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 0.0 μM de AIB – controle (T1); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 2.5 μM de AIB (T2); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 4.9 μM de AIB (T3); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 7.4 μM de AIB (T4); plântulas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de 9.8 μM de AIB (T5).

7.6 DISCUSSÃO

Constatou-se que a adição dos fitorreguladores BAP e AIB ao meio de cultura contribuiu para a oxidação das microestacas de *P. heteromallum*, mesmo na presença do antioxidante PVP no meio de cultivo. Entretanto, o uso de carvão ativo mostrou-se eficiente, controlando 100% da oxidação das microestacas. Este fato que pode ser explicado pelo diferente modo de ação destes antioxidantes.

De acordo com Goulart et al. (2010) o carvão ativo age promovendo a adsorção dos exsudatos liberados pelo explante, os quais provocam a oxidação. Também possui as propriedades de adsorver e reduzir a disponibilidade de auxina exógena no meio de cultura. Já o PVP reage com os compostos oxidantes e seu efeito principal está relacionado com a capacidade de inibir a liberação de compostos fenólicos.

A adição dos fitorreguladores BAP e AIB ao meio de cultivo apresentou efeito antagônico na promoção de raízes e brotações. Contudo, no tratamento T2, embora os fitorreguladores BAP e AIB estejam presentes, possivelmente estes foram adsorvidos pelo carvão ativo e não ficaram disponíveis para os explantes (microestacas), não sendo observado o efeito antagônico desses fitorreguladores. Puttkammer (2015) também constatou que o AIB apresentou efeito negativo para número de brotos e raízes quando não combinado ao carvão ativo na micropropagação de morangueiro.

O tratamento composto por BAP + AIB + carvão ativo apresentou superioridade para o número de raízes, o comprimento da maior brotação e comprimento da maior raiz. Kozak e Wnuk (2012) constataram que a aplicação combinada de BAP e AIA (ácido indol acético) não teve efeito significativo na indução de brotações axilares de *Tibouchina urvilleana* (Melastomataceae) e que o comprimento dos brotos foi inibido com o aumento da concentração de BAP ao meio de cultivo.

Contudo, levando-se em consideração os custos-benefícios da adição de fitorreguladores e antioxidantes ao meio de cultivo, o tratamento isento desses compostos (controle) pode ser considerado o mais interessante para estabelecimento das microestacas de *P. heteromallum in vitro*. Flores et al. (2015) sugerem o uso do meio MS isento de fitorreguladores para otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (batata-doce).

Os resultados para rizogênese *in vitro* mostrou que raízes adventícias crescem em comprimento e se inserem em meio de cultivo isento do fitorregulador AIB (tratamento controle) ou na concentração de 2.5 μM de AIB. Contudo em meio isento de AIB o número de raízes e o comprimento da maior raiz é estatisticamente superior. Observou-se também que, para todos os tratamentos, houve a emissão de raízes adventícias laterais, aqui denominadas de raízes superficiais, uma vez que não crescem em direção ao meio de cultivo.

Além disso, os resultados do ensaio de rizogênese, observados no terceiro experimento, sugerem que o AIB possa contribuir para a oxidação das microestacas, uma vez que apenas em meio isento desse fitorregulador não houve oxidação de estacas.

Latoh et al. (2018) e Latoh et al. (2022) testaram diferentes concentrações de AIB no enraizamento de estacas *Tibouchina heteromalla* (sin. *P. heteromallum*) e constataram que o uso de AIB é dispensável para o enraizamento adventício da espécie. Os resultados do presente trabalho e de outros autores sugerem que *P. heteromallum* possui concentrações endógenas de auxina apresentando, portanto, efeito antagônico do AIB na rizogênese *in vitro* de microestacas.

Durante a rizogênese, sobretudo de espécies lenhosas, pode haver toxidez por auxina, que se torna evidente na fase de alongamento de raízes. Radmann et al. (2002) recomendaram a utilização de dois meios de cultura no processo de rizogênese: primeiro, a estaca é cultivada em meio contendo auxina, favorecendo a indução de raízes e, posteriormente, esta deve ser

transferida para um meio sem auxina, estimulando assim a rizogênese e o crescimento das raízes. Os estudos de Radmann et al. (2002) corroboram com os resultados encontrados no quarto experimento, pela transferência das plântulas para meio MS isento de fitorreguladores, onde se constatou o alongamento/crescimento de raízes em direção meio.

Além do mais, as brotações cultivadas no meio contendo AIB na concentração de 7.4 μM apresentaram aspecto de hiper-hidricidade, o que não é interessante no processo de multiplicação da espécie *in vitro*.

Morfologicamente plantas hiper-hidricas podem apresentar caules e folhas túrgidas, espessas, enrugadas, torcidas, translúcidas, rígidas e facilmente quebráveis, encurtamento dos entrenós e uma aparência morfológica que sugere excesso de água (VASCONCELOS et al., 2012).

A hiper-hidricidade é um distúrbio fisiológico comum associado ao cultivo *in vitro* de plantas, cujos principais fatores que influenciam são a composição mineral e hormonal do meio de cultivo e as condições de cultivo (POLIVANOVA e BEDAREV, 2022). Mediante o exposto, sugere-se que a concentração de 7.4 μM de AIB ao meio de cultura foi o fator determinante para ocorrência de hiper-hidricidade nas brotações, uma vez que nos demais tratamentos esse distúrbio não ocorreu.

Neste estudo constatou-se 67% de sobrevivência de mudas durante o período de aclimatização de *P. heteromallum*, valor superior ao relatado por Prudente et al. (2016), que constataram a sobrevivência de aproximadamente 55% das mudas de *Miconia ligustroides* durante a aclimatização. Contudo, alguns estudos demonstram percentuais superiores para outras espécies de Melastomataceae como, por exemplo, Zeng et al. (2008) relataram 86% de sobrevivência de mudas de *Tigridiopalma magnifica* após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação. Lawrence e Murugan, (2017) constataram 90% de sobrevivência de mudas durante a aclimatização de *Osbeckia aspera* e Burgos et al. (2019) obtiveram cerca de 94% de sobrevivência de mudas de *Bucquetia glutinosa* através da aclimatização em casa de vegetação.

O resultado observado na aclimatização de mudas de *P. heteromallum* pode ser considerado satisfatório, porém, ajustes na metodologia utilizada são sugeridos, ou mesmo a realização de outros testes a fim de possibilitar maior percentual de sobrevivência de mudas durante essa etapa.

7.7 CONCLUSÃO

A organogênese direta a partir de microestacas é uma alternativa eficaz para multiplicação de *P. heteromallum*, podendo ser realizada utilizando meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) isento de fitorreguladores e as mudas aclimatizadas em casa de vegetação, com taxa de 67% de sobrevivência de mudas.

7.8 REFERÊNCIAS

- ALBINO, B. É. S.; CANATTO, R. A.; CORDEIRO, A. T.; FUKUSHIMA, C. H.; PILON, A. M. Propagação *in vitro* de "jequitibá-branco" (*Cariniana estrellensis*): uma alternativa para programas de reflorestamento. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 2, p. 88-99, 2019. DOI: [10.18011/bioeng2019v13n2p88-99](https://doi.org/10.18011/bioeng2019v13n2p88-99)
- BURGOS, C. A. C.; BARRERA, J. A.; QUINTERO, M. A. B.; HERRERA, Y. H.; MALDONADO, J. C. P. Propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Paramos colombianos. **Rodriguésia**, v.70, e00682018, 2019. DOI: [10.1590/2175-7860201970057](https://doi.org/10.1590/2175-7860201970057)
- BURGOS, C. A. C.; MURCIA, J. E. R.; RAMÍREZ, L. A. E.; SALAMANCA, R. A. P. **Propagación de flora nativa: Experiencias desde el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis: Aplicación de técnicas tradicionales y biotecnológicas**. Primera edición. – Bogotá, D. C.: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, 2023. 369 p.
- CUEVAS-REYES, P.; PEREIRA, G. C. N.; GÉLVEZ-ZÚÑIGA, I.; FERNANDES, G. W.; VENÂNCIO, H.; SANTOS, J. C.; MALDONADO-LÓPEZ, Y. Effects of ferric soils on arthropod abundance and herbivory on *Tibouchina heteromalla* (Melastomataceae): is fluctuating asymmetry a good indicator of environmental stress? **Plant Ecology**, v.219, p.69-78, 2018. DOI: [10.1007/s11258-017-0778-y](https://doi.org/10.1007/s11258-017-0778-y)
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L., MANCIPE-MURILLO, C., CALDERÓN-HERNÁNDEZ, M. Evaluación de dos métodos de propagación para la conservación *ex situ* de tres melastomátáceas altoandinas. **Caldasia**, v.42, n.1, p.129-141, 2020.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, p.109-112, 2014. DOI: [10.1590/S1413-70542014000200001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001)
- FLORES, R.; MAGGIO, L. P.; FLÔRES, P. Z.; BEMPCK, G. S.; AULER, N. M. F.; CARVALHO, J. F. C.; GODOI, R. S.; FRANZIN, S. M.; BECKER, L.; SILVEIRA, T. M. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n.3, p.429-437, 2015.
- FRAGOSO, R. O.; STUEPP, C. A.; SÁ, F. P.; KRATZ, D.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Vegetative rescue and *ex vitro* system production of *Tibouchina sellowiana* clonal plants by cutting and mini-cutting. **Ciência Rural**, v.47, n.11, 2017. DOI: [10.1590/0103-8478cr20160098](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160098)
- GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; MICHELANGELI, F. A.; GUIMARÃES, P. J. F.; ROMERO, R.; VERSIANE, A. F. A.; FIDANZA, K.; VÖLTZ, R. R.; SILVA, D. N.; LIMA, L. F. G.; SILVA-GONÇALVES, K. C.; BACCI, L. F.; FONTELAS, J. C.; PACIFICO, R.; BRITO, E. S.; ROCHA, M. J. R.; CADDAM, M. K.; MEIRELLES, J.; ROSA, P.; FERREIRA-ALVES, R.; SANTOS, A. K. A.; MOREIRA, K. V. C.; REGINATO, M.; OLIVEIRA, L. F. A.; FREIRE-FIERRO, A.; AMORIM, A. M. A.; MARTINS, A. B.; ALMEDA, F.; HINOSHITA, L. K. R.; KRIEBEL, R.; MEYER, F. *S. Melastomataceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB161>>. Acesso em: 02 jun. 2024

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, v.34, n.6, p.961-972, 2010. DOI: [10.1590/S0100-67622010000600001](https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000600001)

HASNAIN, A; NAQVI, S. A. H.; AYESHA, S. I.; KHALID, F.; ELLAHI, M.; IQBAL, S.; HASSAN, M. Z.; ABBAS, A.; ADAMSKI, R.; MARKOWSKA, D.; BAAZEEM, A.; MUSTAFA, G.; MOUSTAFA, M.; HASAN, M. E.; ABDELHAMID, M. M. A. Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, v.13, 1009395, 2022. DOI: [10.3389/fpls.2022.1009395](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395)

KOZAK, D.; WNUK, K. The influence of the salt composition of basal medium and growth regulators on *in vitro* growth and development of *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v.11, n.6, p. 59-68, 2012.

