

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE
Dimorphandra mollis E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS
ACESSOS CONSERVADOS *IN VITRO*

MARIA MAYDA MOURA DE MATOS

RIBEIRÃO PRETO-SP

2020

MARIA MAYDA MOURA DE MATOS

DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE
Dimorphandra mollis E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS
ACESSOS CONSERVADOS *IN VITRO*.

Dissertação apresentada à
Universidade de Ribeirão Preto –
UNAERP, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia para a
obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Bianca Waléria Bertoni

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP
- Universidade de Ribeirão Preto -

M433d Matos, Maria Mayda Moura de, 1994-
Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de
dimorphandra mollis e avaliação da diversidade genética dos
acessos conservados *in vitro* / Maria Mayda Moura de Matos.
-- Ribeirão Preto, 2020.
43 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waléria Bertoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Plantas medicinais. 2. Micropropagação. 3. Marcador
molecular. I. título.

CDD 660.6

MARIA MAYDA MOURA DE MATOS

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE
DIMORPHANDRA MOLLIS E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS
ACESSOS CONSERVADOS IN VITRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 30 de setembro de 2020

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Bianca Waléria Bertoni
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Prof. Dra. Ana Valéria Vieira de Souza
EMBRAPA



Prof. Dra. Sônia Marli Zingaretti
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

AGRADECIMENTOS

É chegado ao fim um ciclo de muitas risadas, choro, felicidade e frustrações. Sendo assim, dedico e agradeço este trabalho a todos que fizeram parte desta etapa da minha vida.

Agradeço a **Deus** por ter iluminado o meu caminho, aos **meus pais** Raimundo João e Raimunda Marinalva por me incentivarem e terem propiciado a realização deste sonho, e por serem essenciais na minha vida.

Há todos os **meus amigos** que tiveram comigo nos momentos mais difíceis me apoiaram para que não desistir dos meus sonhos minha gratidão.

Gostaria de deixar um agradecimento especial a **minha orientadora Bianca Waléria Bertoni** por todo apoio e empenho dedicado ao longo da elaboração da minha dissertação. E a **instituição de pesquisa Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP** por possibilitar a execução deste trabalho científico.

Muito obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
	2.1 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	2
	2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E QUÍMICOS DA ESPÉCIE....	
	<i>Dimorphandra mollis</i>	3
	2.3 MARCADOR MOLECULAR SCoT.....	9
3	HIPÓTESE	11
4	JUSTIFICATIVA	12
5	OBJETIVO GERAL.....	13
	5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
	6.2 DIVERSIDADE GENÉTICA	17
	6.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA	17
	6.2.2 START CODON TARGETED (SCoT).	17
	6.3 ANÁLISE DOS DADOS	18
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
	7.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE.....	
	<i>Dimorphandra mollis</i>	21
	7.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	27
	7.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA	27
8	CONCLUSÃO.....	33
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de georeferenciamento dos locais de coleta de <i>D. mollis</i>	20
Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência nos diferentes tipos de assepsias em sementes de <i>Dimorphandra mollis</i>	22
Tabela 3. Tabela com o resultado do teste de média entre os tipos de citocininas em relação à altura das plantas de <i>Dimorphandra mollis</i>	22
Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA e IBA no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Dimorphandra mollis</i>	25
Tabela 5. Número de bandas e polimorfismo obtidos em cada primer com o marcador molecular SCoT em <i>Dimorphandra mollis</i>	28
Tabela 6. Matriz de similaridade obtida pela distância genética de Jaccard entre 20 progênies de <i>Dimorphandra mollis</i>	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Dimorphandra mollis</i>	4
Figura 2. Estrutura da rutina.....	5
Figura 3. Aspectos morfológicos do fruto e da semente de <i>Dimorphandra mollis</i>	6
Figura 4. Aspectos da germinação, planta in vitro e planta jovem de <i>Dimorphandra mollis</i> ...	7
Figura 5. Planta jovem de <i>Dimorphandra mollis</i>	8
Figura 6. Sementes escarificadas com auxílio de uma lixa e germinadas in vitro de <i>Dimorphandra mollis</i>	15
Figura 7. Experimento de enraizamento ex vitro de <i>D. mollis</i> A: substrato carolina®, B: areia e C solo.....	16
Figura 8. Efeito da concentração de WP suplementado com BAP, para avaliar a altura das plantas de <i>Dimorphandra mollis</i>	23
Figura 9. Genótipos de <i>Dimorphandra mollis</i> . Acessos coletadas em Aráxa (A); Sacramento (B).....	24
Figura 10. Genótipos de <i>Dimorphandra mollis</i> conservados in vitro na Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP.....	24
Figura 11. Planta de <i>D. mollis</i> com cinco meses.....	26
Figura 12. Resultado da extração do DNA de indivíduos de <i>Dimorphandra mollis</i> . Amostras de Araxá (MG), amostras de Sacramento (MG).....	27
Figura 13. Gel de agarose com o Primer SCoT 28, em <i>Dimorphandra mollis</i>	29
Figura 14. Dendograma obtido pela distância genética de Jaccard e pelo método de argumento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) em progênes de <i>Dimorphandra mollis</i>	31
Figura 15. Gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (PCoA) em progênes de <i>Dimorphandra mollis</i>	31
Figura 16. Grupos gênicos dos indivíduos de <i>Dimorphandra mollis</i> analisados através do programa STRUCTURE. A mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo gênico.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – Benzilaminopurina

IBA – Ácido indobutírico

ISSR – Inter Single Sequence Repeat

KIN – Cinetina

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

TDZ – Thidiazuron.

WP – Wood Plant

SCoT – Start Codon Targeted.

RESUMO

Dimorphandra mollis conhecida no Brasil como fava d'anta produz os flavonoides rutina e quercetina de grande interesse para indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Nativa em regiões do Cerrado brasileiro, esta espécie medicinal encontra-se em abundância no Estado de Minas Gerais que é atualmente responsável por vinte e três por cento da produção nacional de rutina. No entanto, a coleta de frutos de *D. mollis* acontece de forma extrativista e predatória, pois os mesmos são coletados antes de alcançarem o estágio de maturação adequado, o que impede a produção de semente e conseqüentemente a perpetuação da espécie ocasionando a médio e longo prazo erosão genética. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação de *D. mollis* visando à multiplicação de indivíduos com alta variabilidade genética. Sementes coletadas em Araxá e Sacramento (MG) foram desinfestadas usando vários métodos de assepsia, com ou sem escarificação foram inoculadas em meio de cultura contendo diferentes tipos e concentrações de auxinas e citocininas, visando o estabelecimento de um protocolo para multiplicação da espécie. As progênies de *D. mollis* cultivadas *in vitro* foram analisadas usando marcador molecular SCoT, para determinação da diversidade genética do material conservado *in vitro*. A utilização de cercobim e hipoclorito de cálcio foram eficientes na descontaminação das sementes de *D. mollis*, entretanto foi necessário escarificar as sementes para acelerar o processo de germinação *in vitro*. O regulador de crescimento BAP foi o mais indicado para manutenção das plantas *in vitro*, no entanto as auxinas ANA e IBA nas concentrações utilizadas, não foram eficientes para a indução de raízes *in vitro*. O enraizamento *ex vitro* e a porcentagem de sobrevivência foram baixos, portanto esta etapa do protocolo de micropropagação precisa ser otimizada. O marcador molecular SCoT foi eficiente na caracterização genética das progênies de *Dimorphandra mollis*. O material conservado *in vitro* apresentou alto índice de diversidade genética (acima de 80%), com a formação de dois grupos gênicos (K=2), demonstrando a viabilidade da utilização do material vegetal *in vitro* em programas de melhoramento genético.

Palavras chaves: Plantas medicinais, Micropropagação, Marcador molecular.

ABSTRACT

Dimorphandra mollis well known in Brazil as fava d'anta produces the flavonoids rutin and quercetin, which are of great interest to the pharmaceutical and cosmetic industries. Native to Brazilian Cerrado regions this medicinal species is abundant in the State of Minas Gerais, currently responsible for twenty three percent of the national production of rutin. However, the harvesting of *D. mollis* fruits have been done in an extractive and predatory way, since they are collected before reaching their appropriate stage of maturation, what has obstructed seed production and consequently impeded the species perpetuation, triggering in a medium/long term the genetic erosion. The purpose of this work was to develop a micropropagation protocol aiming the multiplication of *D. mollis* accessions with high genetic variability. Seeds collected in Araxá and Sacramento (MG) were disinfested using various sterilization methods, with or without scarification, and were inoculated on culture medium containing different concentration of auxins and cytokinins to establish an optimized protocol for the multiplication of the species. The *D. mollis* progenies cultured *in vitro* were analyzed using SCoT molecular marker to determine the genetic diversity of the material conserved *in vitro*. The use of cercobin and calcium hypochlorite were efficient in disinfesting *D. mollis* seeds, however it was necessary to scarify the seeds to accelerate the *in vitro* germination process. The growth regulator BAP was the most appropriated for plant maintenance *in vitro*. However, the auxins NAA and IBA in the concentrations used, were not efficient to induce *in vitro* roots. The *ex vitro* rooting as well as percentage of survival were low, therefore this stage of the micropropagation protocol demands optimization. The SCoT molecular marker was efficient in the genetic characterization of *D. mollis* progenies. The material conserved *in vitro* showed high index of genetic diversity (over 80%), with the formation of two genetic clusters ($K = 2$), indicating the viability of using the *in vitro* plant material in breeding programs.

Key words: Medicinal plants, Micropropagation, Molecular marker

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por diferentes populações, sendo uma prática muito antiga usada pelo homem para a cura, prevenção e tratamento de diversas enfermidades. O uso foi crescendo principalmente pela cultura indígena, onde extratos vegetais eram utilizados de muitas formas em especial como cataplasma no processo de cicatrização de ferimentos.

O Brasil é um país rico em diversidade e o bioma Cerrado apresenta uma grande variedade de espécies biológicas com enorme propriedade medicinal. Além disso, com ampla diversificação da flora e com potencial para descoberta de novas drogas.

Dimorphandra mollis é uma planta do Cerrado popularmente conhecida como faveiro, favela e fava d'anta, encontrada principalmente nos Estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Esta espécie é incluída como medicinal em comunidades tradicionais e utilizada como cicatrizante, para problemas de circulação e anti-inflamatória. A ação anti-inflamatória se deve principalmente à presença do composto rutina que corresponde a 50 % dos metabólitos secundários presentes no fruto e a espécie contribui com 60 % da demanda do mercado mundial.

