

Sacarose, número de explantes e vedação de frascos na multiplicação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*

Sucrose, number of explants and frasks sealing on *in vitro* multiplication of *Apuleia leiocarpa*

Sacarosa, número de explantos y sellado de viales en la multiplicación *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*

Beatriz Ferreira da Silva¹

João Victor Baptista Silveira²

Natane Amaral Miranda Padua³

Resumo: Para viabilizar o cultivo *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*, várias são as lacunas de conhecimento. Nesse sentido, coloca-se como pergunta da pesquisa se o sucesso da multiplicação pode ser obtido com a mudança de condições básicas de cultivo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da sacarose, número de explantes e vedação de frascos na multiplicação *in vitro* da espécie. Testou-se as concentrações 0, 5, 15, 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose e a interação entre número de explantes (1, 2, 3 e 4) e formas de vedação de frascos (com e sem membrana) no cultivo de segmento nodais. As menores concentrações de sacarose foram mais eficientes, resultando em um maior número de folhas, redução da oxidação e calos. A vedação dos frascos e o número de explantes influenciaram o crescimento das plantas, com melhores resultados no cultivo de poucos explantes em frascos com uso de membrana.

Palavras-chave: Micropropagação. Espécie Ameaçada. Carboidrato. Troca gasosa.

Abstract: To enable the *in vitro* cultivation of *Apuleia leiocarpa*, there are several gaps in knowledge. In this sense, the research question is whether successful multiplication can be achieved by changing basic cultivation conditions. The objective of this study was to evaluate the effect of sucrose, number of explants, and flask sealing on the *in vitro* multiplication of the species. Sucrose concentrations of 0, 5, 15, 30, and 45 g L⁻¹ were tested, as well as the interaction between the number of explants (1, 2, 3, and 4) and flask sealing methods (with and without membrane) in the cultivation of nodal segments. Lower sucrose concentrations were more efficient, resulting in a greater number of leaves, reduced oxidation, and callus formation. Flask sealing and the number of explants influenced plant growth, with better results when cultivating fewer explants in flasks using a membrane.

Keywords: Micropropagation. Endangered Species. Carbohydrate. Gas exchange.

¹ Graduanda em Engenharia Florestal na UFRRJ. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4151-859X>. E-mail: bbeaferreira@gmail.com

² Doutorando no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV. ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-7331-4812>. E-mail: joao.bapt@outlook.com

³ Docente do curso de Engenharia Florestal da UFRRJ. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8197-5421>. E-mail: nataneamaral@gmail.com

Resumen: Para posibilitar el cultivo *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*, existen varias lagunas en el conocimiento. En este sentido, la pregunta de investigación es si se puede lograr una multiplicación exitosa modificando las condiciones básicas de cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sacarosa, el número de explantos y el sellado del matraz en la multiplicación *in vitro* de la especie. Se probaron concentraciones de sacarosa de 0, 5, 15, 30 y 45 g L⁻¹, así como la interacción entre el número de explantos (1, 2, 3 y 4) y los métodos de sellado del matraz (con y sin membrana) en el cultivo de segmentos nodales. Las concentraciones más bajas de sacarosa fueron más eficientes, resultando en un mayor número de hojas, menor oxidación y formación de callos. El sellado del matraz y el número de explantos influyeron en el crecimiento de la planta, con mejores resultados al cultivar menos explantos en matraces utilizando una membrana.

Palabras-clave: Micropropagación. Especies en peligro de extinción. Carbohidratos. Intercambio de gases.

Submetido 10/09/2025

Aceito 13/10/2025

Publicado 19/01/2026

Considerações iniciais

Apuleia leiocarpa (Vogel) J. F. Macbr., conhecida popularmente como garapa, grápia ou amarelão, é uma espécie arbórea nativa do Brasil, amplamente distribuída no país, com ocorrência registrada em 25 das 27 unidades federativas e, em virtude da excelente qualidade da sua madeira e do seu potencial energético, ao longo dos anos, foi explorada de forma desordenada, resultando na sua inclusão na lista de espécies arbóreas ameaçadas de extinção, sendo classificada como espécie vulnerável (Lorenzi, 1992; Carvalho, 2003; Martinelli; Moraes, 2013; Medeiros, 2025). *A. leiocarpa* também tem importância medicinal, com exemplo de aplicação de seus extratos em testes indicando seu potencial como antitumoral contra o câncer de pulmão (Azevedo *et al.*, 2024).

Esta espécie apresenta madeira moderadamente pesada, dura, fácil de trabalhar, de longa durabilidade e resistência (Reis *et al.*, 2017; Vivian *et al.*, 2018), características que denotam a sua grande importância para o setor madeireiro, sendo usada para marcenaria, postes, moirões e construção civil (Lorenzi, 1992). *A. leiocarpa* está listada como uma das 10 madeiras mais comercializadas no Brasil (SNIF, 2016) e, para que seja possível o atendimento deste mercado, é necessário que os seus aspectos silviculturais sejam estudados, visando a oferta de mudas de qualidade. Para alcançar o sucesso na produção de mudas de espécies arbóreas, é necessário que se tenha domínio de técnicas de produção de mudas de alta qualidade derivadas de fontes superiores ou mudas que atendam aos requisitos de diversidade e aos objetivos do plantio (Silva *et al.*, 2022).

