



LETÍCIA APARECIDA FERREIRA DE ABREU

**RIZOGÊNESE EM BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS
DE CASAQUEIRA (*Campomanesia rufa*)**

**LAVRAS- MG
2020**

LETÍCIA APARECIDA FERREIRA DE ABREU

RIZOGÊNESE EM BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DE CASAQUEIRA
(Campomanesia rufa)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fisiologia Vegetal, para
a obtenção do título de Mestre.

Prof. Renato Paiva, PhD.
Orientador
Prof. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

LAVRAS-MG
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Abreu, Letícia Aparecida Ferreira de.

Rizogênese em brotações micropropagadas de casaqueira
(*Campomanesia rufa*) / Letícia Aparecida Ferreira de Abreu. -
2020.

65 p. : il.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Organogênese. 2. Raiz adventícia. 3. Peroxidase. I. Paiva,
Renato. II. Reis, Michele Valquíria dos. III. Título.

LETÍCIA APARECIDA FERREIRA DE ABREU

RIZOGÊNESE EM BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DE CASAQUEIRA

(Campomanesia rufa)

RHIZOGENESIS OF CASAQUEIRA *(Campomanesia rufa)*

MICROPROPAGATED SHOOTS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia/Fisiologia Vegetal, para
a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de setembro de 2020
Prof. Renato Paiva, PhD, UFLA
Prof. Dr^a Raírys Cravo Herrera, UFPA
Prof. Dr^a Michele Valquíria dos Reis, UFLA

Prof. Renato Paiva, PhD.
Orientador
Prof. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2020**

*À Deus, autor de todas as coisas, à meus pais
Maria da Glória e Vantuir, meus irmãos Rodrigo e
Matheus e ao meu companheiro de vida e meu
amor Boáz,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por ser sempre meu amparo nas dificuldades.

Aos meus pais, Vantuir e Maria da Glória, meus irmãos Rodrigo e Matheus, pelo amor incondicional, por todo apoio e cuidado desde sempre. Vocês são a razão do meu viver, meu bem maior. Agradecimento em especial a meu irmão Rodrigo pela grande contribuição com as análises estatísticas.

À Universidade Federal de Lavras, por possibilitar meu aperfeiçoamento profissional com qualidade.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, pela contribuição com minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Renato Paiva, pela orientação durante a graduação e mestrado.

À professora Michele Reis, pela coorientação, companheirismo e amizade durante a graduação e mestrado!

Ao Diogo Pedrosa, pelas orientações, companheirismo e amizade durante esse tempo de graduação e mestrado. Pessoa com um coração sem igual! Muito sucesso sempre!

Aos companheiros de luta do LCTP, que se tornaram grandes amigos, e que guardarei pra sempre com carinho no coração:

Bruna Raphaella (Brunet), Raquel Mesquita (Raquet), Bia Veronese (Bea-ta), que estão desde 2015, no laboratório comigo com muitas risadas, choros, desabafos, reclamações, ajudas em infinitos experimentos com a casaqueira... Muita coleta de fruto no barro, muita semente pra separar, meio pra fazer, tubos pra lavar... Dei muito trabalho pra vocês rsrs! Sou imensamente grata por ter vocês em minha vida!

Caroline Timóteo, Carol!!! Gosto-te em quantidades absurdas! Obrigada pelas várias ajudas, por ajudar com a bioquímica, pela amizade e pelo seu “No final vai dar tudo certo!”. No final, deu certo!

Afonso Ricardo, sempre divertido e prestativo, obrigada pelas dicas com a anatomia, elas foram importantíssimas para mim! Gratidão! Gosto muito de você!

Breno Durães e Mateus Bernardes, que também contribuíram para montar o experimento para a bioquímica, compondo a equipe de 5 pessoas o dia inteiro a todo vapor para conseguir acabar a tempo! Imensamente grata a vocês pela ajuda, pelos bons momentos juntos no laboratório, e pela amizade!

Josiane Fonseca, Josi blogueira, companheira de disciplina, sofrimento com metabolismo, seminário, qualificação e defesa, passamos por isso tudo juntas!! Muitos bons momentos, muitas risadas, gosto muito de você!

Aos companheiros de Fisiologia, Thaís Caetano, Marina, Mateus, alegraram muitos dos meus dias!

Também tenho muito a agradecer à banca avaliadora, que se prontificou a contribuir com este trabalho, por sua dedicação.

Muito obrigada!

RESUMO

A *Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied., também conhecida como casaqueira, é uma frutífera nativa do Cerrado que apresenta grande potencial medicinal. Existe uma dificuldade na propagação do gênero *Campomanesia* em seu ambiente natural, tanto pela recalcitrância das sementes, quanto pela degradação da vegetação nativa. Deste modo, a micropropagação surge como uma alternativa para a propagação desta espécie. A fase de enraizamento é uma fase crítica da micropropagação, indispensável para obtenção de mudas viáveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel da auxina no processo de enraizamento adventício *in vitro* e *ex vitro*, que são de suma importância para a multiplicação e conservação da *C. rufa* e entender como ocorrem as alterações histológicas e bioquímicas durante a rizogênese. As auxinas analisadas neste processo foram AIA e AIB, de modo que *in vitro* foram utilizadas nas concentrações 0, 1, 5 e 10 μ M, suplementadas em meio MS e *ex vitro* nas concentrações de 0, 500 e 1000 μ M pelo método de imersão rápida. Para as análises histológicas, amostras da base foram emblocadas em Historresina®, os cortes corados em azul de toluidina 0,5% e analisados em microscópio óptico. As análises bioquímicas foram realizadas com o tratamento controle e o melhor tratamento *ex vitro*, sendo analisada a atividade das enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e também a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica. A rizogênese *in vitro* apresentou melhores resultados com a utilização de 10 μ M de AIB que ocorreu pela via organogênica indireta. Esta via de formação indireta foi comprovada pelas análises histológicas, em que foi observado que os primórdios são formados a partir do calo, não apresentando conexão com a vasculatura do caule. A rizogênese *ex vitro* apresentou melhores resultados com a imersão em 500 e 1000 μ M de AIA, recomendando-se a utilização de 500 μ M devido ao menor custo. A formação de raízes *ex vitro* ocorreu pela via organogênica direta, comprovada pelas análises histológicas que mostraram que os primórdios surgem a partir de células vasculares, provavelmente do câmbio vascular. Com as análises bioquímicas no enraizamento *ex vitro*, foi possível observar que a aplicação exógena de AIA provoca um aumento na atividade da POD na fase de indução, que atua aumentando o enrijecimento das paredes celulares e controlando os níveis de AIA nas brotações. Nesta fase ocorre um aumento da atividade da CAT, que juntamente com a SOD atua sobre as EROs, diminuindo a peroxidação lipídica. Na fase de iniciação a SOD e a CAT continuam controlando as EROs para manter a peroxidação lipídica baixa. As paredes celulares ficam menos rígidas devido a redução da atividade da POD, o que permite o início das divisões celulares para formação do primórdio radicular. Na fase de expressão há uma diminuição da atividade da CAT e da POD, acarretando no aumento de H₂O₂ e peroxidação lipídica, promovendo o afrouxamento de membrana plasmática, que juntamente com a diminuição da rigidez de parede celular permite o alongamento das células para a emergência do primórdio radicular.

Palavras-chave: Organogênese; Raiz adventícia; Peroxidase; Cerrado.

ABSTRACT

Campomanesia rufa (O. Berg.) Nied. also known as casaqueira is a native fruit plant from Brazilian Savannah and stands out for its medicinal potential. However, there is a difficulty on *Campomanesia* genus propagation due to its recalcitrant seeds and natural habitat degradation. Thereby, the micropropagation of these species rises as a promising alternative. The rooting stage is a critical phase on micropropagation, being essential to obtain viable seedlings. The goal for this project was to study and evaluate the role of auxin on the *in vitro* and *ex vitro* adventitious rooting process, which is extremely important to multiply and maintain *C. rufa* conservation, helping to understand the biochemical and histological alterations of its rhizogenesis. IAA and IBA were the auxins evaluated on this project, the concentrations used *in vitro* were 0, 1, 5 and 10 μM along with the MS medium supplementation. The concentrations used *ex vitro* were 0, 500 and 1000 μM by the rapid immersion method. For the histological analysis, the samples were embedded in HistoResin® and stained with 0,5% Toluidine Blue, and analyzed in light optic microscopic. The biochemical analysis of Peroxidase (POD), Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) activities, hydrogen peroxide (H_2O_2) and lipid peroxidation content for the optimum treatment of the *ex vitro* group were evaluated, alongside with the control group. The application of 10 μM of IBA *in vitro* presented the best results through indirect organogenesis. This indirect pathway was confirmed through histological analysis, with which the primordium formation was observed from the callus, without any vascular connection with the stem tissue. The immersion with 500 and 1000 μM of IAA showed the best results *ex vitro*, therefore the 500 μM is recommended due to its lower cost. On the *ex vitro* rooting, the direct pathway was confirmed through histological analysis, with the primordium being formed from the vascular tissue cells, probably from the cambium. The exogenous application of IAA increased the POD activity in the induction phase, by rising the cell wall rigidity and modulating the IAA levels at shoots. In this stage, there is also an increase in CAT activity, which along with SOD operates upon ROS scavenging, mitigating the lipid peroxidation. In the initiation phase, SOD and CAT continue to modulate the ROS levels in order to maintain lipid peroxidation at base levels. The cell wall became thinner due to POD activity decline, which allowed the beginning of cell division, forming root primordium. In the expression stage, CAT and POD activities decreased, promoting a rise on the H_2O_2 content and lipid peroxidation causing the plasma membrane softening, which alongside with cell wall thickness reduction enables cell elongation required to emerge the root primordium.

Key words: Organogenesis; Adventitious root; Peroxidase, Brazilian Savannah.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	<i>Campomanesia</i>	11
2.2	Cultura de tecidos	15
2.2.1	Rizogênese adventícia	16
2.2.1.1	Alterações bioquímicas no enraizamento adventício	18
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Obtenção do material vegetal	21
3.2	Rizogênese <i>in vitro</i>	21
3.2.1	Auxinas no enraizamento <i>in vitro</i>	21
3.2.2	Análises histológicas	22
3.3	Rizogênese <i>ex vitro</i>	23
3.3.1	Auxinas no enraizamento <i>ex vitro</i>	23
3.3.2	Análises histológicas.....	23
3.3.3	Análises bioquímicas durante o enraizamento <i>ex vitro</i>	24
3.3.3.1	Análises bioquímicas não enzimáticas	24
3.3.3.1.1	Determinação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e peroxidação lipídica	24
3.3.3.2	Análises bioquímicas enzimáticas	25
3.3.3.2.1	Determinação da atividade da catalase	25
3.3.3.2.2	Determinação da atividade da superóxido dismutase.....	26
3.3.3.2.3	Determinação da atividade da peroxidase	26
3.4	Análises estatísticas	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Auxinas na rizogênese <i>in vitro</i>	27
4.2	Alterações histológicas no processo de enraizamento <i>in vitro</i>	33
4.3	Auxinas no enraizamento <i>ex vitro</i>	38
4.4	Alterações histológicas no processo de enraizamento <i>ex vitro</i>	43
4.5	Análises bioquímicas durante o enraizamento <i>ex vitro</i>	47
5	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma brasileiro que apresenta uma ampla biodiversidade da flora e fauna. Esta rica flora apresenta espécies frutíferas que podem ser utilizadas no consumo alimentar e também como fonte de compostos com propriedades medicinais e agentes anti-proliferativos de células cancerígenas (MALTA et al., 2012; 2013). Além disso, existe a possibilidade de exploração comercial racional de seus frutos e derivados, gerando renda para a comunidade local (LUCIA et al., 2011).

Dentre essas frutíferas, destaca-se a *Campomanesia rufa*, uma Myrtaceae popularmente conhecida como casaqueira ou gabioba de árvore. O gênero *Campomanesia* apresenta diversas espécies já utilizadas na medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais, reumatismo, infecções urinárias e inflamações (LESCANO et al, 2018). Além disso, espécies do gênero já possuem propriedades comprovadas de interesse farmacológico, como *C. adamantium*, *C. phaea* e outras (AMARAL et al, 2019; CASTELUCCI et al, 2019; CATELAN et al, 2019; DE SOUSA et al, 2019; MALTA et al., 2012; 2013; SILVEIRA et al, 2019).

No entanto, existe uma dificuldade na propagação do gênero *Campomanesia* em seu ambiente natural, tanto pela recalcitrância das sementes encontrada no gênero, quanto pela degradação da vegetação nativa do Cerrado, causada pelo extrativismo excessivo e expansão agrícola (DOUSSEAU et al, 2011; ROSSATO et al, 2015). Condições estas que reforçam a necessidade de desenvolvimento de técnicas que contribuíssem para a conservação dessas espécies.

Nesse sentido, a micropropagação surge como uma alternativa para propagação assexuada de espécies do gênero *Campomanesia*, como a *C. rufa*. Entretanto, não existem protocolos completos de micropropagação para *C. rufa*, sabe-se apenas que apresenta uma lenta e desuniforme germinação *in vitro* e uma efetiva obtenção de brotações via multiplicação *in vitro* (SANT'ANA et al, 2018), e um avanço com a utilização de nanopartículas de prata na micropropagação (TIMOTEO et al, 2019), mas, nenhuma informação sobre o processo de enraizamento de suas brotações *in vitro* ou *ex vitro*. A fase de enraizamento é fundamental no processo de micropropagação e muitas vezes se mostra problemática em espécies lenhosas, de modo que as perdas na obtenção de mudas constituem uma desvantagem econômica (ILCZUK; JACYGRAD, 2016).

Deste modo, assim como em outras etapas da micropropagação, para a formação de raízes adventícias a utilização de reguladores de pode contribuir para obtenção de

melhores resultados (CURTI; REINIGER, 2014). Dentre os reguladores de crescimento utilizados, a classe das auxinas é amplamente empregada para formação de raízes adventícias (BUURON DA SILVA et al, 2019; PÁDUA et al, 2017). Isso acontece por promoverem a divisão celular e manter a viabilidade das células durante o desenvolvimento das raízes que, quanto maiores e bem desenvolvidas, mais chances têm de sobreviverem *ex vitro* (SAIANI et al, 2013). Além disso, é necessário identificar o tipo de auxina e a concentração ideal para a indução das raízes adventícias para cada espécie, pois o efeito é espécie-dependente (SILVA et al, 2019).

Este processo de enraizamento adventício pode ocorrer por duas vias organogênicas. A via direta, onde as raízes se originam de tipos celulares já definidos, e via indireta, onde há uma formação de calo causado pelos ferimentos no explante e posteriormente, a partir do calo, as raízes surgem (PORFIRIO et al, 2016). O desenvolvimento de raízes adventícias ocorre em 3 fases. A primeira fase é a de indução, onde ocorrem as alterações bioquímicas sem nenhuma alteração histológica visível. A segunda fase é a de iniciação, onde se dá início nas divisões celulares, que culminam na fase de expressão com o crescimento e emergência dos primórdios radiculares (HUSEN, 2015; ILCZUC; JACYGRAD, 2016; PACURAR et al, 2014; ZHANG et al, 2017).

Durante esse processo de desenvolvimento, com as alterações histológicas ocorrem também alterações bioquímicas, como a atuação da auxina, enzimas oxidativas, fenóis entre outros (JOFRÉ et al, 2016). Dentre as enzimas oxidativas, destaca-se a peroxidase (POD), que pode controlar os níveis da auxina utilizando o peróxido de hidrogênio como agente oxidante (PORFIRIO et al, 2016). No entanto, existem controvérsias em relação ao comportamento da POD no enraizamento de diferentes espécies, sendo necessário compreender sua atuação, que aparenta depender da espécie (PORFIRIO et al, 2016).

Neste contexto, objetivou-se estudar o papel da auxina no processo de enraizamento adventício *in vitro* e *ex vitro*, que são de suma importância para a multiplicação e conservação da *C. rufa*. Além disso, objetivou-se entender como as alterações histológicas, enzimáticas e não enzimáticas ocorrem ao longo do processo de enraizamento adventício em *C. rufa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Campomanesia*

O Cerrado brasileiro, juntamente com a Mata Atlântica, apresenta os maiores números no que diz respeito à biodiversidade e endemismo de plantas com sementes no país. Contudo, este bioma apresenta diversas espécies da flora e da fauna que se encontram sob ameaça de extinção, principalmente por ações antrópicas como a expansão agrícola, ocupação urbana e queimadas, sendo considerado um *hotspot* (BFG, 2015; KLINK; MACHADO, 2005).

Dentre as espécies de ocorrência no Cerrado, mais de 40% são endêmicas distribuídas entre herbáceas, arbustivas, cipós e arbóreas (BFG, 2015; KLINK; MACHADO, 2005). Muitas dessas espécies são frutíferas que são utilizadas tradicionalmente por populações locais (DIAS et al., 2015) como pequi (*Caryocar* spp.), mangaba (*Hancornia* spp.), araticum (*Annona crassiflora*), maracujás nativos (*Passiflora* sp.), murici-pequeno (*Byrsonimia intermedia*) e cagaita (*Eugenia dysenterica*) (DA SILVA et al, 2018; JUNQUEIRA, 2012).