No entanto, a espécie não é cultivada e toda matéria-prima é extraída do Cerrado de forma extrativista, não havendo o cuidado com a reprodução da planta. Com isso, as populações naturais de *Dimorphandra mollis* podem ser extintas localmente, principalmente com a expansão da fronteira agrícola nas regiões do Cerrado.

A utilização de técnicas que maximizem a multiplicação de espécies nativas como, por exemplo, a micropropagação, uma técnica de cultura de tecido que tem a possibilidade de multiplicar várias plantas a partir de único explante inicial. E tem se mostrado uma prática eficiente para a produção de mudas e de fundamental importância para o aumento da qualidade das plantas.

Entretanto apesar das diversas vantagens dessa técnica o conhecimento sobre os aspectos ecofisiológicos e técnicas de propagação e cultivo da maioria das espécies nativas ainda são incipientes. A partir disso, este trabalho tem como objetivo desenvolver protocolo de micropropagação de *Dimorphandra mollis* visando à multiplicação de indivíduos com alta variabilidade genética, contribuindo com duas lacunas do conhecimento sobre a espécie, que é a propagação *in vitro* e a diversidade genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

Com os avanços em pesquisas de novas técnicas visando à conservação das espécies medicinais, a técnica de micropropagação tem alcançado sucesso e impacto na cultura de tecido e na agricultura, entre outras áreas de estudos, onde possibilita uma rápida produção de plantas em larga escala, em espaço reduzido. Essa técnica baseia-se na utilização de pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados explantes, isolados de um organismo vegetal, desinfestados, inoculados em um meio de cultura artificial apropriado e cultivados asépticamente, em ambiente controlado sob condições *in vitro* (CID, 2010; PEREIRA, 2016; JUNGHANS et al., 2013; SILVA, 2019).

Sua primeira aplicação comercial foi realizada por Morel em 1960, ao multiplicar Orquídeas através da cultura de ápices caulinares. Mais tarde, Smith e Murashige (1970) conseguiram desenvolver plantas inteiras a partir de meristemas apicais (sem qualquer primórdio foliar), em meio contendo sais minerais e vitaminas, enriquecido com reguladores de crescimento (CARVALHO et al., 2003; SILVA, 2019). É uma técnica considerada alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, incluindo as espécies medicinais com valor farmacológico reconhecido (MORAIS et al., 2012).

Essa técnica tem sido realizada com sucesso em espécies de hortaliças (batata e cenoura), ornamentais (cravos, crisântemo e orquídea), fruteiras (abacaxi, banana e morango), medicinais (erva de São João, espinheira santa, ipeca, entre outras espécies), e em espécies florestais (eucalipto e pinos); com o passar dos anos essa técnica vem evoluindo amplamente e numerosas espécies têm sido propagadas por essa técnica (MONFORT et al., 2010; SILVA, 2019).

Alguns trabalhos publicados, utilizando a técnica de micropropagação apontam a vantagem desta no que se refere a baixo custo. Tais como: o estudo sobre a micropropagação de baixo custo em bananeira com a utilização de meios de cultura com diferentes fontes de carbono e avaliação do desempenho em campo das mudas (BERNARDI et al., 2004); micropropagação de abacaxizeiro utilizando diferentes concentrações de ANA e BAP e cultivo hidropônico das plantas obtidas *in vitro* (MACEDO, 2003) e micropropagação fotoautótrofica com o uso de luz natural visando a redução dos custos de produção de mudas (ERIG, 2005).

A micropropagação tem sido utilizada para produção de espécies medicinais como *Psidium spp* (REGO, 2015), *Amburana cearensis* (CAMPOS et al., 2013), *Mandevilla velutina* (SOUZA et al., 2011) *Croton antisiphiliticus* (OLIVEIRA et al., 2011) e *Artemisia annua* cuja propagação *in vitro* visa atender a alta demanda de artemisinina uma vez que o número de casos de malária tem aumentado consideravelmente (SOUZA et al., 2019; CAMPOS, 2019).

Outro exemplo interessante de espécie medicinal obtida através da micropropagação é a *Dioscorea multiflora* Griseb. Essa planta produz a diosgenina como metabólito secundário majoritário, uma substância potencialmente usada pela indústria farmacêutica para a produção de cortisona e substâncias com ação contraceptiva entre outros trabalhos já publicados nessa área (SOUZA et al., 2011; SOUZA et al., 2015).

Embora haja muitos trabalhos de micropropagação de plantas medicinais, muitas espécies que crescem no cerrado apresentam um enorme desafio quando a produção e desenvolvimento *in vitro* do sistema radicular, demandando sempre muitos experimentos e ajustes nas concentrações e tipos de auxinas, citocininas e outros promotores de crescimento (NEPOMUCENO et al., 2009; YONG 2015).

2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E QUÍMICOS DA ESPÉCIE

Dimorphandra mollis.

Dimorphandra mollis (Fabaceae - Caesalpinoideae) (Figura 1) é uma planta medicinal heliófita, pioneira, seletiva xerófila, característica do Cerrado *stricto sensu* e Campo Cerrado. Conhecida popularmente como faveiro, favela, fava d'anta, barbatimão de folha miúda, que ocorre principalmente nos Estados do Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo (GONÇALVES et al., 2010; COTA et al., 2019).

Figura 1. *Dimorphandra mollis*



Fonte: Ana Maria Soares Pereira

Esta espécie é conhecida também como a falso-barbatimão apresentando casca grossa, folhas alternadas, pecioladas, com as margens menos revolutas ou na maioria das vezes plana; os frutos, crescem em cachos e com menor número de pinas nas folhas (LANDIM et al., 2012; SOUZA et al., 2015).

Os frutos são utilizados na forma de chá, infusão e de cataplasma, em comunidades tradicionais são utilizadas como anti-inflamatório, cicatrizante, no tratamento de varizes e de hemorroidas, melhora os sintomas decorrentes da insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, associados com doenças hemorrágicas ou relacionados à hipertensão, normaliza a resistência e promove a estabilidade da parede de vasos. Outros sintomas como a fragilidade capilar também são melhorados, acne, problemas de circulação, atua como antioxidante no combate a radicais livres e ajuda no fortalecimento da permeabilidade visual e a alteração do campo visual (GONSALVES et al., 2010; URSULINO et al., 2019; COTA et al., 2019).

A propriedade anti-inflamatória dos frutos de *D. mollis* se deve a presença principalmente de rutina e quercetina (SOUZA et al., 2016; MACÊDO et al., 2017). A principal importância econômica da espécie é atribuída ao fruto (favas), pois o pericarpo e a polpa contêm os flavonoides mencionados anteriormente, que são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica no tratamento de diversas doenças, e pelas indústrias de cosmético e alimentício como aromatizante, sendo o Estado de Minas Gerais ranqueado entre os que mais extraem a fava,

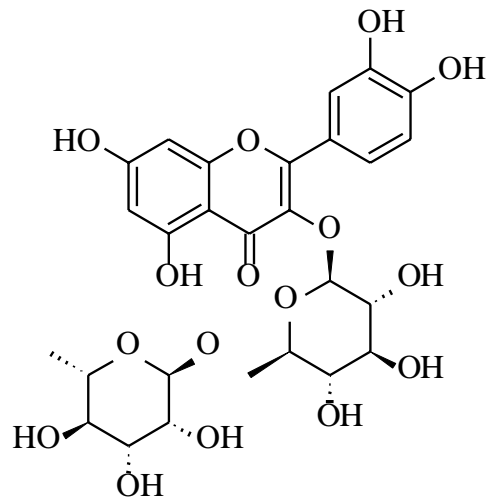
contribuindo com 23 % da produção nacional de espessante e estabilizante, além disso a casca do tronco dessa espécie é rica em tanino (GONSALVES et al., 2010; MACÊDO et al., 2017; BABY et al., 2008; TOMAZELLE et al., 2017).

A importância farmacológica da rutina (Figura 2) se deve a ação promissora no combate ao envelhecimento e as doenças degenerativas, principalmente considerando o contínuo aumento da população idosa no mundo inteiro, bem como no fortalecimento e aumento da permeabilidade das paredes dos vasos capilares agindo contra a oxidação, sendo empregada, por conseguinte como anti-hemorrágica (AZZI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Outra substância extraída da *Dimorphandra mollis*, de grande interesse da indústria farmacêutica é a quercetina que é um antioxidante polifenólico natural, presente nos vegetais, frutas e sucos com expressiva atividade antioxidante (BEHLING et al., 2004; FILIZOLA 2013).

Além da importância dos frutos a madeira também é amplamente utilizada para produção de tabuado, confecção de caixas, compensados, forros, painéis, brinquedos, lenha e carvão, além da espécie ser utilizada em paisagismo e regeneração de áreas degradadas, (URSULINO et al., 2019; MENDES et al., 2014).

Figura 2. Estrutura da rutina

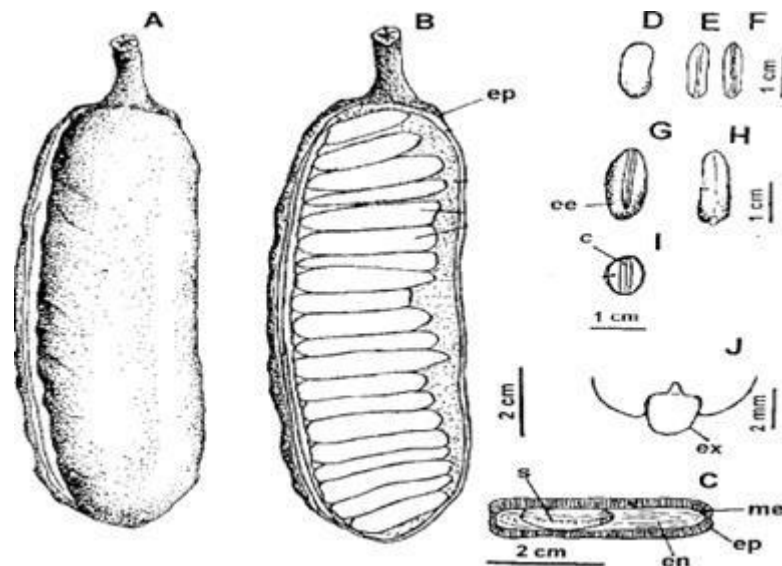


Fonte: Próprio autor

Os frutos de *Dimorphandra mollis*, são deiscentes, abrindo-se por fenda longitudinal, liberando as sementes (Figura 3), o fruto tem formato achatado, cor variando de marrom-escuro a quase negro, opaco, de superfície irregular, rugoso, de ápice e base arredondados, bordas

irregulares, lenhoso (seco), o comprimento em média é de 12,97 cm (mas pode variar de 9,2 a 18,5 cm), largura média é de 2,6 cm e espessura de 1,15; na parte dorsal do fruto há a linha de sutura, saliente, impressa, indo do pedúnculo até o ápice do fruto, que é bem visível na maioria deles. O pedúnculo é persistente e de consistência lenhosa. Quando aberto, o fruto apresenta o pericarpo bem distinto (Figura 3B-C). Epicarpo fino, que corresponde à camada superficial; mesocarpo de consistência farinácea, macia, marrom-escuro e o endocarpo esbranquiçado a amarelado; os frutos apresentam odor forte e adocicado (FERREIRA et al., 2001; AMABILE et al., 2018).