A produção de mudas de *A. leiocarpa* tem sido tradicionalmente realizada pela propagação sexuada, enfrentando dificuldades, como a irregularidade na produção e baixa viabilidade de sementes, necessidade de conhecimento fenológico amplo da espécie, adicionadas ao baixo controle de fatores genéticos e ambientais neste sistema de produção (Felippi *et al.* 2012). A propagação vegetativa oferece uma solução para alguns desses problemas. A micropropagação, como uma técnica de propagação vegetativa, surge como uma ferramenta alternativa importante, principalmente quando se encontra dificuldades a partir das técnicas convencionais de produção de mudas (Xavier; Wendling; Silva, 2021). A micropropagação permite a produção *in vitro* de forma rápida de um material homogêneo e uniforme, em larga escala, livre de patógenos, vigoroso e produtivo (Trueman; Hung; Wendling, 2018).

No cultivo *in vitro* tradicional, é rotineira a adição de açúcares orgânicos, como a sacarose, ao meio de cultura em frascos vedados, que permitem pouca troca gasosa. O uso de açúcares influencia diretamente na morfogênese das plantas, podendo ocasionar alterações em fatores como vigor, altura, taxa de multiplicação, desenvolvimento e alongamento do sistema radicular, além da taxa de sobrevivência nas etapas da aclimatização (Soares *et al.*, 2023). O cultivo *in vitro* no sistema de vedação convencional propicia alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas, resultando em um aumento de CO₂ e gás etileno (Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016). Alguns estudos indicam que o aumento da taxa de troca gasosa pode possibilitar melhores taxas de crescimento *in vitro*, bem como melhoria de aspectos anatômicos e fisiológicos, além da sobrevivência nas etapas de aclimatização (Guanais; Moraes; Fermino Junior, 2022; Oliveira Junior *et al.*, 2022). Além disso, a definição da quantidade de material cultivado em um mesmo ambiente pode influenciar no sucesso da multiplicação (Santos *et al.*, 2015), uma vez que haverá diferenças no consumo do meio nutritivo, assim como na produção de etileno e consumo de CO₂ dentro dos frascos.

Desse modo, para se conseguir sucesso e produção de mudas de qualidade *in vitro*, vários fatores precisam ser ajustados, de forma a atender necessidades específicas de cada espécie. Dentre esses fatores estão a quantidade de sacarose adicionada ao meio nutritivo, o tipo de vedação dos frascos, visando a adequada troca gasosa com o meio externo, e a quantidade de explantes a ser cultivada em um mesmo recipiente.

Para *A. leiocarpa*, alguns trabalhos de cultivo *in vitro* avançaram no conhecimento sobre o uso de benzilaminopurina e qualidade de luz na multiplicação e ácido indol butírico no enraizamento; no entanto, os resultados de multiplicação ainda não foram considerados satisfatórios para produção em escala da espécie (Lencina *et al.*, 2017; Lencina *et al.*, 2018; Silveira; Miranda; Abreu, 2024). Muitos fatores que influenciam o desenvolvimento *in vitro* de plantas ainda são desconhecidos para *A. leiocarpa*. Silva *et al.* (2022) apontam a propagação vegetativa como um passo importante para permitir a multiplicação de árvores selecionadas, mas a falta de informação para a espécie é uma dificuldade no processo. Nesse sentido, o presente estudo visa avaliar a influência da quantidade de sacarose, do número de explantes e formas de vedação na multiplicação *in vitro* de plantas de *Apuleia leiocarpa*.

Metodologia

O trabalho, utilizando-se de dados numéricos, emprega uma abordagem quantitativa, para a descrição e a explicação da influência de fatores como concentração de sacarose, quantidade de explantes inoculados e formas de vedação dos frascos de cultivo no crescimento *in vitro* de *A. leiocarpa*. Trata-se de uma pesquisa de natureza aplicada e experimental para levantamento e coleta dos dados em ambiente controlado, com a utilização de métodos estatísticos para quantificar os dados e generalizar os resultados. Os objetivos são de característica explicativa e abordam o comportamento das plantas em diferentes condições de cultivo, intencionando contribuir com a evolução do conhecimento científico, uma vez que tais informações ainda não foram elucidadas para a espécie. Dessa maneira, atribui-se a esta pesquisa uma abordagem quantitativa de natureza aplicada, cujo intuito explicativo é a estimativa da melhor concentração de sacarose, número de explante e forma de vedação no cultivo *in vitro* de *A. leiocarpa*.

Estabelecimento de culturas assépticas

Plântulas obtidas de cultivo *in vitro* e isentas de contaminação foram utilizadas como fontes doadoras de explantes. Para obtê-las, foram realizadas a assepsia e a quebra de dormência das sementes de *A. leiocarpa* em ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98% por 20 minutos, sob agitação constante, com posterior lavagem das sementes, por 5 minutos, em água destilada e autoclavada (Fabris; Gerber; Sartoretto, 2016).

Após desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM (Lloyd; Mccown, 1981) previamente preparado e autoclavado, acrescido de 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP), 20 g L^{-1} de sacarose e 2,3 g L^{-1} de phytigel, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Foram inoculadas três sementes por recipiente, os quais foram mantidos em sala de cultura com temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (16h) controlados. Após 30 dias, foram obtidas as plântulas para retirada dos explantes e montagem dos testes.

Sacarose

Na câmara de fluxo laminar, segmentos apresentando cerca de 2 cm foram retirados das plântulas germinadas *in vitro* e inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM

previamente preparado e autoclavado, acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP, 2 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,3 g L⁻¹ de phytigel com pH ajustado para 5,7±0,1. Testou-se a adição de 0, 5, 15, 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de sacarose) e 10 repetições, cada uma composta por um frasco contendo dois explantes. O material vegetal foi mantido em sala de cultura com temperatura de 25±2°C e 16h de fotoperíodo, até a avaliação aos 30 dias.