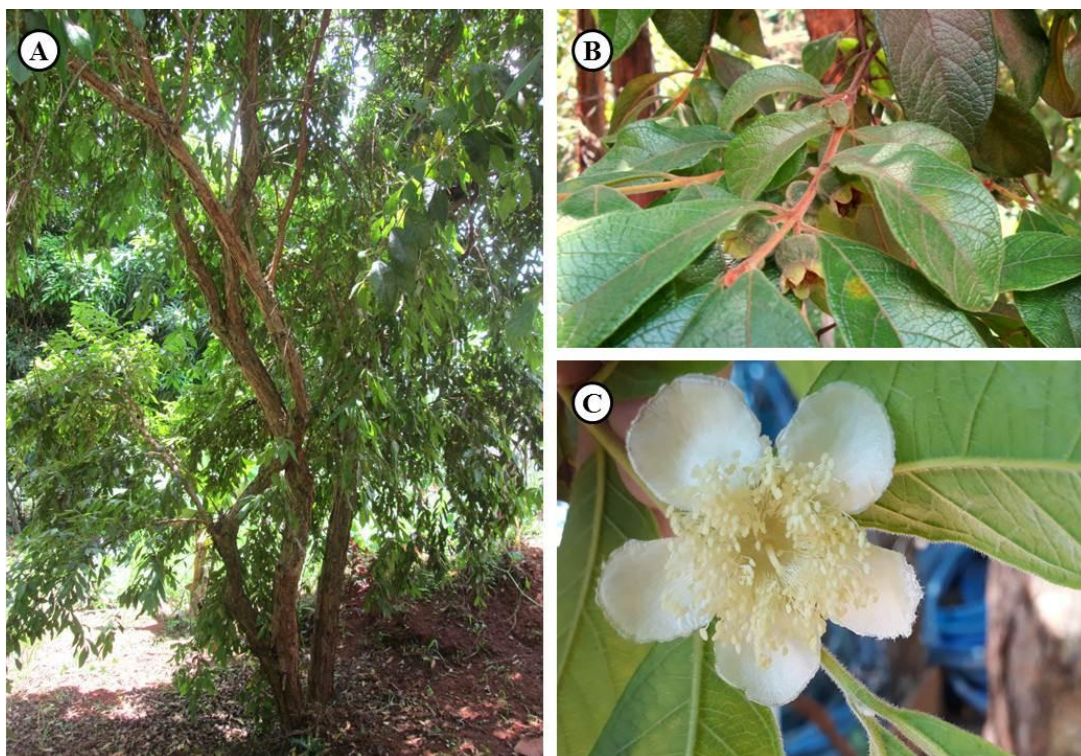
Das espécies nativas do Cerrado, diversas pertencem à família Myrtaceae que é composta por 150 gêneros com aproximadamente 3.600 espécies arbustivas e arbóreas (LORENZI; MATOS, 2002). Muitas mirtáceas como algumas espécies dos gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Campomanesia*, possuem frutos com potenciais, ou já são utilizados na exploração comercial tanto para o consumo *in natura*, quanto de seus derivados como sucos, geleias e licores. Diversas espécies também podem ser utilizadas na arborização urbana, devido sua arquitetura de copa, além de apresentar atratividade pela bela floração (GOMES et al, 2016; LUCIA et al, 2011).

Dentre estas espécies, podemos ressaltar as espécies do gênero *Campomanesia*, descrito em 1794 por Ruiz e Pávon (LANDRUM, 1986; LANDRUM, 1987; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; LANDRUM, 2001). O gênero pertence à subtribo Myrtinae, sendo um dos gêneros mais claramente definidos da família Myrtaceae e está distribuído em toda América do Sul, em vários ambientes como florestas, cerrados e restingas (LANDRUM, 1986; LANDRUM; KAWASAKI, 1997), apresentando 26 espécies endêmicas do Brasil (REFLORA, 2020).

As espécies do gênero variam de árvores a arbustos e apresentam a casca madura grossa e esfoliante em fibras ou em lâminas papiráceas na maioria das vezes (LANDRUM, 1986). Diferencia-se dos outros gêneros pela formação de frutos e sementes, com ovários de 4 a 18 lóculos com vários óvulos por lóculo que após a fecundação, geralmente, apenas um lóculo não é abortado. Distingue-se também pela presença de uma parede glandular protetora que atua como uma testa falsa na semente (LANDRUM, 1986). Os frutos são descritos como um subtipo de baga, chamados de campomanesióide, com tecido carnoso, uniforme e compacto, com lóculos radiais (BARROSO et al, 2004) .

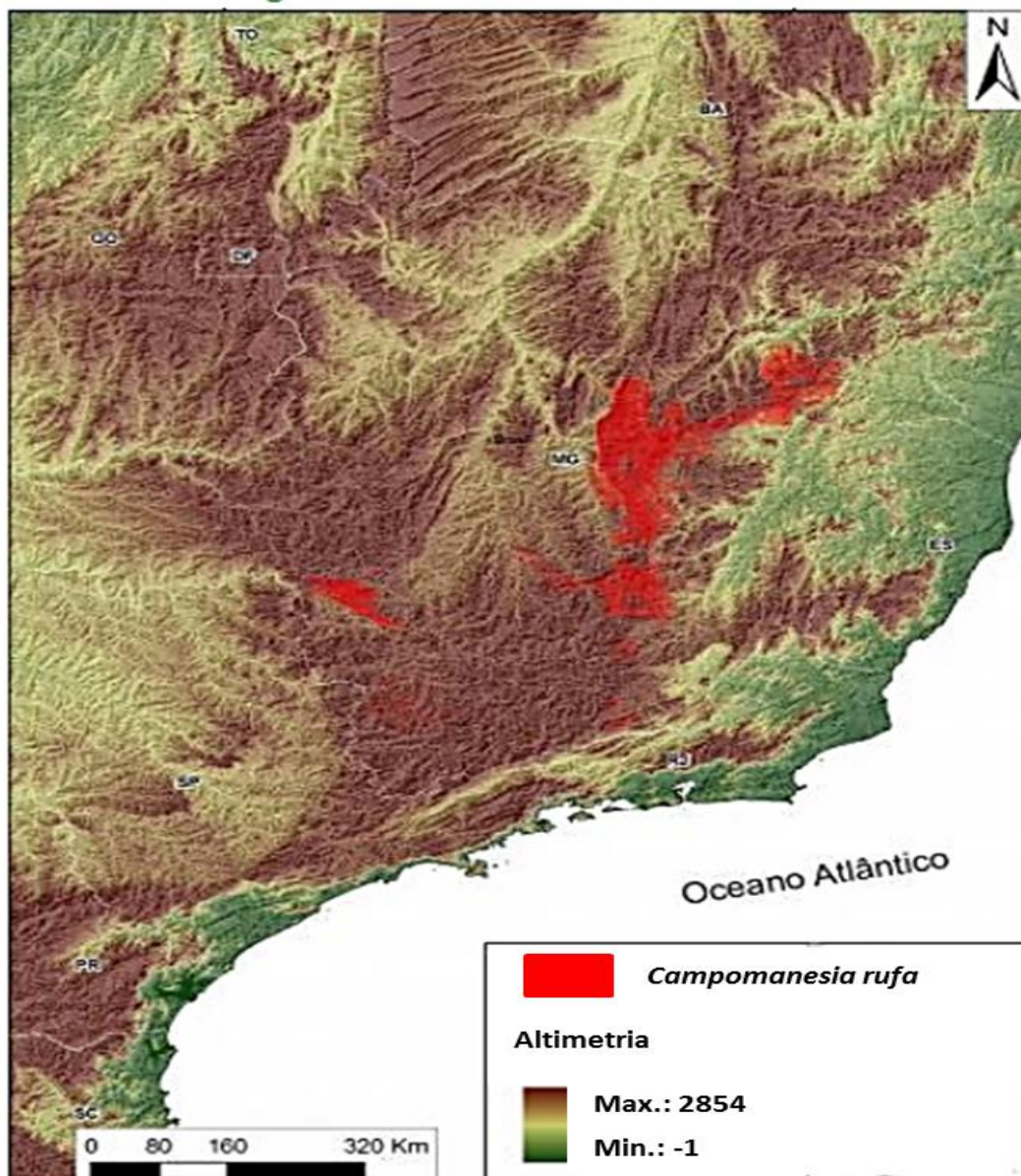
Diversas espécies de *Campomanesia* apresentam potencial farmacológico, como atividade antioxidante e atuação contra dislipidemia como demonstrado em *C. phaea* (CASTELUCCI et al, 2019; DE SOUSA et al, 2019), potencial antitumoral em *C. xanthocarpa*, (AMARAL et al, 2019), agentes antimicrobianos em *C. eugenioides* (SILVEIRA et al, 2019), também *C. guazumifolia* , *C. sessiliflora* , *C. xanthocarpa* e *C. adamantium* com potenciais fotoprotetores (CATELAN et al, 2019). Outra espécie de *Campomanesia* que apresenta grande potencial é a *C. rufa* (Figura 1). Esta espécie é conhecida popularmente como casaqueira ou gabioba de árvore além de ter como basônimo o nome *Abbevillea rufa*, atualmente em desuso na literatura.

Figura 1- Aspectos de uma planta adulta de *Campomanesia rufa* no campus da Universidade Federal de Lavras.



Legenda: Em (A) aspecto geral da planta adulta, em (B) início de frutificação e (C) detalhe da floração de casaqueira. Fonte: Da autora, 2020.

A espécie típica do Cerrado é endêmica do Brasil com distribuição limitada aos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica e Cerrado em Minas Gerais (Figura 2) (RELORA, 2020).

Figura 2- Mapa de ocorrência de *C. rufa*.

Fonte: Adaptado de CNCFlora, 2012.

Na literatura poucas informações sobre a espécie são encontradas, de modo que há muito a ser investigado. A espécie foi descrita por Landrum (1986), que demonstrou que *C. rufa* se distingue por apresentar um pedúnculo densamente pubescente de 6 a 8 mm de comprimento sendo mais curto que o botão da flor, onde a flor apresenta de 300 a 500 estames. Relata também que a parede do lóculo é uma membrana cartilaginosa com glândulas com aproximadamente 0,25 mm de diâmetro e que a parede nunca tem mais do que a espessura da glândula.

Além disso, apresenta casca fissurada com sulcos delicados, folhas com tamanho de 2,5 a 7,5 cm, apresentando pecíolo desenvolvido e piloso. As inflorescências são do tipo uniflora com posição axilar, apresentando sépalas triangulares, número de pétalas variáveis de 4 a 6 (Figura 1 C), com hipanto constricto com mais de 6 óvulos por lóculo e numerosos lóculos, apresentando frutos com numerosas sementes com testa fina e membranácea (REFLORA, 2020).

Não há relatos na literatura sobre sua propagação em ambiente natural. No entanto, devido à sua distribuição geográfica ser restrita, podemos inferir que esta apresenta dificuldade em se propagar naturalmente, assim como muitas outras espécies do gênero. Essa dificuldade pode ser devido à disparidade no amadurecimento de frutos, sementes que apresentam dormência ou recalcitrância, comprometendo assim, a viabilidade do desenvolvimento de mudas em escala comercial (PINHAL et al, 2011). Deste modo, as técnicas de cultura de tecidos podem contribuir com a propagação dessas espécies.

2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos permite o crescimento *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio de cultura artificial para gerar uma nova planta. Dentre as técnicas de cultura de tecidos a micropropagação destaca-se como uma alternativa viável a ser utilizada devido à alta taxa de plantas uniformes que podem ser obtidas (PINHAL et al, 2011).

Entretanto a micropropagação é bastante complexa, com diversos fatores que a influenciam como tipo de explante vegetal, constituição do meio nutritivo, concentrações de sacarose (CAVALCANTE; BORIN e PEDROSO-DE-MORAES, 2018; LEMES et al., 2016), fontes de luz (GOMES DA ROCHA et al., 2017; FERREIRA et al., 2016), agentes solidificantes, carvão ativado (RODRIGUES et al, 2017), fotoperíodo, tempo de cultivo (PINHEIRO; CARVALHO; MARTINS, 2018) entre outros aspectos.

A micropropagação engloba algumas etapas, desde o estabelecimento da cultura, multiplicação de brotações, enraizamento e posterior aclimatização (BASTOS et al, 2007; PINHAL et al, 2011). Esta técnica já é amplamente utilizada para a propagação clonal de diversas espécies. Protocolos já foram desenvolvidos para várias Myrtaceae

que apresentam grande relevância, seja para a indústria alimentícia, farmacêutica ou para o paisagismo, como protocolos de multiplicação de *Eugenia involucrata*, (GOLLE et al, 2017), multiplicação e enraizamento de *Corymbia ptychocarpa* (YANG et al, 2016), estabelecimento de *Psidium cattleianum* (ARRUDA, 2019) por exemplo. Dentro do gênero *Campomanesia*, a cultura de tecidos também vem sendo utilizada, na germinação de pólen e micropropagação de *C. xanthocarpa* (BRUNNER SCUTTI, 2000; FRANZON et al, 2006; MACHADO et al, 2020) e multiplicação e enraizamento de *C. adamantium* (GOELZER et al, 2019; ROSSATO et al, 2015).

Com relação à propagação de *C. rufa*, um estudo recente relata uma germinação desuniforme e lenta em torno de 90 dias *in vitro*, mas em contrapartida apresenta uma formação de 58,7% de calos com uso de 10 μ M de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (SANT'ANA et al, 2018). Além disso, Sant'ana et al (2018) desenvolveram um protocolo eficiente para indução de brotações com adição do regulador de crescimento BAP (6-Benzilaminopurina) no meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), possibilitando a obtenção de um grande número de brotações.

Alguns avanços também foram apresentados com o uso de nanopartículas de prata na micropropagação de *C. rufa*, no qual se observou que baixas concentrações de nanopartículas de prata não afetam o desenvolvimento das brotações, porém em concentrações mais elevadas apresentam um efeito fitotóxico (TIMOTEO et al, 2019).

No entanto, não existem relatos sobre o processo de enraizamento e aclimatização para essa espécie. Que são fases críticas e essenciais no processo de micropropagação para formação de mudas viáveis (SILVA et al, 2011).

2.2.1 Rizogênese adventícia

O processo de formação de raízes adventícias pode se dar de forma natural no desenvolvimento normal da planta na maioria das monocotiledôneas e em diversas eudicotiledôneas. Além disso, também pode ocorrer devido a estresses, seja ambiental ou causado mecanicamente por corte ou por algum ferimento em cultura de tecidos (BIRNBAUM, 2016; PORFIRIO et al, 2016).

Durante o processo de rizogênese, as raízes adventícias podem ser originadas por duas vias (PORFIRIO et al, 2016). A primeira via é chamada de organogênese

direta onde a formação radicular ocorre a partir de tipos celulares já estabelecidos, como câmbio, córtex, feixes vasculares e periciclo envolvendo o processo de rediferenciação celular. A segunda via se dá pela organogênese indireta, onde há a formação de calos formados por danos mecânicos induzidos pela preparação do explante e posteriormente, a partir dos calos, ocorre o desenvolvimento das raízes adventícias (PORFIRIO et al, 2016).

O enraizamento adventício já foi considerado como um processo constituído apenas de uma etapa, entretanto, por meio de estudos histológicos e fisiológicos, entende-se atualmente que é um processo de desenvolvimento, com diferentes etapas, cada uma com suas particularidades (PORFIRIO et al, 2016). Esse processo de desenvolvimento de raízes adventícias se dá em 3 fases: indução, iniciação e expressão (HUSEN, 2015; ILCZUC; JACYGRAD, 2016; PACURAR et al, 2014; ZHANG et al, 2017). A fase inicial de indução apresenta alterações que se restringem a eventos moleculares e bioquímicos, não apresentando nenhuma alteração histológica. Já na segunda fase, a iniciação, as primeiras modificações histológicas ocorrem com divisões celulares para a organização dos primórdios de raízes adventícias, sendo possível observar células pequenas com citoplasma denso e núcleos grandes. Já na fase final, de expressão, surgem as estruturas em forma de cúpula culminando na emergência dos primórdios radiculares (HUSEN, 2015; PORFIRIO et al, 2016).

Em angiospermas, geralmente as raízes laterais são formadas a partir do periciclo, mas a endoderme, córtex e parênquima vascular também podem participar da morfogênese do primórdio, assim como em raízes adventícias (TORRES-MARTÍNEZ et al, 2019). Na fase inicial de formação, as células iniciais do primórdio são definidas pela rediferenciação das células do tecido de origem, o que vai depender da espécie (GUAN et al, 2019; ITOH et al, 2005). Na iniciação, ocorrem divisões celulares e a determinação destas células para formação de epiderme, córtex, endoderme, vasculatura e meristema. Na fase final, de expressão, os primórdios crescem e emergem da epiderme (GUAN et al, 2019; ITOH et al, 2005).

Durante as alterações histológicas, o processo de desenvolvimento das raízes adventícias é permeado por alterações bioquímicas, como conteúdo de auxina, compostos fenólicos, enzimas oxidativas dentre outros e a compreensão destes fatores contribui para o melhor desenvolvimento de raízes adventícias (JOFRE et al, 2016).

2.2.1.1 Alterações bioquímicas no enraizamento adventício

Dentre as alterações bioquímicas que ocorrem durante o processo de desenvolvimento de raízes adventícias, o papel da auxina é um dos mais compreendidos. A auxina é um hormônio essencial para praticamente todos os aspectos de crescimento e desenvolvimento de plantas, sendo o ácido indol-3-acético (AIA) a auxina natural primária (SAINI et al, 2013; ZHAO, 2018). O AIA é considerado a principal auxina endógena e coexiste com outras, por exemplo o ácido indol-3-butírico (AIB). Além disso, também existem compostos sintéticos que atuam como auxina na planta como o ácido 1-naftalenacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), (PORFIRIO et al, 2016).

Para a formação de raízes adventícias, as auxinas são amplamente utilizadas por atuarem na divisão celular e na viabilidade das células durante a formação dos primórdios (BUURON DA SILVA, et al, 2019; PÁDUA et al, 2017; SAIANI et al, 2013). Dentre as auxinas, o AIB é o mais utilizado por sua maior capacidade de induzir raízes, isso ocorre parcialmente por apresentar maior estabilidade à luz em comparação ao AIA (PACURAR, 2014).

Diferentes auxinas já foram avaliadas em espécies da família Myrtaceae, como o AIB em diferentes concentrações para enraizamento de microestacas de *Eucalyptus* spp. e *Eugenia pyriformis* por exemplo (GALLO et al, 2017; NASCIMENTO et al, 2008). Dentro do gênero *Campomanesia*, auxinas foram avaliadas em *C. adamantium*, utilizando diferentes concentrações de AIB, ANA ou AIA, embora sem resultados satisfatórios com as concentrações utilizadas (ROSSATO et al, 2015), reafirmando a importância de se conhecer a auxina e a concentração ideal necessária para a indução de raízes adventícias.

Além disso, existe uma relação da atividade da auxina com enzimas oxidativas no processo de enraizamento adventício, como as peroxidases, por exemplo. As peroxidases são encontradas tanto na parede celular quanto no citoplasma e atuam catalisando a oxidação de diversos doadores de elétrons e sua atividade está implicada em muitos eventos biológicos em plantas, dependendo da natureza do doador (MOLASSIOTIS et al, 2004). Alguns exemplos de compostos que as peroxidases podem oxidar são fenólicos e o AIA, usando o peróxido de hidrogênio como agente oxidativo (PORFIRIO et al, 2016). Considera-se que a principal via de degradação do

AIA ocorre por oxidação não descarboxilativa, porém a descarboxilação oxidativa enzimática também pode ocorrer catalisada por um grupo de isoformas de peroxidases (PORFIRIO et al, 2016).