KUSTER, Ricardo Machado; ARNOLD, Norbert; WESSJOHANN, Ludger. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, n.1 p.63-65, 2009. DOI: [10.1016/j.bse.2009.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.01.005)

LATOH, L.P.; DALLAGRANA, J. F.; PORTES, D. C.; MAGGIONI, R. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa via estaca caulinar de espécies do gênero *Tibouchina* spp. nas estações do ano. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, n.1, p.17-41, 2018. DOI: [10.21674/2448-0479.41.17-41](https://doi.org/10.21674/2448-0479.41.17-41)

LATOH, L. P.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa, produtividade de minicepas e determinações metabólicas de 4 espécies do gênero *Tibouchina*. **Ciência Florestal**, v.32, p.1640-1658, 2022. DOI: [10.5902/1980509836951](https://doi.org/10.5902/1980509836951)

LAWARENCE, B.; MURUGAN, K. *In vitro* Callus Induction and Plant Regeneration of *Osbeckia aspera* L., a dye yielding medicinal plant. **Trends in Biosciences**, v.10, n.18, p.3297-3303, 2017.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2015. 1120p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)

NAULI, R.; YUNIATI, R.; HANDAYANI, W. *In vitro* culture of leaf explant *Melastoma malabathricum* L. on Murashige & Skoog (1962) modified medium with thidiazuron (TDZ) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA). **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v.481, n.1, 2020. DOI: [10.1088/1755-1315/481/1/012025](https://doi.org/10.1088/1755-1315/481/1/012025)

PÊGO, R.G.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R. *In vitro* seed germination and seedlings development of *Syngonanthus elegans* and *Syngonanthus elegantulus*. **Acta Horticulturae**, v.31, n.1083 p. 249-254, 2015. DOI: [10.17660/ActaHortic.2015.1083.30](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.30)

PLESSIS, H. J.; NIKOLOVA, R. V.; KLEYNHANS, R.; EGAN, B. A. *In vitro* seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*. **Ornamental Horticulture**, v.26, p. 598-606, 2020. DOI: [10.1590/2447-536X.v26i4.2191](https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i4.2191)

POLIVANOVA, O. B.; BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, v.11, n.23, 2022. DOI: [10.3390/plants11233313](https://doi.org/10.3390/plants11233313)

PRUDENTE, D.O.; NERY, F.C.; PAIVA, R.; REIS, M.V.; PAIVA, P.D.O.; NERY, M.C. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 1. p. 13-19, 2016.

PUTTKAMMER, C. C. Micropropagação de morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch) em resposta a diferentes concentrações de Metatopolina. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias, 2015.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A.; Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p. 624-628, 2002. DOI: [10.1590/S0100-29452002000300011](https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300011)

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

RODRIGUES, F. A.; COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M. Crescimento de bananeiras micropropagadas em função do substrato e adubo de liberação controlada. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.18, n.1, p.146-149, 2019. DOI: [10.5965/223811711812019146](https://doi.org/10.5965/223811711812019146)

SILVA, T.T.S.; SPADA, G.; FARIA, M.F.; GOULART, L.M.L.; FURTADO, E.L.; PASSOS, J.R.S.; GUERRINI, I.A. Fitossanidade e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função da aplicação de fosfito e silício. **Summa Phytopathologica**, v.45, p.332-336, 2019. DOI: [10.1590/0100-5405/184112](https://doi.org/10.1590/0100-5405/184112)

VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, n.5, p. 837-844, 2012. DOI: [10.1590/S0103-84782012000500013](https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000500013)

VICENTE, M. C.; ARAUJO, J. S. P. Propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Revista Agrária Acadêmica**, v.3, n.3, 2020. DOI: [10.32406/v3n32020/262-273/agrariacad](https://doi.org/10.32406/v3n32020/262-273/agrariacad)

ZENG, S.J.; LI, L.N.; WU, K.L.; CHEN, Z.L.; DUAN, J. Plant regeneration from leaf explants of *Tigridiopalma magnifica* (Melastomataceae). **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.3, p. 1179-1184, 2008.

8 CAPÍTULO VI

OFICINA PEDAGÓGICA: POPULARIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO DE PLANTAS NO ENSINO DE CIÊNCIAS

8.1 RESUMO

Para que o processo de aprendizagem seja significativo, além da contextualização do conteúdo escolar com a realidade do aluno, também se faz necessário a aplicação de metodologias dinâmicas e interativas. A utilização de oficinas pedagógicas mostra-se como importante estratégia metodológica, unindo teoria e prática de maneira lúdica e vivenciada, possibilitando o ensino e aprendizado mais interessante dos conteúdos. A compreensão pelo alunado das formas de reprodução das plantas e da importância desses processos e métodos no seu cotidiano, adicionalmente, pode contribuir para superação da Disparidade na Consciência Botânica (DCB). O objetivo deste trabalho foi analisar a contribuição do uso de uma oficina pedagógica sobre métodos de propagação de plantas no ensino e aprendizado de conteúdos de Ciências. O levantamento de dados a respeito do conhecimento dos alunos sobre os diferentes métodos de propagação de plantas foi realizado de forma qualitativa através de um questionário diagnóstico aplicado antes e depois da realização da oficina pedagógica. A oficina foi realizada com 33 alunos do 7º ano do Ensino Fundamental durante aulas de Ciências. Verificou-se melhoria dos conceitos científicos no questionário diagnóstico aplicado após realização da oficina, com maior número de acertos das questões propostas. Indicando que a utilização de oficinas pedagógicas pode contribuir positivamente para o ensino e aprendizado mais significativo e dinâmico dos conteúdos de reprodução de plantas. Além disso, uma forma de promover a valorização da diversidade vegetal pelos estudantes. A pesquisa revelou ainda que a propagação *in vitro* (micropropagação) é pouco difundida na educação básica, evidenciando a importância de parcerias entre universidades e escola, através da extensão universitária, para popularização dessa técnica de propagação de plantas na educação básica.

Palavras-chave: Educação. Ensino e aprendizado. Reprodução de plantas.

8.2 ABSTRACT

In order for the learning process to be meaningful, in addition to contextualizing the school content with the student's reality, it is also necessary to apply dynamic and interactive methodologies. The use of pedagogical workshops has proven to be an important methodological strategy, combining theory and practice in a playful and experiential way, enabling more interesting teaching and learning of the content. The students' understanding of the ways in which plants reproduce and the importance of these processes and methods in their daily lives can also contribute to overcoming the Disparity in Botanical Awareness (DBA). The objective of this study was to analyze the contribution of the use of a pedagogical workshop on plant propagation methods in the teaching and learning of Science content. Data collection regarding students' knowledge of the different methods of plant propagation was carried out in a qualitative and quantitative way through a diagnostic questionnaire applied before and after the pedagogical workshop. The workshop was held with 33 7th grade students during Science classes. An improvement in scientific concepts was observed in the diagnostic questionnaire applied after the workshop, with a greater number of correct answers to the proposed questions. This indicates that the use of pedagogical workshops can contribute positively to more meaningful and dynamic teaching and learning of plant reproduction content. In addition, it is a way to promote the appreciation of plant diversity by students. The research also revealed that *in vitro* propagation (micropropagation) is not widely used in basic education, highlighting the importance of partnerships between universities and schools, through university extension, to popularize this plant propagation technique in basic education.

Keywords: Education. Teaching and learning. Plant reproduction.

8.3 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da educação básica é tornar as aulas mais atrativas e possibilitar a inserção de componentes concretos que possam auxiliar na consolidação dos conceitos teóricos e a aproximação sensorial direta, isto é, às suas vivências experimentadas no cotidiano (OLIVEIRA e SANTOS, 2022; SILVA, 2021). Estudos demonstram que o uso de material concreto em sala de aula é uma forma de apresentar ao aluno uma maneira mais fácil e palpável de aprender, sendo esse recurso pedagógico um estímulo ao interesse e a criatividade do aluno, tornando a aula participativa e proveitosa (SILVA e SILVA, 2017).

As plantas estão intimamente ligadas ao desenvolvimento e a sobrevivência do ser humano, estando presentes na alimentação, em fármacos, em livros, mobília, cosméticos e até mesmo em nossa respiração (BRITO et al., 2021). No Ensino Fundamental (EF), os conteúdos de botânica estão presentes na disciplina de Ciências da Natureza desde os anos iniciais até os anos finais (BRASIL, 2018). Entretanto, estudos relatam a dificuldade e, por conseguinte, o desinteresse de professores e estudantes no ensino-aprendizado desses conteúdos (SALATINO e BUCKERIDGE, 2016; URSI et al., 2018; VINHOLI JÚNIOR et al., 2018; NEVES et al., 2019; SOUSA e; SUDÉRIO, 2023).