Número de explantes e vedação dos frascos

Segmentos nodais apresentando cerca de 2 cm, contendo um par de folhas, foram retirados de plântulas *in vitro* e inoculados, em câmara de fluxo laminar, em frascos de 250 mL de capacidade contendo 30 mL de meio de cultura WPM acima descrito. Testaram-se quatro quantidades de explantes inoculadas nos frascos, sendo 1, 2, 3 e 4 segmentos nodais e dois tipos de vedação dos frascos (Figura 1). No primeiro tipo de vedação, os frascos foram vedados com tampas de polipropileno (com taxa de troca de CO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹), enquanto no segundo foram utilizadas tampas de polipropileno com um orifício de 10 mm coberto com membrana porosa (com taxa de troca de CO₂ de 21 µL L⁻¹ s⁻¹) (Saldanha *et al.*, 2012).

Figura 1: Padrões de vedação de frascos empregados no cultivo *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*, (A) Tampa de polipropileno sem membrana; (B) Tampa de polipropileno com orifício de 10 mm coberto por uma membrana



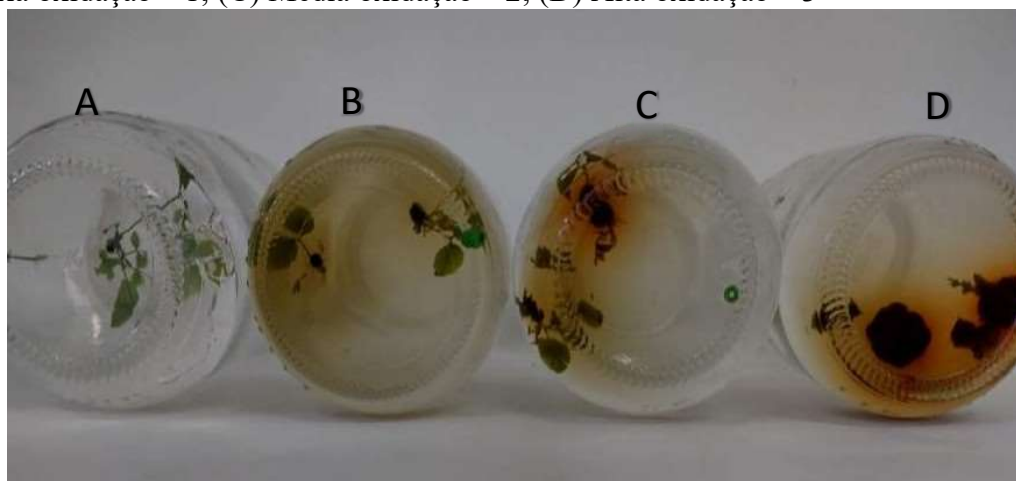
Fonte: elaboração própria (2024)

Os frascos foram mantidos em sala de cultura com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 16h de fotoperíodo. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4×2 , com quatro quantidades de explantes e dois padrões de vedação de frascos, com nove repetições.

Análise de dados e resultados

Para os testes de sacarose e de número de explantes em função dos tipos de vedação, foram avaliados, aos 45 dias, o número e o tamanho da maior brotação emitida, tamanho dos calos, oxidação do meio de cultura, classificado em escala 0 – sem oxidação, 1 – baixa, 2 – média e 3 – alta (Figura 2) e o vigor das plantas, classificado em uma escala de 0 a 3, em que: 0 – morto, 1 – ruim, 2 – bom, 3 – ótimo (Figura 3). Para o teste de sacarose, foram avaliados também o tamanho médio das brotações emitidas, o número de gemas e de folhas expandidas ($>0,5\text{mm}$).

Figura 02: Classificação de oxidação do meio de cultivo de *Apuleia leiocarpa* sob diferentes concentrações de sacarose aos 45 dias de cultivo, variando entre 0 e 3. (A) Sem oxidação - 0; (B) Baixa oxidação – 1; (C) Média oxidação – 2; (D) Alta oxidação – 3

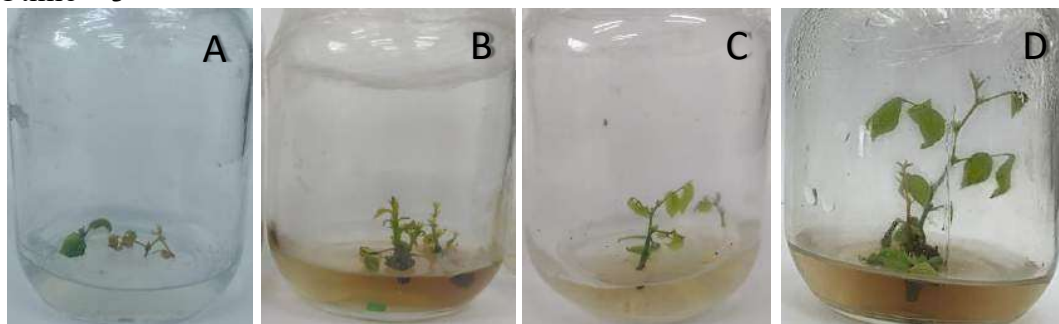


Fonte: elaboração própria (2024)

A oxidação do meio de cultura foi observada pelo escurecimento do meio nutritivo, que antes da inoculação não apresentava coloração. O escurecimento do meio, avaliado na escala descrita, foi obtido em diferentes níveis, a partir do cultivo das plantas por 45 dias (Figura 2).