Figura 3. Aspectos morfológicos do fruto e da semente de *Dimorphandra mollis* A. Fruto; B. seção longitudinal do fruto sem semente, mostrando os lóculos; C. seção transversal do fruto, mostrando a semente em seu interior; D. *mollis* semente em vista lateral; E. semente em vista ventral; F. semente em vista dorsal; G. embrião com endosperma; H. embrião sem endosperma; I. seção transversal da semente; J. detalhe do eixo embrionário. (C- cotilédone; EE- endosperma; EN - endocarpo; EP - epicarpo; EX - eixo embrionário; ME - mesocarpo; PD - pedúnculo; S - semente).

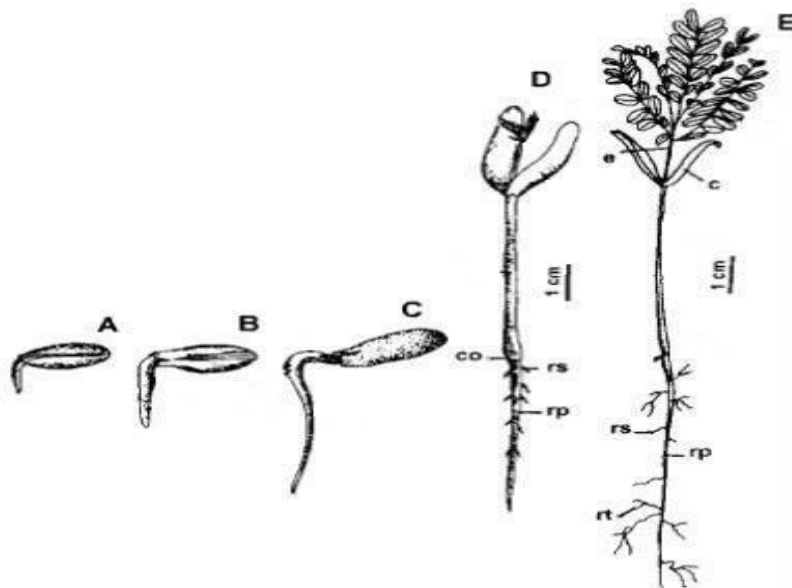


Fonte: Ferreira, 2001/aspectos morfológicos do fruto e da semente de *Dimorphandra mollis*.

A germinação e morfologia da plântula (Figura 4) tem início após sete dias de sua semeadura, período em que a sua raiz primária rompe os tegumentos da base da semente. As sementes têm o

formato curto, são espessas, de cor-verde-claro e seu ápice esbranquiçado. Sua raiz apresenta desenvolvimento rápido, no início é engrossada sofrendo afinção com dilatação na base, cilíndrica, tenra, esbranquiçada e coifa amarelada; raízes secundárias são finas cilíndricas da mesma cor da raiz primária (FERREIRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2003).

Figura 4. Aspectos da germinação, plântula e planta jovem de *D. mollis*. A - D Germinação e plântula com protolifos; E - fase inicial de plantas jovem. (C - cotilédone; CO - coleto; E - epicótilo; RP – raiz primária; RS - raiz secundária; RT - raiz terciária).

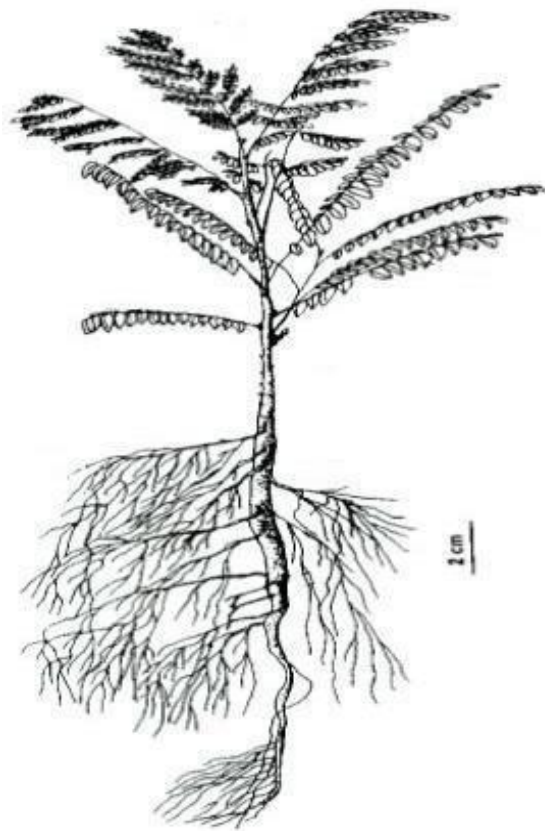


Fonte: Ferreira, 2001/aspectos da germinação, plântula e planta jovem de *Dimorphandra mollis*.

Na planta jovem (Figura 5), a raiz primária axial é pivotante longa, sinuosa, cilíndrica, amarelada a ferrugíneo-clara, tuberosa, tenra, quebradiça passando à lenhosa, apresentando lenticelas, com descamações longitudinais na epiderme, rugosa, devido a pontuações pequenas e salientes; onde ocorrem as descamações, a nova superfície é amarela clara; raízes secundárias, finas, sinuosas, ferrugíneo claras com a coifa amarelada, cilíndricas, tenras, abundantes e bem distribuídas ao longo da raiz primária, sendo algumas tuberosas; raízes terciárias semelhantes às raízes secundárias (FERREIRA et al., 2001; CAMPOS et al., 2013).

As raízes apresentam pelos simples, translúcidos, somente vistos sob microscópio estereoscópico. O caule jovem é reto, de base lenhosa, cilíndrico, verde-escuro amarronzado, apresentando algumas rachaduras no sentido longitudinal, com lenticelas arredondadas e esbranquiçadas, glabro. As folhas definitivas são inicialmente compostas por sete a 22 pares de folíolos e apresentam pulvino; os folíolos são opostos ou alternos, ovoides ou oblongos, às vezes elípticos, bordo inteiro, ápice obtuso e base cordiforme, pilosos, com pulvínulo; os folíolos mais velhos são verde-escuros na face ventral e verde claro na face dorsal (FERREIRA, et al., 2001; GOULET et al., 2017).

Figura 5. Planta jovem de *Dimorphandra mollis*. (CL – caule jovem; F – folhas; FO – foliólulo; GA – gema apical; RP– raiz primária; RS - raiz; RT – terciária).



Fonte: Ferreira, 2001/Planta jovem de *Dimorphandra mollis*.

Quanto à sua distribuição geográfica a espécie tem uma extensão de ocorrência e 5.215 km² e uma área de ocupação de 272 km². Os registros de ocorrência atual principalmente nos Estados do Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e São Paulo (GONÇALVES et al., 2010).

2.3 MARCADOR MOLECULAR SCoT

O uso de marcadores moleculares com maior precisão e resolução é uma ferramenta importante para estratégias de conservação, manutenção do germoplasma da espécie e um forte aliado em estudos de diversidade e análise da estrutura populacional (SABOORI et al., 2019; SCOTT et al., 1974). Esses marcadores vêm se mostrando eficientes para quantificar a variabilidade genética das espécies naturais, sendo indicado para estudos populacionais, inclusive para *D. mollis*, com isso é possível avaliar efeitos e características genéticas.

Entre os diversos marcadores moleculares utilizados para o estudo da diversidade genética de plantas o Start Codon Targeted (SCoT) tem sido muito indicado por ser um marcador dominante e reprodutível, baseado na região curta conservada em genes de plantas em torno do códon de início (ou iniciação) de tradução ATG e utilizando um único iniciador 18-mer nos ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR), com temperatura de anelamento superior a 50 °C. Este marcador molecular tem ganhado popularidade por sua superioridade sobre outros marcadores de DNA dominantes, como RAPD e ISSR (POCZAI et al., 2012; PRATIK, et al., 2015; PASHANEZHAD et al., 2019).

O marcador molecular SCoT foi utilizado no estudo da diversidade genética e estrutura populacional da análise de germoplasma de *Coffea canephora* em coleções localizadas na Índia, identificando 31 acessos mais divergentes os quais são indicados para programa de melhoramento, visando a adaptação às mudanças climáticas e resistência a novas pragas e doenças (HUDED et al., 2020; CANESI et al., 2013; BIONDO et al., 2007).

Outro estudo importante com SCoT realizado com planta medicinal foi feito com papola (*P. somniferum* L.) usando análises multivariadas que evidenciaram o polimorfismo entre os acessos a nível molecular (ABHILASHA et al., 2020).

O marcador molecular SCoT é visualizado por eletroforese em gel de agarose tornando esta técnica adequada para a grande maioria dos laboratórios de pesquisa de plantas com equipamento padrão (ZHANG et al., 2015; SABOORI et al., 2019). Possibilitando o uso direto em programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares, e vêm sendo empregado com sucesso para avaliar a diversidade e estrutura genética, identificar cultivares e para o mapeamento de QTLs e DNA fingerprinting em diferentes espécies, incluindo plantas como arroz, cana-de-açúcar, uva, batata, manga e amendoim (PRATIK et al., 2015).

Há vários trabalhos já publicados com o marcador SCoT, como por exemplo trigo duro (*Triticum turgidum* var. Durum) (ETMINAM et al., 2016), *E. sibiricus* (ZHANG et al., 2015), *Dendrobium* (FENG et al., 2015), *Mangifera indica* (LUO et al., 2014) e *Phoenix dactylifera* (SABOORI et al., 2019).

3 HIPÓTESE

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos que viabilizará a multiplicação de mudas em larga escala da espécie *Dimorphandra mollis*, com alta variabilidade genética de indivíduos promissores para serem utilizados em programas de melhoramento.

4 JUSTIFICATIVA

A *Dimorphandra mollis*, é a principal fonte de rutina, corresponde a 50 % dos metabólitos secundários presentes no fruto e a espécie contribui com 60 % da demanda do mercado mundial. Em função disso os frutos vêm sendo submetidos há intenso extrativismo predatório, pois são coletados verdes antes de alcançarem o ponto de maturação, o que prejudica a sobrevivência da espécie em longo prazo ocasionando erosão genética. Portanto, justifica-se a proposta de desenvolver um protocolo de micropropagação de *Dimorphandra mollis* visando à multiplicação em larga escala de indivíduos com grande variabilidade genética.