De acordo com a Base Nacional Comum Curricular (BNCC) o conteúdo reprodução de plantas deve ser ministrado no 2º e no 8º ano do EF, onde os estudantes devem adquirir algumas habilidades, dentre elas, no 2º ano do EF “(EF02CI06) identificar as principais partes de uma planta (raiz, caule, folhas, flores e frutos) e a função desempenhada por cada uma delas, e analisar as relações entre as plantas, o ambiente e os demais seres vivos” (BRASIL, 2018, p. 335) No 8º ano do EF “(EF08CI07), comparar diferentes processos reprodutivos em plantas e animais em relação aos mecanismos adaptativos e evolutivos” (BRASIL, 2018, p. 349).

Naturalmente, as plantas podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente; neste último caso o processo também pode ser induzido pelo homem (SENAR, 2018). É através das sementes que as plantas se reproduzem sexuadamente, garantindo a variabilidade genética (SILVA et al., 2019). A reprodução assexuada ocorre a partir de estruturas vegetativas das plantas (folhas, caules, raízes, tubérculos, bulbos, colmos, etc.) e, nesse caso, o indivíduo gerado é idêntico a planta mãe, são clones (ROBERTO; COLOMBO; 2020). Dentre os principais métodos de propagação vegetativa induzidos artificialmente temos a estaquia, a alporquia, a enxertia e a mergulhia (SENAR, 2018).

Outro método de propagação de plantas é o cultivo *in vitro* ou micropropagação. Esta técnica permite realizar a reprodução sexuada pela semeadura *in vitro*, bem como a reprodução assexuada a partir das partes vegetativas da planta (HASNAIN et al., 2022).

A compreensão pelo alunado das formas de reprodução das plantas e da importância desses processos e métodos no seu cotidiano, adicionalmente, pode contribuir para superação da “cegueira botânica”, e, por consequência, a valorização da biodiversidade vegetal (NEVES et al., 2019; BARBOSA et al., 2020).

Nesse aspecto, para que o processo de aprendizagem seja significativo, além da contextualização do conteúdo escolar com a realidade do aluno, também se faz necessário a aplicação de metodologias dinâmicas e interativas (MORAIS et al., 2019; SANTOS; AÑEZ, 2021; URSI et al., 2018). A utilização de oficinas pedagógicas mostra-se como importante estratégia metodológica, unindo teoria e prática de maneira lúdica e vivenciada, possibilitando o ensino-aprendizado mais interessante dos conteúdos (FELICETI et al., 2021; OLIVEIRA; SANTOS, 2022).

Diante disso, o presente estudo buscou analisar as contribuições da realização de uma Oficina Pedagógica sobre Métodos de Propagação de Plantas no Ensino de Ciências para uma aprendizagem significativa e prazerosa desses conteúdos.

8.4 MATERIAL E MÉTODOS

8.4.1 Área de estudo e sujeitos envolvidos

O estudo foi realizado no CIEP Brizolão Municipalizado 288, ‘Professor Ruy Gonçalves Ramos’, no município de Mendes/RJ. O trabalho foi conduzido durante as aulas de Ciências do 7º ano do Ensino Fundamental (EF), por meio da realização de uma Oficina Pedagógica intitulada “Popularização dos métodos de propagação de plantas no ensino de Ciências” com a participação de 33 alunos.

A pesquisa foi realizada com alunos do 7º ano do EF uma vez que o livro didático (período 2020-2023) utilizado pela rede não estava atualizado conforme a sequência dos conteúdos de Ciências da Base Nacional Comum Curricular (BNCC).

8.4.2 Desenvolvimento da oficina pedagógica

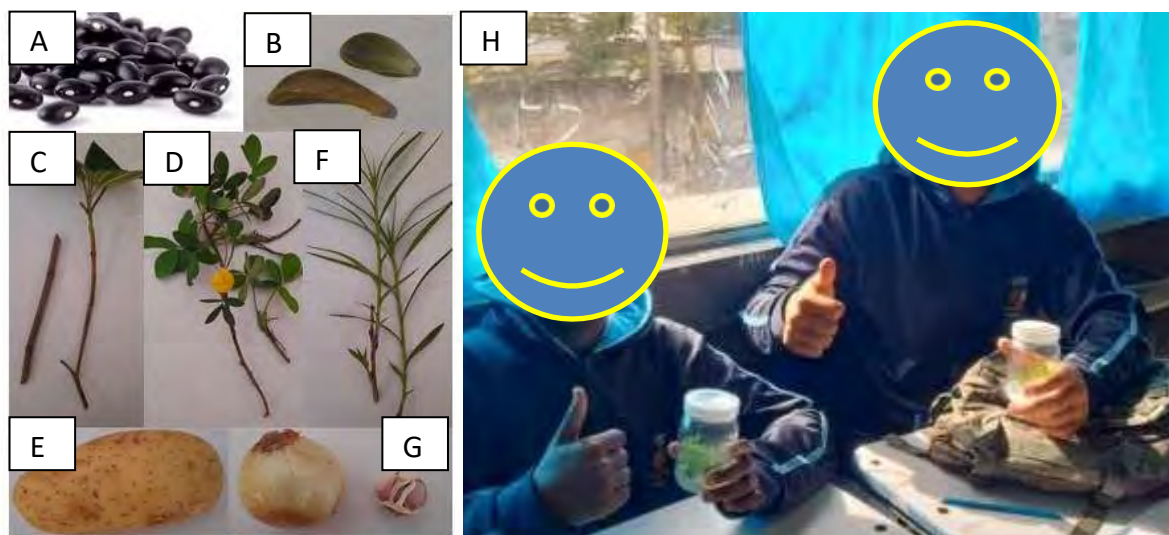
A condução metodológica consistiu em três momentos. Na primeira etapa identificaram-se os alunos e aplicou-se um questionário diagnóstico para avaliar o nível de conhecimento prévio dos estudantes acerca das diferentes possibilidades de propagação de plantas. Para identificar o embasamento teórico, foi construído um questionário semiestruturado com oito questões, sendo sete de múltipla escolha e uma discursiva sobre a temática de propagação de plantas (Figura 52).

Figura 52. Questionário diagnóstico aplicado antes e após a realização da atividade prática da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.

Questionário	
1. De que maneira as plantas podem se reproduzir? a) Apenas através dos frutos. b) Apenas através das sementes. c) Através das sementes, das folhas, do caule e das raízes. d) Apenas através dos frutos e das sementes.	5. Os frutos (laranja, abacate, limão, etc.) de uma planta surgem a partir de qual parteda planta? a) Das folhas. b) Do caule. c) Das flores. d) Das raízes.
2. Quais os tipos de propagação (reprodução) das plantas? a) Assexuada b) Sexuada c) Sexuada ou assexuada. d) Não sei.	6. O feijão é? a) Um grão (alimento). b) Uma semente. c) Um grão e uma semente. d) Um fruto.
3. A propagação (reprodução) sexuada das plantas ocorre a partir? a) Das folhas. b) Dos frutos. c) Das sementes. d) Do caule.	7. As plantas podem se reproduzir através de qual(is) parte(s)? Marque com X () Frutos () Sementes () Folhas () Caules () Raízes
4. A propagação (reprodução) assexuada (vegetativa) das plantas ocorre a partir? a) Das sementes. b) Das sementes e das folhas. c) Das folhas, do caule ou das raízes. d) Dos frutos.	8. Você conhece ou já ouviu falar em propagação (reprodução) de plantas <i>in vitro</i>? () Sim () Não. Caso positivo (sim), sabe qual a importância deste método de propagação de plantas? Resposta: _____

Na segunda etapa, após a aplicação do questionário diagnóstico, a fim de elucidar as inúmeras formas de propagação de plantas (sexuada e assexuada), apresentou-se aos alunos algumas partes de diferentes espécies vegetais. Essa etapa consistiu na parte prática da Oficina Pedagógica. Em sala de aula, os alunos foram divididos em grupo e cada grupo de alunos receberam sementes de feijão e diferentes partes vegetativas de várias espécies como, por exemplo, folhas (suculentas), caules (estacas de orelha-de-onça; estolões de amendoim forrageiro), tubérculos (batata inglesa), filhotes (“*keikis*” de arundina), bulbos (cebola e alho), além de frascos contendo plântulas de orelha-de-onça *in vitro* (Figura 53) para maior consistência do processo de ensino-aprendizagem.

Figura 53. Material utilizado para parte prática da Oficina Pedagógica: sementes de feijão (A), folhas de suculentas (B), estaca de orelha-de-onça (C), estolão de amendoim forrageiro (D), tubérculo de batata inglesa (E), filhotes “*keikis*” de arundina (F), bulbo de cebola e alho (G) estudantes com frascos contendo plântulas de orelha-de-onça propagadas *in vitro* (H).
Fonte: Autora, 2023.



Fonte: Autora, 2023.

A terceira etapa consistiu da reaplicação do questionário diagnóstico (Figura 52), para avaliar, após as atividades práticas, a construção dos novos conhecimentos pelos estudantes.

8.4.3 Análise de dados

A avaliação dos dados baseou-se na comparação das respostas dos alunos ao questionário diagnóstico aplicado no primeiro e no último encontro da oficina. Os dados obtidos foram analisados quali-quantitativamente utilizando a metodologia proposta por Schneider et al. (2017).

Os dados quantitativos foram tabulados e os valores percentuais representados em forma de gráficos, com auxílio do programa Microsoft Excel versão 2010, de acordo com a metodologia de Bardin (2011). Durante a tabulação dos dados, não foram contabilizadas as questões deixadas em branco pelos alunos.