Durante o processo de enraizamento foi observado um padrão de atividade da peroxidase, de modo que na fase de indução há um declínio acentuado em sua atividade, que é aumentada na iniciação e na fase de expressão, por sua vez, se observa uma diminuição gradual, seguida pelos primeiros sinais histológicos visíveis dos primórdios da raiz (RIVAL et al; 1997). Este comportamento também foi relatado em tratamentos de brotações com auxina, que causaram aumento na atividade da peroxidase, nos quais se observou um nível mínimo na fase indutiva e um nível máximo na fase de iniciação (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000). Assim, a avaliação da atividade da peroxidase passou a ser utilizada como um marcador da iniciação do enraizamento adventício.

Em *Malus hupehensis*, por exemplo, a atividade da POD aumentou gradualmente nos estádios iniciais, aumentando a resistência da parede celular e então diminuiu na fase final, facilitando a expansão e crescimento radicular (ZHANG et al, 2017). O híbrido GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) também apresentou um aumento da atividade da peroxidase da parede celular no 6º dia, seguido de uma redução no 9º dia que facilitou a expansão celular para formação radicular (MOLASSIOTIS et al, 2004). Outro exemplo em que a POD apresentou o mesmo padrão de atividade durante o processo de enraizamento foi em *Gardenia jasminoides*, com um pico na fase de iniciação e redução gradual até a fase de expressão dos primórdios radiculares (HATZILAZAROU et al, 2006). No entanto, há resultados contrastantes para outras espécies como em *Morus alba* que teve seus níveis aumentados nas fases finais do enraizamento (HUSEN et al, 2015). Assim, é necessário se compreender como a atividade da POD ocorre em cada caso, pois aparenta ocorrer de forma específica em diferentes espécies (PORFIRIO et al, 2016).

Neste sentido, foi proposto que a peroxidase afeta o enraizamento por regular os níveis de auxina, e também que pode atuar indiretamente por meio do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PORFIRIO et al, 2016). Isso se dá porque o H_2O_2 pode funcionar como uma molécula de sinalização, atuando como estimulador da formação e desenvolvimento de raízes adventícias (SHIWENG et al, 2007). Em *Mucuna pruriens*, foi sugerido que o H_2O_2 pode funcionar como uma molécula sinalizadora em uma via direta ou em uma via paralela induzida por ácido salicílico na formação e no

desenvolvimento de raízes adventícias (YANG et al, 2013). Para o enraizamento *in vitro* de *Linum usitatissimum*, o H₂O₂ afetou positivamente a formação de raízes adventícias ao regular os níveis de auxina endógena (TAKÁČ et al, 2016). Em pepino foi observado que a aplicação de H₂O₂ pode promover a formação e o desenvolvimento de raízes. Além disso, se concluiu que esse efeito na formação e desenvolvimento das raízes pode ser inibido parcial ou completamente por sequestradores de H₂O₂ ou inibidores de sua síntese (LI et al, 2007).

Um desses sequestradores de H₂O₂ utilizados foi a catalase (CAT), que eliminou os efeitos promotores do H₂O₂ exógeno por meio de sua remoção, mas sua aplicação exógena não consegue eliminar o conteúdo endógeno de peróxido por não ser permeável (LI et al, 2007). Em *Mucuna pruriens* a aplicação da CAT apresentou resultados semelhantes, não tendo efeito direto no enraizamento, mas eliminando os efeitos promotores de H₂O₂ (LI et al, 2009). Assim, contribui para a compreensão da atuação do H₂O₂ no desenvolvimento de raízes adventícias.

O estudo da ação de auxinas para indução do enraizamento, bem como da atividade enzimática e do H₂O₂ auxiliam a compreender como ocorrem as alterações histológicas para a formação do primórdio radicular. Neste contexto, entender o processo de enraizamento adventício *in vitro* e *ex vitro* de *C. rufa*, pode constituir-se um avanço significativo de suma importância para a multiplicação da espécie e posteriormente poderá contribuir para o desenvolvimento de técnicas que envolvam a conservação de recursos genéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de enraizamento e análises histológicas foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, as análises bioquímicas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, ambos do Setor de Fisiologia Vegetal. A obtenção dos cortes histológicos foi realizada com contribuição do Laboratório Central de Biologia Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Obtenção do material vegetal

Para a obtenção de plântulas para a rizogênese, frutos maduros foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Lavras. Para o estabelecimento *in vitro* foi utilizado o protocolo de Sant'ana et al. (2018) no qual as sementes foram desinfestadas por 30 segundos em álcool 70%, 20 minutos em hipoclorito de sódio (2%) em câmara de fluxo laminar e, posteriormente, submetidas à tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos contendo 15 ml de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes da autoclavagem. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura ajustada a 25°C com fotoperíodo de 16h com irradiância de 36µM m⁻²s⁻¹ produzida por lâmpada fluorescente.

Para obtenção de brotações, após a germinação, segmentos caulinares foram coletados e inoculados em meio MS suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 5,6 µM (concentração ideal pela análise de regressão) de 6-Benzilamina Purina (BAP) e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes da autoclavagem. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura ajustada a 25°C com fotoperíodo de 16h com irradiância de 36µM m⁻²s⁻¹ produzida por lâmpada fluorescente (SANT'ANA et al., 2018).

Após 60 dias, as brotações obtidas para realização dos experimentos de rizogênese foram individualizadas e inoculadas em tubos contendo 10 ml meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,8 ± 0,2 solidificado com 7g L⁻¹ de ágar, livre de reguladores de crescimento. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias com temperatura ajustada a 25°C com fotoperíodo de 16h fornecida por lâmpada de LED.

3.2 Rizogênese *in vitro*

3.2.1 Auxinas no enraizamento *in vitro*

Brotações com aproximadamente 3 cm, foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de meio de cultivo MS suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 2,5g L⁻¹ de

phytagel™, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil, acrescidos com AIB ou AIA nas concentrações 0; 1; 5 e 10 μM , com pH ajustado em $5,8 \pm 0,2$ antes da esterilização. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura ajustada a 25°C e fotoperíodo de 16h fornecida por lâmpada de LED.

Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, com 5 brotações cada repetição. Após 60 dias de cultivo foram avaliados a formação de raízes (%), comprimento (cm) das raízes formadas, a formação de calos na base do explante (%) e também o comprimento da parte aérea (cm) para analisar o crescimento das brotações durante o enraizamento *in vitro*.

3.2.2 Análises histológicas

Brotações com aproximadamente 3 cm de comprimento foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de meio de cultivo MS suplementado com 30g L^{-1} de sacarose, $2,5\text{g L}^{-1}$ de phytagel, acrescido com a melhor concentração de auxina determinada no item 3.2.1, com pH ajustado em $5,8 \pm 0,2$ antes da esterilização. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura ajustada a 25°C e fotoperíodo de 16h fornecido por lâmpada de LED. Amostras da base (1 cm) das brotações em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletadas para as análises histológicas.

O material foi fixado em álcool 70% por 48h. Posteriormente procedeu-se a desidratação em série crescente de álcool (80%, 90% e álcool P.A.), permanecendo duas horas sob vácuo em cada concentração. Em seguida, foram submetidas a uma mistura de álcool e Historesina® hidróxi-etilmetacrilato (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) ativada (1:1) sob vácuo por 2 horas e transferidas para inclusão overnight do material em historresina ativada pura. Após esse processo, as amostras foram emblocadas em historresina com Hardener (endurecedor) (15 ml de resina: 1g de Hardener). As amostras emblocadas foram seccionadas em micrótomo, sendo obtidos cortes transversais com espessura de 5 μm . Depois de seccionados, os cortes obtidos foram transferidos para lâmina e corados com azul de toluidina 0,5% por 2 minutos.

As lâminas foram analisadas e fotografadas com o auxílio de microscópio óptico com câmera acoplada LEICA ICC50 W® (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Foram realizadas análises qualitativas de presença ou ausência das características

anatômicas, bem como as variações das formas, tipos das células ao longo do desenvolvimento das raízes adventícias.

3.3 Rizogênese *ex vitro*

3.3.1 Auxinas no enraizamento *ex vitro*

Brotações com aproximadamente 3 cm de comprimento, oriundas da multiplicação e individualização (item 3.1) foram submetidas à imersão em diferentes concentrações (0, 500 e 1000 μM) das auxinas AIB ou AIA por 30 segundos, e após foram inoculadas em tubetes de 290 cm^3 contendo substrato comercial Tropstrato[®]. Foram utilizadas 5 repetições com 4 brotações cada repetição.

Em seguida foram irrigadas com água destilada e recobertas com saco transparente de polietileno para manter a umidade. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento de plantas com temperatura de 25°C com fotoperíodo de 16h fornecidas por lâmpada de LED. A cada 7 dias, uma parte do saco plástico foi recortada e as plântulas irrigadas. Após 28 dias os sacos plásticos foram retirados por completo e aos 30 dias, avaliou-se a formação de raízes (%), comprimento das raízes formadas (cm) e também o comprimento da parte aérea (cm) para analisar o crescimento das brotações no enraizamento *ex vitro*.

Em seguida, brotações enraizadas de cada tratamento, foram transferidas para sacos plásticos para mudas 10 x 16 cm contendo substrato comercial Troptrato[®]. Em seguida foram levadas para casa de vegetação com telado do tipo sombrite que permite a passagem de apenas 50% da radiação solar incidente onde permaneceram por 30 dias, e foi avaliada a sobrevivência (%). Após esse período foram transferidos para pleno sol, e então 30 dias depois, foi avaliada a sobrevivência (%).

3.3.2 Análises histológicas

Brotações com aproximadamente 3 cm de comprimento foram submetidas ao melhor tratamento do item anterior e após foram inoculadas em tubetes de 290 cm^3 contendo substrato Tropstrato[®]. Em seguida foram irrigadas e recobertas com saco transparente de polietileno para manter a umidade. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento de plantas com temperatura de 25°C e amostras da base (1 cm) e acima

da base (1 cm) das brotações em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletadas para as análises histológicas. O processo de fixação, desidratação, emblocamento e obtenção das imagens foram realizados conforme descrito no item 3.2.2.

Foram realizadas análises qualitativas de presença ou ausência das características anatômicas, bem como as variações das formas, tipos das células ao longo do desenvolvimento das raízes adventícias.

3.3.3 Análises bioquímicas durante o enraizamento *ex vitro*

Para realização das análises bioquímicas, 2.100 brotações com aproximadamente 3 cm de comprimento foram submetidas ao melhor tratamento de enraizamento *ex vitro* determinado anteriormente e ao tratamento controle e após foram inoculadas em copos plásticos de 200 mL descartáveis contendo substrato Tropstrato[®]. Foram acondicionadas 3 brotações por copo. Em seguida foram irrigadas e recobertas com saco transparente de polietileno para manter a umidade.

As brotações foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16h. Após 0, 4, 8 e 16 dias de cultivo, amostras da base das brotações foram coletadas para as análises bioquímicas. Foi realizada a determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica e também foi analisada a atividade das enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

Amostras de 200 mg da base dos explantes com 1 cm (aproximadamente 50 bases) do melhor tratamento para enraizamento, além do tratamento controle foram acondicionadas em triplicata, em envelopes de papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido (NL). Posteriormente, as amostras foram transferidas para um ultra-freezer -80 °C onde ficaram armazenadas.

3.3.3.1 Análises bioquímicas não enzimáticas

3.3.3.1.1 Determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica

Para determinação do H₂O₂, 200 mg da base dos explantes com 1 cm (em triplicata) foram macerados em NL, acrescido de 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (m/v), homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e

centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, à 4 °C. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorvância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 500 µL do extrato e 1,0 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). 200 mg da base dos explantes com 1 cm (em triplicata) foram macerados em NL, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados com 1500 µL de TCA 0,1% (m/v). O homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. Aliquotas de 125 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação com 250 µL de [0,5% (m/v) de TBA e 10% (m/v) de TCA], incubando-se, em seguida, em banho-maria a 95°C, por 30 minutos.

A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

3.3.3.2 Análises bioquímicas enzimáticas

Para a CAT, SOD e POD, 200 mg da base dos explantes com 1 cm (em triplicata) foram macerados em NL, acrescido de 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (m/v). O meio de extração foi constituído de tampão fosfato de potássio 400 mM, pH 7,8; EDTA 10 mM; ácido ascórbico 200 mM e água (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998). A quantificação de proteína para determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.3.3.2.1 Determinação da atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático ao meio de reação constituído de 90 µL tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0, 72 µL de água e 9 µL de H₂O₂ 250 mM, incubado em banho-maria a 30°C (HAVIR e McHALE, 1987), (concentrações finais: Fosfato de potássio 100 mM e H₂O₂ 12,5 mM).

A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ANDERSON et al., 1995) e expresso em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.3.3.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O meio de reação utilizado foi composto por 10 μL do extrato enzimático, 100 μL de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, 40 μL de metionina 70 mM, 3 μL de EDTA 10 μM , 15 μL de NBT 1 mM, 2 μL de riboflavina 0,2 mM e 31 μL de água. As placas com o meio de reação foram iluminadas por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade (U) da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio. A atividade foi expressa por $\text{U min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.3.3.3 Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da POD foi avaliada pela capacidade da enzima em formar guaiacol oxidado (coloração alaranjada) (NAKANO, ASADA, 1981, com modificações de GARCIA-LIMONES, 2002). O meio de reação utilizado foi composto por 8 μL do extrato enzimático, 100 μL de fosfato de potássio 200 mM, pH 6,5, 30 μL de guaiacol 100 mM, 32 μL de água e 30 μL de H_2O_2 0,35%, incubado em banho-maria a 30°C. As leituras foram realizadas a 470 nm de 15 em 15 segundos durante 5 minutos. A atividade da POD foi determinada pelo aumento na absorvância pela formação do tetraguaiacol. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade da POD corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 1 $\eta\text{mol min}^{-1}$ tetraguaiacol nas condições do ensaio. A atividade foi expressa por $\eta\text{mol de tetraguaiacol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

3.4 Análises estatísticas

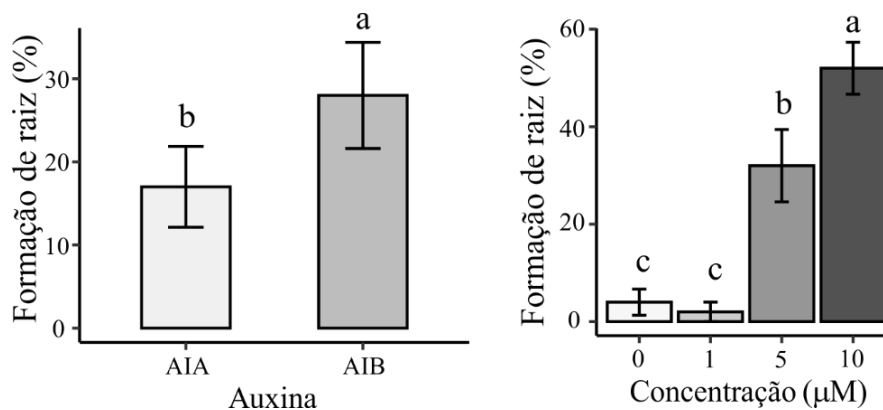
Todas as análises foram realizadas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em fatorial duplo (auxina x concentração). Foi realizada a análise de variância, teste F ($p < 0,05$), para todas as variáveis e foi aplicada transformação de Box-Cox aos dados que apresentaram desvio nos parâmetros de normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises e elaboração dos gráficos foram realizadas com auxílio do software R Core Team (2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Auxinas na rizogênese *in vitro*

Na análise do efeito das auxinas no processo de enraizamento *in vitro* para a variável formação de raízes, os resíduos da análise de variância não são normais, então foi realizada a transformação Box-Cox com parâmetro $\lambda = 2$. Após a transformação, foi observada diferença significativa para o efeito da auxina e da concentração, mas não foi observado efeito significativo da interação. Analisando os efeitos simples, observou-se que as porcentagens médias de enraizamento das brotações expostas ao AIB (28%) foram superiores a AIA (17%). Pelo teste de Tukey, as brotações expostas à concentração 10 μM foram as que apresentaram o melhor desempenho (52%) e às concentrações 0 e 1 μM de auxina não diferiram entre si e representaram as menores porcentagens médias (4 e 2% respectivamente) (Figura 3).

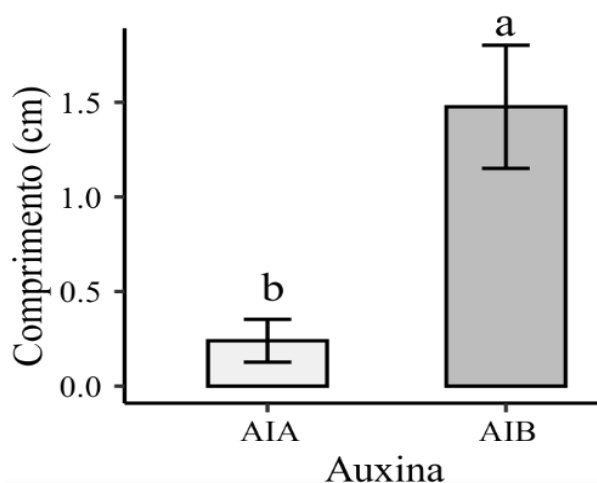
Figura 3- Efeito das auxinas AIA e AIB e de concentração na formação de raízes *in vitro* em brotações de *Campomanesia rufa*.



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

Para a análise de variância foi realizada a transformação Box-Cox com $\lambda = \frac{1}{2}$, pois houve um desvio nos pressupostos de normalidade. Pelo teste de Tukey, observou-se diferença significativa para auxina, em que a média de AIB foi superior a AIA. No entanto, não foi observada diferença significativa para a concentração nem para a interação. Para o comprimento das raízes, observou-se que do mesmo modo que para formação radicular, as brotações expostas ao AIB apresentaram melhores resultados que com AIA. Já com relação à concentração não houve diferença significativa.

Figura 4- Comprimento de raízes em brotações de *Campomanesia rufa* enraizadas *in vitro* com AIA e AIB.