Já o vigor das plantas, avaliado também na escala descrita, considerou o desenvolvimento geral da planta *in vitro*, seu aspecto visual e crescimento (Figura 3).

Figura 03: Classificação de vigor de *Apuleia leiocarpa* sob diferentes concentrações de sacarose aos 45 dias de cultivo, variando entre 0 e 3. (A) Morto - 0; (B) Ruim - 1; (C) Bom - 2; (D) Ótimo - 3



Fonte: elaboração própria (2024).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise complementar do experimento com regressão para o fator sacarose e teste de Tukey para a comparação de número de explantes em função dos sistemas de vedação dos frascos. O nível de significância 5 foi adotado como padrão nas análises realizadas em ambiente R versão 4.2.3 (R Core Team, 2024), utilizando o pacote ExpDes (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2014).

Sacarose

As concentrações de sacarose adicionadas ao meio nutritivo influenciaram o número de folhas expandidas emitidas pelos explantes *in vitro*, a oxidação do meio e o tamanho do calo (Tabela 1). O vigor das plantas, número de gemas, número e tamanho de brotações não se diferiram, significativamente, entre as concentrações de sacarose utilizadas.

Tabela 1 – Resultado da análise de variância para vigor, número de gemas, número de brotações, tamanho médio das brotações, tamanho da maior brotação, oxidação do meio, tamanho do calo e número de folhas expandidas (>5mm), a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* inoculados *in vitro* em função das diferentes concentrações de sacarose, 45 dias após a inoculação

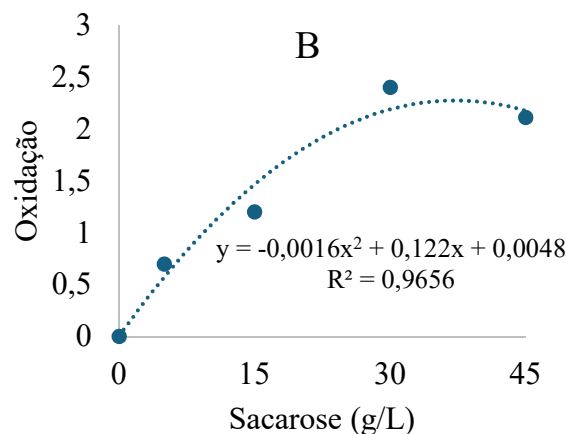
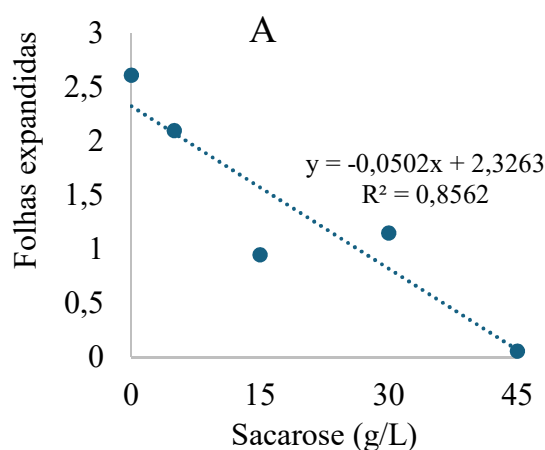
Variável	P	CV(%)
Vigor	0,1365 ^{ns}	36,71

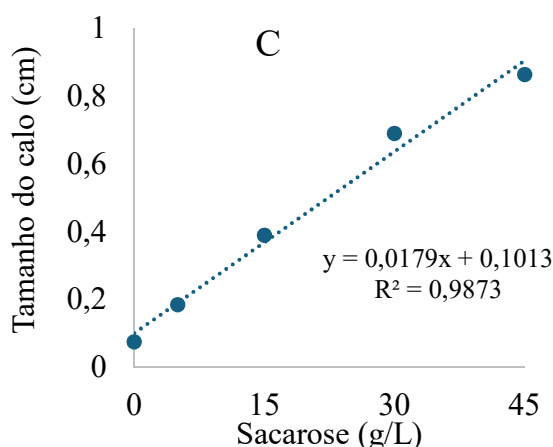
Número de gemas	0,0944 ^{ns}	39,98
Número de brotações	0,0942 ^{ns}	58,99
Tamanho da maior brotação	0,8427 ^{ns}	31,05
Oxidação	4,5 x 10 ⁻¹² *	42,55
Tamanho do calo	3,9 x 10 ⁻¹⁴ *	36,07
Número de folhas expandidas	0,0156*	119,07

Nota: CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; *: $p < 0,05$; ns: $p \geq 0,05$.
Fonte: elaboração própria (2024).

Os maiores valores para oxidação do meio e tamanho de calos foram observados nas maiores concentrações de sacarose. Para a variável número de folhas expandidas, houve tendência de decréscimo com o aumento da concentração de sacarose (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Número de folhas expandidas (A), oxidação do meio (B) e tamanho do calo (C) em função das concentrações de sacarose na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 45 dias após a inoculação





Fonte: elaboração própria (2024).

De forma geral, a ausência da sacarose proporcionou melhores resultados, apresentando plantas com menor quantidade de calos, oxidação mais baixa do meio de cultivo e com maior número de folhas expandidas. A presença de maior número de folhas expandidas pode ser associada a uma maior área fotossinteticamente ativa dos explantes. Além disso, a redução ou a ausência de sacarose no meio nutritivo significa uma redução no custo de produção.