5 OBJETIVO GERAL

Desenvolver protocolo de micropropagação de *Dimorphandra mollis* visando à multiplicação de indivíduos com alta variabilidade genética e avaliar a diversidade genética de duas populações da espécie.

5.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Coletar sementes em populações naturais;
- Desenvolver o protocolo de micropropagação;
- Avaliar a diversidade genética nos indivíduos micropropagados, utilizando marcador molecular SCoT.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.3 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Dimorphandra mollis*.

A coleta de sementes e material botânico para confecção de exsiccatas foi realizada nos municípios de Araxá e Sacramento, ambos localizados no estado de Minas Gerais - Brasil. As exsiccatas foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, sob número de registro HPMU-408. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen (nº do cadastro AAFCFEO).

A assepsia das sementes foi realizada com diferentes agentes antimicrobianos, sendo eles Cercobin e hipoclorito de cálcio, em seguida foram inoculados em meio WP (Wood Plant). Foram realizados seis tratamentos, sendo três destes com sementes não escarificadas (A) e três com sementes escarificadas manualmente com auxílio de uma lixa (B). A avaliação quanto à contaminação foi realizada após 30 dias do material inoculado no meio de cultura WP (Figura 6).

Tratamento 1A: As sementes permaneceram em solução com 2 % de cercobin por 24h, em seguida foram transferidas para solução 0,5 % de hipoclorito de cálcio permanecendo por 40 minutos e inoculadas posteriormente em meio WP (Wood Plant).

Tratamento 2A: As sementes permaneceram em solução com 2 % de cercobin por 2h, em seguida foram transferidas para solução 0,5 % de hipoclorito de cálcio permanecendo por 40 minutos e inoculada posteriormente em meio WP (Wood Plant).

Tratamento 3A: As sementes permaneceram em solução com 2 % de cercobin por 2h, em seguida foram transferidas para solução 0,5 % de hipoclorito de cálcio permanecendo por 1 hora e inoculada posteriormente em meio WP (Wood Plant).

Tratamento 1B: As sementes permaneceram em solução com 2 % de cercobin por 24h, em seguida foram transferidas para solução 0,5 % de hipoclorito de cálcio permanecendo por 40 minutos, posteriormente foram escarificadas manualmente com auxílio de uma lima de metal número 350 e inoculadas em meio WP (Wood Plant).

Tratamento 2B: As sementes permaneceram em solução com 2 % de cercobin por 2h, em seguida foram transferidas para solução 0,5 % de hipoclorito de cálcio permanecendo por 40 minutos, posteriormente foram escarificadas manualmente com auxílio de uma lima de metal número 350 e inoculadas em meio WP (Wood plant).

Tratamento 3B: 2 % de cercobin por 2h, em seguida as sementes foram transferidas para solução 0,5 % de hipoclorito de cálcio permanecendo por 1 hora, posteriormente foram escarificadas manualmente com auxílio de uma lima de metal número 350 e inoculadas em meio WP (Wood plant).

Após a escolha do tratamento de assepsia, foram utilizadas 30 sementes de cada indivíduo com cinco repetições para os experimentos futuros.

Figura 6. Sementes escarificadas com auxílio de uma lima de metal número 350 e plantas germinadas *in vitro* de *Dimorphandra mollis*.



Fonte: Próprio autor

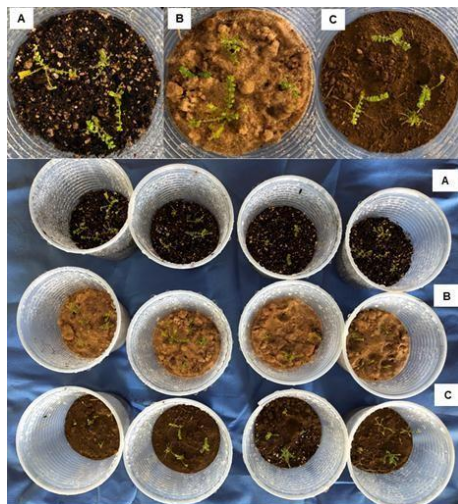
As sementes germinadas *in vitro* e que não apresentaram contaminação, forneceram segmentos nodais axênicos de 0,5 cm de altura e foram transferidos para o meio de cultura WP suplementando com benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e Thidiazuron (TDZ), nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mg/L⁻¹.

As avaliações quanto ao número de gemas por haste, altura da plântula, porcentagem de calos na base, porcentagem de vitrificação e índice de sobrevivência foram realizados após 40 dias da inoculação do explante.

Plantas com um par de folhas medindo 1,0 cm de comprimento foram transferidas para o meio de enraizamento, ou seja, WP suplementado com IBA (ácido indolbutírico) ou ANA (ácido naftalenoacético), nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg. L⁻¹. Após 40 dias foram avaliadas as porcentagens de plantas enraizadas, o número de raízes, altura da plântula, porcentagem de calos na base, porcentagem de vitrificação e índice de sobrevivência.

Foram selecionadas brotações, com 7 cm de altura, advindas de cultura de tecidos sem a presença de raiz. Estas plantas foram transferidas para copos descartáveis transparentes com capacidade para 500 mL, com quatro furos na base para drenagem do excesso de água. O primeiro tratamento continha apenas substrato comercial Carolina Soil®, o segundo areia e o terceiro solo. Foram utilizadas quatro plantas por parcela, com quatro repetições. As plantas permaneceram em casa de vegetação com umidade de 80 %. A porcentagem de enraizamento e sobrevivência foi realizada após cinco meses (Figura7).

Figura 7. Experimento de enraizamento *ex vitro* de *D. mollis*. A: substrato Carolina®, B: areia e C: solo.



Fonte: Ana Maria Soares Pereira

6.4 DIVERSIDADE GENÉTICA

6.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA

Foram selecionadas duas amostras com folhas jovens de cada progênie de *Dimorphandra mollis* que foi estabelecida *in vitro*. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE 1990) com algumas modificações. O tampão de extração (1000 µL) foi adicionado sob 100 mg de folha, em seguida macerada em nitrogênio líquido, e homogeneizado a 4 °C, depois foram incubados em banho-maria a 65 °C por 30 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e foi adicionado 200 µL de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1). Após agitação, o material foi centrifugado a 12000 rpm/10 min. A fase aquosa foi removida para outro tubo, à qual foram adicionados 600 µL de isopropanol, misturando-se bem. Logo após a centrifugação a 12000 rpm /10 min, foi adicionado ao sedimento 1 mL de tampão de lavagem (etanol 70 % v/v e acetato de amônio 10 mM), permanecendo em temperatura ambiente por 20 minutos. A centrifugação foi repetida a 12000 rpm /10 min, e o sobrenadante descartado, o sedimento (DNA) foi lavado duas vezes em etanol 70 %, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 min. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o pellet foi ressuscitado em 100 µL de água ultra pura. A qualidade do material genético de cada indivíduo foi analisada por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8 % e a quantidade avaliada através do nanofotômetro (IMPLEN P360).

6.4.2 START CODON TARGETED (SCoT).

Para o presente estudo as amostras de DNA foram submetidas ao ensaio com marcador molecular SCoT, de acordo com o protocolo descrito por Collard e Mackill (2009).

O DNA extraído de cada indivíduo foi armazenado em freezer -20 °C, e a partir destes foram retiradas as alíquotas para diluição e obtenção de concentração final a 10 ng/µL, a fim de padronizar as reações de PCR.

A amplificação foi realizada em uma mistura contendo água ultra pura 4,4 µL, 1,0 µL de tampão de reação (10X), 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,1 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL),

1,0 μL de primer (8 μM) e 2,5 μL de DNA (10 ng/ μL). Totalizando 10 μL de reação por indivíduo. Importante dizer que o Tampão da enzima é suplementado com MgCl_2 .

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (marca JG modelo Gene Mate Series) em diferentes temperaturas. As condições dos ciclos consistiram em 3 minutos iniciais a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 2 minutos de extensão a 72 °C, e finalizando com 5 minutos de extensão a 72 °C.

O produto das amplificações foi visualizado em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,001 % e submetido à eletroforese em cuba horizontal Bio Rad (Electrophoresis Power Supply – EPS 6000), a 60 V. por um período aproximado de 180 minutos, usando marcador 100 pb.

O gel foi visualizado no transluminador (Gel Doc 2000 da Bio Rad) e documentado através do programa Carestream Molecular Imagine Software.

6.5 ANÁLISE DOS DADOS

O delineamento experimental adotado nos experimentos realizados *in vitro* foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com regressão linear utilizando o programa SISVAR V.4.3 (FERREIRA 2003), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A partir das imagens de géis, geraram uma leitura para a configuração de uma matriz binária de 0 e 1 (presença ou ausência de bandas nos indivíduos). A matriz de similaridade entre indivíduos foi obtida pelo programa FreeTree v.0.9.1.50. As relações genéticas foram mostradas com a elaboração de um dendograma, no programa Tree VieW e MEGAS6.

Na obtenção da medida da similaridade genética realizada empregando-se o coeficiente de Jaccard ($a/a+b+c$), onde $-a|$ representa o número de concordância positiva do tipo 1-1, $-b|$ é o número de discordância 1-0 e $-c|$ é o tipo de discordância 0-1. Em seguida o agrupamento foi realizado pelo método da média aritmética não ponderada *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). A mesma matriz foi analisada por PCoA (Análise em Coordenadas Principais) visando determinar a formação dos grupos no programa GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006; 2012).

Para a discriminação dos grupos gênicos entre os indivíduos foi empregado o método bayesiano utilizando o programa STRUCTURE versão 2,1 (PRITCHARD et al., 2000). Neste estudo foram testadas as probabilidades de 01 a 6 agrupamentos (K=1 a K=6) seguindo os parâmetros: 300000 burning e 500000 MCMC. O modelo Bayesiano utilizado foi o admixture model, pois trata-se de progênies advindas de populações naturais. A escolha do valor de K para melhor agrupar os acessos foi feita com base no critério proposto por Evanno et al. (2005).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas sementes de 13 árvores de *D. mollis* no município de Sacramento e 21 árvores no município de Araxá (MG) (Tabela 1), ambas localizadas no estado de Minas Gerais.

Tabela 1. Dados de georeferenciamento dos locais de coleta de *D. mollis*.