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

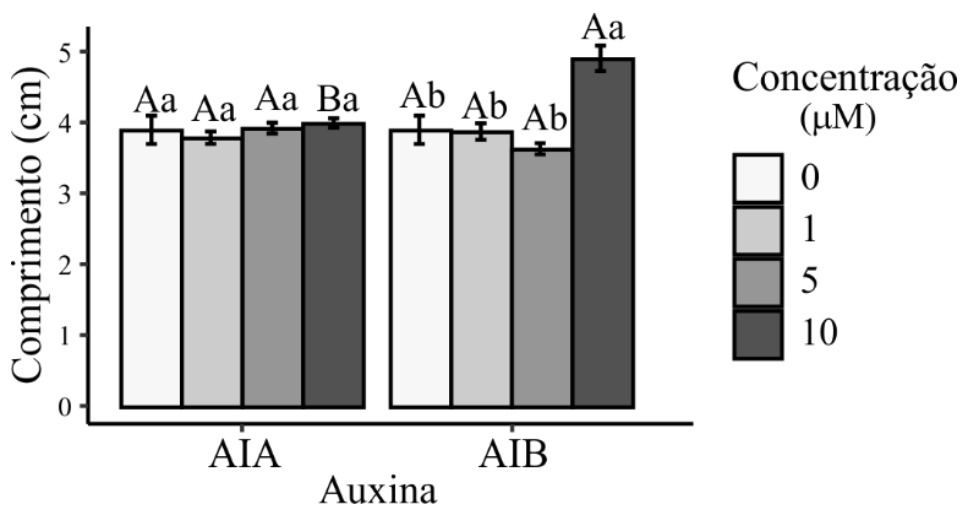
Com relação ao comprimento das raízes formadas, as brotações expostas às concentrações 0 e 1 μ M apresentaram uma quantidade muito pequena de raiz, se comparadas com as concentrações 5 e 10 μ M. Assim, o número de parcelas para essas concentrações é muito pequeno podendo acarretar em resultados que não representam bem a realidade. Deste modo, para proceder com a análise de variância para o comprimento de raiz, foram consideradas apenas as concentrações 5 e 10 μ M, que não apresentaram diferença estatística entre si.

O AIB para enraizamento adventício é mais utilizado que o AIA por apresentar maior capacidade de induzir raízes sendo mais estável à luz que o AIA (PACURAR, 2014). Além disso, o AIB atua como uma liberação lenta e contínua de AIA, por ser convertido em AIA de forma similar à oxidação de ácidos graxos, atuando como uma forma conjugada de AIA. Além disso, a aplicação exógena de AIB também pode ser potencializada pelos níveis endógenos de AIA presentes na planta (BARTEL et al, 2001). Desta forma, compreende-se porque utilizar o AIB em meio de cultivo para enraizamento de *C. rufa* apresentou melhores resultados que o AIA. Isso ocorreu porque as brotações inoculadas em meio de cultivo com a auxina foram mantidas em sala de crescimento com 16h de exposição à luz. Então por apresentar maior estabilidade à luz e atuando como uma liberação lenta de AIA para a brotação, o AIB foi capaz de induzir maior enraizamento nas brotações de *C. rufa in vitro* (Figura 3).

Diversas espécies apresentam resultado positivo com a utilização de AIB para enraizamento *in vitro*, como *Eugenia pyriformis*, *Cotinus coggygia*, *Ugni molinae* e *Eucalyptus* spp (BERAUD et al, 2015; GALLO et al, 2017; ILCZUK; JACYGRAD, 2016; NASCIMENTO et al, 2008). Já para enraizamento de *Campomanesia adamantium*, o AIB, AIA ou ANA (ácido naftaleno acético) não apresentaram resultados positivos para o enraizamento com as concentrações que foram testadas (ROSSATO et al, 2015). Estes resultados auxiliam a compreender a importância de estudar a auxina e sua concentração adequada, pois é variável e espécie dependente (PORFIRIO et al, 2016).

Além de avaliar a formação e comprimento das raízes formadas em brotações de *C. rufa*, também foi analisado o desenvolvimento da parte aérea no enraizamento *in vitro*, que apresentou um efeito significativo para a interação. Fazendo o desdobramento de auxina dentro de cada concentração, observou-se a diferença significativa entre AIA e AIB apenas na concentração 10 μ M (Figura 5).

Figura 5- Efeito das auxinas AIA e AIB e da concentração no comprimento de parte aérea de brotações de *Campomanesia rufa* no enraizamento *in vitro*.



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas representam a comparação do efeito entre as auxinas e minúsculas comparam o efeito de concentração dentro de cada auxina. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

No desdobramento de concentração dentro de cada auxina, observou-se que as brotações expostas à auxina AIA, não apresentam diferença significativa considerando as diferentes concentrações. Já para AIB, observou-se que as brotações expostas à concentração de 10µM apresentaram maior comprimento de parte aérea, e nas concentrações 0, 1 e 5 µM não diferiram estatisticamente entre si pelo teste Tukey (Figura 5).

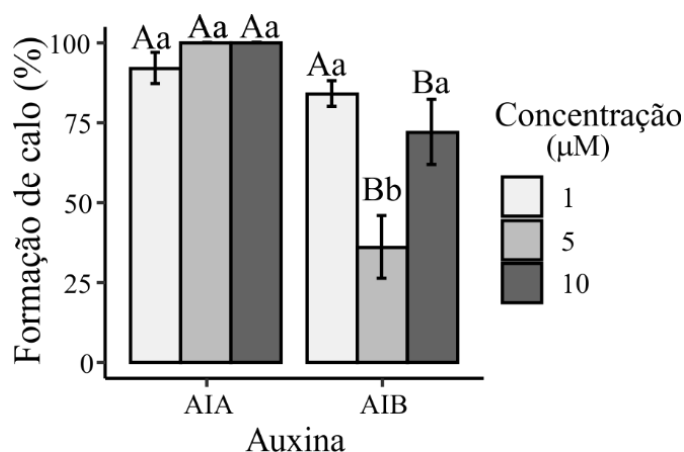
A aplicação dos reguladores vegetais em uma concentração ótima estimula o crescimento e diferenciação dos tecidos (MULLER; LEYSER, 2011). Nesse sentido, a utilização de AIB aumentou a formação e o comprimento das raízes em *C. rufa*, aumentando a área de absorção, permitindo maior crescimento da parte aérea (MULLER; LEYSER, 2011). Assim, os resultados encontrados são condizentes, de modo que a melhor concentração encontrada (10 µM) para a promoção do enraizamento gerou o maior crescimento da parte aérea, embora para comprimento de raiz a concentração de 5 e 10 µM de AIB não tenham diferido significativamente (Figuras 3, 4 e 5).

Além destes aspectos, durante o processo de enraizamento *in vitro*, observou-se formação de calos na base das brotações inoculadas em meio contendo auxina, o que não foi observado para o tratamento controle.

Como para a ausência de regulador não houve formação de calo, a análise da variância foi feita utilizando apenas as concentrações 1, 5 e 10 μM . Para realização das análises, foi realizada a transformação Box-Cox com $\lambda = 2$ devido a um desvio nos pressupostos de normalidade. Foi observado um efeito significativo para a interação.

Fazendo o desdobramento de auxina dentro de cada concentração, observou-se diferença significativa entre as brotações expostas à AIA e AIB apenas nas concentrações 5 e 10 μM (Figura 6). No desdobramento de concentração dentro de auxina, observou-se que para auxina AIA, não há diferença significativa entre as concentrações testadas. Já para AIB, observou-se que as brotações expostas à 5 μM apresentaram menor porcentagem de formação de calo, e as expostas às concentrações 1 e 10 μM apresentaram maior formação de calo, não diferindo estatisticamente entre si pelo teste Tukey (Figura 6).

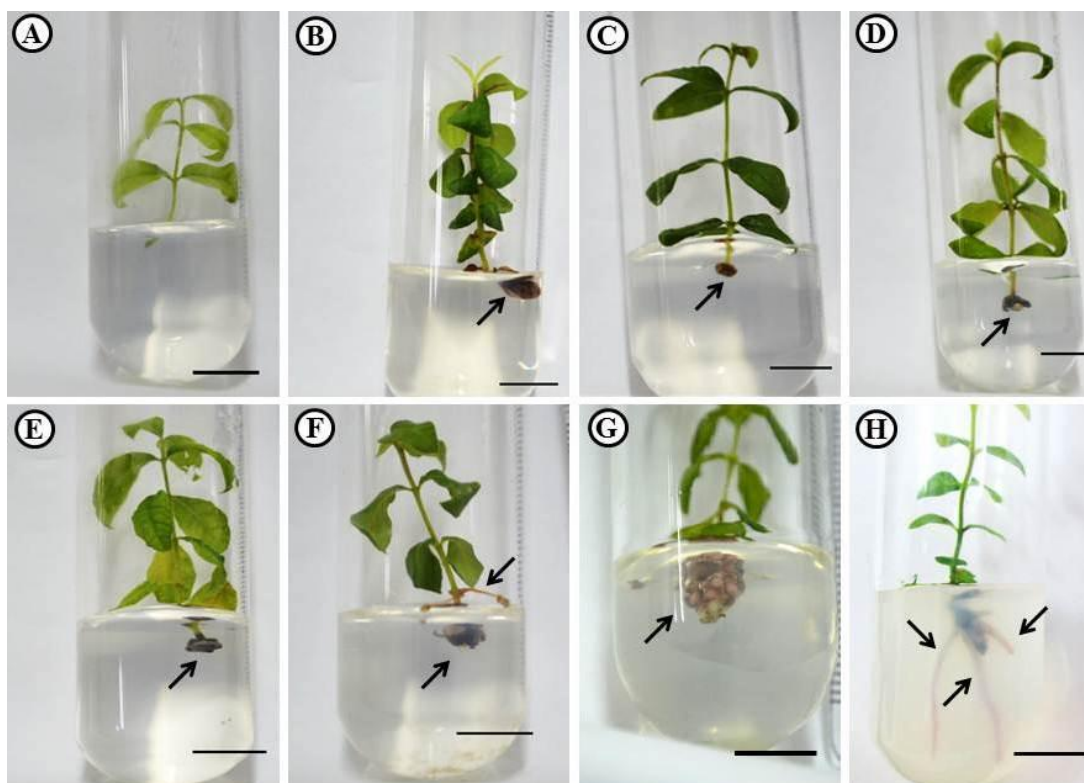
Figura 6- Efeito das auxinas AIA e AIB e da concentração na formação de calos na base de brotações de *Campomanesia rufa* no enraizamento *in vitro*.



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas representam a comparação do efeito entre as auxinas e minúsculas comparam o efeito de concentração dentro de cada auxina. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

Esta formação de calo na base das brotações de *C. rufa*, submetidas aos tratamentos com AIA e AIB, podem ser observadas na figura 7.

Figura 7- Brotações de *Campomanesia rufa* 60 dias depois de serem submetidas aos tratamentos para enraizamento *in vitro*.



Legenda: Brotação livre de auxina (A); 1µM de AIA (B); 5µM de AIA (C); 10µM de AIA (D); 1µM de AIB (E); 5µM de AIB (F); 10µM de AIB (G); detalhe de raízes formadas *in vitro* com 10µM de AIB. Setas apontam para formação de calo e/ou formação de raiz. Barra= 1cm.

Fonte: Da autora, 2020.

A formação de calo pode ser ocasionada pelo dano mecânico realizado pela preparação do explante (ferimento na base) para indução de enraizamento adventício, o que leva a formação da raiz pela organogênese indireta. Esse processo está geralmente ligado às espécies de difícil enraizamento, embora também possam ocorrer as vias direta e indireta na mesma espécie (PORFIRIO et al, 2016). No entanto, como o tratamento controle não apresentou formação de calos nas brotações de *C. rufa*, esse efeito foi ocasionado pela ação das auxinas, não dos ferimentos na base.

Durante a organogênese indireta de raízes, primeiramente ocorre o processo de dediferenciação das células e posteriormente o desenvolvimento do primórdio radicular, a partir do calo (PORFIRIO et al, 2016). Os calos são constituídos por massas dediferenciadas de células parenquimáticas, tipicamente desorganizadas, pouco diferenciadas. Deste modo, as células que se tornam meristemáticas dividem-se e

originam primórdios radiculares, ocorrendo diferenciação de raízes adventícias a partir de células adjacentes ao câmbio e ao floema secundário (HARTMANN et al, 2011).

Os autores abordam ainda que é necessário se considerar que a formação radicular e de calos são processos independentes na maioria das plantas. Todavia, em algumas espécies, a formação de calo pode ser precursora da formação de raízes adventícias (HARTMANN et al, 2011), como por exemplo, o enraizamento *in vitro* em segmentos apicais e nodais de *Eugenia involucrata*, de gemas de *Eucalyptus globulus* e enraizamento de *Carica papaya* (BALTIERRA; MONTENEGRO; GARCÍA, 2004; GOLLE et al, 2012; SCHMILDT et al, 2010). Deste modo, as brotações de *C. rufa* que apresentaram alta porcentagem de calos, tratadas com AIA, podem necessitar de um período mais prolongado para a posterior formação radicular. No entanto, esse maior período para formação das raízes é desvantajoso, pois acarreta em maior tempo para obtenção das mudas viáveis e consequentemente maior custo de produção.

Para o enraizamento *in vitro* de *C. rufa* também foram testadas concentrações superiores (15, 20, 25 e 50 μM) de AIA e AIB, além da utilização da auxina ANA, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios (dados não mostrados). Além disso, também foi realizado o processo de enraizamento conforme a metodologia descrita por De Klerk et al. (2002), onde dois meios de cultivo são empregados: um meio de indução à rizogênese contendo as fontes de auxina e um meio de expressão à rizogênese livre de auxinas. Para o meio de indução foram utilizadas as auxinas AIA, AIB e ANA nas concentrações 0, 5, 10, 15 e 20 μM , no qual as brotações permaneceram por 7 dias no escuro ou em luz e então foram transferidas para o meio de expressão livre de auxinas. Com a utilização desta metodologia não foi possível obter resultados satisfatórios para *C. rufa* (dados não mostrados).

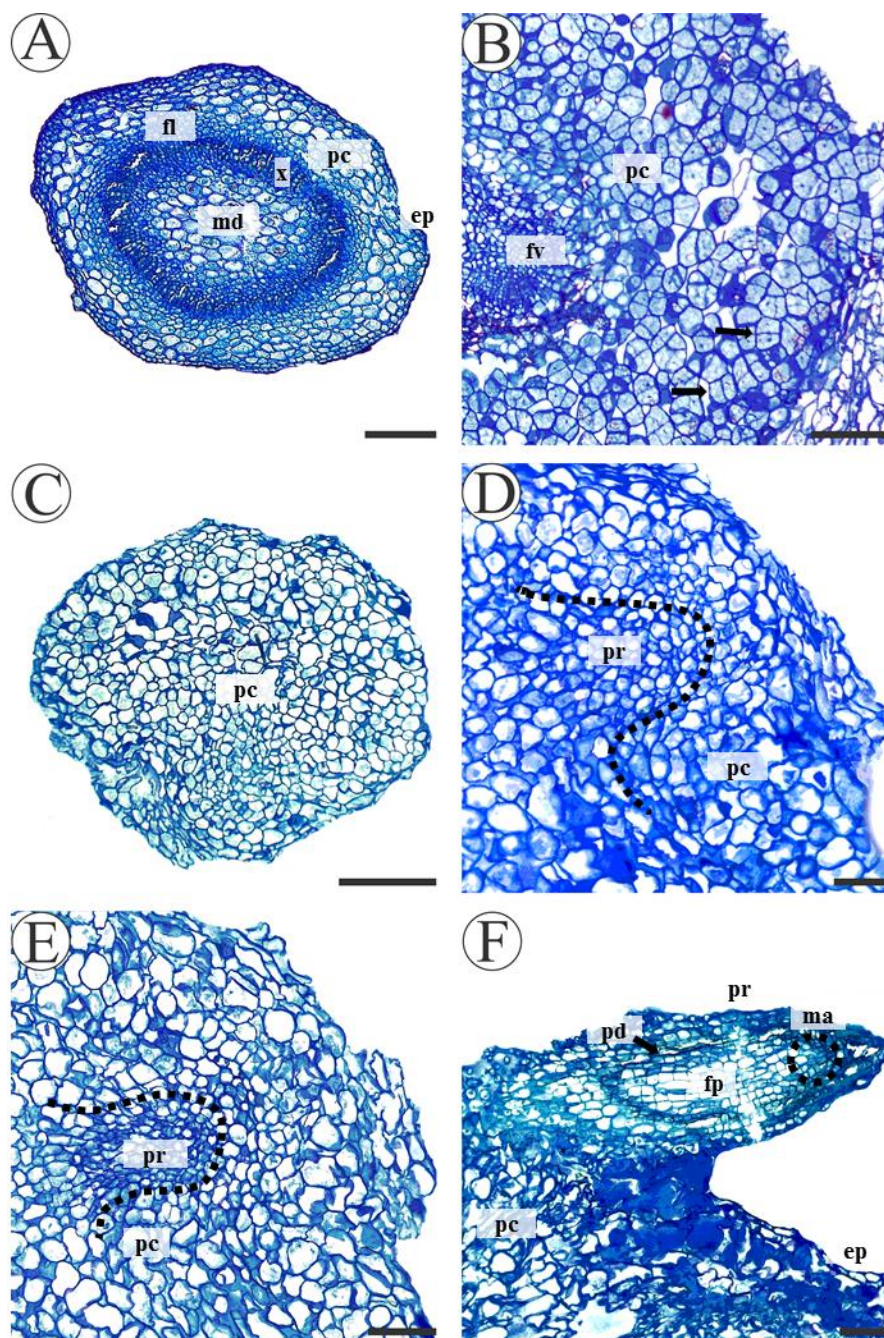
4.2 Alterações histológicas no processo de enraizamento *in vitro*

A formação de raízes adventícias de *C. rufa in vitro* foi obtida via organogênese indireta, como discutido anteriormente no item 4.1. Para comprovar essa via de formação, recorreu-se à observação histológica ao longo do processo de enraizamento, a fim de identificar as alterações da fase de indução para as fases de iniciação e expressão.

No dia 0, anterior à inoculação em meio com auxina, observou-se que a estrutura da base da brotação apresentava características típicas de caule. Apesar de se tratar de uma brotação jovem obtida via micropropagação, foi possível identificar o

desenvolvimento secundário das estruturas vasculares (xilema e floema). Observa-se uma epiderme bem delimitada, logo abaixo se encontra de 6 a 7 camadas de parênquima cortical, também podendo se observar as células medulares na região central do corte (Figura 8A).