Um calo é basicamente um tecido tumoral, a princípio não organizado e não diferenciado, que, geralmente, surge a partir de cortes de materiais vegetais e tecidos diferenciados, por estímulos, como o uso de reguladores de crescimento (Pierik, 1990). No presente trabalho, observou-se que a concentração de sacarose também estimulou a formação de calos em *A. leiocarpa*, que eram maiores quanto maior fosse a quantidade de sacarose adicionada ao meio nutritivo (Gráfico 1C). Em alguns testes, a formação de calo é o objetivo do cultivo, podendo ser um passo importante para a obtenção de outras estruturas, a partir da organogênese ou embriogênese somática (Xavier; Wendling; Silva, 2021). No entanto, em algumas situações, esse pode ser um resultado morfogênico desfavorável, dificultando alcançar resultados de multiplicação ou enraizamento das plantas cultivadas *in vitro*. Apesar da formação de calo em *A. leiocarpa* mostrar que a adição de sacarose no meio de cultura ocasiona um estímulo de produção de novas células, essas não foram direcionadas para formação de estruturas vegetativas importantes, não contribuindo para a produção de gemas e brotos da espécie, sob as condições testadas.

A sacarose representa uma das principais fontes de carboidratos para o cultivo vegetal *in vitro*, podendo influenciar na proliferação das plantas (Vasconcelos *et al.*, 2014). O seu suprimento exógeno pode ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas, favorecendo a sua multiplicação e desenvolvimento, bem como a aclimatização *ex vitro*, acelerando as adaptações fisiológicas necessárias neste ambiente de cultivo (Hazarika, 2003; Mahendra *et al.*, 2020). As concentrações convencionalmente utilizadas são de 20 a 30 g L⁻¹ de meio de cultura, no entanto, uma investigação mais específica para cada espécie e condição de cultivo pode trazer resultados diferentes em relação ao melhor desenvolvimento *in vitro*. Alguns trabalhos já relataram que a redução do açúcar, principalmente associada a sistemas de maior troca gasosa, pode beneficiar a multiplicação das plantas *in vitro* e que a demanda por açúcar também pode variar entre as fases de desenvolvimento *in vitro* (Miranda *et al.*, 2024)

Os açúcares agem como moléculas sinalizadoras, que regulam muitos processos metabólicos e de desenvolvimento nos vegetais, sendo a sacarose mais comumente translocada. O seu acúmulo nos tecidos foliares pode promover um aumento da taxa de crescimento das plantas, bem como atuar como um sinal inicial no controle do crescimento de gemas axilares, além da armazenagem de carboidratos em órgãos reserva, enquanto a sua carência pode estimular um aumento de taxas de fotossíntese (Taiz *et al.*, 2017). Além de fornecer carbono e energia para o crescimento e a biossíntese de polissacarídeos, a sacarose é crucial no desenvolvimento das plantas, essencialmente nas etapas de enraizamento e aclimatização, devido a uma formação eficiente de sistemas radiculares e foliares, alto acúmulo de compostos fenólicos, maior lignificação do tecido vascular, desenvolvimento de estômatos funcionais e maior teor de substâncias fotossintéticas (Nunez-Ramos *et al.*, 2021).

Segundo Pereira *et al.* (2021), ao avaliarem a influência da sacarose em *Syagrus coronata* (Mart.) Becc, os autores observaram que condições de 40 g L⁻¹ de sacarose são ideais para germinação e multiplicação de embriões zigóticos. Já Fortini *et al.* (2021) concluíram que a suplementação de sacarose no cultivo *in vitro* de *Vernonia condensata*, juntamente com taxas de trocas gasosas, representa uma estratégia eficiente para obtenção de plantas com maior biomassa. A redução da sacarose e o aumento das taxas de trocas gasosas também foram relatadas como estratégias eficientes para o estabelecimento de microcepas do clone de *Eucalyptus urophylla* mantidas em condições *in vitro* (Miranda *et al.*, 2024). No presente

trabalho se pode observar um desenvolvimento superior para *A. leiocarpa*, sem a utilização de sacarose na fase de multiplicação.

Número de explantes e vedação dos frascos

Houve interação dos fatores número de explantes e vedação dos frascos para o vigor das plantas. As variáveis oxidação e número de brotações foram influenciadas, de forma independente, pelo número de explantes, enquanto o tamanho do calo foi influenciado pelo tipo de vedação utilizado. Já para a variável tamanho da maior brotação, não foi observada diferença significativa para os fatores testados (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultado da análise de variância para oxidação, número de brotações, tamanho da maior brotação, vigor e tamanho do calo a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* inoculados *in vitro* em função do sistema de vedação (Ved) e número de explantes (NE) por frasco, após 45 dias de cultivo

Variável	P			CV (%)
	Ved	NE	Ved x NE	
Oxidação	0,1915 ^{ns}	6 x 10 ⁻⁵ *	0,5466 ^{ns}	28,97
Número de brotações	0,6787 ^{ns}	0,0216*	0,7082 ^{ns}	68,66
Tamanho da maior brotação	0,7609 ^{ns}	0,2144 ^{ns}	0,8522 ^{ns}	79,49
Vigor	0,7013 ^{ns}	0,4519 ^{ns}	0,0402*	42,70
Tamanho do calo	0,0229*	0,3240 ^{ns}	0,3613 ^{ns}	55,46

Nota: CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; *: $p < 0,05$; ns: $p \geq 0,05$

Fonte: elaboração própria (2024)

Uma maior oxidação do meio de cultura foi observada quando se utilizou mais explantes em um mesmo frasco de cultivo (3 e 4 explantes) (Tabela 3). Quanto maior o número de explantes em um mesmo recipiente de cultivo *in vitro*, maior é o acúmulo de substâncias exsudadas pelas plantas no meio de cultura. Ademais, foi observada uma variação na produção de brotações em relação ao número de explantes inoculados. Quando se utilizou apenas 1 explante, comparado com o uso de 4 explantes no frasco, obteve-se um maior número de brotos por explante. Este resultado pode indicar uma relação entre a oxidação do meio e a multiplicação das plantas, de forma que a produção de novos brotos pode ser afetada

negativamente pelo processo de oxidação do meio nutritivo, durante o tempo de avaliação do teste.