Município de Sacramento			
Pontos	Latitude	Longitude	Alt (m)
1	11° 49'32,0"	54°11'19,6"	1039
2	19° 42'82,0"	47°07'72,4"	1099
3	19° 44'51,0"	47°11'236"	1059
4	19° 44'60,5"	47°11'30,4"	1065
5	19° 44'60,9"	47°11'30,5"	1066
6	19° 47'60,9"	47°14'92,9"	1001
7	19° 49'25,0"	47°16'33,6"	993
8	19° 50'19,5"	47°17'82,3"	1156
9	19° 50'32,0"	47°17'98,4"	1157
10	19° 50'09,8"	47°19'54,4"	1119
11	19° 56'69,0"	47°23'52,3"	761
12	19° 57'19,7"	47°23'34,5"	712
13	19° 59'54,1"	47°24'39,3"	569
Município de Araxá			
Árvore	Lat.	Long.	Alt (m)
1	19° 35'37,1"	54°08'53,3"	972
2	19° 35'35,9"	47°07'59,0"	975
3	19° 35'34,8"	47°07'53,3"	985
4	19° 35'36,4"	47°07'51,7"	990
5	19° 35'34,2"	47°07'49,3"	983
6	19° 35'33,8"	47°07'43,0"	984
7	19° 35'34,0"	47°07'41,3"	983
8	19° 35'31,9"	47°07'37,3"	981
9	19° 35'31,5"	47°07'41,4"	982
10	19° 35'35,5"	47°07'59,2"	982
11	19° 35'40,5"	47°08'21,0"	975
12	19° 35'41,3"	47°08'24,6"	979
13	19° 35'49,8"	47°08'56,1"	997
14	19°36'46,3"	47°10'07,1"	995

15	19°36'40,7"	47°10'44,5"	1003
16	19°36'44,1"	47°11'49,2"	992
17	19°36'53,0"	47°12'25,3"	1001
18	19°36'53,6"	47°12'23,6"	1003
19	19°36'53,0"	47°12'22,0"	1003
20	19°36'52,8"	47°12'21,4"	1000
21	19°36'51,1"	47°12'18,6"	1001

7.3 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Dimorphandra mollis*.

De acordo com os resultados da tabela 2, não houve diferença significativa pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade entre as assepsias realizadas nas sementes de *Dimorphandra mollis* para todas as variáveis analisadas.

Pode-se observar que a porcentagem de contaminação e de germinação foi menor nas sementes não escarificadas, quando comparado com as sementes que foram escarificadas manualmente. Entretanto, a escarificação proporcionou uma diferença significativa em relação à germinação das sementes (Tabela 2).

A porcentagem de germinação variou de 73,33 a 96,99 % quando as sementes foram escarificadas. Resultado semelhante ao de Pereira et al. (2014), sobre a eficiência dos tratamentos para a superação ou quebra de dormência de semente de *Fabaceae*. Portanto, a maior porcentagem de germinação em sementes escarificadas confirma a existência de dormência física imposta pelo tegumento na semente de *Dimorphandra mollis*.

Ao comparar os três tratamentos de assepsia com sementes escarificadas manualmente, verificou-se que não houve diferença significativa em relação ao tipo de assepsia. Entretanto, considerando que a menor porcentagem de oxidação que ocorreu no tratamento em que as sementes permaneceram em solução com 2 % de cercobin por 24h e solução 0,5 % de hipoclorito de por 40 minutos, recomenda-se essa assepsia como sendo a mais adequada.

Em trabalho realizado por Pacheco et al. (2011), sobre dormência de sementes e produção de mudas de *Dimorphandra mollis* observou-se que quando as sementes foram escarificadas proporcionaram maiores porcentagens de germinação, devido à quebra da dormência tegumentar o que facilita o processo pré-germinativo (PEREIRA et al., 2016; COSTA et al., 2017).

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência nos diferentes tipos de assepsias em sementes de *Dimorphandra mollis*.

Tipos de assepsia	Descontaminada (%)		Fungo (%)		Bactéria (%)		Oxidação (%)		Germinação (%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	93,33Aa	86,66Aa	6,66Aa	13,33Aa	6,66Aa	0,00Aa	0,00Aa	13,33Aa	0,00 Aa	96,66Ab
2	90,00Aa	73,33Aa	6,66Aa	26,66Aa	6,66Aa	3,33 Aa	3,33Aa	36,66Bb	6,66 Aa	86,66Ab
3	86,66Aa	76,66Aa	13,33Aa	20,00Aa	3,33Aa	6,66 Aa	3,33Aa	43,33Bb	3,33 Aa	73,33Ab

A= semente íntegra, B= semente escarificada. As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A regressão linear seguida de teste de média realizado para verificar qual o melhor regulador vegetal (BAP, cinetina e TDZ) para a multiplicação *in vitro* de *D mollis*, indicou que a citocinina benzilaminopurina (BAP), apresentou diferença significativa em relação aos outros reguladores em relação à altura das plantas (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela com o resultado do teste de média entre os tipos de citocininas em relação à altura das plantas de *Dimorphandra mollis*.

Tratamentos	Altura
BAP	2,78a
Cinetina	1,65c
TDZ	2,19b

As médias acompanhadas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

A análise de variância não evidenciou diferença significativa entre as doses de BAP para a variável número de brotos que permaneceram na média com um broto por explante. Entretanto, quando comparado às cinco concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0) em relação ao comprimento da parte aérea, a regressão linear indicou a concentração de 1,16 mg. L⁻¹ de BAP para crescimento de plantas com 2,93 cm.

Apesar da melhor dose ter sido calculada, esta não apresentou diferença significativa em relação às doses inferiores, sendo que a concentração de 0,1 mg. L⁻¹ é suficiente para produzir plantas com 2,88 cm. Portanto, a utilização das menores concentrações de reguladores vegetais sempre é mais indicada, pois pode minimizar a indução de variação somaclonal, o que é comum quando se utiliza doses mais elevadas (Figura 8, 9 e 10).

Um trabalho realizado com *Xylopia aromatica* por Porfírio et al. (2019), o BAP mostrou um resultado positivo, tanto no número de brotos quanto na altura. Entretanto, em *D. mollis* apesar das concentrações de BAP não terem sido eficientes na indução da parte aérea, plantas mais altas facilitam a aclimatização do material vegetal.

Figura 8. Efeito da concentração de BAP na altura de plantas de *Dimorphandra mollis*.

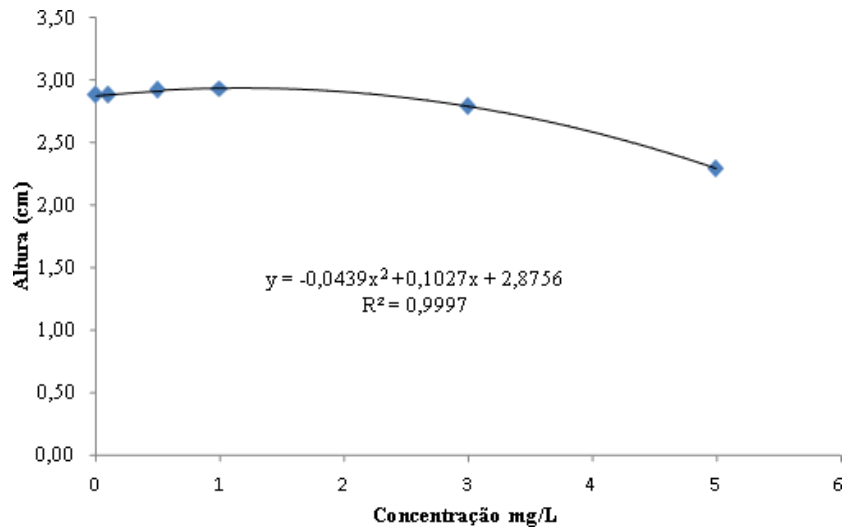
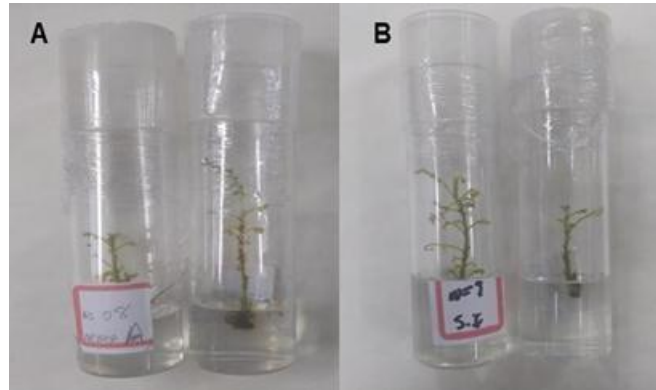


Figura 9. Genótipos de *Dimorphandra mollis*. Acessos coletadas em Aráxa (A); Sacramento (B).



Fonte; Próprio autor

Figura 10. Genótipos de *Dimorphandra mollis* conservados *in vitro* na Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP.



Fonte; bpróprio autor

Em trabalho realizado por Souza et al. (2016), que publicou uma revisão sobre enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, citaram vários estudos que confirmam o efeito benéfico das auxinas no enraizamento das plantas. A ação positiva das auxinas durante esta etapa é conhecida de longa data e ocorre durante as fases de indução e iniciação das raízes (em períodos de duas, três e/ou quatro semanas) quando há conjugação com a auxina endógena e a formação do primórdio radicular.

Entretanto, os experimentos de enraizamento realizados com a adição de auxinas visando à indução de raízes *in vitro* em plantas de *D. mollis* (Tabela 4) não foram eficientes e não houve diferença significativa no número de brotos e altura das plantas.

Em espécies consideradas difíceis de enraizar, após o tratamento com as auxinas sintéticas, ocorre aumento na concentração de AIA endógeno e posteriormente decréscimo, antes da formação das raízes. Nesse caso, não ocorre a conjugação com a auxina exógena para a formação do primórdio radicular (MENDES; LACERDA, 2014), o que pode ter ocorrido em *Dimorphandra mollis*. Tendo em vista que a concentração de reguladores utilizados não foi efetiva para promover o enraizamento adventício *in vitro* de *D. mollis*, esta pode ser considerada uma espécie difícil de enraizar.

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA e IBA no enraizamento *in vitro* de *Dimorphandra mollis*.

Tratamento	Número de brotos		Altura brotação (cm)		% de enraizamento	
	ANA	IBA	ANA	IBA	ANA	IBA
WP	1,2aA	1,2aA	3,0aA	3,0aA	-	-
WP + 0,1 mg/L	1,1aA	1,0aA	3,2aA	3,1aA	-	-
WP + 0,5 mg/L	1,0aA	1,0aA	3,1aA	3,1aA	-	-
WP + 1,0 mg/L	1,0aA	1,0aA	3,3aA	3,0aA	-	-

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A micropropagação apresenta vantagens quando comparada aos métodos tradicionais, por exemplo, é excelente para a multiplicação de clones elites, multiplicação em longo prazo independente de fatores ambientais ou climáticos, permite a produção de um grande número de indivíduos em um curto espaço de tempo (KAVAND et al., 2011; PRITCHARD et al., 2000).