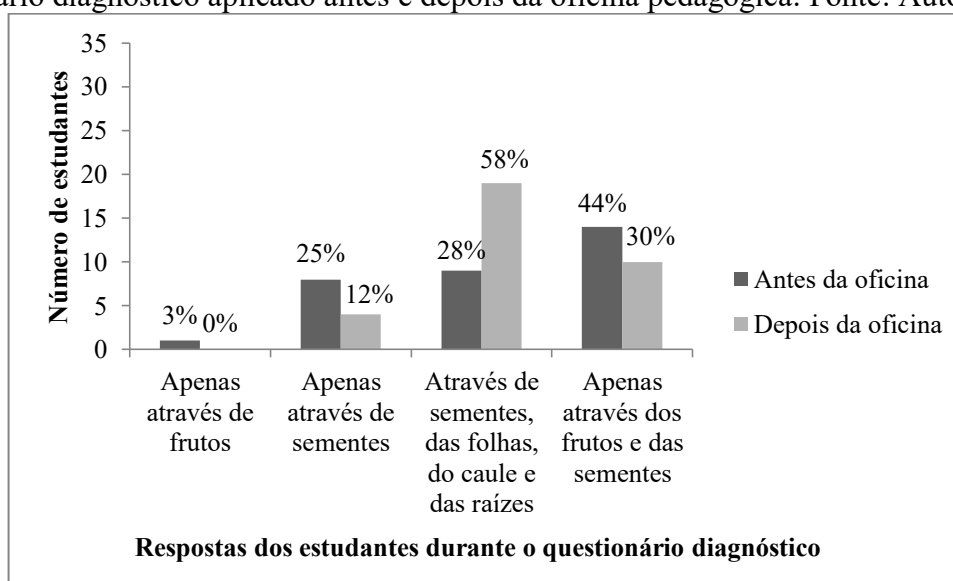
As respostas dos alunos à questão discursiva “Qual a importância deste método de propagação de plantas?” foram categorizadas e os dados analisados a partir da frequência relativa, conforme Souza et al. (2019).

8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o questionamento nº 1 “De que maneira as plantas podem se reproduzir?”, observou-se que 44% dos estudantes acreditavam que as plantas poderiam ser propagadas através dos frutos e das sementes, seguidos de 28% de alunos que acreditavam que as plantas se propagavam através de sementes, folhas, caules e das raízes, 25% acreditavam ser apenas através de sementes e 3% apenas a partir de frutos (Figura 54A).

Os resultados para o mesmo questionamento no pós-questionário mostrou que 58% dos alunos compreenderam que as plantas podem se reproduzir a partir de sementes, folhas, caules e das raízes. Entretanto, 30% dos estudantes ainda mativeram a concepção de que as plantas podiam se propagar através de frutos e sementes, bem como 12% que acreditavam que as plantas podem ser propagadas apenas através das sementes (Figura 54B).

Figura 54. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 1 “De que maneira as plantas podem se reproduzir?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.



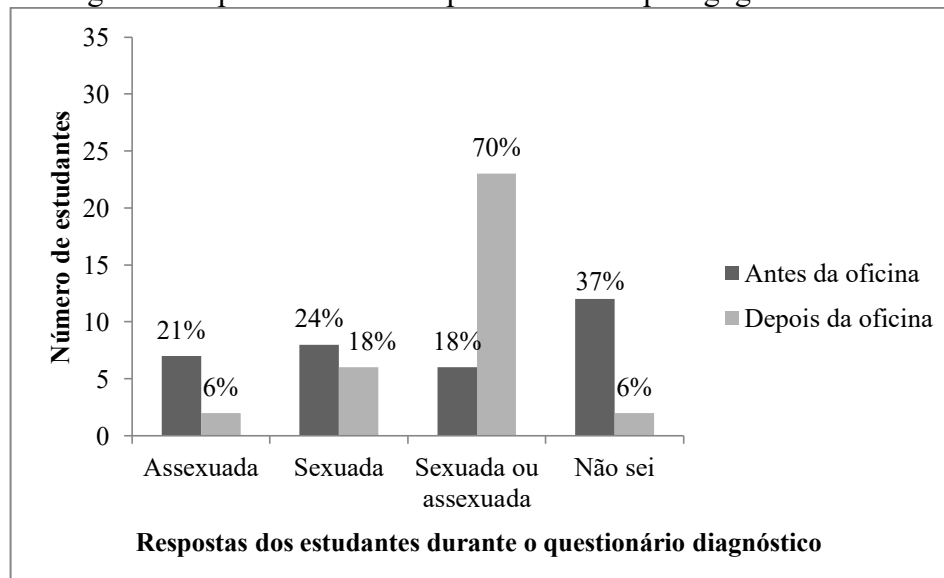
Mendonça et al. (2019) indagaram alunos do 7º ano do EF se sabiam como as plantas se reproduziam, incluindo a explicação desse processo. Os autores apuraram que 87% dos estudantes afirmaram que sim, enquanto 13% disseram não saber como as plantas se reproduziam. Diferentes explicações foram dadas pelos alunos em relação ao processo de reprodução das plantas, dentre elas: através de sementes (20,0%), flores e frutos (6,0%), sementes e frutos (6,0%) e polinização (13,0%). Estes resultados evidenciam a deficiência de conhecimento prévio por parte dos estudantes em relação ao processo de reprodução vegetativa das plantas, tendo em vista que os estudantes não citam esse tipo de propagação ou estruturas vegetativas de propagação. Até mesmo quando estes estudantes são questionados quanto às partes da planta relacionadas com a reprodução, tendo como alternativas as raízes, as folhas, os frutos, os caules, as flores e as sementes. Mendonça et al. (2019) constataram que a maior parte dos estudantes relacionaram as raízes, os caules e as folhas como órgãos de reprodução sexuada.

Em se tratando da questão nº 2 “Quais os tipos de propagação (reprodução) das plantas?” verificou-se que 37% dos alunos disseram não saber quais os tipos de propagação das plantas, enquanto 24% acreditavam que as plantas se propagavam apenas de forma sexuada e 21% apenas de forma assexuada. Já 18% de estudantes disseram que as plantas

poderiam se propagar tanto de forma sexuada quanto assexuadamente (Figura 55A).

No pós-questionário, ou seja, ao final da Oficina Pedagógica 70% dos alunos disseram que as plantas podem se propagar (reproduzir) sexuada ou assexuadamente. Entretanto, 18% dos estudantes ainda afirmaram que as plantas podiam ser propagadas apenas de forma sexuada; 6% de forma assexuada e 6% dos estudantes disseram ainda não saber como as plantas podem se propagar (Figura 55B).

Figura 55. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 2 “Quais os tipos de propagação (reprodução) das plantas?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.

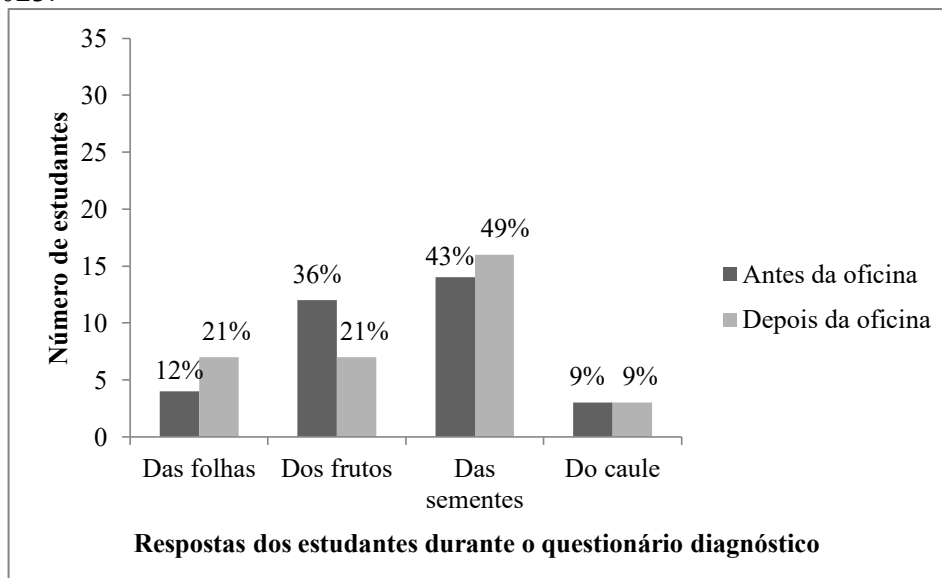


Resultados semelhantes foram observados por Feliceti et al. (2021), que durante Oficina de Botânica com alunos do 9º ano do EF, investigaram se os alunos já tinham ouvido falar em propagação vegetativa e também sobre o que eles entendiam por este termo. Os autores verificaram que 100% dos estudantes disseram não conhecer este termo e que nunca ouviram falar a respeito.

Diferentemente dos resultados obtidos com o pré-questionário, após atividades práticas da oficina, dentre elas a propagação vegetativa via miniestaquia caular de plantas de espinheira-santa e boldo, Feliceti et al. (2021) relataram que este termo se tornou mais claro para os alunos, os quais passaram a explicar de forma simples o termo propagação vegetativa. Os resultados corroboram e evidenciam a eficácia da aplicação de oficinas pedagógicas para o ensino-aprendizado de estudantes do EF a respeito dos diferentes tipos e estruturas envolvidas na reprodução das plantas.

À respeito da questão número 3 “A propagação (reprodução) sexuada das plantas ocorre a partir?”, durante o pré-questionário observou-se que 43% dos estudantes acreditavam que esse tipo de reprodução ocorria a partir das sementes enquanto que 36% dos estudantes acreditavam que ocorria a partir dos frutos; 12% das folhas e 9% a partir dos caules (Figura 56A). Após atividades da Oficina Pedagógica observou-se que 49% dos estudantes compreenderam que a propagação sexuada das plantas ocorre a partir das sementes, enquanto 21% disseram ser a partir dos frutos, 21% a partir das folhas e 9% a partir do caule (Figura 56B).