Tabela 3 - Valores médios de número de brotações e oxidação do meio de cultura, a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* inoculados *in vitro* em função do número de explantes por frasco, 45 dias após a inoculação

Nº de explantes	Nº de brotações	Oxidação
1	3,17 a	1,67 b
2	2,12 ab	1,83 b
3	1,82 ab	2,67 a
4	1,29 b	2,83 a

Nota: Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de significância

Fonte: elaboração própria (2024)

A severidade do escurecimento devido à oxidação varia, dependendo da espécie, idade e posição do tecido, idade da planta mãe e local da excisão do explante, bem como do meio de cultura (Huang *et al.*, 2002). Um recurso utilizado para minimizar o efeito da oxidação fenólica no meio de cultura é a transferência sucessiva dos explantes em novos meios e frascos com maior frequência, bem como a adição de antioxidantes como o carvão ativado (Xavier; Wendling; Silva, 2021). Normalmente, a incisão causada nos explantes provoca um estresse oxidativo, que pode causar a oxidação dos meios de cultura e dos tecidos vegetais, sendo este um desafio ainda maior em espécies lenhosas (Teixeira *et al.*, 2024).

O vigor das plantas foi influenciado pela interação entre a quantidade de explantes e o tipo de vedação. Inoculando-se 1 explante por frasco de cultivo, o uso de tampas sem membranas proporcionou melhor vigor. No entanto, ao inocular 2, 3 ou 4 explantes, o tipo de tampa não influenciou significativamente os resultados de vigor (Tabela 4). Avaliando-se o fator número de explante para cada tipo de vedação utilizado, percebeu-se que ao se utilizar tampas com membranas, o número de explantes inoculados não influenciou no vigor. Entretanto, quando se utiliza tampas sem membranas, a inoculação de 4 explantes por frasco permite obter um vigor significativamente inferior quando comparado ao resultado com a inoculação de apenas 1 explante (Tabela 4). Quanto maior o número de explantes usados no

mesmo frasco de cultivo, aumenta-se, possivelmente, o benefício do uso de membrana, que permite maior troca gasosa.

Tabela 4 – Valores médios de vigor a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* inoculados *in vitro* em função do tipo de vedação e número de explantes por frasco, 45 dias após a inoculação

Vedação	Número de explantes			
	1	2	3	4
Com membrana	1,5 aB	2,17 aA	1,67 aA	1,83 aA
Sem membrana	2,5 aA	1,50 abA	1,50 abA	1,33 bA

Fonte: Médias seguidas por letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de significância

Fonte: elaboração própria (2024)

Quanto ao tamanho dos calos, apenas o tipo de vedação influenciou significativamente, de forma que a utilização de membrana proporcionou a formação de calos maiores (0,96 cm), quando comparado ao uso de tampas sem membrana (0,65 cm). As duas formas de vedação utilizadas se diferem, principalmente, quanto à taxa de troca gasosa entre o meio interno e externo do frasco, produzindo ambientes diferentes dentro dos recipientes no cultivo *in vitro*.

Tradicionalmente na micropropagação, tampas sem membranas porosas são as mais utilizadas. Nesse sistema convencional, as trocas gasosas, geralmente, ocorrem apenas pela difusão de ar na área de contato entre a tampa e o frasco (Xiao; Niu; Kozai, 2011), restringindo as trocas gasosas com o ambiente, aumentando a umidade e limitando as taxas de respiração, podendo causar desordens morfológicas e fisiológicas (Saldanha *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2017). Essas condições podem limitar o crescimento das plantas, devido a uma redução do desempenho fotossintético e de absorção de água e nutrientes, além de perdas elevadas durante a aclimatização, devido à alta mortalidade das plantas com desordens morfofisiológicas (Chandra *et al.*, 2010; Xiao; Niu; Kozai, 2011).

O uso de membranas porosas no cultivo de plantas é, muitas vezes, capaz de melhorar o crescimento *in vitro* e o processo de aclimatização, aumentando a porcentagem de sobrevivência (Hoang *et al.*, 2017). Os melhores resultados em ambientes com membranas, comumente, são associados ao aumento da fotossíntese causada pelo aumento da disponibilidade de CO₂. Para espécies como *Dendrobium bigibbum*, *Acca sellowiana* e

Eremanthus incanus, o uso de formas de vedação que permitiam maior troca gasosa resultou em benefícios no crescimento *in vitro* das plantas (Miranda *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2019; Guanais; Moraes; Fermino Junior, 2022). Em *Humulus lupulus*, o uso de membranas proporcionou melhorias significativas nos parâmetros de crescimento das plantas, incluindo comprimento do broto, área foliar e desenvolvimento radicular, além de facilitar uma melhor regulação da transpiração, levando a maiores taxas de sobrevivência durante a aclimatização (Vale *et al.*, 2025). No entanto, é importante que seja testado para cada material vegetal e em diferentes condições. No presente estudo o uso de membranas foi considerado dispensável na multiplicação *in vitro* de *A. leiocarpa*, principalmente quando há uma quantidade reduzida de material vegetal compartilhando o mesmo recipiente.