Figura 8- Micrografias de cortes histológicos na base de brotações de *Campomanesia rufa* durante o enraizamento *in vitro*.



Legenda: Cortes transversais de brotações de *C. rufa* dia 0, anterior à inoculação com meio MS acrescido de 10 μ M de AIB, barra= 200 μ m (A); resquício de feixe vascular caulinar com divisões celulares (setas) no parênquima cortical do caule, barra= 50 μ m (B); Calo formado, evidenciado por células parenquimáticas altamente vacuolizadas e desorganizadas, barra= 200 μ m (C); Diminuição da vacuolização (tracejado), início da diferenciação de primórdio radicular, barra= 50 μ m (D); Estádio mais avançado de diferenciação que em D, barra= 50 μ m (E); primórdio radicular emergindo do calo, barra= 50 μ m (F); pc= parênquima cortical; ep= epiderme; x= xilema; fl= floema; md= medula; fv= feixe vascular; pr= primórdio radicular; pd=protoderme; fp= feixe procambial, ma= meristema apical da raiz. Fonte: Da autora, 2020.

Por volta dos 15 dias após a inoculação em meio acrescido de auxina, nota-se a presença de um resquício de vasculatura na região central do corte e observou-se intensa atividade mitótica no parênquima cortical, com divisões desordenadas que darão origem ao calo (Figura 8B). Posteriormente, as células cessaram as divisões celulares, e não foi possível se distinguir as células típicas de caule, notando-se apenas um conjunto de células parenquimáticas, tipicamente desorganizadas, caracterizando a formação de calo (Figura 8C). A formação de calos pode ser ocasionada pelo balanço hormonal de citocinina endógena com a auxina exógena, visto que no tratamento sem auxina não há formação de calos na base das brotações (HARTMANN et al, 2011).

As células do calo começam a se organizar para originar os primórdios radiculares, o que pode ser observado com a diminuição da vacuolização entre 20 e 30 dias após inoculação em meio MS com auxina (indicadas com a linha tracejada e que na figura 8E apresenta estágio mais avançado que na figura 8D). Essa organização ocorre para iniciar o processo de diferenciação de raízes adventícias, provavelmente a partir de células adjacentes ao câmbio e ao floema secundário do caule acima da estrutura do calo (HARTMANN et al, 2011). A formação de calos e de raízes adventícias são processos independentes, mas em determinadas espécies, como em *C. rufa in vitro*, a formação de calo pode anteceder a formação radicular.

Na figura 8E, observa-se o primórdio radicular surgindo não de células ligadas à vasculatura, mas das células do parênquima cortical entre 40 e 60 dias após indução ao enraizamento por AIB. No primórdio radicular, como ainda não são visíveis estruturas vasculares, supõe-se que ainda se têm estruturas meristemáticas, de modo que estas estruturas podem ser os feixes procambiais que posteriormente originarão os tecidos vasculares xilema e floema. Circundando essas células procambiais, há uma camada de células, possivelmente da protoderme, evidenciada por células mais alongadas, que darão origem à epiderme da raiz. Também é possível observar externamente à camada de protoderme, um resquício de células parenquimáticas do caule que foram arrastadas pelo primórdio radicular (Figura 8F).

Quando ocorre a formação de calos para posterior formação radicular, refere-se ao processo de organogênese indireta (PORFIRIO et al, 2016). E assim como a via de organogênese direta, o processo indireto é dividido nas fases de indução, iniciação e expressão (HUSEN, 2015; ILCZUC; JACYGRAD, 2016; PACURAR et al, 2014; ZHANG et al, 2017).

A duração da fase de indução de raízes adventícias em cultura de tecidos é variável e depende da espécie, até mesmo de cultivar (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). No caso do enraizamento *in vitro* de *C. rufa*, o processo de indução foi de aproximadamente 15 dias, onde não foram observadas alterações histológicas, como representado na figura 8A. Diferentemente, *Eucalyptus globulus*, por exemplo, já no terceiro dia após inoculação em meio de cultivo contendo AIB, apresentou sinais de desdiferenciação para formação de calo (BALTIERRA, MONTENEGRO; DE GARCÍA, 2004).

Na fase seguinte em *C. rufa*, a iniciação foi marcada pela intensa e desordenada divisão celular no parênquima cortical (Figura 8B) o que resultou na formação de calos (Figura 8C) culminando na diminuição da vacuolização para diferenciação do primórdio (Figuras 8D, 8E). Este período de iniciação ocorreu entre os 15 e 40 dias após a inoculação das brotações em meio MS com AIB. Já a fase de expressão ocorreu entre 40 e 60 dias após exposição das brotações ao AIB no meio de cultura com o rompimento da epiderme pelo primórdio radicular oriundo das células parenquimáticas do calo (Figura 8F). Em *Gomphrena macrocephala*, também nativa do Cerrado, foi observado que no processo de enraizamento indireto, assim como em *C. rufa*, não houve conexão vascular com o explante (MOREIRA; APPEZZATO-DA-GLORIA; ZAIDAN, 2000). Desta forma foram concluídas as alterações durante as fases de enraizamento de *C. rufa* *in vitro* que podem ser analisadas morfológicamente na figura 9.

Figura 9- Fases do processo de enraizamento adventício *in vitro* de brotações de *Campomanesia rufa*.



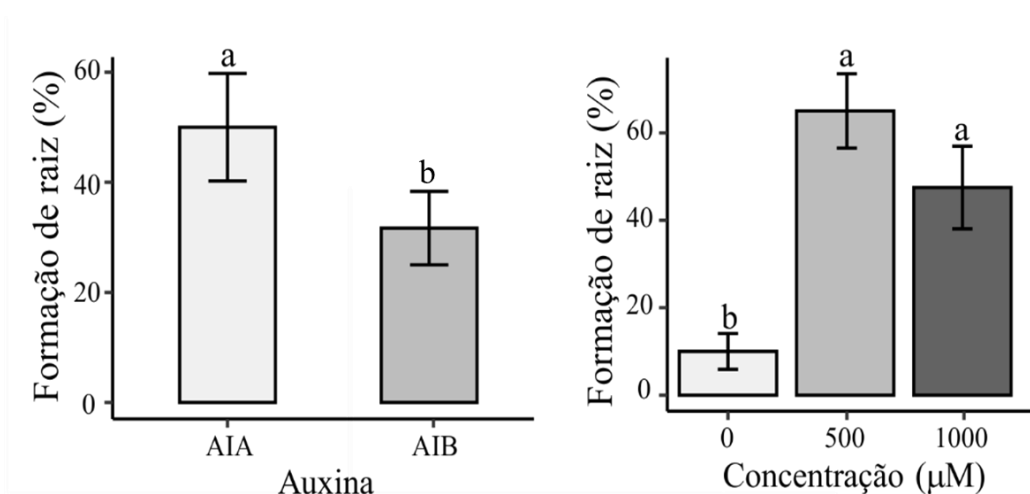
Legenda: Enraizamento via organogênese indireta *in vitro* de *C. rufa* ao longo de 60 dias com 10 μ M de AIB. Detalhe para formação de calo na base na fase de iniciação e para formação da raiz a partir do calo na fase de expressão. Barra= 1cm. Fonte: Da autora, 2020.

Na imagem podemos observar que as brotações durante a fase de iniciação, aproximadamente 15 dias, não apresentam alterações visíveis na base, o que já começa a ser visualizado na fase de iniciação com a formação de calo na base, dos 15 aos 40 dias aproximadamente. Também podemos observar na fase de expressão, que ocorre de 40 a 60 dias aproximadamente, que o processo de formação de raízes em *C.rufa in vitro*, ocorre via organogênese indireta, a partir do calo.

4.3 Auxinas no enraizamento *ex vitro*

Considerando as porcentagens médias para formação de raízes *ex vitro*, pelo teste F ($p < 0,05$) existe diferença significativa para o efeito de auxina e de concentração, mas não há efeito significativo da interação entre eles. Analisando os efeitos simples pelo teste de Tukey, para o efeito de auxina, a porcentagem média de formação de raiz em brotações tratadas com AIA foi superior (50%) às tratadas com AIB (31,67%). Para o efeito de concentração, as porcentagens de formação de raiz das brotações nas concentrações 500 e 1000 μM não diferiram entre si, (65 e 47,5% respectivamente) mas foram superiores ao tratamento controle que apresentou 10% de enraizamento (Figura 10). Todas brotações sobreviveram a aclimatização durante o processo de enraizamento *ex vitro*, incluindo as brotações do tratamento controle, embora tenham apresentado baixa porcentagem de enraizamento.

Figura 10 - Efeito das auxinas AIA e AIB e da concentração na formação de raízes *ex vitro* em brotações de *Campomanesia rufa*.

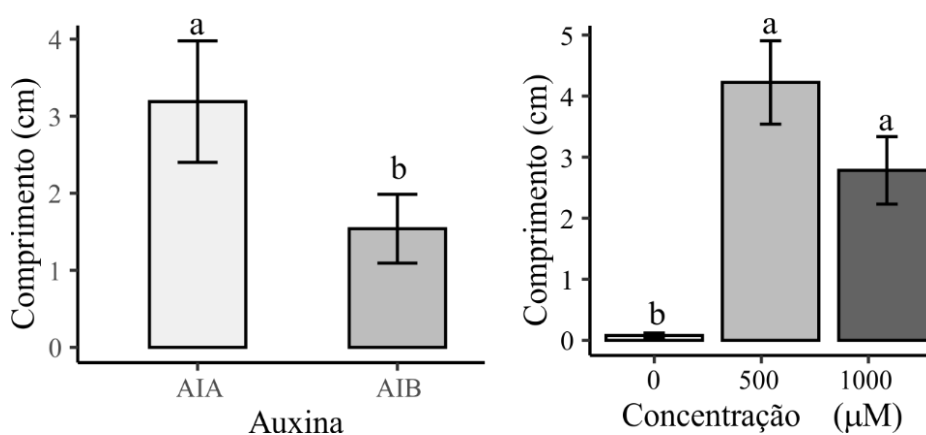


Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

A observação da porcentagem de formação de raízes *ex vitro*, reforça que para a obtenção de raízes, aplicar AIA é melhor que AIB, ao contrário do observado *in vitro* para esta espécie. Para as brotações tratadas com as concentrações 500 e 1000 μ M, embora não apresentem diferença estatisticamente, a utilização de 500 μ M de AIA apresenta vantagens. Isso porque representa a utilização da metade da concentração em comparação com 1000 μ M de AIA, o que acarreta uma diminuição de 50% dos gastos com o regulador de crescimento.

Considerando os comprimentos médios de raiz nas repetições, também se observou diferença significativa para auxina e concentração, mas não houve efeito significativo da interação. Analisando os efeitos simples pelo teste de Tukey, para efeito de concentração, o comprimento médio (cm) das raízes formadas nas brotações tratadas com as concentrações 500 e 1000 μ M não diferiram entre si, mas foram significativamente maiores que as brotações do tratamento controle. Considerando o efeito de auxina, o comprimento médio das raízes formadas utilizando o AIA foi superior (3,19 cm) ao AIB (1,54 cm). Já considerando o efeito de concentração, os comprimentos médios das raízes das brotações tratadas com as concentrações 500 e 1000 μ M não diferiram entre si, mas foram superiores ao controle (Figura 11).

Figura 11- Efeito das auxinas AIA e AIB e da concentração no comprimento de raízes em brotações de *Campomanesia rufa* enraizadas *ex vitro*.



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

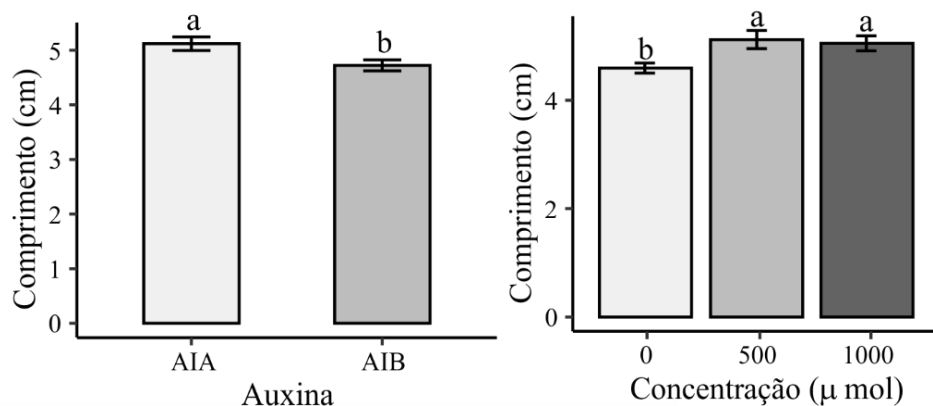
Como discutido anteriormente, para indução de raízes, o AIB geralmente se destaca por ser mais estável à luz em relação ao AIA (PACURAR, 2014). No entanto, o

AIA ter apresentado melhor resultado *ex vitro*, pode ser justificado porque o método utilizado foi de imersão rápida, então, o tempo de exposição à luz foi muito curto e pode não ter afetado a sua estabilidade durante a imersão das brotações. Além disso, o AIB pode ser convertido em AIA por um mecanismo paralelo à oxidação de ácidos graxos, de modo que atua como alguns conjugados de AIA (BARTEL et al, 2001). Assim, como o tempo de imersão nos reguladores foi de apenas 30 segundos, considerando que o AIB atua como uma liberação lenta e contínua de AIA (BARTEL et al, 2001), a atuação do AIA para o enraizamento *ex vitro* por imersão rápida pode ter sido mais efetiva por já ser fornecida na sua forma ativa, diferentemente do ocorrido no enraizamento *in vitro*.

Em *Maytenus aquifolia*, a utilização de AIA também se mostrou eficiente para formação e comprimento de raízes com utilização de 1000 mg L^{-1} (equivalente a $5707,76 \text{ } \mu\text{M}$) do regulador de crescimento, cerca de 10 vezes superior à concentração utilizada no melhor tratamento para *C. rufa* (DALPIAZ et al, 2019). Em estacas lenhosas de pessegueiro, 500 mg L^{-1} de AIA promoveu maior enraizamento (SCARIOT et al, 2016). Inclusive uma espécie do gênero, *Campomanesia adamantium*, apresentou melhor enraizamento de estacas lenhosas com a utilização de 1000 mg L^{-1} de AIA (MARTINS et al, 2015). Já em outras espécies a utilização de AIB se mostra eficaz no enraizamento de estacas como em *Luehea divaricata* e *Psidium guinnensis*, (BUURON DA SILVA et al, 2019; CARVALHO; RIBEIRO; SOUSA, 2020). Assim, se demonstra a importância de se estudar qual a auxina e a sua concentração ideal para indução do enraizamento.

Além de avaliar a formação e comprimento das raízes formadas em brotações de *C. rufa*, também foi analisado o desenvolvimento da parte aérea no enraizamento *ex vitro*, que assim como para a formação e comprimento de raízes, apresentou efeito significativo para concentração e auxina, mas não houve efeito de interação entre eles. Analisando os efeitos simples, para efeito de concentração, os comprimentos da parte aérea das brotações tratadas com as concentrações 500 e $1000 \text{ } \mu\text{M}$ não diferiram entre si. Para o efeito de auxina, a média de comprimento da parte aérea das brotações em AIA foi superior (5,12 cm) a AIB (4,72 cm). Para efeito de concentração, o comprimento da parte aérea foi maior nas concentrações 500 e $1000 \text{ } \mu\text{M}$ que não diferiram entre si, mas foram superiores ao controle (Figura 12).

Figura 12- Efeito das auxinas AIA e AIB e de concentração no comprimento de parte aérea no processo de enraizamento *ex vitro* em brotações de *Campomanesia rufa*.



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

Na figura 13 é possível observar a diferença do comprimento das raízes formadas entre os tratamentos, evidenciando em D o melhor resultado, obtido com a aplicação de 500 µM de AIA.

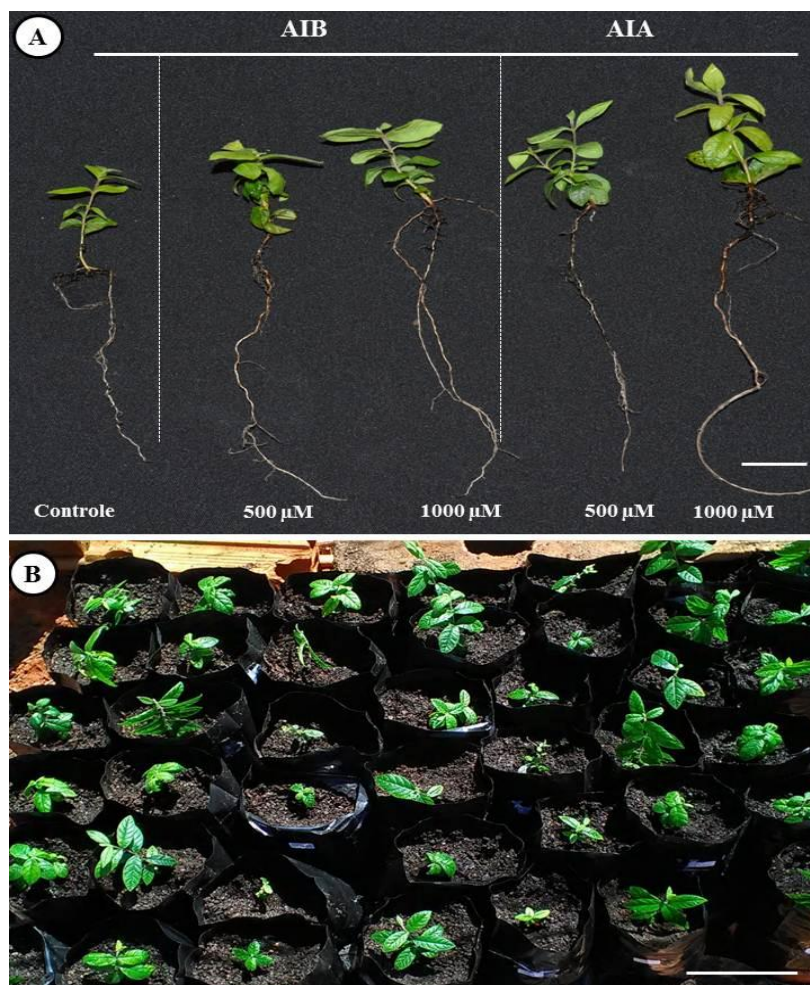
Figura 13- Brotações de *C. rufa* 30 dias depois de serem submetidas aos tratamentos para enraizamento *ex vitro* com AIA e AIB.