Entretanto, várias dificuldades são encontradas no desenvolvimento do protocolo de micropropagação de algumas espécies. Desde dificuldade com descontaminação, até problemas

com enraizamento e aclimatização, pois são processos de grande complexidade (SOUZA et al., 2011; SINGH 2018).

Vários trabalhos são encontrados na literatura sobre a dificuldade com a germinação das sementes de *D. mollis* que apresenta dormência (FREITAS et al., 2009; HERMANSEN et al., 2000; MANSETTO et al., 2014), entretanto ainda não está disponível um protocolo eficiente de micropropagação da espécie.

Até o momento existem apenas ensaios de introdução de *D. mollis in vitro*, mas não há um protocolo completo, concluindo que há necessidade de ajustes na composição do meio de cultura para maximizar o número de brotações e produção de novas plantas (SUDRÉ 2009).

Neste trabalho a maior dificuldade foi no enraizamento das plantas. Os meios de cultura utilizados não induziram raiz *in vitro*, portanto a opção foi o enraizamento *ex vitro*. O resultado do experimento não foi satisfatório, apresentando apenas 12,5 % (□ 0,1) de enraizamento e de sobrevivência das plantas que permaneceram por cinco meses em condições de casa de vegetação, quando utilizado o substrato Carolina Soil® (Figura 11).

Figura 11. Planta de *D. mollis* com cinco meses.



Fonte: Ana Maria Soares Pereira

Plantas enraizadas ou não *in vitro* podem se adaptar as condições de solo com taxa de sobrevivência de 10 a 100 % (BIONDO et al., 2007). O uso de microrganismo, principalmente micorrizas pode ser utilizado para aumentar esta eficiência levando a um melhor desempenho sob condições *ex vitro* (BEZERRA et al., 2019). Em plantas micropropagadas da frutífera *Pouteria lucuna* transplantada em substrato enriquecido com microrganismo, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 80%, em *Pogostemum Mollis* e *Glycyrrhiza glabra*, ambas as espécies medicinais apresentaram melhora na taxa de sobrevivência e o desempenho das mudas, quando

foram inoculadas com micorriza no início da aclimatização (PADILLA et al., 2006; YADAV et al., 2013; MUTHURAJ et al., 2018).

A condição axênica das plantas micropropagadas pode dificultar a sobrevivência de espécies dependentes de microrganismos. Isto pode ter acontecido durante o enraizamento e aclimatização de *D. mollis*, portanto novos experimentos utilizando microrganismos que crescem em associação com essa espécie, podem aumentar a taxa de sobrevivência da planta nesta etapa do protocolo de micropropagação.

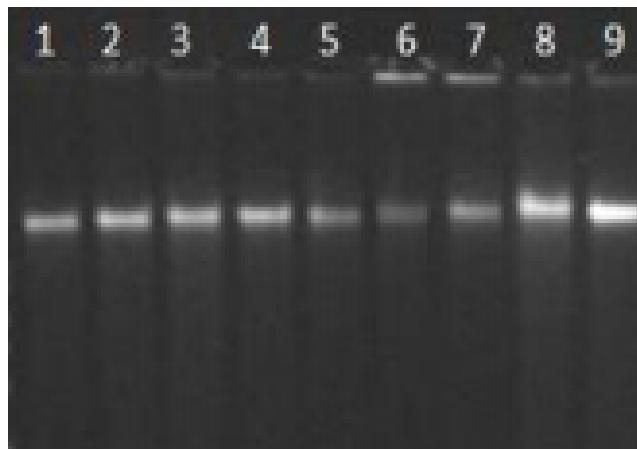
7.4 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

7.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O resultado da extração de DNA utilizando o protocolo Doyle e Doyle (1990), e os tecidos foliares de *D. mollis* (Figura 12) foi eficiente. O material apresentou qualidade adequada para as reações de PCR.

As amostras tiveram uma grande quantidade de DNA íntegro e bandas amplificadas, e de melhor qualidade. Além disso, não houve degradação do DNA genômico.

Figura 12. Resultado da extração do DNA de indivíduos de *Dimorphandra mollis*. Amostras de Araxá (MG), amostras de Sacramento (MG).



O protocolo Doyle e Doyle (1990), é o método de extração de DNA mais utilizado, pois, apresenta boa resposta para diferentes espécies vegetais. Entretanto, Souza et al. (2011) relata a dificuldade em se utilizar este protocolo em folhas de *D. mollis* devido a contaminação por polissacarídeo, o que dificulta as reações de PCR, sugerindo o protocolo desenvolvido por Russell (2010), que introduz uma lavagem do material vegetal com um tampão contendo sorbitol.

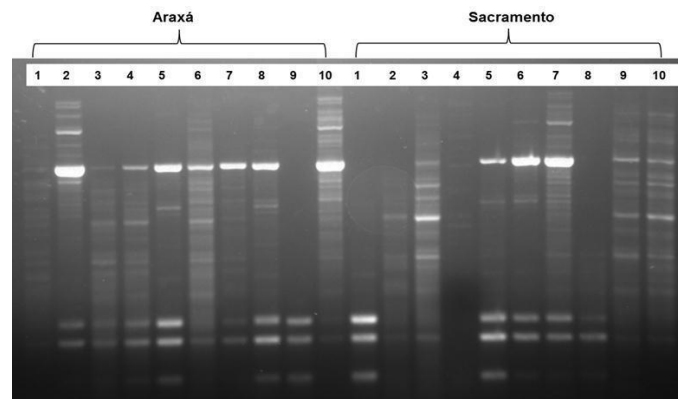
Esta contaminação não foi evidenciada nas extrações realizadas com plantas de *D. mollis* advindas de cultura de tecidos, pois este material é muito tenro e pode ser comparado a indivíduos juvenis. Portanto, neste caso o protocolo Doyle e Doyle foi eficiente na extração e amplificação de DNA, utilizando os primers do marcador molecular SCoT. Resultado semelhante foi relatado por Moreira e Oliveira (2011), comparando a extração de Doyle e Doyle em folhas jovens e velhas de *D. mollis*, em que o protocolo foi eficiente apenas nas folhas jovens, os quais foram advindos de indivíduos juvenis.

Os 36 primers descritos por Collard e Mackill (2009), foram utilizados para se evidenciar os melhores primers quanto à nitidez e o polimorfismo. Portanto, um total de 12 iniciadores SCoT (01, 11, 12, 14, 15, 17, 20, 22, 25, 28, 29 e 32) foram selecionados. Esta seleção levou em conta a quantidade de bandas amplificadas e a presença e ausência das mesmas nas diferentes amostras. Os doze primers escolhidos amplificaram de 5 a 39 bandas, por primer, com um total de 203 bandas amplificadas apresentando em média 94,58 % de polimorfismo. Os iniciadores 1, 12, 15, 17 e 29 exibiram 100% de polimorfismo (Tabela 5, Figura 13).

Tabela 5. Número de bandas e polimorfismo obtidos em cada primer com o marcador molecular SCoT em *Dimorphandra mollis*.

Primers	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficos	Polimorfismo (%)
1 CAACAATGGCTACCACCA	21	21	100
11 AGCAATGGCTACCACCA	5	4	80
12 CGACATGGCGACCAACG	16	16	100
14 CGACATGGCGACCAACGC	23	22	95
15 CGACATGGCGACCGCGA	19	19	100
17 CCATGGCTACCACCGAG	6	6	100
20 CCATGGCTACCACCGCG	20	19	95
22 ACCATGGCTACCACCGAC	11	10	90
25 CCATGGCTACCACCGGG	16	15	93
28 CATGGCTACCACCGCCA	39	36	92
29 CATGGCTACCACCGGCC	16	16	100
32 CATGGCTACCACCGCAC	11	10	90
Média	16,91	16,16	94,58
Total	203	194	-

Figura 13. Gel de agarose com o Primer SCoT 28, em *Dimorphandra mollis*



A similaridade genética variou de 0,18 a 0,65, sendo que os indivíduos geneticamente mais próximos foram ARA2 e ARA10 (0,65), ARA5 e ARA9 (0,64) e SAC5 e SAC6 (0,63). Os mais distantes foram ARA3 e ARA10 (0,18), apresentando uma média geral entre os indivíduos de 0,33. Sendo que a população de Araxá apresentou uma média de similaridade de 32% e a de Sacramento 30% (Tabela 6).

Os indivíduos selecionados neste trabalho se dividiram em dois grupos como pode ser visto no dendograma, obtido pelo cálculo de similaridade genética utilizando o índice de Jaccard (Figura 14) e no gráfico de dispersão de Análise em Coordenadas Principais (Figura 15).

O primeiro grupo denominado 1 é composto por onze indivíduos, sendo seis procedentes de Araxá (ARA3, ARA4, ARA5, ARA7, ARA8 e ARA9) e cinco de Sacramento (SAC1, SAC2, SAC5, SAC6 e SAC8), o segundo grupo denominado 2 é composto por nove indivíduos, sendo quatro advindos de Araxá (ARA1, ARA2, ARA6 e ARA10) e cinco de Sacramento (SAC3, SAC4, SAC7, SAC 9 e SAC10). Ambos os grupos apresentaram indivíduos de Araxá e Sacramento, apenas em proporções diferentes (Figuras 14 e 15).

A distância entre Araxá e Sacramento é de apenas 86 km, sendo a *D. mollis* uma espécie alógama facultativa (MENDES et al., 2013), apresentando flores hermafroditas polinizadas por pequenos insetos, proporcionando, portanto, um fluxo gênico suficiente para contrapor os efeitos de deriva genética. Sua dispersão é realizada por mamíferos (mastocoria) como, por exemplo, a Anta (*Tapirus terrestris*) um consumidor dos frutos e potencial dispersor das sementes. A maior diversidade genética está dentro das populações naturais e a endogamia entre elas é

insignificante. Portanto, a alta diversidade genética das populações naturais de *D. mollis* indica um potencial considerável para conservação e manejo da espécie (GONÇALVES et al., 2010).

Os acessos mantidos *in vitro* provenientes de Araxá e Sacramento apresentaram alta divergência genética, o que torna este material altamente promissor para futuros programas de melhoramento.

Tabela 6. Matriz de similaridade obtida pela distância genética de Jaccard entre 20 progênies de *Dimorphandra mollis*.