Considerações finais

A concentração de sacarose, o número de explantes inoculados e a forma de vedação utilizada nos frascos de cultivo são fatores que influenciam no crescimento e na multiplicação *in vitro* de *A. leiocarpa*. A pergunta da pesquisa “se o sucesso da multiplicação pode ser obtido com a mudança de condições básicas de cultivo” foi respondida, uma vez que mudanças nas condições de cultivo tradicional, como alteração nas quantidades de sacarose adicionada no meio nutritivo e forma de vedação de frascos, causaram efeito na morfogênese das plantas. Comumente, é abordado que, na fase de multiplicação, deve-se trabalhar essencialmente a combinação de reguladores de crescimento, no entanto, este estudo mostra que as condições básicas de cultivo precisam ser consideradas.

Apesar dos avanços obtidos, limitações relacionadas às baixas taxas de multiplicação obtidas no cultivo *in vitro* são reconhecidas, necessitando ser maiores para fomentar projetos de produção dessa espécie via cultura de tecidos. Percebe-se que a espécie apresenta dificuldade nesta etapa de proliferação, com baixas taxas de formação de gemas e brotos, sendo necessário, ainda, explorar novos fatores, que podem influenciar nas respostas morfogênicas e garantir uma maior multiplicação de *A. leiocarpa in vitro*.

Foi possível testar todos os fatores propostos, obtendo respostas no desenvolvimento das plantas submetidas às diferentes condições, alcançando os objetivos do estudo. Os resultados indicaram que a ausência de sacarose no meio traz vantagens na multiplicação, observadas pela menor oxidação do meio nutritivo, maior número de folhas expandidas e menor

tamanho de calos. Além disso, a redução da sacarose permite redução de custo de produção, bem como representa a redução da dependência de fontes externas de carbono, o que pode facilitar a aclimatização das plantas na fase posterior.

Quanto à vedação dos frascos e número de explantes, os resultados indicaram que quando se cultiva menor quantidade de material vegetal em um mesmo frasco, é recomendável vedá-los com tampas sem membranas porosas. Com o aumento da quantidade de material vegetal a ser cultivado em um mesmo ambiente, cresce também a possibilidade de benefício de aumento da troca gasosa, permitida pela utilização de membranas porosas.

Assim, a redução de sacarose em meios nutritivos e o cultivo de menor quantidade de explantes em frascos sem uso de membranas compõem condições mais adequadas para multiplicação *in vitro* de *A. leiocarpa*. A partir desses resultados, esta pesquisa objetiva também servir como base para trabalhos futuros sobre a espécie, uma vez que inclui elementos não abordados em outros estudos, mas que demonstraram a sua influência no crescimento das plantas *in vitro*.

Referências

AZEVEDO, Samir Vieira de *et al.* Antitumoral activity of Amazon plant species: extracts of *Apuleia leiocarpa* induce apoptosis and autophagy in lung tumor cell line. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 75, e01832023, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202475058>. Acesso em: 02 dez. 2024.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CHANDRA, Sheela *et al.* Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>. Acesso em: 06 nov. 2024.

FABRIS, Daiane; GERBER, Thaise; SARTORETTO, Laudete Maria. Desinfestação, germinação e micropropagação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride. **Scientific Electronic Archives**, Rondonópolis, v. 9, n. 3, p. 17-26, 2016.

FELIPPI, Marciele *et al.* Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel). J f Macbr. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 477-491, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/198050986616>>. Acesso em: 02 dez. 2024.

FERNANDES, Dayane Ávila *et al.* Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* Lf. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 88, n. 3, p. 218-228, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.37856/bja.v88i3.114>. Acesso em: 20 nov. 2024.

FERREIRA, Eric Batista; CAVALCANTI, Pórtia Piscitelli; NOGUEIRA, Denismar Alves. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. **Applied Mathematics**, Irvine, v. 5, n. 19, p. 2952-2958, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>. Acesso em: 19 out. 2024.

FORTINI, Evandro Alexandre *et al.* Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 144, n. 3, p. 593-605, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01981-5>. Acesso em: 06 nov. 2024.

GUANAIS, Dara Damiana Souza; MORAES, Francielle Kern de; FERMINO JUNIOR, Paulo Cesar Poeta. Cultivo *in vitro* de *Acca sellowiana* (o. Berg.) Burret. em sistema de ventilação natural com tampas comerciais. **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 19, n. 42, p. 190-197, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.18677/EnciBio_2022D16. Acesso em: 06 nov. 2024.

HAZARIKA, Budhindra Nath. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24109975>. Acesso em: 07 nov. 2024.

HOANG, Nhung Ngoc *et al.* A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1219-2>. Acesso em: 06 nov. 2024.

HUANG, Li-Chun *et al.* High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 38, p. 358-365, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/IVP2002298>. Acesso em: 07 nov. 2024.

LENCINA, Kelen Haygert *et al.* *In vitro* productivity of apuleia (*Apuleia leiocarpa*) microstumps. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 150-159, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509831635>. Acesso em: 23 ago. 2024.

LENCINA, Kelen Haygert *et al.* Rooting and acclimatization of *Apuleia leiocarpa* plantlets. **Agrociencia**, Chapingo, v. 51, n. 8, p. 909-920, 2017.