Figura 56. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 3 “A propagação (reprodução) sexuada das plantas ocorre a partir?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.

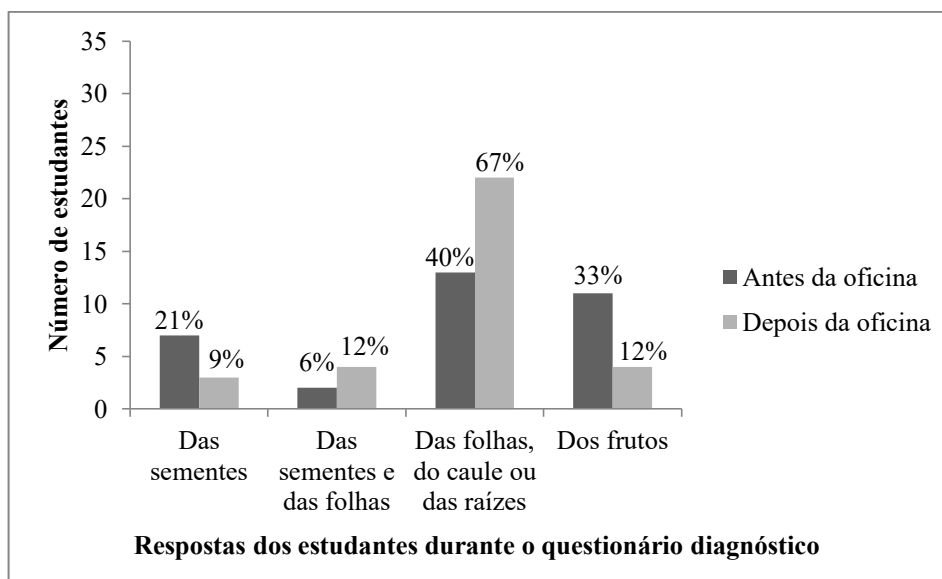


Conforme apresentado, houve incremento de apenas 6% de estudantes que compreenderam que a propagação sexuada dos vegetais ocorre a partir de sementes, logo esse conceito foi revisado com os estudantes durante a aula de Ciências. Mendonça et al. (2019) também constataram que alguns estudantes não conseguiram avançar nos conhecimentos sobre as partes da planta que estão relacionadas com a reprodução sexuada.

Estudos demonstram que determinadas concepções prévias (ou alternativas) dos estudantes não são tão simples de serem substituídas (FAGUNDES et al., 2017; SANTOS e ROSSI, 2020). Estas concepções não devem ser desconsideradas pelo professor, que deve encontrar estratégias pedagógicas alternativas que garantam o sucesso do ensino e aprendizado desses conteúdos (BRUM e SCHUHMACHER, 2015; SOUZA et al., 2023).

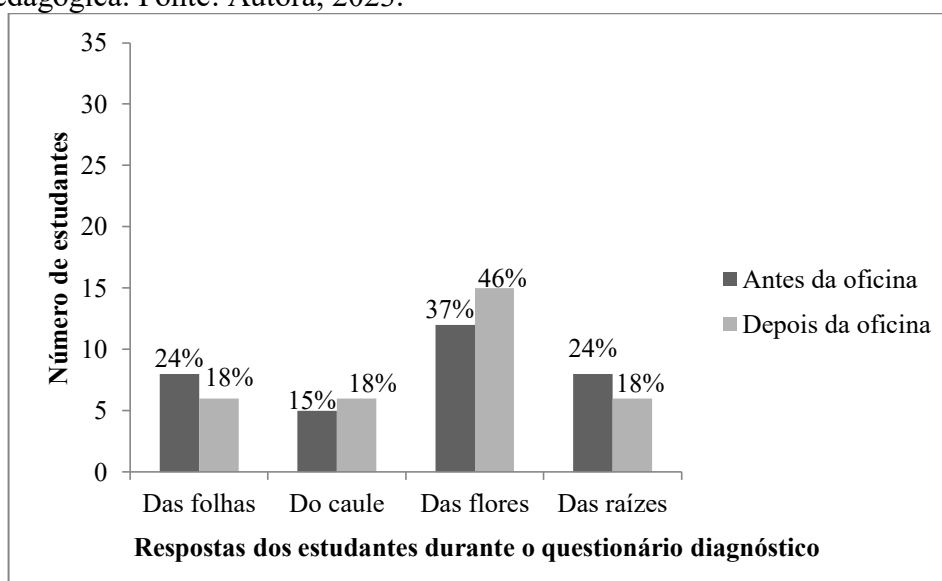
Para a questão número 4 “A propagação (reprodução) assexuada (vegetativa) das plantas ocorre a partir?” constatou-se com o pré-questionário que 40% dos alunos acreditavam que a propagação assexuada (vegetativa) das plantas ocorre a partir das folhas, do caule ou das raízes, enquanto 33% acreditavam ser a partir dos frutos; 21% a partir das sementes e 6% a partir das sementes e das folhas (Figura 57A). Com o pós-questionário observou-se que 67% dos estudantes compreenderam que a propagação assexuada das plantas ocorre a partir das folhas, do caule ou das raízes; 12% a partir das sementes; outros 12% afirmaram ser a partir dos frutos; enquanto 9% a partir das sementes (Figura 57B).

Figura 57. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 4 “A propagação (reprodução) assexuada (vegetativa) das plantas ocorre a partir?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.



Quanto ao questionário “Os frutos (laranja, abacate, limão, etc.) de uma planta surgem a partir de qual parte da planta?”, verificou-se com a aplicação do pré-questionário que 37% dos alunos acreditavam que os frutos surgiam a partir das flores; 24% das raízes; 24% das folhas e 15% disseram que os frutos surgiam a partir do caule (Figura 58A). Após realização da Oficina Pedagógica 46% dos estudantes compreenderam que os frutos originam-se de uma flor; entretanto, 54% ainda afirmaram que os frutos se originam a partir de folhas ou a partir de caules ou a partir de raízes (Figura 58B).

Figura 58. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 5 “Os frutos (laranja, abacate, limão, etc.) de uma planta surgem a partir de qual parte da planta?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.



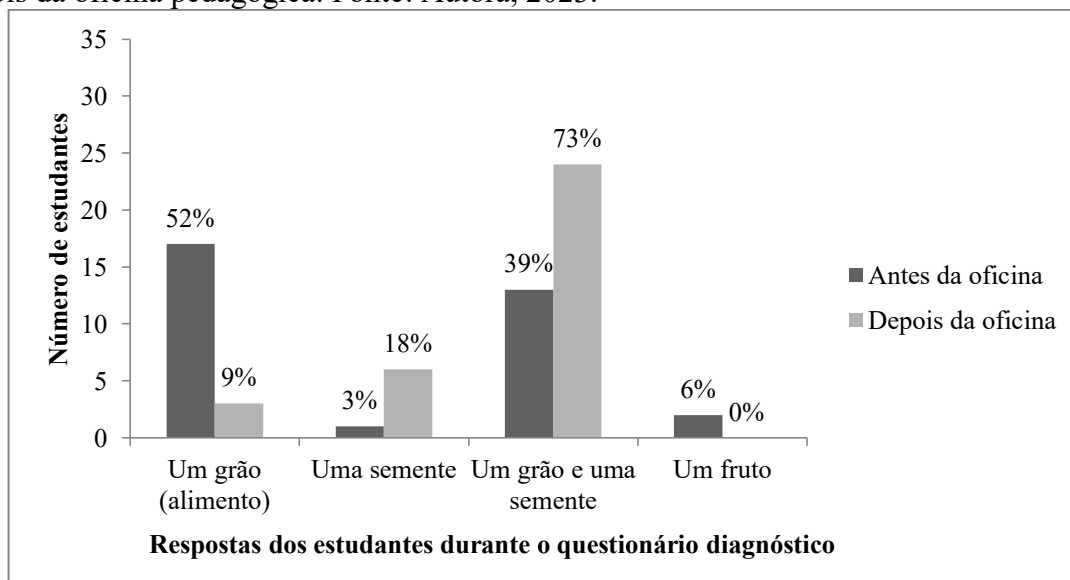
Sousa e Sudério (2023) investigaram os conhecimentos prévios de 45 estudantes do 2º ano do Ensino Médio sobre a reprodução de plantas. Os pesquisadores constataram, por parte de alguns estudantes, respostas sucintas e sem detalhamento de como achavam que a reprodução acontecia. Outros estudantes apresentaram respostas parciais, conseguiram

apresentar órgãos e estruturas típicas da reprodução, desenvolvendo uma explicação breve do processo de reprodução. Apenas uma minoria dos estudantes conseguiu dar explicações ao nível de conhecimento oriundo do EF para explicar como ocorre a reprodução das plantas. Diferentemente, França et al. (2021) constataram que a maior parte dos alunos do 3º ano do Ensino Médio reconhecem a relação entre flor e fruto, apenas 20,7% dos estudantes não responderam ou não souberam explicar tal relação.

Dentre os desafios encontrados pelos estudantes para assimilação dos conteúdos de botânica estão a compreensão dos termos científicos, que são considerados complexos e a falta de afinidade por esses conteúdos (OLIVEIRA et al., 2022). Também deve-se considerar que cada indivíduo possui tempo e forma única de aprendizagem para construção de conhecimentos. “A construção do conhecimento acontece através do tempo, o indivíduo recebe a informação e constrói o saber, salientando que há o aprendizado, mas os indivíduos aprendem de formas diferentes” (MARTINS et al., 2018, p. 420).