Códigos	ARA1	ARA2	ARA3	ARA4	ARA5	ARA6	ARA7	ARA8	ARA9	ARA10	SAC1	SAC2	SAC3	SAC4	SAC5	SAC6	SAC7	SAC8	SAC9	SAC10
ARA1	1,00																			
ARA2	0,49	1,00																		
ARA3	0,20	0,22	1,00																	
ARA4	0,24	0,28	0,53	1,00																
ARA5	0,30	0,47	0,37	0,45	1,00															
ARA6	0,49	0,48	0,30	0,39	0,41	1,00														
ARA7	0,22	0,21	0,54	0,44	0,32	0,33	1,00													
ARA8	0,33	0,39	0,39	0,48	0,60	0,44	0,40	1,00												
ARA9	0,32	0,45	0,43	0,47	0,64	0,48	0,35	0,55	1,00											
ARA10	0,45	0,65	0,18	0,30	0,45	0,43	0,20	0,36	0,41	1,00										
SAC1	0,30	0,31	0,44	0,57	0,47	0,41	0,39	0,51	0,54	0,32	1,00									
SAC2	0,19	0,29	0,46	0,39	0,44	0,27	0,30	0,44	0,47	0,26	0,44	1,00								
SAC3	0,43	0,54	0,27	0,37	0,42	0,47	0,26	0,43	0,45	0,50	0,49	0,30	1,00							
SAC4	0,43	0,43	0,22	0,30	0,33	0,43	0,22	0,29	0,30	0,42	0,31	0,21	0,44	1,00						
SAC5	0,30	0,34	0,36	0,44	0,48	0,40	0,34	0,48	0,53	0,34	0,54	0,42	0,50	0,27	1,00					
SAC6	0,35	0,42	0,38	0,44	0,49	0,41	0,32	0,48	0,53	0,38	0,57	0,42	0,51	0,34	0,63	1,00				
SAC7	0,43	0,48	0,26	0,30	0,34	0,39	0,19	0,30	0,33	0,49	0,32	0,25	0,50	0,42	0,34	0,37	1,00			
SAC8	0,22	0,25	0,43	0,36	0,39	0,29	0,27	0,39	0,44	0,24	0,51	0,45	0,33	0,21	0,40	0,47	0,21	1,00		
SAC9	0,43	0,44	0,22	0,22	0,32	0,37	0,23	0,39	0,31	0,40	0,31	0,28	0,44	0,37	0,31	0,31	0,33	0,29	1,00	
SAC10	0,45	0,58	0,21	0,29	0,38	0,41	0,22	0,34	0,38	0,55	0,34	0,30	0,58	0,41	0,42	0,44	0,49	0,26	0,42	1,00

Figura 14. Dendrograma obtido pela distância genética de Jaccard e pelo método de argumento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) em progênies de *Dimorphandra mollis*.

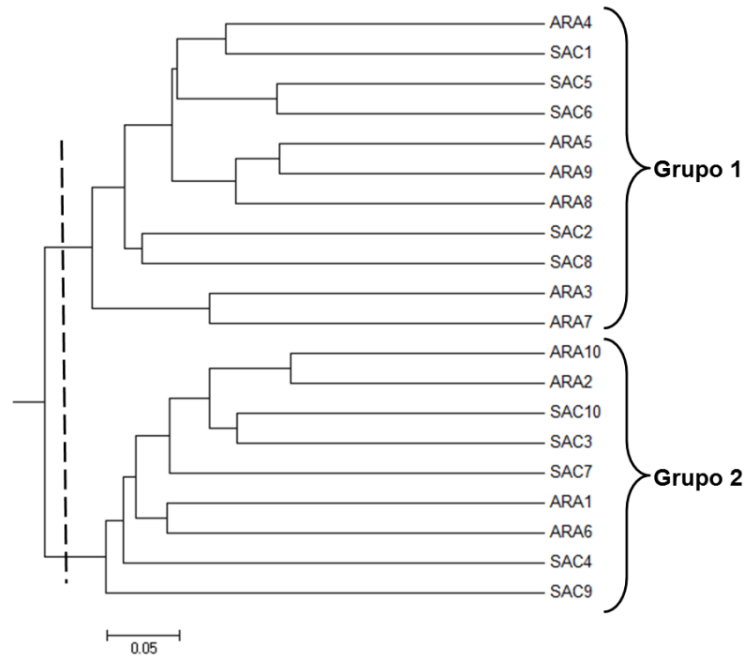
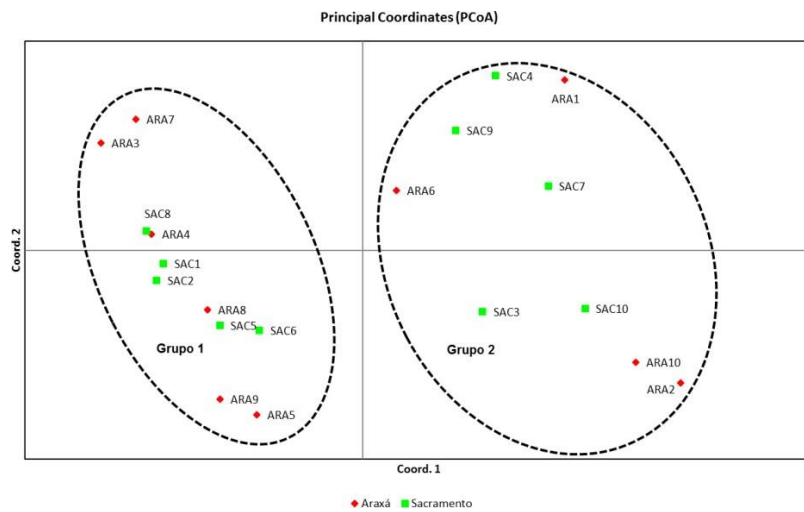


Figura 15. Gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (PCoA) em progênies de *Dimorphandra mollis*.



O método bayesiano utilizando o programa STRUCTURE (Figura 16), identificou os grupos gênicos presentes nas progênies advindas das populações naturais de *D. mollis*. A análise evidenciou a presença de dois grupos gênicos (K=2), em que os indivíduos não apenas compartilham grupos gênicos diferentes, mas proporções dos diferentes grupos em alguns indivíduos. A análise bayesiana não assume uma estrutura pré-definida, ela visa delinear grupos de indivíduos com base em seus genótipos, permitindo assim a estimativa mais provável do número de clusters. É uma quantificação de quão provável cada indivíduo pertence a cada grupo e identifica a presença de mistura de populações, ou seja, hibridizações (EVANNO 2005).

A identificação da ocorrência de hibridização em progênie é fundamental para a utilização do germoplasma, pois a manutenção da diversidade genética nas progênies é importante para o progresso de seleção, porque aumenta a chance de seleção a médio e longo prazo em programas de melhoramento (SILVA et al., 2015).

Em populações naturais a hibridização pode introduzir variações adaptativas em uma população e posteriormente pode ser empregada na domesticação para tirar vantagem do vigor híbrido (GOULET et al., 2017).

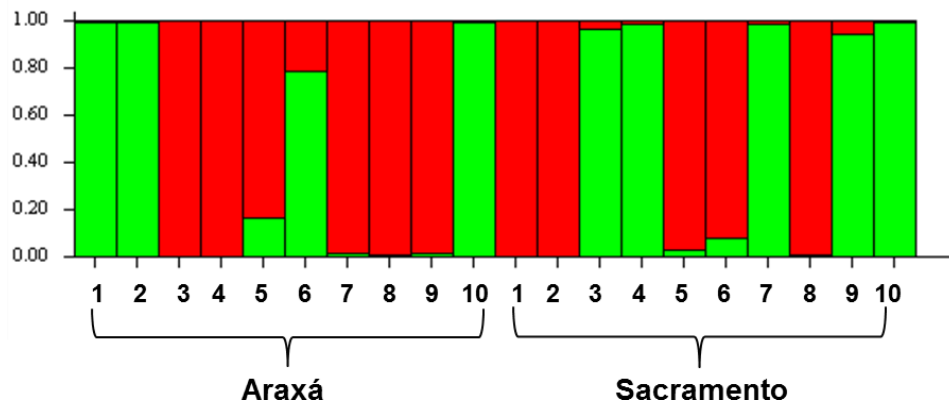


Figura 16. Grupos gênicos dos indivíduos de *Dimorphandra mollis* analisados através do programa STRUCTURE. A mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo gênico.

8 CONCLUSÃO

A utilização de cercobim e hipoclorito de cálcio são eficientes na descontaminação das sementes de *Dimorphandra mollis*, entretanto é necessário realizar uma escarificação das sementes para acelerar o processo de germinação *in vitro*. O regulador vegetal BAP, é o mais indicado para manutenção das plantas *in vitro*, no entanto as auxinas ANA e IBA nas concentrações utilizadas, não foram eficientes para indução de raízes *in vitro*. A porcentagem de enraizamento *ex vitro* e sobrevivência das plantas em condição de casa de vegetação foram abaixo de 13%, portanto esta etapa do protocolo de micropropagação precisa ser otimizada.

O marcador molecular SCoT foi eficiente na caracterização genética das progênes de *Dimorphandra mollis* em duas populações naturais. O material conservado *in vitro* apresentou alto índice de diversidade genética, com a formação de dois grupos gênicos. Portanto é um material promissor para ser utilizado em programas de melhoramento genético.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASHA, S.; SONI, G.; KARUNA, S.; NAMITA, G.; ANIL, K. G. R. K. Genetic diversity in Indian poppy (*P. somniferum L.*) germplasm using multivariate and SCoT marker analysis. **Industrial Crops & Products**, vol. 144, p. 8, 2020.

ABU-ROMAN, S. M.; KHALDOUN, A. H.; ABDULLAH, R. A. Kinetin is the most effective cytokinin on shoot multiplication from cucumber. **Journal of Agricultural Science**, vol. 7, n. 10, p. 159, 2015.

AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas. **Embrapa Melhoramento de plantas**, vol. 3, p. 108, 2018.

AZZI, D. C.; OLIVEIRA, B. C.; JANEGITZ, V. G.; BONIFÁCIO, O. F.; FILHO, C. H. M. J. Determinação de rutina em formulações f Melhoramento de plantas farmacêuticas utilizando um sistema de análise por infecção em fluxo envolvendo multicomutação. **Eclética Química Journal**, vol. 41, p. 32-42, 2016.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUFI, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUEI, V.; GOMES, E. P.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, p.234-248, 2018.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavónoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimento Nutricional**, vol. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BERNARDI, W. F.; RODRIGUES, B. I.; NETO, P. C.; AKIHIKO, A.; TULMANN-NETO, A.; CERAVOLO, L. C.; MONTES, S. M. N. M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maça em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo de

mudas produzidas. **Revistas Brasileira**, vol. 26, n. 3, p. 503-506, 2004.