Legenda: Brotação livre de auxina (A); 500 µM de AIB (B); 1000 µM de AIB (C); 500 µM de AIA (D); 1000 µM de AIA (E). Barra= 1cm. Fonte: Da autora, 2020.

Após a avaliação do enraizamento *ex vitro* aos 30 dias, as brotações enraizadas foram levadas para casa de vegetação com sombrite 50%, e 30 dias depois, avaliou-se a sobrevivência foi de 100%, independente do tratamento. Em seguida foram transferidas para pleno sol, e após 30 dias nesta condição, também foi observado 100% de sobrevivência, independente do tratamento (Figura 14).

Figura 14- Brotações de *C. rufa* enraizadas *ex vitro* cultivadas em sala de crescimento após transferência para casa de vegetação com sobrite 50% e à pleno sol.



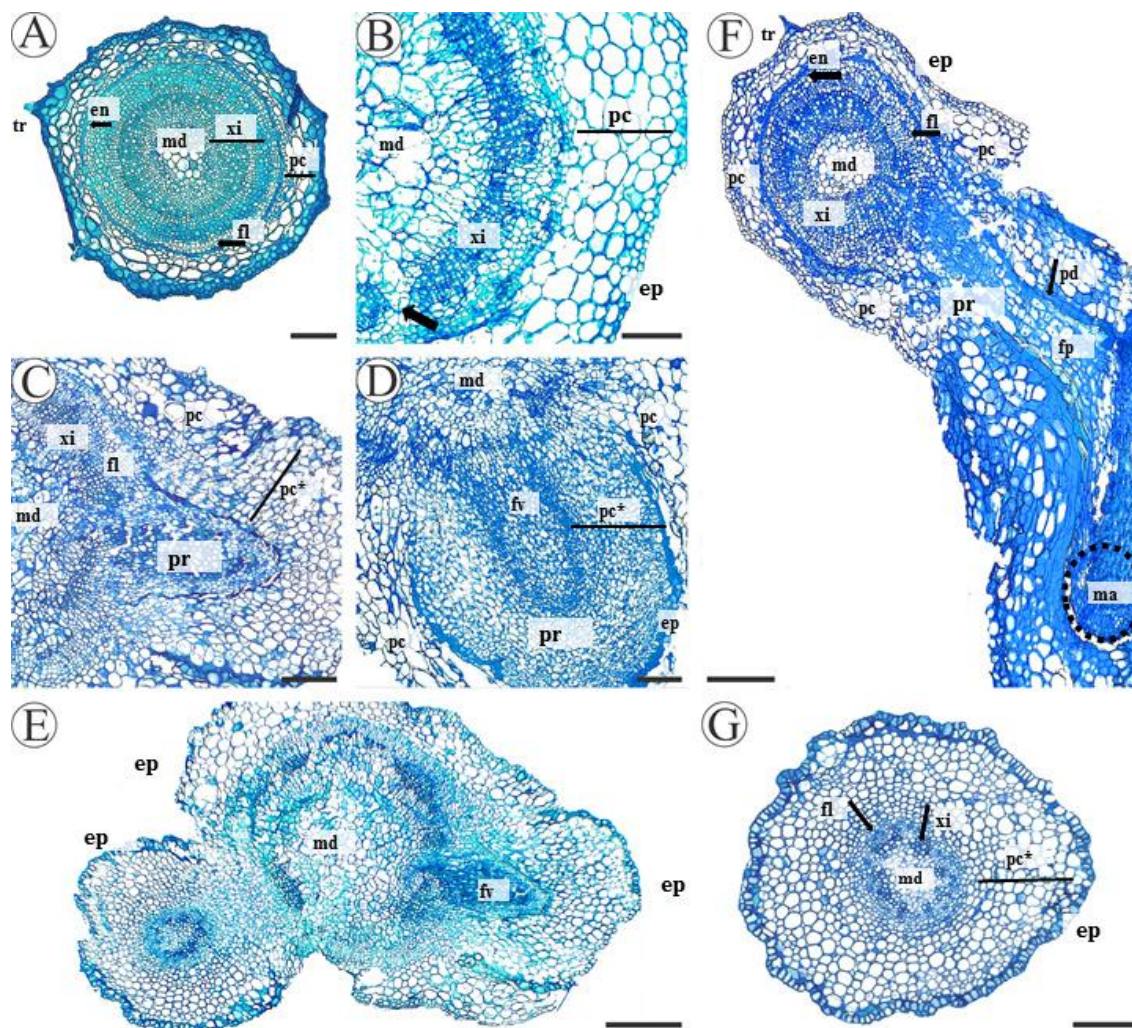
Legenda: Brotações enraizadas *ex vitro* 30 dias após transferência para casa de vegetação com sobrite 50%, barra= 2cm (A) e 30 dias após transferência para pleno sol, barra= 10 cm (B).
Fonte: Da autora, 2020.

Assim, conclui-se que após o processo de formação de raízes em *C. rufa*, independente de aplicar auxina ou não, as brotações enraizadas apresentam uma excelente sobrevivência, tanto após transferência para casa de vegetação com sombrite, quanto à pleno sol, embora com diferença no comprimento de parte aérea entre os tratamentos. Para o tratamento controle, considerando que apenas 10% das brotações formaram raízes até os 30 dias, quando realizada a avaliação, apenas 2 brotações foram transferidas para casa de vegetação com sombrite e posteriormente transferidas para pleno sol.

4.4 Alterações histológicas no processo de enraizamento *ex vitro*

As brotações de *C. rufa*, no dia 0, antes da imersão em 500 μM de AIA, (que embora seja estatisticamente igual a utilização de 1000 μM , foi escolhido por questões de custo) *ex vitro*, apresentaram uma estrutura bem organizada de caule. É possível observar que há um padrão de crescimento secundário, com xilema e floema secundários. Além disso, observa-se também a epiderme bem estruturada, já iniciando a formação de periderme, logo abaixo, formando o córtex tem-se o parênquima. Nota-se também uma camada de endoderme acima do floema secundário, logo abaixo se observa anéis de crescimento do xilema secundário e na região central a medula (Figura 15A). Na base das brotações também pode ser encontrada a estrutura do caule em transição do crescimento primário para o crescimento secundário, onde ainda não ocorreu o fechamento completo do cilindro vascular (Figura 15B).

Figura 15- Micrografias de cortes histológicos na base de brotações de *Campomanesia rufa* durante o enraizamento *ex vitro*.



Legenda: Cortes transversais de brotações de *C. rufa* dia 0, anterior à aplicação de 500μM de AIA, barra= 200 μm (A); Detalhe da base da brotação em transição para crescimento secundário, barra= 50 μm (B); Início da formação de primórdio radicular a partir do câmbio vascular, barra= 50 μm (C); Estádio mais avançado de desenvolvimento do primórdio radicular, barra= 50 μm (D); Detalhe de caule com 2 primórdios radiculares em diferentes estádios de desenvolvimento, barra= 200 μm (E); Caule em corte transversal, primórdio radicular em longitudinal, destaque para protoderme, feixes procambiais e meristema apical, barra= 200 μm (F); Raiz adventícia obtida *ex vitro*, barra= 200 μm (G).); pc= parênquima cortical; pc*= parênquima cortical radicular; ep= epiderme; x= xilema; fl= floema; md= medula; fv= feixe vascular; pr= primórdio radicular; pd=protoderme; fp= feixe procambial, ma= meristema apical da raiz. Fonte: Da autora, 2020.

Analisando a figura 15C, podemos observar a emergência do primórdio radicular via organogênese direta, não precedida pela formação de calo, ao contrário do que foi observado no processo *in vitro*. Além disso, é possível identificar uma conexão do primórdio radicular com a vasculatura, originado do câmbio vascular, o que também

não ocorreu *in vitro*. Na região onde o primórdio se desenvolve, há uma desorganização do xilema e floema (Figura 15C) que serão reorganizados quando a formação da raiz se completar (Figura 15E). À medida que se inicia o desenvolvimento do primórdio radicular, ocorrem divisões e alongamento celular para o seu crescimento, até o rompimento do córtex do caule (Figura 15D, 15E e 15F).

Na figura 15D, podemos observar o primórdio mais desenvolvido que em 15C, onde já podemos observar um rompimento da epiderme do caule, já sendo possível identificar a epiderme do primórdio radicular com resquício de células parenquimáticas do corte do caule ao seu redor. Além disso, podemos visualizar as células se organizando para formação do feixe vascular. Já na figura 15E, podemos observar 2 estádios de desenvolvimento do primórdio radicular. À direita tem-se a fase de iniciação, com o alongamento das células para seu crescimento, apresentando conexão com a vasculatura caulinar. À esquerda se observa a fase de expressão, onde já é possível identificar a estrutura da raiz independente da estrutura do caule, que já reorganiza os feixes vasculares.

A figura 15F nos permite observar o caule em corte transversal e o primórdio adventício em corte longitudinal. Assim como foi observado nas figuras 15C, 15D e 15E, observa-se que há uma comunicação do primórdio com a vasculatura caulinar, rompimento do córtex e epiderme, e na estrutura do primórdio ainda não são visualizadas as estruturas vasculares, apresentando ainda estruturas meristemáticas, podendo representar os feixes procambiais que posteriormente originarão xilema e floema. Circundando essas células procambiais, assim como observado no primórdio do enraizamento *in vitro* (Figura 8) há uma camada de células, possivelmente da protoderme, evidenciada por células mais alongadas, que darão origem à epiderme da raiz. Na região apical do primórdio, se observa um conjunto de células pequenas com citoplasma denso e tipicamente meristemáticas, podendo ser o meristema apical radicular. As células parenquimáticas externamente à protoderme são uma continuidade do córtex caulinar.

Na figura 15G, temos a estrutura da raiz adventícia formada, onde podemos observar o padrão de crescimento primário com medula na região central, feixes de xilema e de floema, córtex e epiderme.

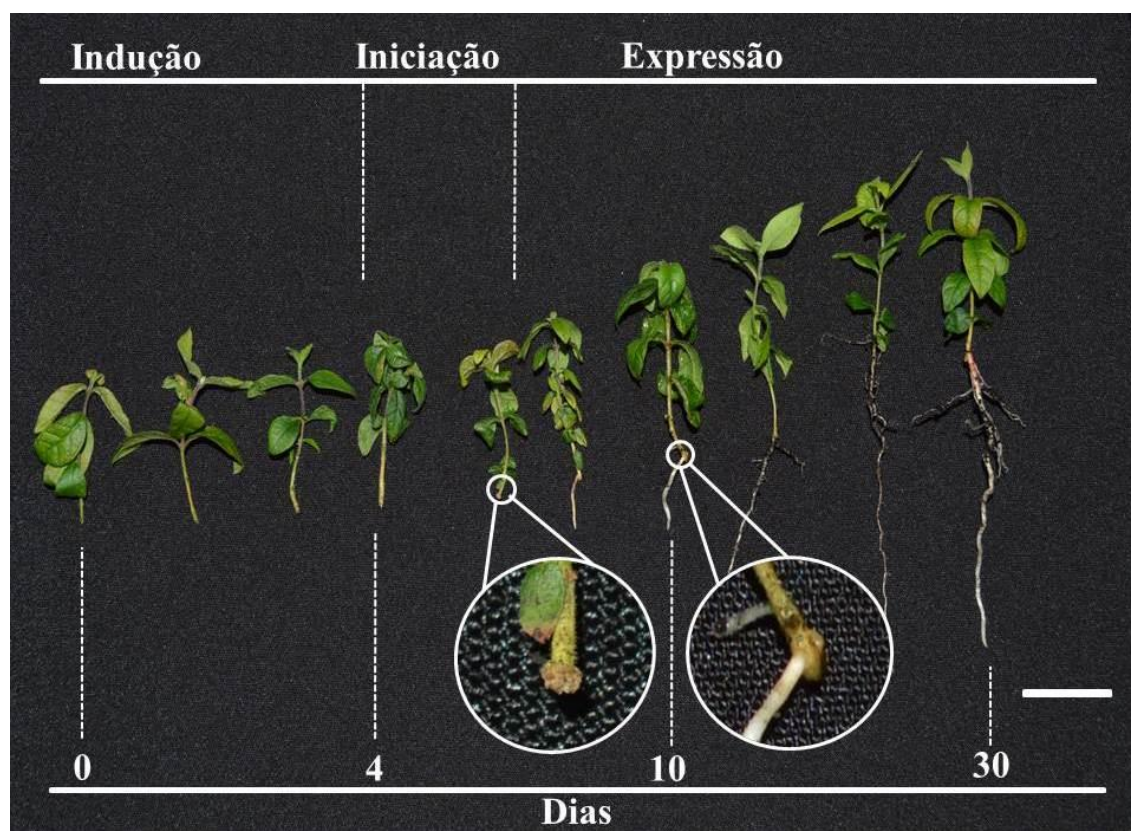
Deste modo, pudemos evidenciar as alterações anatômicas ao longo do processo de enraizamento adventício *ex vitro* de brotações de *C. rufa* por organogênese direta. Na

via direta a formação radicular ocorre a partir de tipos celulares já estabelecidos, como câmbio, córtex, feixes vasculares e periciclo envolvendo rediferenciação celular (PORFIRIO et al, 2016).

O processo de formação de raízes *ex vitro* foi iniciado com a indução ao realizar imersão rápida em 500 μ M de AIA. Esta primeira fase durou aproximadamente 4 dias, quando começaram as primeiras alterações histológicas até o dia 7 aproximadamente, dando início à fase de iniciação (Figura 15). Na iniciação, as células iniciais do primórdio são definidas pela rediferenciação das células do tecido de origem, que depende da espécie (GUAN et al, 2019; ITOH et al, 2005). Nas brotações de *C. rufa ex vitro*, o tecido de origem do primórdio foi o câmbio vascular. Essa origem dos primórdios a partir do câmbio vascular também foi relatada em outras espécies, como em *Cotinus coggygria*, entre 4 e 6 dias, porém no processo de enraizamento *in vitro* (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). Em miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla* o câmbio vascular também foi o tecido de origem dos primórdios (GOULART et al, 2014).

Já a fase de expressão do primórdio, caracterizada pela formação da estrutura radicular em forma de cúpula (HUSEN, 2015; PORFIRIO et al, 2016) foi observada posteriormente ao dia 8, quando finalizava a fase de iniciação. Aos 16 dias após imersão em AIA, a maioria das brotações apresentavam primórdios radiculares visíveis, momento em que houve então maior expressão dos primórdios radiculares em *C. rufa ex vitro*. Desta forma, a formação de primórdios radiculares não é um processo sincrônico, as etapas de desenvolvimento dos primórdios podem apresentar sobreposição temporalmente onde o enraizamento adventício esteja ocorrendo (GOULART et al, 2014). Por isso, as etapas foram determinadas em dias aproximados, podendo ter um tempo a mais ou a menos de margem. As etapas de enraizamento adventício podem ser morfológicamente analisadas na figura 16.

Figura 16- Fases do processo de enraizamento adventício *ex vitro* de brotações de *Campomanesia rufa*.



Legenda: Enraizamento via organogênese direta *ex vitro* de *C. rufa* ao longo de 30 dias com 500 μ M de AIA. Detalhe para início da formação radicular na base da brotação na iniciação e para formação da raiz na fase de expressão. Barra= 2cm. Fonte: Da autora, 2020.

Na imagem 16 podemos observar que na fase de indução no processo de enraizamento *ex vitro*, assim como processo *in vitro*, não é possível observar alterações visíveis na estrutura da base das brotações de *C. rufa*. Na fase de indução já é possível observar o início das divisões celulares para formação do primórdio radicular, evidenciado com a alteração na estrutura da base da brotação. Além disso, na fase de expressão já é visível a emergência da raiz.

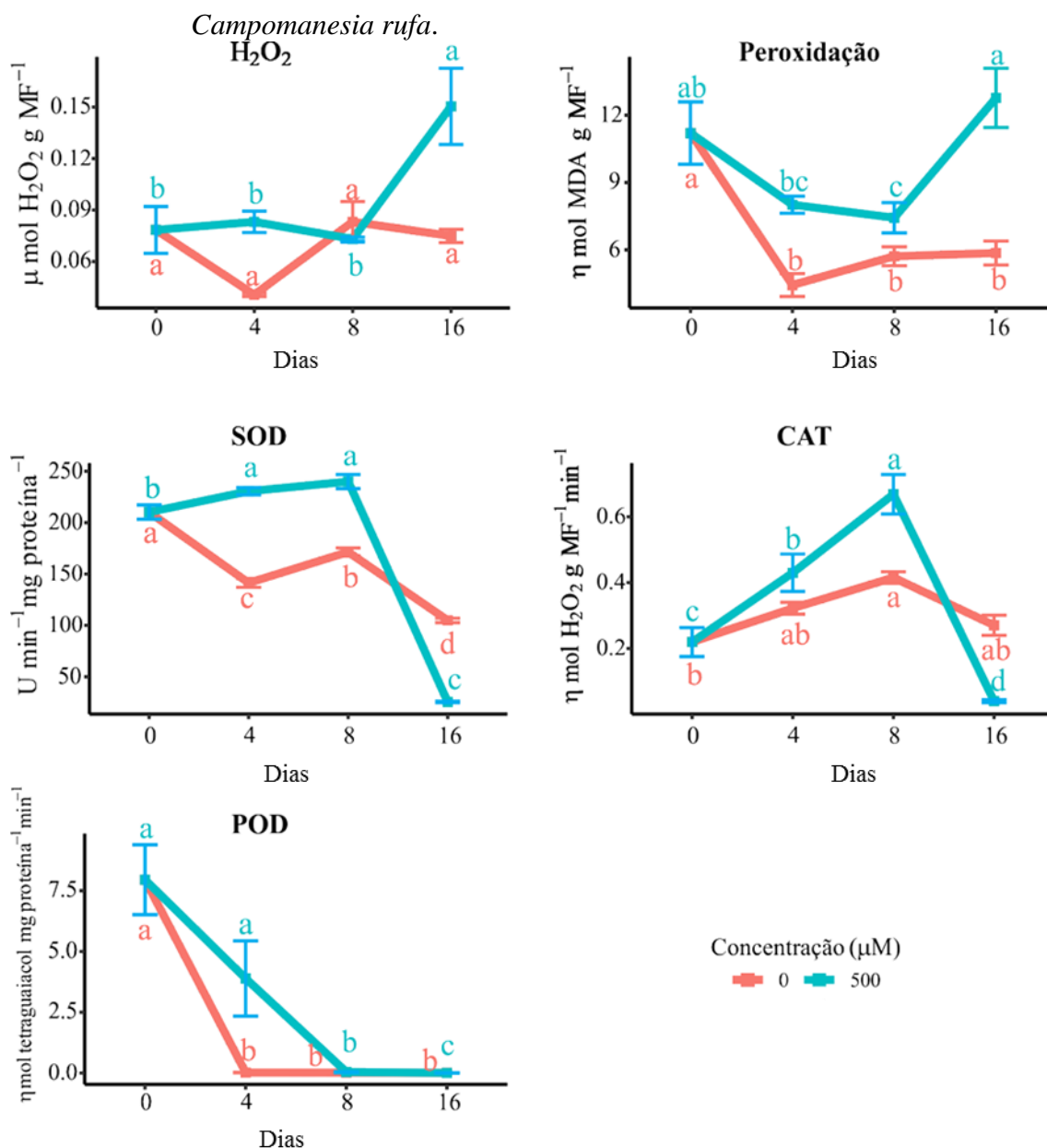
4.5 Análises bioquímicas durante o enraizamento *ex vitro*

Para as análises bioquímicas foi considerada análise em DIC no esquema de fatorial duplo e a análise de variância para cada uma das variáveis foi realizada. A variável POD foi a única em que houve a necessidade de transformação nos dados, devido a um desvio nos pressupostos de normalidade. Depois de realizada a transformação Box-Cox com parâmetro $\lambda = 0.107070707$, as análises subsequentes

foram executadas e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Feitos os desdobramentos das interações significativas e considerando as diferenças entre as duas concentrações (0 e 500 μ M) de AIA para cada um dos tempos (0, 4, 8 e 16 dias) e o efeito do tempo em cada concentração foi analisado (Figura 17).