Em se tratando da questão nº 6 “O feijão é?” constatou-se a partir do pré-questionário que 52% dos alunos acreditavam que o feijão era um grão (alimento), 39% um grão (alimento) e uma semente, 6% um fruto e 3% uma semente (Figura 59A). Verificou-se com o pós-questionário que 73% dos estudantes compreenderam que o feijão pode ser um grão (alimento) e uma semente, entretanto 18% dos estudantes ainda consideraram o feijão como sendo uma semente e 9% dos estudantes apenas como sendo grão (Figura 59B). Portanto, houve o incremento de 34% de estudantes que passaram a considerar o grão (feijão) como uma semente ou alimento a depender do objetivo de uso.

Figura 59. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 6 “O feijão é?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.



Crespi (2014) avaliou o conhecimento prévio de alunos do 2º ano do EF e também verificou que os alunos não reconhecem o grão (feijão) como sendo sementes, visto que este também foi identificado apenas como alimento pelos estudantes.

As dificuldades enfrentadas pelos alunos no processo de ensino-aprendizagem podem estar relacionadas a diferentes situações. Uma das hipóteses defendidas por Salatino e Buckeridge (2016) para explicar tais dificuldades é a “cegueira botânica”. Atualmente denominada “Disparidade na Conscientização Botânica (DCB)”, trata-se da tendência de não

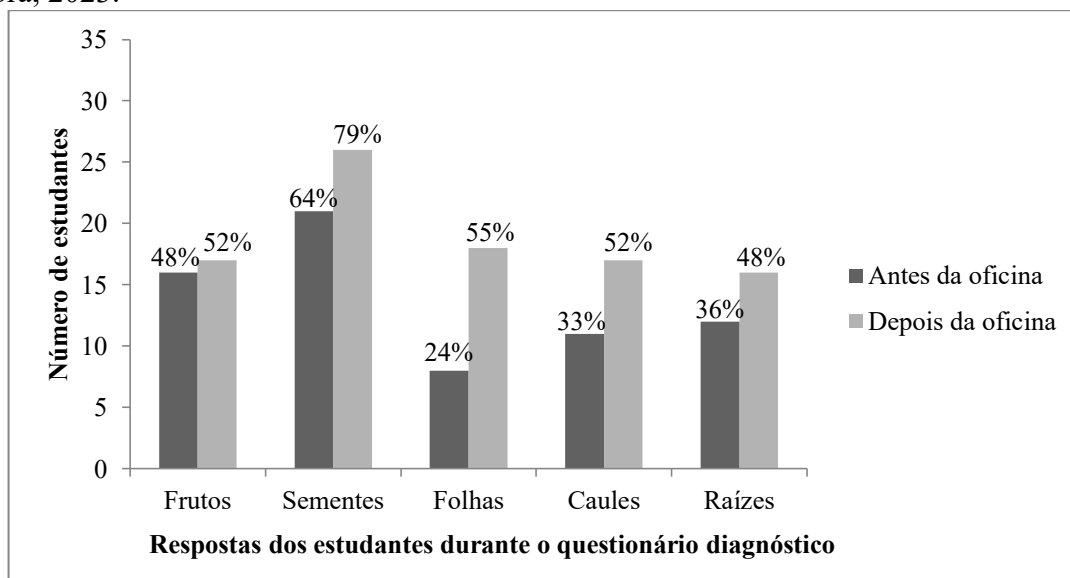
notar as plantas no ambiente, o que leva à perspectiva de que as plantas não são importantes (BROWNLEE et al., 2021).

Dentre os fatores que podem contribuir para a DCB estão a consideração de que os conteúdos de botânica são complexos por parte de alunos e professores, a carência na formação inicial e continuada de professores, a depreciação dos conteúdos de botânica nos livros didáticos de Ciências e Biologia, a não contextualização entre os conteúdos botânicos e o cotidiano do estudante (SALATINO e BUCKERIDGE, 2016; BROWNLEE et al., 2021; PIASSA et al., 2022; SANTOS et al., 2022).

Em relação à questão nº 7 “As plantas podem se reproduzir através de qual(is) parte(s)?” verificou-se a partir do pré-questionário que os estudantes possuíam conhecimento prévio sobre algumas partes das plantas que podem ser utilizadas para propagação das mesmas.

Com a aplicação do pós-questionário constatou-se que o conhecimento entre os estudantes aumentou sobre esse quesito, por exemplo, constatou-se o acréscimo de 31%, ou seja, 10 estudantes que passaram a considerar a possibilidade de propagar plantas a partir das folhas. Contudo, há de se considerar que a maior parte dos estudantes (79%) ainda consideraram as sementes como a principal estrutura envolvida na reprodução das plantas (Figura 60).

Figura 60. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 7 “As plantas podem se reproduzir através de qual(is) parte(s)?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.



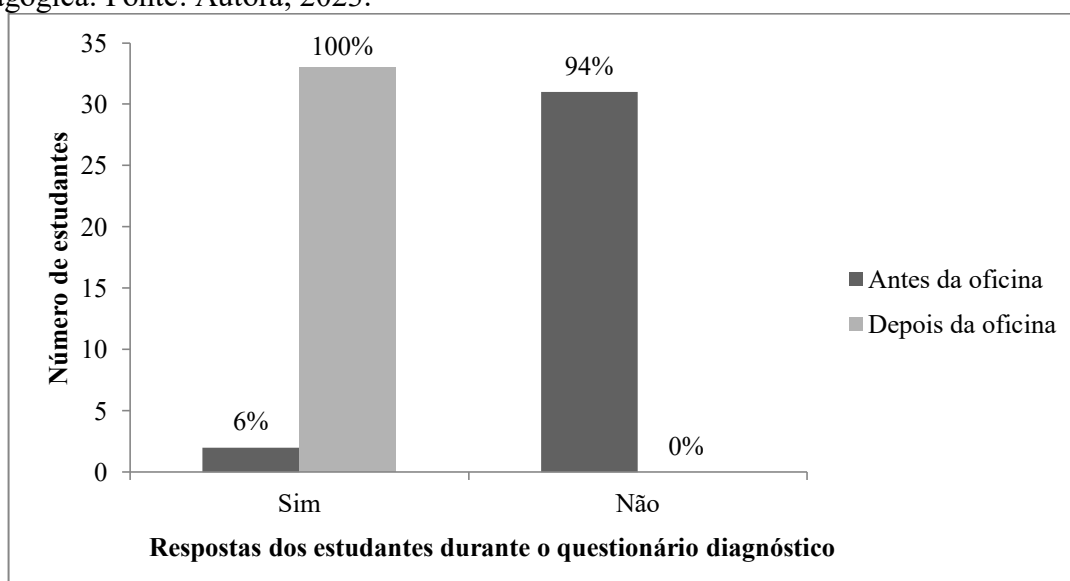
Os resultados encontrados foram semelhantes aos de Feliceti et al. (2021), que durante oficina pedagógica com estudantes do 9º ano do EF, questionaram aos mesmos se já haviam presenciado alguém da família plantando uma planta e quais as partes da planta eram utilizadas no plantio. Os autores apuraram que 93% dos estudantes já presenciaram alguém da família plantando, quanto às partes vegetais utilizadas no plantio 36% dos alunos assinalaram a opção sementes, 28% ramos, 24% caule, 8% folhas e 4% não responderam.

Os resultados evidenciam que os estudantes possuem conhecimentos empíricos dos diferentes tipos de reprodução de plantas, contudo, não relacionam esse conhecimento aos termos científicos reprodução sexuada ou assexuada. Inclusive, fica evidente que os

estudantes apresentam dificuldades de identificar as partes das plantas envolvidas em cada um dos tipos de reprodução (sexuada ou assexuada).

Quanto ao conhecimento dos estudantes sobre a propagação (reprodução) de plantas *in vitro* (questão número 8) verificou-se com o pré-questionário que 94% dos estudantes não conheciam e nunca ouviram falar a respeito desse método de propagação de plantas (Figura 61A). Dentre os estudantes que disseram conhecer ou ter ouvido falar sobre o método de propagação de plantas *in vitro*, apenas um deles mencionou uma importância sobre essa técnica. O estudante relatou: “*Existe um método desses que eles utilizam muitas sementes e de vários tipos de plantas para caso ocorra algum desastre na Terra*”. Após atividades teóricas e práticas da oficina pedagógica e aplicação do pós-questionário, 100% dos estudantes afirmaram conhecer ou ter ouvido falar dessa técnica (Figura 61B).

Figura 61. Resposta dos alunos do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 8 “Você conhece ou já ouviu falar em propagação (reprodução) de plantas *in vitro*?” durante o questionário diagnóstico aplicado antes e depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.



O encantamento dos estudantes face aos frascos contendo plantas *in vitro* e do conhecimento das diferentes aplicabilidades da técnica pode explicar o sucesso nas respostas obtidas com a aplicação do questionário após oficina.

Sousa et al. (2018) questionaram estudantes do 3º ano do Ensino Médio com a pergunta “O que você entende por micropropagação?”. Dentre as alternativas objetivas, os pesquisadores constataram que apenas cerca de 20% dos estudantes marcaram a alternativa correta à respeito da técnica. Após a aplicação de documentários em vídeo e visita técnica a um laboratório de cultura de tecidos vegetais, os autores apuraram, a partir da aplicação de pós-questionário, que cerca de 40% dos estudantes acertaram essa mesma questão. Entretanto, mesmo tendo constatado um incremento significativo do número de estudantes que passaram a conhecer sobre tal assunto, é importante considerar que praticamente 60% dos estudantes ainda não sabiam explicar sobre a técnica de micropropagação de plantas.

Averiguou-se com esta pesquisa que, dentre os estudantes que responderam sobre a importância do método de propagação de plantas *in vitro* no questionário após a oficina, a frequência relativa dos termos que mais se destacaram nas explicações foram: plantas saudáveis (14%); plantas livres de doenças (07%); plantas livres de microrganismos (09%), mudas sadias (18%); conservação de plantas (09%); clones (19%); melhoramento genético

(09%); produção de muitas plantas em qualquer época do ano (16%) (Tabela 25).