LLOYD, Gwendolyn; MCCOWN, Brent. Commercially-feasible micro-propagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Volume I. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAHENDRA, Rohit *et al.* *Ex vitro* establishment of tissue cultured plants in fruit crops-A review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 9, n. 11, p. 3321-3329, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.397>. Acesso em: 20 fev. 2024.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MEDEIROS, Úrsula Tathiana Oliveira de. The distribution of *Apuleia leiocarpa* in Brazil: insights for the conservation and socio-environmental management of native species. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, Miami, v. 19, n. 7, p. 1-9, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.24857/rgsa.v19n7-097>. Acesso em: 15 ago. 2025.

MIRANDA, Natane Amaral *et al.* Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia Forentalis**, Piracicaba, v. 44, n. 112, p. 1009-1018, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18671/scifor.v44n112.22>. Acesso em: 07 nov. 2024.

MIRANDA, Natane Amaral *et al.* Gas exchange rates and sucrose concentrations affect development in microstumps of *Eucalyptus urophylla* grown *in vitro*. **Forest Science**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 250-258, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/forsci/fxae009>. Acesso em: 07 abr. 2025.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS (SNIF). **Espécies madeireiras de interesse comercial**. 2016. Disponível em: <https://snif.florestal.gov.br/pt-br/especies-florestais>. Acesso em: 20 fev 2024.

NUNEZ-RAMOS, Jenny Elizabeth *et al.* Morphological and physiological reponses of tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz) microshoots to ventilation and sucrose treatments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 57, p. 1-14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10104-w>. Acesso em: 01 dez. 2024.

OLIVEIRA JUNIOR, João Bosco de *et al.* A simple, alternative and efficient sealing system to improve natural ventilation in culture vessels and the morphophysiological and anatomical quality of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) grown *in vitro*. **Biologia**, Bratislava, v. 77, p. 1-10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01140-5>. Acesso em: 07 abr. 2025.

PEREIRA, Ellie José *et al.* Reguladores vegetais e sacarose na germinação *in vitro* de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc). **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 2, p.18812-18825, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-498>. Acesso em: 27 set. 2024.

PIERIK, Rudolf Leonardus Maria. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. 3.ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2024. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 01 dez. 2024.

REIS, Alisson Rodrigo Souza *et al.* Natural resistance of four Amazon woods submitted to xylophagous fungal infection under laboratory conditions. **Madera y Bosques**, Xalapa, v. 23, n. 2, p. 155-162, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21829/myb.2017.232968>. Acesso em: 23 ago. 2024.

RIBEIRO, Luan Marlon *et al.* Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Ponta Grossa, v. 14, n. 3, p. 1-7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i3a5957>. Acesso em: 06 nov. 2024.

SALDANHA, Cleber Witt *et al.* A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, Boston, v. 110, p. 413-422, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>. Acesso em: 20 fev. 2024.

SANTOS, Priscila Bezerra dos *et al.* Número de explantes, meio de cultura e fotoperíodo na micropropagação de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, p. 749-754, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150062>. Acesso em: 08 abr. 2025.

SILVA, Adriano Bortolotti da *et al.* *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya Walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667418>. Acesso em: 07 nov. 2024.

SILVA, Carlos de Souza *et al.* *In vitro* culture of *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) occurring in the Cerrado in Central-West region. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 4, p. 1083-1091, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667418>. Acesso em: 23 nov. 2024.

SILVA, Jayme Teixeira da *et al.* Acclimatization of in vitro-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, Beijing, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>. Acesso em: 07 fev. 2024.

SILVA, José Gabriel de Souza *et al.* Vegetative propagation of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 33, p. 455-462, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01394-w>. Acesso em: 25 out. 2024.

SILVEIRA, João Victor Baptista; MIRANDA, Natane Amaral; ABREU, Marcel Carvalho. Qualidade de luz na multiplicação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. **Revista Brasileira De Iniciação Científica**, Itapetininga, v.11, e024027. Disponível em <https://periodicoscientificos.itp.ifsp.edu.br/index.php/rbic/article/view/1246>. Acesso em: 15 abr. 2025.

SOARES, Jackeline Schultz *et al.* *Brassavola tuberculata* Hook.: *in vitro* growth and *ex vitro* establishment as a function of the micropropagation system and sucrose. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 83, e270892, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.270892>. Acesso em: 07 abr. 2025.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

TEIXEIRA, Lurdeslaine Faria *et al.* Ação antioxidante de extrato de cenoura e selênio no estabelecimento foliar do cafeeiro. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 13, n. 5, e3413545626, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v13i5.45626>. Acesso em: 02 mar. 2025.

TRUEMAN, Stephen; HUNG, Cao Dinh; WENDLING, Ivar. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, Basel, v. 9, n. 2, e84, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/f9020084>. Acesso em: 21 nov. 2024.

VALE, Ellen Moura *et al.* Increased gas exchange improves photosynthetic efficiency, growth, and acclimatization in micropropagated hop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 162, n. 13, p. 1-14, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-025-03119-x>. Acesso em: 20 ago. 2025.

VASCONCELOS, Jaqueline Martins *et al.* *In vitro* propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by carbon sources. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 50, n. 6, p. 746-751, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9651-z>. Acesso em: 17 jun. 2024.

VIVIAN, Magnos Alan *et al.* Durabilidade natural das madeiras de *Apuleia leiocarpa*, *Astronium lecointei* e *Enterolobium schomburgkii* ao fungo apodrecedor *Trametes versicolor*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 38, p. 1-5, 2018.

XAVIER, Aloisio; WENDLING, Ivar; SILVA, Rogério Luiz da. **Silvicultura clonal: Princípios e técnicas**. 3.ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.

XIAO, Yulan; NIU, Genhua; KOZAI, Toyoki. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 105, p. 149-158, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>. Acesso em: 20 fev. 2024.