Figura 17- Análises bioquímicas ao longo do processo de enraizamento *ex vitro* de



Legenda: Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra corresponde ao erro padrão da média. Fonte: Da autora, 2020.

A atividade da POD, apresentou diferença significativa entre o tratamento controle e o tratamento com aplicação do AIA apenas no dia 8, pelo teste F ($p < 0,05$). Considerando a atividade enzimática nos diferentes dias, o tratamento controle apresentou uma maior atividade no dia 0, seguida de uma redução significativa no dia 4 o que se manteve no dia 8 e 16. Já no tratamento com aplicação de AIA, a atividade da POD se manteve alta no dia 0 e 4, com progressiva redução no dia 8 e 16 (Figura 17).

Passardi et al (2005) explanaram que as peroxidases geralmente são induzidas fortemente no início de um evento e, em seguida, diminuem lentamente com o tempo. Por exemplo, o aumento na atividade específica da peroxidase na fase de indução do enraizamento foi indicado como um marcador do desenvolvimento dos primórdios radiculares (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000). Em *C. rufa*, a atividade específica da POD se manteve alta no dia 0 e no dia 4, quando houve o tratamento com auxina. O dia 4 é coincidente com a fase de indução que é anterior à iniciação do enraizamento. Esse resultado apresenta uma relação da atividade da POD com a aplicação de AIA, pois sua atividade se manteve no dia 4, o que não ocorreu com o tratamento controle (Figura 17). Em porta enxerto de macieira, a atividade da POD também aumentou na presença de AIB exógeno na fase inicial do enraizamento com diminuição da atividade com o passar do tempo (ZANOL et al, 1997).

Entretanto, há controvérsias com relação à atividade da POD durante as fases de desenvolvimento de raízes adventícias. Em *C. cogyggria*, por exemplo, nenhuma relação entre a atividade da peroxidase e as fases de enraizamento foi observada, pois apresentou sucessivos picos e vales na atividade da enzima ao longo do enraizamento, na presença ou não de auxina (ILCZUK; JACYGRAD, 2016). Em *Morus alba*, a aplicação de auxina promoveu um aumento na atividade da POD, que teve seus níveis aumentados nas fases finais do enraizamento (HUSEN et al, 2015). Já em *Vigna radiata* L. cv. 105, o pico da atividade da peroxidase ocorreu no final da fase de iniciação (NAG; PAUL; CHOUDHURI, 2013).

Além disso, foi relatado por Gaspar et al (1992) que o comportamento típico da atividade da peroxidase é caracterizado por uma redução acentuada na fase de indução, por um aumento na fase de iniciação e por uma redução gradual de sua atividade na fase de expressão. Várias espécies apresentaram este padrão de comportamento, como *Gardenia jasminoides* (HATZILAZAROU et al, 2006), *Psoralea corylifolia* (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000), *Plumbago zeylanica* (SAXENA et al, 2000) e *Arbutus*

unedo (METAXAS et al, 2004). Assim, o comportamento da atividade da POD durante as fases de enraizamento adventício, aparentemente é espécie/cultivar dependente, devido às grandes discrepâncias de resultados encontrados em diferentes espécies e cultivares (PORFIRIO et al, 2016).

Para a *C. rufa*, o fato da atividade da POD ser maior nos dias 0 e 4 e então sofrer uma queda significativa pode ser justificada, pois as peroxidases podem criar uma barreira física catalisando a reticulação de compostos da parede celular em resposta a diferentes estímulos estressantes como danos físicos, químicos e ambientais (PASSARDI et al, 2005). No caso da *C. rufa*, os estímulos estressantes podem ter sido a transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* e os ferimentos na base dos explantes. Com relação aos ferimentos, as peroxidases atuam no enrijecimento da parede celular por meio da construção de uma densa rede de extensina, pois em resposta ao estresse agudo, as plantas regulam positivamente a atividade geral de peroxidase (PASSARDI et al, 2005).

Analisando a diminuição brusca da atividade da POD nas fases de iniciação e expressão em *C. rufa*, supõe-se, por sua vez, que como a peroxidase está relacionada com o enrijecimento da parede celular (PASSARDI et al, 2005), e a fase de iniciação é marcada pelas divisões celulares (GUAN et al, 2019; HUSEN, 2015; ITOH et al, 2005; PORFIRIO et al, 2016), esse enrijecimento das paredes pela POD, pode dificultar essas divisões celulares. O enrijecimento das paredes celulares pela POD também pode dificultar o alongamento celular que acontece na fase de expressão do enraizamento que é marcada pela formação da estrutura em forma de cúpula pelo crescimento e emergência dos primórdios radiculares pela epiderme (GUAN et al, 2019; HUSEN, 2015; ITOH et al, 2005; PORFIRIO et al, 2016).

A atuação das peroxidases se dá pela catalisação de doadores de elétrons, como fenólicos e a auxina, utilizando peróxido de hidrogênio como agente oxidante (PORFIRIO et al, 2016). Isso ajuda a explicar porque os níveis da POD foram maiores quando houve aplicação de AIA em comparação ao controle que não recebeu a auxina (Figura 17). Além disso, como a POD utiliza peróxido de hidrogênio para realizar oxidação, os níveis de peróxido encontrados em *C. rufa* são condizentes com a atividade da POD no tratamento com aplicação de auxina, de modo que quando a atividade da POD foi mais baixa, foi observado um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Figura17).

Os níveis de H_2O_2 apresentaram diferença significativa entre o controle e a aplicação de AIA apenas nos dias 4 e 16 segundo o teste F ($p < 0,05$). Observando o tratamento controle, os níveis de H_2O_2 ao longo do tempo não apresentaram diferença significativa, se mantendo do dia 0 ao dia 16. Entretanto, com aplicação de AIA, os níveis de H_2O_2 aumentaram no dia 16 comparado aos dias anteriores (Figura 17).

O H_2O_2 faz parte do grupo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que além de atuarem na resposta e sinalização ao estresse, também são reconhecidas como atuantes nos processos de desenvolvimento (TAKÁČ et al, 2016). O H_2O_2 , assim como a peroxidase, é importante em resposta a danos físicos, como ferimentos induzidos para obtenção de raízes, devido sua função de sinalização estimulando a formação e desenvolvimento de raízes adventícias (SHIWENG et al, 2007; STEFFANS; RASMUSSEN, 2016). Em *Linum usitatissimum*, o H_2O_2 afetou positivamente a formação de raízes adventícias ao regular os níveis de auxina endógena (TAKÁČ et al, 2016). Do mesmo modo, em *Mucuna pruriens*, se constatou que o H_2O_2 endógeno nas células pode ser uma molécula sinalizadora durante a indução de raízes adventícias mediada por auxina, devido a aplicação exógena deste fitorregulador ter induzido um aumento nos níveis de H_2O_2 (LI et al, 2009). Isso ajuda a explicar porque os níveis de H_2O_2 foram maiores no dia 4 em *C. rufa* no tratamento com AIA em comparação ao dia 4 no tratamento controle (Figura 17), momento coincidente com a fase final de indução do enraizamento adventício de *C. rufa*. Já o aumento nos níveis de H_2O_2 no dia 16 no tratamento com aplicação de AIA, está relacionado com a fase de expressão, que é marcada pelo alongamento celular para crescimento do primórdio radicular (GUAN et al, 2019; HUSEN, 2015; ITOH et al, 2005; PORFIRIO et al, 2016). Esta fase também foi marcada pela alteração na peroxidação lipídica no tratamento com aplicação de AIA (Figura 17).

A peroxidação lipídica, assim como o H_2O_2 apresentou diferença significativa entre o controle e a aplicação de AIA apenas nos dias 4 e 16 pelo teste F ($p < 0,05$). Considerando o tratamento controle ao longo do tempo, no dia 0 a concentração de malondialdeído (MDA) foi maior, seguida por um declínio no dia 4 que se manteve até o dia 16. Já com aplicação de AIA, não houve diferença significativa entre o dia 0 e o dia 4, nem do dia 4 com o dia 8, porém no dia 16 houve um aumento em relação ao dia 8, embora não tenha diferido da concentração encontrada no dia 0 (Figura 17).

A peroxidação lipídica muitas vezes é considerada como um processo deletério que conduz à ruptura das biomembranas, acarretando a disfunção celular (KÜHN; BORCHERT, 2002). Contudo, trata-se de um processo metabólico natural em condições aeróbicas normais, em que produtos oxigenados oriundos da degradação lipídica, bem como os iniciadores (EROs) do processo de peroxidação lipídica, podem participar da cascata de transdução de sinal (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

No metabolismo celular normal, por exemplo, a diferenciação e maturação celular são caracterizadas por uma quebra de organelas subcelulares seguidas por remodelamento das membranas. Esse remodelamento da membrana está envolvido em muitos processos, como tráfego de vesículas, fagocitose entre outros, todos por meio de desestabilização temporária e local das estruturas da membrana (KÜHN; BORCHERT, 2002). Desta forma, podemos relacionar esta informação com o aumento na peroxidação lipídica encontrada no dia 16 em *C. rufa* no tratamento com aplicação de AIA, momento que coincide com a fase de expressão do enraizamento adventício. Como discutido anteriormente, a fase de expressão é caracterizada pelo crescimento e emergência dos primórdios radiculares (GUAN et al, 2019; HUSEN, 2015; ITOH et al, 2005; PORFIRIO et al, 2016). Assim, além da diminuição da rigidez da parede celular pela diminuição da atividade da POD, a desestabilização local e temporária das estruturas da membrana causada por peroxidação lipídica (KÜHN; BORCHERT, 2002), possivelmente ocasionada pelo aumento nos níveis de H_2O_2 , contribuiu para que o alongamento celular pudesse ocorrer para desenvolvimento dos primórdios radiculares. Já no tratamento controle, os níveis de peroxidação lipídica foram iguais do dia 4 ao dia 16, pois não havia brotações na fase de expressão, o que justifica não ter apresentado um aumento nos níveis de peroxidação e de H_2O_2 (Figura 17).

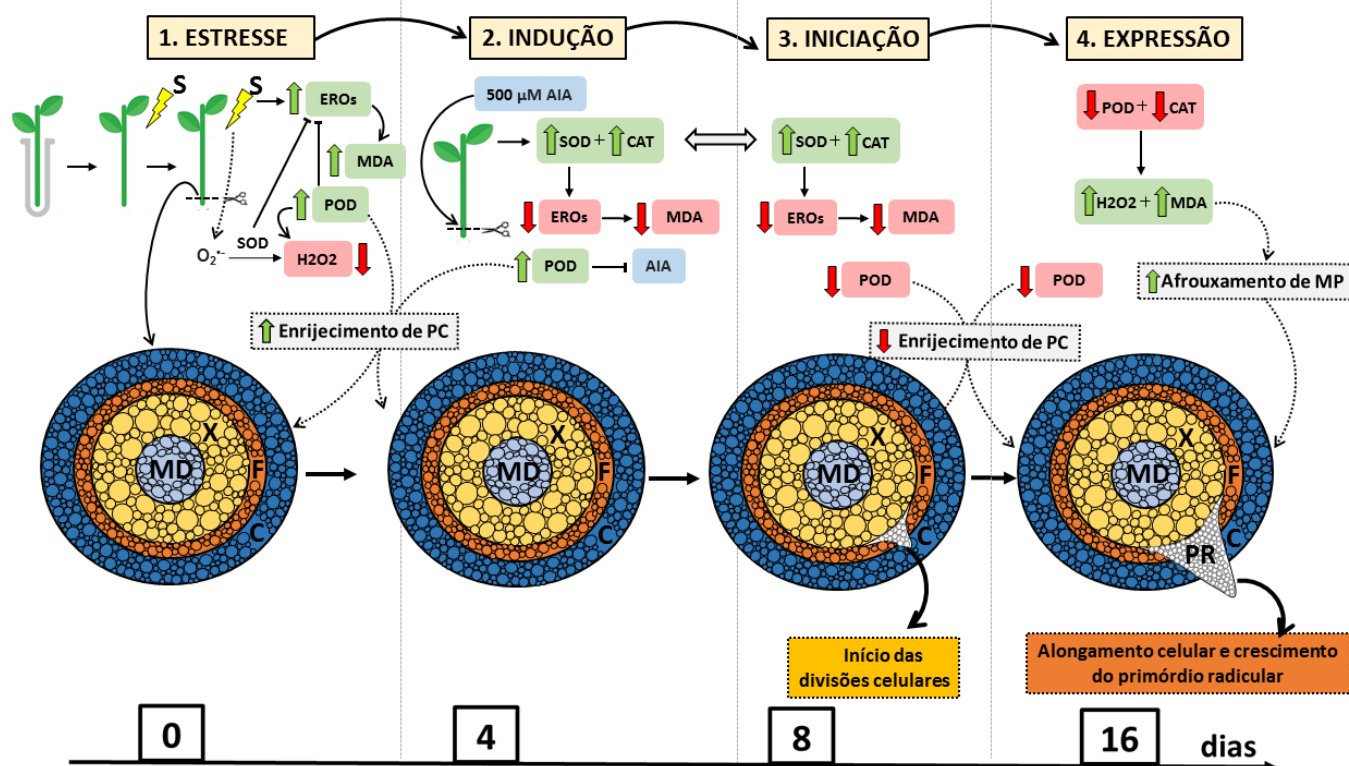
Estes resultados também estão condizentes com a atividade das enzimas CAT e SOD encontradas em *C. rufa* para o tratamento com aplicação de AIA (Figura 17). A atividade da CAT mostrou diferença significativa entre o controle e a aplicação de AIA nos dias 8 e 16 pelo teste F ($p < 0,05$). Ao longo do tempo, o tratamento controle não apresentou diferença significativa para a atividade da catalase nos dias 0 e 4, nem do dia 4 com relação ao dia 8 e 16. Contudo, quando foi analisado o tratamento com aplicação de auxina, observou-se um aumento na atividade do dia 0 ao dia 8, seguido por um decréscimo no dia 16 (Figura 17).

A atividade da SOD apresentou diferença significativa entre o controle e a aplicação de AIA do dia 4 ao dia 16 pelo teste F ($p < 0,05$). Com relação ao tempo, o tratamento controle apresentou um decréscimo significativo do dia 0 para o dia 4, seguido por um aumento e posterior redução na atividade da enzima no dia 16. Já o tratamento com aplicação de AIA apresentou um aumento significativo do dia 0 para o dia 4 que se manteve no dia 8 seguido de uma grande redução da atividade no dia 16 (Figura 17).

As EROs, como ânion superóxido e H_2O_2 , são formadas naturalmente durante o desenvolvimento, e as enzimas antioxidantes mantêm os níveis homeostáticos adequados. Os ânions superóxidos são convertidos em H_2O_2 por superóxido dismutase (SOD) e a catalase atua então sobre o H_2O_2 formado (STEFFENS; RASMUSSEN, 2016). Embora a atividade da SOD tenha apresentado uma diminuição no dia 16, quando os níveis de H_2O_2 foram aumentados, a atividade das enzimas sequestradoras de H_2O_2 (CAT e POD) também foi menor, o que justifica os níveis de H_2O_2 estarem mais altos, mesmo com a diminuição de sua produção pela atividade da SOD (Figura 17).

Essas alterações bioquímicas ao longo do processo de enraizamento *ex vitro* de brotações de *C. rufa* podem ser visualizados conjuntamente na figura 18.

Figura 18- Esquema representativo das alterações bioquímicas ao longo do processo de enraizamento adventício *ex vitro* de brotações de *C.rufa* induzido por AIA.