Sousa et al. (2018) também questionaram estudantes do 3º ano do Ensino Médio sobre a importância da biotecnologia vegetal para a humanidade. Os pesquisadores averiguaram que, em média, 47% dos estudantes souberam responder no pré-questionário e 62% no pós-questionário. Dentre as justificativas apresentadas pelos alunos, a proteção de espécies ameaçadas de extinção foi a mais citada.

Como forma de promoção da extensão universitária, Tiburski et al. (2013) buscaram popularizar a técnica de micropropagação de videira para estudantes de diferentes idades e escolas do município de Dom Pedrito/RS, notando reações muito positivas e a compreensão da técnica por parte dos estudantes, bem como da comunidade escolar.

Tabela 25. Menções dos estudantes do 7º ano do Ensino Fundamental de uma escola pública referente à questão nº 8 “Você conhece ou já ouviu falar em propagação (reprodução) de plantas *in vitro*? Caso positivo, sabe qual a importância deste método de propagação de plantas?” durante o questionário diagnóstico aplicado depois da oficina pedagógica. Fonte: Autora, 2023.

Menção (Categoria)	Frequência absoluta	Frequência relativa
Plantas saudáveis	08	0,14
Plantas livres de doenças	04	0,07
Plantas livres de microrganismos	05	0,09
Mudas sadias	10	0,18
Conservação de plantas	05	0,09
Clones	11	0,19
Melhoramento genético	05	0,09
Produção de muitas plantas em qualquer época do ano	09	0,16
Total	57	1,00

Visto que o tema biotecnologia possui considerável relevância no cenário atual, Pelizzari et al. (2018) enfatizam a importância da difusão de conteúdos biotecnológicos na educação básica, incluindo a cultura de tecidos vegetais, como forma de desenvolver a alfabetização científica e estímulo para formação dos estudantes. Os autores consideraram, ainda, que um dos entraves é a defasagem na formação dos docentes. Outra opção relevante para popularização da Ciência seria pela aproximação entre a universidade e a escola através da extensão universitária (SOUZA e CONTE, 2020). Essa sinergia proporciona aos professores maior experiência dentro das escolas e, em contrapartida, oferece aos alunos da Educação Básica experiências inovadoras de ensino (SILVA et al., 2023).

8.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de Oficinas Pedagógicas pode contribuir para o ensino e aprendizado mais significativo e prazeroso dos conteúdos de reprodução de plantas.

Verificou-se melhoria dos conceitos científicos no questionário diagnóstico aplicado após a oficina, o que indica que grande parte dos estudantes conseguiu organizar seus pensamentos e compreenderam os conceitos estudados.

Alguns conceitos precisaram ser esclarecidos e reforçados como, por exemplo, a concepção dos estudantes que o fruto é uma estrutura de reprodução e não de proteção das sementes.

Ressalta-se que na literatura corrente pouquíssimos são os trabalhos que tratam da difusão da propagação de plantas *in vitro* (micropropagação) na educação básica, presumidamente, a técnica é pouco trabalhada devido à deficiência ou até mesmo ausência do assunto na formação de docentes de Ciências Biológicas, somada a falta de estruturas (laboratórios) nas escolas para realização de atividades práticas.

A parceria entre universidades e escola, através da extensão universitária, pode ser de grande valia para popularização de diferentes biotecnologias, sobretudo da propagação de plantas *in vitro*.

Desta forma, conclui-se que o uso de Oficinas Pedagógicas durante aulas de Ciências é um recurso pedagógico viável e eficaz para aproximação do educando ao seu objeto de estudo, proporcionando aulas mais dinâmicas e interativas, o que pode contribuir para transpor dificuldades na aprendizagem de alguns temas considerados complexos pelos alunos.

8.7 REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M. C. P.; SANTOS, J. W. M.; SILVA, F. C. L.; GUILHERME, B. C. O ensino de botânica por meio de sequência didática: uma experiência no ensino de ciências com aulas práticas. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.7, p. 45105-45122, 2020. DOI: [10.34117/bjdv6n7-217](https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-217)
- BARDIN, L. **Análise de conteúdo**. 1ª Edição. São Paulo: Aumedina Brasil, 2011. 280p.
- BRASIL. **Base Nacional Comum Curricular (BNCC): educação é a base**. Brasília, DF: MEC/CONSED/UNDIME, 2018. 595p.
- BRITO, A.K.O. de; SILVA, A.P.A. da; CARVALHO FILHO, R.S. de M.; ARAÚJO, L.A.; SILVA, P.T. da; MAGALHÃES, A.F.S.; SILVA, M.F.A. da; OLIVEIRA, D.L. de; AMARAL, F.M.; SILVA NETO, J.X. da. Use of medicinal plants in teaching botany for the final years of Elementary School. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e408101321196, 2021. DOI: [10.33448/rsd-v10i13.21196](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21196)
- BROWNLEE, K.; PARSLEY, K. M.; SABEL, J. L. An Analysis of plant awareness disparity within introductory Biology textbook images. **Journal of Biological Education**, 2021. DOI: [10.1080/00219266.2021.1920301](https://doi.org/10.1080/00219266.2021.1920301)
- BRUM, W. P.; SCHUHMACHER, E. O tema solo no ensino fundamental: Concepções alternativas dos estudantes sobre as implicações de sustentabilidade. **Revista Comunicação e Educação Ambiental**, v.5 n.1, p.1–22, 2015.
- CRESPI, N. **Concepções sobre a reprodução nas plantas (1º ciclo do ensino básico)**. Dissertação (Mestrado), Ensino do 1º e 2º ciclo do Ensino Básico, Escola Superior de Educação e Comunicação, Universidade do Algarve, 2014. 66p.
- FAGUNDES, A. L.; SILVA, T.; BARROSO, M. F. Concepções Prévias de Alunos Iniciantes de um Curso de Graduação na Área de Ciências Exatas e Tecnologia sobre a Visualização da mesma Face Lunar do Referencial Terrestre. **Alexandria: Revista de Educação em Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 2, p. 223-237, 2017. DOI: [10.5007/1982-5153.2017v10n2p223](https://doi.org/10.5007/1982-5153.2017v10n2p223)
- FELICETI, M. L.; MASIERO, M.A.; GOMES, J.O.; BELUSSO, J.R.; LIMA, D.M. A produção de mudas via propagação vegetativa e a construção do conhecimento no contexto escolar. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 10, e301101018668, 2021. DOI: [10.33448/rsd-v10i10.18668](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18668)
- FRANÇA, L. S.; SILVA, S. C. G. M.; SILVA, R. S.; Concepções de estudantes sobre o ensino de botânica em escolas Estaduais de Vitória de Santo Antão-PE. **Revista Ciência em Extensão**, v.17, p.121-137, 2021. DOI: [10.23901/1679-4605.2021v17p121-137](https://doi.org/10.23901/1679-4605.2021v17p121-137)
- HASNAIN, A; NAQVI, S. A. H.; AYESHA S. I.; KHALID, F.; ELLAHI, M.; IQBAL, S.; HASSAN, M. Z.; ABBAS, A.; ADAMSKI, R.; MARKOWSKA, D.; BAAZEEM, A.; MUSTAFA, G.; MOUSTAFA, M.; HASAN, M. E.; ABDELHAMID, M. M. A. Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**. v.13:1009395, 2022. DOI: [10.3389/fpls.2022.1009395](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395)

MARTINS, E. D.; MOURA, A. A.; BERNARDO, A.A. O processo de construção do conhecimento e os desafios do ensino-aprendizagem. **Revista on line de Política e Gestão Educacional RPGE**, v.22, n.1, p. 410-423, 2018. DOI: [10.22633/rpge.v22.n.1.2018.10731](https://doi.org/10.22633/rpge.v22.n.1.2018.10731)

MENDONÇA, C. A. S.; CARVALHO, J. S. B.; CARDOSO, M. L. C.; SILVA, L. F. M.; SILVEIRA, F. P. R. A. A construção de significados sobre reprodução sexuada das plantas por estudantes do ensino fundamental. **Revista de Investigación**, v. 43, n. 97, p. 77-99, 2019.

MORAIS, C. S.; SIMÕES NETO, J. E.; FERREIRA, H. S. Oficina pedagógica de aprendizagem: uma proposta de ferramenta didática para museus de Ciências. **REnCiMa Revista de Ensino de Ciências e Matemática**, v.10, n.3, p. 204-222, 2019.

NEVES, A.; BÜNDCHEN, M.; LISBOA, C. P. Cegueira botânica: é possível superá-la a partir da Educação? **Ciência & Educação**, Bauru, v.25, n.3, p. 745-762, 2019. DOI: [10.1590/1516-731320190030009](https://doi.org/10.1590/1516-731320190030009)

OLIVEIRA, A. P. S.; OLIVEIRA, E. T. C. C.; QUEIROZ, L. L. G.; CRUZ, R. D. M. Principais desafios no ensino-aprendizagem de botânica na visão de um grupo de professores da educação básica. **Revista Pedagógica**, v. 24, p. 1-26, 2022. DOI: [10.22196/rp.v22i0.6566](https://doi.org/10.22196/rp.v22i0.6566)

OLIVEIRA, M. G. M.; SANTOS, I. S. Oficinas pedagógicas e aprendizagem significativa no ensino de Geografia. **Revista Ensino de Geografia**, v. 5, n. 3, 2022. DOI: [10.51359/2594-9616.2022.253710](https://doi.org/10.51359/2594-9616.2022.253710)

PIASSA, G.; MEGID NETO, J.; SIMÕES, A. O. Os conceitos de cegueira botânica e zoochauvinismo e suas consequências para o ensino de biologia e ciências da natureza. **Rev. Int. de Pesq. em Didática das Ciências e Matemática (RevIn)**, v. 3, e022003, p. 1-19, 2022.