Legenda: Processo de enraizamento adventício *ex vitro* de *C. rufa* induzido por 500 μM de AIA. Etapa 1- O estresse causado pela transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* e o corte na base aumentam as EROs, que elevam a peroxidação lipídica (MDA), acarretando um aumento na atividade do sistema antioxidante, com a SOD convertendo O_2^- em H_2O_2 e a POD oxidando H_2O_2 , controlando os níveis de EROs. A POD também atua no enrijecimento da parede celular contra o dano mecânico. Etapa 2- Fase de indução: a aplicação exógena de AIA provoca um aumento na atividade da POD, que vai atuar tanto aumentando o enrijecimento das paredes celulares, quanto controlando os níveis de AIA nas brotações. Nesta fase há atividade da SOD que junto com o aumento da atividade da CAT, atuam sobre as EROs, diminuindo a peroxidação lipídica. Etapa 3- Iniciação: SOD e CAT continuam controlando as EROs para manter a peroxidação lipídica baixa, há diminuição da atividade da POD, diminuindo a rigidez das paredes celulares para início das divisões celulares para formação do primórdio radicular. Etapa 4- Expressão: Apresenta uma diminuição da atividade da CAT e da POD, acarretando no aumento de H_2O_2 e da peroxidação lipídica, que em níveis altos provocam afrouxamento de membrana plasmática, que juntamente com a diminuição da rigidez de parede celular pela diminuição da atividade da POD, permitem o alongamento celular para crescimento do primórdio radicular. S= estresse; MD= medula; X=xilema; F=floema; C=córtex; PR= primórdio radicular; setas vermelhas= diminuição de atividade, de níveis ou de efeito; setas verdes= aumento de atividade, níveis ou efeito; \perp = controle negativo dos níveis ou atividade; seta tracejada= relação com o efeito.

Conforme a análise das alterações bioquímicas durante o processo de enraizamento adventício *ex vitro* de *C. rufa*, podemos observar que no momento inicial (dia 0) (Figuras 17 e 18), a alta atividade da POD pode estar relacionada com o estresse causado pela transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* e também devido ao ferimento causado na base para induzir a formação de raízes (PASSARDI et al, 2005).

Também foi observada uma alta peroxidação lipídica que atua em resposta a fermentos com a perda local da função da membrana (KÜHN; BORCHERT, 2002). A SOD atua sobre o ânion superóxido, que é muito reativo, o convertendo em H₂O₂, menos reativo, e no dia 0 apresentou uma maior atividade, quando as brotações sofreram o estresse de mudança de ambiente e do fermento formado (STEFFENS; RASMUSSEN, 2016).

Durante a fase inicial, de indução com aplicação de AIA (dia 4), a peroxidação lipídica e os níveis de H₂O₂ se mantiveram (Figuras 17 e 18), o que leva a inferir que para *C. rufa*, o H₂O₂ não atua fortemente na sinalização juntamente com a auxina na indução do enraizamento como ocorreu em *Mucuna pruriens* (LI et al, 2009). Essa sinalização mediada por auxina mostrou ocorrer em conjunto com a atividade da POD, que se mostrou alta no dia 4, possivelmente por sua ação estar relacionada com a regulação dos níveis de auxina, promovendo sua oxidação (PORFIRIO et al, 2016) e por aumentar a resistência da parede celular pelo enrijecimento como em *Malus hupehensis* (ZHANG et al, 2017).

Na fase de iniciação, com aplicação de AIA (dia 8), não foram observadas alterações nos níveis de H₂O₂, de SOD, nem na peroxidação lipídica, mas esta fase foi marcada pelo aumento na atividade da CAT em compensação ao declínio da atividade da POD (Figuras 17 e 18). Nesta fase, com o início das divisões celulares para formação dos primórdios (HUSEN, 2015; PORFIRIO et al, 2016), a atividade da POD que contribui para o enrijecimento da parede celular (PASSARDI et al, 2005) ter diminuído, facilita esse processo.

Finalmente a fase de expressão do processo de enraizamento de *C. rufa*, foi marcada pela diminuição na atividade das enzimas SOD, CAT e POD e pelo aumento na peroxidação lipídica e de H₂O₂ (Figuras 17 e 18). A diminuição da POD que acarreta a diminuição da rigidez da parede celular (PASSARDI et al, 2005) e o aumento da peroxidação lipídica que provoca a desestabilização das estruturas da membrana (KÜHN; BORCHERT, 2002), contribui para o alongamento celular durante o crescimento e emergência dos primórdios radiculares (GUAN et al, 2019; HUSEN, 2015; ITOH et al, 2005; PORFIRIO et al, 2016), concluindo assim o processo de formação de raízes adventícias *ex vitro* de *C. rufa*.

5 CONCLUSÕES

O enraizamento adventício de brotações de *C. rufa in vitro* ocorre pelo processo de organogênese indireta, apresentando uma maior formação de raízes com a utilização de 10 μ M de AIB no meio de cultivo em 60 dias após inoculação. Esta via de formação foi comprovada com as análises histológicas, com as quais foi possível identificar as diferentes fases do desenvolvimento radicular. Na fase de indução pelo AIB, não foram identificadas alterações histológicas, que começaram a surgir na fase de iniciação, com as divisões desordenadas no córtex formando o calo, do qual emergiu o primórdio radicular na fase de expressão.

Já o processo de enraizamento adventício de brotações de *C. rufa ex vitro* ocorre pela organogênese direta, com melhores resultados obtidos com a imersão em 500 μ M de AIA. Essa via direta também foi evidenciada pelas análises histológicas, que mostraram a estrutura típica de caule em crescimento secundário na indução. Na fase de iniciação, foram observadas divisões celulares na região do câmbio vascular que culminaram na expressão do primórdio radicular já aos 16 dias.

As análises bioquímicas do processo *ex vitro* permitiram identificar que com a aplicação exógena de auxina, a atividade da POD está relacionada com a fase de indução do enraizamento adventício de *C. rufa*, e sua diminuição gradual favorece o processo de divisão e expansão celular para emergência do primórdio, que também é facilitada pelo aumento nos níveis de H₂O₂ e peroxidação lipídica.

Analisando os resultados conjuntamente, sugere-se que o enraizamento adventício de brotações micropropagadas de *C. rufa*, seja realizado *ex vitro*, com a utilização de 500 μ M de AIA por imersão em solução por 30 segundos. Esta via de formação é benéfica por resultar na diminuição de uma etapa da micropropagação, resultando em diminuição de custos de produção de mudas. Além disso, a porcentagem de brotações enraizadas, o comprimento das raízes formadas e o desenvolvimento são melhores que *in vitro* e por um período até 50% mais rápido.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, S. C. et al. Cytotoxic effect of crude and purified pectins from *Campomanesia xanthocarpa* Berg on human glioblastoma cells. **Carbohydrate Polymers**, v.224, p. 115140, 2019.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**. v. 109, p. 1247-1257, 1995.
- ARRUDA, A. L. et al. Estabelecimento *in vitro* de sementes de *Psidium cattleianum* Sabine. **Acta Biológica Catarinense**, v.6, n. 4, p. 105-113, 2019.
- AUGUSTO, C. S.S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n. 3, p. 473-476, 2006.
- BALTIERRA, X. C.; MONTENEGRO, G.; GARCÍA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 499-503, 2004.
- BARROSO, G.M. et al. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas, **UFV**, p. 85-86, 2004.
- BARTEL, B et al. Inputs to the active indole-3- acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β oxidation. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 198–216, 2001.
- BASTOS, L.P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.1122-1124, 2007.
- BERAUD, M. R. et al. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Ugni molinae* Turcz. microshoots, a native species to Chile. **Gayana Botánica**, v.72, n.1, 2015.
- BFG- THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, 2015.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BIRNBAUM K. D. How many ways are there to make a root? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 34, p. 61-67, 2016.
- BLOKHINA O.; VIROLAINEN E.; FAGERSTEDT K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179–194, 2003.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNNER SCUTTI M.; ZANETTE F. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, v.1, n. 1-2, p. 75-82, 2000.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, n. 1, p. 302-310, 1978.

BUURON DA SILVA, K. et al. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, 2019.

Campomanesia in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10329>>. Acesso em: 07 Fev. 2020.

CARVALHO, W. F.; RIBEIRO, F. H. M.; SOUSA, C. M. Application of AIB in araçazeiro caulinary piles. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n.6, p.33136-33139, 2020.

CASTELUCCI, A. C. L.; SILVA, P. P. M. DA; SPOTO, M. H. F. Bioactive compounds and *in vitro* antioxidant activity of pulps from fruits from the Brazilian atlantic forest. **Acta Scientiarum**. Technology, v. 42, n. 1, p. e44503, 2019.

CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the *in vitro* photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus *Campomanesia*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, 2019.

CAVALCANTE, V. R.; BORIN, L.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Germinação e crescimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em diferentes meios de cultivo e períodos de exposição a agentes desinfestantes seminais. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n.2, p.196-207, 2018.

CNCFlora. *Campomanesia rufa* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia_rufa>. Acesso em 3 agosto 2020.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural**, v. 44, 2014.

DALPIAZ, E. L. Germinação *in vitro* e enraizamento de miniestacas de espinheira santa. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.2, p.415-425, 2019.

DA SILVA, D. P. C. et al. Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. **Plant Cell Tissue And Organ Culture**, v. 133, p. 115-122, 2018.

DE KLERK, G-J. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 38, p. 415–422, 2002.

DE SOUSA, J. A. et al. Anti-hyperlipidemic effects of *Campomanesia xanthocarpa* aqueous extract and its modulation on oxidative stress and genomic instability in Wistar rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v.82, p.1009-1018, 2019.

DIAS, M. et al. Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian Cerrado fruit and their cellulolytic activity potential. *Annals of microbiology*, v. 65, n. 2, p. 851-864, 2015.

DOUSSEAU, S. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. *Ciência Rural*, v. 41, 2011.

FERREIRA, L. T. et al. Light source and sucrose concentration on *in vitro* culture of sugarcane (RB 867515). *Plant Cell Culture e Micropropagation*, v.12, n. 2, p. 46-52, 2016.

FRANZON R. C.; RASEIRA M. C. B.; JÚNIOR A. W. Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG). *Ceres*, v. 53, n.305, p.129-134, 2006.

GALLO, R. et al. IBA and microcutting collections in the micropropagation of *Eucalyptus* spp hybrid clones. *Revista Árvore*, v. 41, n. 6, 2017.

GARCÍA-LIMONES, C. et al. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 61, n. 6, p. 325-337, 2002.

GASPAR T. et al. Practical use of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*, v.12, p. 757-765, 1992.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOELZER, A. et al. Growth regulators *in vitro* multiplication of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). *Brazilian Applied Science Review*, v.3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.

GOLLE, D. P. et al. *In vitro* establishment and development of *Eugenia involucrata* DC.: influence of explant source and nutritional medium. *Ciência Florestal*, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GOLLE, D. P. et al. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. *Revista Árvore*, v.41, n.5, 2017.

- GOMES DA ROCHA, P. S. et al. LED lights in the *in vitro* multiplication of three banana cultivars. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v.11, n.2, p.247-252, 2017.
- GOMES, J. P. et al. Myrtaceae na Bacia do Rio Caveiras: Características ecológicas e usos não madeireiros. **Floresta e Ambiente**, v. 24, p. 1-10, abr., 2016.
- GOULART, P. B. et al. Morpho-anatomic of adventitious rhizogenesis in mini-cuttings of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, v. 24, n.3, 2014.
- GUAN L. et al. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. **BMC Plant Biology**, v. 19, 2019.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8^a ed. New Jersey: Prentice-Hall, 915 p., 2011.
- HATZILAZAROU S. P. et al. Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and *ex vitro* rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 8, p. 827-836, 2006.
- HAVIR, E.; McHALE, N. A. A regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. **Plant Physiology**. v. 89, n. 3, p. 952-957, 1989.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.125, p.189-198, 1968.
- HODGES, D. M.; FORNEY, C. F. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. **J. Exp. Bot.**, v. 51, n. 344, p. 645-655, 2000.
- HUSEN, A. et al. Effect of indole-3-butyric acid on clonal propagation of Mulberry (*Morus alba* L.) stem cuttings: rooting and associated biochemical changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v.87, p. 161-166, 2015.
- ILCZUK, A.; JACYGRAD, E. The effect of IBA on anatomical changes and antioxidant enzyme activity during the *in vitro* rooting of smoke tree (*Cotinus coggygria* Scop.) **Scientia Horticulturae**, v. 210, p. 268-276, 2016.
- ITOH JI, et al. Rice Plant Development: from Zygote to Spikelet. **Plant Cell Physiology**, v. 46, n.1, p. 23-47, 2005.
- JOFRÉ M. P. et al. Physiological characterization of *in vitro* rooting of *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. **Gayana Botanica**, v.73, n.2, 2016.
- JUNQUEIRA, N.T.V. et al. Frutíferas nativas do Cerrado: O extrativismo e a busca da domesticação. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura-RS**. 2012.

- KAWASAKI, M. L. 2000. A new specie of *Campomanesia* (Myrtaceae) from southeastern Brazil. **Brittonia**, v.52, p. 188-190, 2000.
- KÜHN H.; BORCHERT A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 154-172, 2002.
- LANDRUM L. R. *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, v. 45, p. 7-72, 1986.
- LANDRUM, L. R. A new species of *Campomanesia* (Myrtaceae) from Brazil. **Brittonia**, v. 39, p. 245-247, 1987.
- LANDRUM, L. R. Two new species of *Campomanesia* (Myrtaceae) from Espírito Santo and Bahia, Brazil. **Brittonia**, v. 53, n.4, p. 534-538, 2001.
- LANDRUM, L. R; KAWASAKI. M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n.4, p. 508-536, 1997.
- LEMES, R. S. et al. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 499-505, 2016.
- LESCANO, C. H. et al. Effect of polyphenols from *Campomanesia adamantium* on platelet aggregation and inhibition of cyclooxygenases: Molecular docking and *in vitro* Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.
- LI S. X. et al. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 63-71, 2009.
- LI S. X. et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. **Plant Growth Regulation**, v. 52, p. 173-180, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002. 347 p.
- LUCIA, F.D. et al. Marolo (*Annona crassiflora* Mart.): gerando trabalho e renda. **Extensio**, v. 8, n. 11, p. 81-91, 2011.
- MACHADO J. S. Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. BERG (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Trees**, v. 34, p. 791–799, 2020.
- MALTA, L.G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, p. 417–425, 2013.

MALTA, L.G. et al. *In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, p. 604–611, 2012.

MARTINS, W. A. et al. Estaquia e concentração de reguladores vegetais no enraizamento de *Campomanesia adamantium*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n.1, 2015.

METAXAS D. J. et al. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 257–266, 2004.

MOLASSIOTIS A.N. Changes in peroxidases and catalase activity during *in vitro* rooting. **Biologia Plantarum**, v. 48, n.1, p. 1-5, 2004.

MORAIS P. O.; LUNDIANA J. A. L. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Instituto de Ciências Biológicas – UFMG**, v. 7, p. 3-32, 2006.

MOREIRA, M. F.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; ZAIDAN, L. B.P. Anatomical Aspects of IBA-treated Microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 2, p. 221-227, 2000.

MULLER D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, v. 107, p. 1203-1212, 2011.

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

NAG S.; PAUL A., CHOUDHUR M. A. Changes in peroxidase activity during adventitious root formation at the base of mung bean cuttings. **International Journal Of Scientific & Technology Research**, v. 2, n. 5, 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, A. C. et al. BAP and AIB *in vitro* cultivation of *Eugenia pyriformis* Cambess. **Ciências Agrárias Ambiental**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

NEVES, L. L. DE M. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]**. 72 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

PACURAR, D. I.; PERRONI, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, p. 83–96, 2014.

PÁDUA, M. S. S. et al. Enraizamento *in vitro* de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq.) híbrido tenera. **Revista Árvore**, v. 41, n. 4, 2017.

PINHEIRO, M. V. M.; CARVALHO, A. C. P. P.; MARTINS, F. B. Modificações no meio de cultura, fotoperíodo e tempo de cultivo afetam o alongamento e enraizamento *in vitro* de bananeira cv. Pacovan. **Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 1, p. 27-32, 2018.

PORFIRIO, S. et al. Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 207-226, 2016.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>.

RIVAL, A., BERNARD, F., MATHIEU, Y. Changes in peroxidase activity during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Scientia Horticulture**, v.71, p. 103-112, 1997.

RODRIGUES, F. A. et al. Solidifying agents and activated charcoal for *in vitro* culture of *Solanum sessiliflorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.11, p.1123-1126, 2017.

ROSSATO M. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2015.

ROUT G. R.; SAMANTARAY S.; DAS P. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p.215–219, 2000.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root developed. **Plant cell Reports**, v. 32, p. 741-757, 2013.

SAMAL, D. et al. Potassium uptake efficiency and dynamics in the rizosphere of maize (*Zea mays* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) evaluated with mechanistic model. **Plant Soil**, v. 332, p.105-121, 2010.

SANT'ANA, C. R. O. et al. Propagação *in vitro* de *Campomanesia rufa*: Uma espécie frutífera em extinção. **Ciência e agrotecnologia**, v.42, n.4, p.372-380, 2018.

SAXENA, C. et al. Effect of Auxins on *in vitro* Rooting of *Plumbago Zeylanica*: Peroxidase Activity as a Marker for Root Induction. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 121–124 (2000).

SCARIOT, E. et al, Extrato aquoso de *Cyperus rotundus* no enraizamento de estacas lenhosas de *Prunus persica* cv. 'Chimarrita'. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.16, n.2, p.195-200, 2017.

SCHMILDT, E. R. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SHIWENG L. et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. **Plant Growth Regulation**, v. 52, n. 2, p. 173-180, 2007.

SILVA, A. L. L. et al. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Symphyomyrtus. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, p. 179-184, 2011.

SILVA, K. B. et al. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, 2019.

SILVEIRA, S. M. et al. Brazilian native species as potential new sources of natural antioxidant and antimicrobial agents. **Acta Alimentaria**, v.48, ed.4, 2019.

TAKÁČ, T. et al. Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. **New Biotechnology**, v. 33, n. 5B, p. 728-734, 2016.

TIMOTEO, C. DE O. et al. Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 359–368, 2019.

TORRES-MARTÍNEZ H. H. Lateral Root Primordium Morphogenesis in Angiosperms. **Frontier Plant Science**, 2019.

VELIKOVA, V. et al. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid raintreated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

YANG W. Hydrogen peroxide is a second messenger in the salicylic acid-triggered adventitious rooting process in mung bean seedlings. **Plos One**, v.8, 2013.

YANG, Y. et al. Multiplication of *Corymbia ptychocarpa* subsp. *aptycha* via tissue culture, **Australian Forestry**, v. 79, n.1, p. 59-62, 2016.

ZANOL G. C. et al. Enraizamento de Porta-Enxerto de Macieira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n. 1, p. 23-30, 1997.

ZHANG, W. et al. The effects of exogenous hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. **Plos One**, v.23, 2017.

ZHAO Y. Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. **Plant Biology**, v. 69, p. 417–35, 2018.