PELIZZARI, A.; SILVA, I. S.; FELIPE, M. S. S.; Ensino da Biotecnologia no Itinerário Formativo de Ciências da Natureza e suas Tecnologias no Novo Ensino Médio. **Revista Concilium**, v. 22, n. 4, 2022. DOI: [10.53660/CLM-335-341](https://doi.org/10.53660/CLM-335-341)

ROBERTO, S. R.; COLOMBO, R. C. Innovation in Propagation of Fruit, Vegetable and Ornamental Plants. **Horticulturae**, v. 6, n. 23, 2020. DOI: [10.3390/horticulturae6020023](https://doi.org/10.3390/horticulturae6020023)

SALATINO, A.; BUCKERIDGE, M. "Mas de que te serve saber Botânica?". **Estudos Avançados**, v. 30, n. 87, p. 177-196, 2016. DOI: [10.1590/S0103-40142016.30870011](https://doi.org/10.1590/S0103-40142016.30870011)

SANTOS, L. C. B.; RAIOL, R. D. O.; MIRANDA, T. G.; SARAH, A. T.; MARTINS-JÚNIOR, A. S.; TAVARES-MARTINS, A. C. C. A Disparidade na Conscientização Botânica (DCB): um Estudo sobre a Percepção de Plantas. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 429-433, 2022. DOI: [10.17921/1415-6938.2022v26n4p429-433](https://doi.org/10.17921/1415-6938.2022v26n4p429-433)

SANTOS, M. A.; ROSSI, C. M. S. Conhecimentos prévios dos discentes: contribuições para o processo de ensino-aprendizagem baseado em projetos. **Revista Educação Pública**, v. 20, n. 39, 2020. DOI: [10.18264/REP](https://doi.org/10.18264/REP)

SANTOS, R. A.; AÑEZ, R. B. S. O ensino da Botânica no Ensino Médio: o que pensam professores e alunos do município de Tangará da Serra, Mato Grosso? **REnBio - Revista de Ensino de Biologia da SBEnBio**, v.14, n.2, p. 862-882, 2021. DOI: [10.46667/renbio.v14i2.581](https://doi.org/10.46667/renbio.v14i2.581)

SCHNEIDER, E.M.; FUJII, R. A. X.; CORAZZA, M. J. Pesquisas quali-quantitativas: contribuições para a pesquisa em ensino de ciências. **Revista Pesquisa Qualitativa**, v.5, n.9, p. 569-584, dez. 2017.

SENAR - Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Plantas ornamentais: propagação e produção de mudas**. 2, ed. Brasília: Coleção Senar – 211, 68 p, 2018.

SILVA, A. L. N. S.; ABREU, A. S.; GARCIA, M. M.; Bartelmebs, R. C.; Venturi, T. Relato de experiência: Oficina de micropropagação *in vitro* através da iniciativa do Programa de Residência Pedagógica. **ANAIS do IX ENALIC - Encontro Nacional de Licenciaturas**, Campina Grande: Realize Editora, 2023. 5p.

SILVA, H. M. A Metodologia de Resolução de Problemas no Ensino da Genética. **Scientia Generalis**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 1-13, 2021.

SILVA, J. A. A.; TEIXEIRA, G. H. A.; MARTINS, A. B. G.; CITADIN, I.; WAGNER JÚNIOR, A.; DANNER, M.A. Advances in the propagation of Jabuticaba tree. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 3: (e-024), 2019. DOI: [10.1590/0100-29452019024](https://doi.org/10.1590/0100-29452019024)

SILVA, K. C. J.; SILVA, V. G. Material concreto: uma estratégia Pedagógica no ensino e aprendizagem de Matemática. **Diversa Prática**, v. 4, n. 1, p. 16-42, 2017. DOI: [10.14393/DP-v4n1-2017-48683](https://doi.org/10.14393/DP-v4n1-2017-48683)

SOUSA, G. F.; SUDÉRIO, F. B. “Eu vejo plantas”: uma sequência didática para o ensino de botânica no ensino médio. **Dialogia**, v. 45, p. 1-21, e23696, 2023. DOI: [10.5585/45.2023.23696](https://doi.org/10.5585/45.2023.23696)

SOUSA, I. B.; SOARES, B. O.; PETTINELLI, J. A.; GARCIA, R.; SILVA, C. R.; GAGLIARDI, R. F. Conservação *in vitro* da biodiversidade vegetal: abordagem no ensino médio. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, v.9, n.1, p. 47-56, 2018. DOI: [10.24317/2358-0399.2018v9i1.6838](https://doi.org/10.24317/2358-0399.2018v9i1.6838)

SOUZA, A. M.; CONTE, H. Ciência acessível: O ensino de biotecnologia para estudantes do Ensino Médio através de projetos de extensão universitária. **Saber Científico**, v.9, n.1, p.152-159, 2020. DOI: [10.22614/resc-v9-n1-1304](https://doi.org/10.22614/resc-v9-n1-1304)

SOUZA, A. R.; SILVA, C. D. D.; GOMES, M. J. P. O.; SANTOS, D. B. Vírus, saúde e pandemia: um estudo sobre as concepções alternativas de escolares do ensino fundamental. **Ensino, Saúde e Ambiente**, v 16: e49678, 2023. DOI: [10.22409/resa2023.v1_6.a4967](https://doi.org/10.22409/resa2023.v1_6.a4967)

SOUZA, M. M. S.; CRUZ, A. C. R.; VICENTE, M. C. Percepção ambiental de alunos da FAETEC sobre a Área de Proteção Ambiental Serra dos Pretos Forros. **EDU.TEC - Revista Científica Digital da FAETEC**, v. 1, p. 124-144, 2019.

TIBURSKI, S.; BROILO, C. F.; CARDOSO, F. S.; COMIM, H. B.; NASCIMENTO, D. C.; QUADROS, E. S. Difusão da técnica de micropropagação de videira a estudantes do município de Dom Pedrito. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, [S. l.], v.4, n.1, 2013.

URSI, S.; BARBOSA, P.; SANO, P.; BERCHEZ, F. Ensino de Botânica: conhecimento e encantamento na educação científica. **Estudos Avançados**, v.32, n.94, p. 07-24, 2018. DOI: [10.1590/s0103-40142018.3294.0002](https://doi.org/10.1590/s0103-40142018.3294.0002)

VINHOLI JÚNIOR, A. J.; ZANON, A. M.; VARGAS, I.A. O ensino de biologia e seus contextos com a teoria da aprendizagem significativa. **Revista e-Curriculum**, v.16, n. 4, 2018. DOI: [10.23925/1809-3876.2018v16i4p1381-1407](https://doi.org/10.23925/1809-3876.2018v16i4p1381-1407)

9 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dadas as demandas ambientais e comerciais (ornamentais, medicinais, dentre outras) associadas à família Melastomataceae torna-se relevante a busca pela produção sustentável de mudas utilizando técnicas avançadas e econômicas.

A germinação de sementes de *P. granulosum*, *P. heteromallum* e *P. mutabile in vitro*, sobretudo em meio Murashige e Skoog (MS), mostrou-se uma alternativa ao método convencional de semeadura (*ex vitro*), inclusive com incremento nas taxas de germinação.

O uso do meio MS com a metade da concentração original de sais no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *P. granulosum* (quaresmeira) e *P. mutabile* (macacá da serra), mostrou-se mais benéfico no desenvolvimento *in vitro* de plântulas dessas espécies. Contudo, durante a etapa de desenvolvimento *in vitro*, após aproximadamente 30 dias surgem “estruturas brancas” no limbo foliar dessas plântulas, estruturas essas que, aparentemente, interferiram no desenvolvimento *in vitro* das mesmas e, consequentemente, na etapa de aclimatização. Deste modo, sugere-se que outros ensaios sejam realizados testando diferentes condições *in vitro* (meios de cultivo, quantidade e qualidade de luz, trocas gasosas, dentre outros).

Para a espécie *P. heteromallum* (orelha-de-onça) pode-se verificar que as plântulas cultivadas em meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais e, posteriormente, aclimatizadas em substrato comercial foram aquelas que apresentaram maior percentual de sobrevivência. A partir desses resultados, foi averiguada a possibilidade do desenvolvimento de um protocolo para obtenção de mudas micropropagadas para *P. heteromallum* utilizando este meio e o substrato Multiplant na aclimação das mudas, sob as condições deste experimento.

Os resultados da propagação vegetativa de *P. heteromallum in vitro* sugeriram efeito negativo dos antioxidantes (PVP e carvão ativo) na calogênese de *P. heteromallum*. Há necessidade da adição de BAP e AIB para indução de calos e na regeneração de planta via organogênese indireta a partir de explantes foliares de *P. heteromallum*.

Tendo em vista o alto custo dos fitorreguladores de plantas, para a organogênese direta a partir de microestacas de *P. heteromallum* recomenda-se o uso de meio de cultura MS com 100% da concentração original de sais e isento de fitorreguladores. Inclusive, os resultados encontrados sugeream que a adição de auxina sintética ao meio de cultura inibe o alongamento de raízes dessa espécie.

A completa elucidação dos mecanismos envolvidos no cultivo *in vitro* de espécies de *Pleroma* spp. ainda não foi obtida, portanto, novas pesquisas com a cultura de tecidos são contribuições valiosas que no futuro poderão viabilizar o completo estabelecimento de protocolos de micropropagação dessas espécies.

Difundir os diferentes métodos de propagação de plantas, especialmente técnicas de propagação de plantas *in vitro* (micropropagação), é uma forma de ampliar o conhecimento dos alunos da Educação Básica sobre essa temática e, adicionalmente, contribuir para superação da Disparidade na Conscientização Botânica. O tripé “Educação, Pesquisa e Extensão” promove retornos nos investimentos públicos em educação, juntamente com melhorias na formação dos alunos da Educação Básica e no desenvolvimento profissional de professores.