BEZERRA, G. A.; GABRIEL, A. V. M. D.; MARIANO, E. D.; CARDOSO, J. C. *In vitro* culture and greenhouse acclimatization of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) with microorganisms isolated from its roots. **Ornamental Horticulture**, vol. 25, n. 4, p. 407-416, 2019.

BIONDO, R.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; SOARES, A. M.; FRANÇA, S. C.; PERREIRA, A. M. S. Micropropagation seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) WOODSON. **Sci. Agricultura**, vol. 64, n. 3, p. 263-268, 2007.

CAMPOS, A. S.; MELO, P. B. S.; MAGALHÃES, C. H. C.; CARVALHO, B. A. C. P. Micropropagação de antúrio rubi estiolamento e regeneração de brotações. **Embrapa Agroindústria Tropical**, vol. 1, n. 1, p. 1-23, 2019.

CAMPOS, V. C. A.; BRITO, A. L.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, vol. 43, n. 4, p. 1-6, 2013.

CANESIN, A.; MARTINS, J. M. D. T.; SCALON, S. P. Q.; MASETTO, T. E. Bioestimulante no vigor de sementes de plântulas de feijão (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Cerne Lavras**, vol. 18, n. 2, p. 309-315, 2012.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. Noções de cultivo de tecidos vegetais. **Embrapa Algodão**, vol. 116, n.1, p. 1-39, 2003.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. **Embrapa – informação Tecnológica**, vol. 1, n. 1, p. 15-49, 2010.

COLLARD, B. C.Y.; MACKILL, D. J. Star targeted (Scot) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene targeted markers in plants. **Plant Mol. Rep.**, vol. 27, n. 86, p. 86-93, 2009.

COSTA, C. H. M.; DIARIS, K. B.; GUIMARÃES, T. M.; Métodos de escarificação para superação de dormência de sementes de jatobá. **Rev. C. E. F.**, vol, 30, n. 1, p. 1-9, 2017.

COTA, C. G.; SILVA, M. S. A.; MARTINS, E. R.; FERNANDES, L. A.; MAGALHÃES, J. R.; BRITO, T. R. Atributos do solo, crescimento inicial e teor de flavonoides em mudas de fava - d anta sob níveis de saturação por bases. **Revista de Ciências Agrárias**, vol. 42, n. 1, p. 226-236, 2019.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; SHAOHUA, C.; BOHYUN, B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, vol. 12, n. 1. P. 13-15, 1990.

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

ETMINAN, A.; POUR-ABOUGHADAREH, A.; MOHAMMADI, R.; AHMADI-RAD, A.; AFSANEH, N.; MAHDAVIAN, Z. Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. **Journal Biotechnology & Biochnological Equipment**, vol. 30, n. 6, p. 1075-1081, 2016.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, vol. 567, n. 2, p. 2611-2620, 2005.

FENG, S.; REFENG, H.; YANG, C. Start codon targeted (SCoT) and target region amplication polymorphism (TRAP) for evaluting the genetic relationship of *Dendrobium* species. **Revista Gene**, vol. 567, n. 2, p. 182-188, 2015.

FERREIRA, D. F.; MARCELINO, S. D. R.; IEMMA, A. F. SISVAR (Sistema para análise de variância de dados balanceados), **Lavras: UFLA**, vol.4, n. 3, p. 1-10, 2003.

FERREIRA, R. A.; BOTELHO, S. A.; DAVID, A. C.; MALAVASI, M. M. Morfologia de

frutos, sementes, plântulas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth., faveira (Leguminose-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 24, n. 3, p. 303-309, 2001.

FILIZOLA, B. C. Boas práticas de manejo para extrativismo sustentável da fava danta. **Embrapa**, vol. 2, n.1, p. 1-76, 2013.

FREITAS, V. L. O.; ALVES, T. H. S.; LOPES, R. M. F.; FILHO, J. P. L. Biometria de frutos, sementes e germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth., e *Dimorphandra wilson* (Fabaceae – Caesalpinioideae). **Sciencia Forestalis**, vol. 37, n. 81, p. 27-35, 2009.

GONÇALVES, A. C.; VIEIRA, F. A.; REIS, C. A. F.; CARVALHO, D. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth., (Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, vol. 34, n. 1, p. 95-101, 2010.

GOULET, B. E.; RODA, F.; HOPKINS, R. Hybridization in plants: Old ideas new techniques. *Plant Physiology*, vol. 173, n. 8, p. 65-78, 2017.

HERMANSEN, L. A.; DURYEY, M. W.S.; WHITE, T.; MALAVASI, M. Pretreatments to overcome seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. **Seed Sci technol**, vol. 28, n. 3, p. 581-595, 2000.

HUDED, A. K.; HUDED, A. K. C.; JINGADE, P.; BYCHAPPA, M.; MISHRA, M. K. Genetic diversity and population structure analysis of coffee (*Coffea canéfora*) germplasm collections in Indian gene bank employing SRAP and SCoT markers. **International Journal of Fruit Science**, vol.52, n. 10, p. 1-29, 2020.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. Aspectos práticas da micropropagação de plantas. **Embrapa**, vol. 23, n. 2, p. 407, 2013.

KAVAND, S.; KERMANI, M. J.; HAGHNASARI, A.; KHOSRAVI, P.; AZIMI, M. R. Micropropagation and médium term conservation of *Rosa pulverulenta*. **Acta Scientiarum**

Agronomy, vol. 33, n. 2, p. 297-301, 2011.

LANDIM, L. P.; COSTA, J. G. M. *Gardneriana Tulasne* (fava danta) uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção. **Revista da Biologia**, vol. 9, n. 1, p. 1-20, 2012.

LUO, C.; XIN, H.; YING, H. Oligo-dT anchored Cdna-SCoT: a novel differential display method for analyzing differential gene expression in response to several stress treatments in mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Gene*, vol. 548, n. 2, p. 182-189, 2014.

MACEDO, C. E. C. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Bras. Frutic**, vol. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

MACÊDO, I. S. V.; CUNHA, K. G.; ALVES, A. T. V.; MARTINS, R. M.; SIMÕES, M. O. S. Atividade antioxidante da rutina. **Bio farmacêutica**, vol. 13, n. 1, p. 1-4, 2017.

MANSETTO, T. E.; SCALON, S. P. Q.; REZENDE, R. K. S.; OBA, G. C.; GAMBATTI, M. V. S. Germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth: Efeito de salinidade e condicionamento osmótica. **Revista Brasileira de Biociências**, vol. 12, n. 3, p. 122-178, 2014.

MENDES, A. D. R.; LACERDA, T. H. S. Reguladores vegetais e substratos no enraizamento de estacas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 16, n. 2, p. 262-270, 2014.

MENDES, A. D. R.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Estudo do sistema de reprodução da fava danta (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 15, n. 4, p. 607-608, 2013.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T. Micropropagação e aclimatização de *Ocimum selloi* Benth, uma planta medicinal. *Hortic. bras.*, v. 28, n. 2, p. 215-223, 2010.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira**, vol. 14, n. 2, p. 110-121, 2012.

MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extractet from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the cerrado region of Brasil. **Genetics and Molecular Research**, vol. 10, n. 1, p. 353-358, 2011.

MUTHURAJ, K.; KAFFOOR, H. A.; NAGARAJAH, N. Establishment of *in vitro* protocol and impact of mycorrhization with phosphobacteria on micro propagated *Pogostemon mollis* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Taibah University for Science**, vol. 12, n. 1, p. 1-10, 2018.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenam var, cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, vol. 33, n.3, p. 481-490, 2009.

OLIVEIRA, T. G.; SOUZA, P. S. P.; BERTONI, B. W.; FRANCA, S. C.; PERREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* (Mart.). **Ciência Rural**, vol. 41, n. 10, p. 1712-1718, 2011.

OLIVEIRA, R. S.; SILVA, J. H. O.; VIANA, J. B. V.; ARAUJO, R. B. Seleção de primers ISSR para caracterização molecular de acessos de *Dimorphandra mollis* Benth (Fabaceae), **Embrapa**, vol. 15, n. 3, p. 1-4, 2016.

PACHECO, M.V. Dormência de sementes e produção de mudas de *Dimorphandra mollis* Benth. **Rev. Ciência Florestal**, vol. 21, n. 4, p. 689-697, 2011.

PADILLA, I. M. G.; CARMONA, E.; WESTENDORP, N.; ENCINA, C. L. Micropropagation and effects of mycorrhiza and soil bactéria on aclimatization na development of lucumo (*Pouteria lucuma* r. and pav.) var. la molina. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, vol. 42, n. 8, p. 193-196, 2006.

PASHANEZHAD, M. Z.; SHAHBAZI, E. Genetic variation of *Eruca sativa* L. genotypes. **Journal Industrial crops and products**, vol. 145, n. 5, p. 111-992, 2019.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Gena1EX 6.5: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, vol. 28, n. 7, p. 2537-2539, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Gena1EX 6.5: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, vol. 6, n. 4, p. 288-295, 2006.

PEREIRA, A. G.; CRUZ, E. D.; BARROS, H. S. D. Methods for overcoming dormancy in *Stryphnodendron pulcherrimum* seeds. **Pesq. Flor. Bras.**, vol. 36, n. 87, p. 195-199, 2016.

PEREIRA, J. V.; SANTANA, D. G.; LOBO, G. A.; BRANDÃO, N. A. L. Eficiência dos tratamentos para a superação ou quebra de dormência de sementes de Fabaceae. **Rev. Ciências Agrárias**, vol. 37, n. 2, p. 195-199, 2014.

POCZAI, P. V. I.; BELL, N.; HYVONEM, J. Genomics meets biodiversity: Advances in molecular Genomics Meets Biodiversity: Advances in Molecular Marker Development and Their Applications in Plant Genetic Diversity Assessment. **The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity**, vol. 7, n. 5, p. 1-30, 2012.

PORFÍRIO, K.de P.; TITON, Miranda.; TITON, Miranda.; CASTRO, A. C. M.; PEREIRA, I. M.; KNEGT, R. A. P. Multiplicação in vitro de *Xylopiá aromática* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP e concentrações de BAP. **Pesq. Flor. Bras**, vol. 39, p. 1-7, 2019.

PRATIK, S. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. **Meta Gene**, vol. 3, N. 2, p. 62-70, 2015.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, vol. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

REGO, M. M. Micropropagação de *Psidium spp.* Ciências Agrárias, vol. 2, n. 1, p. 1-160, 2015.

RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; RUPP, B.; BARFUSS, M. H. J. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus polystachya (*Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae*): Evidence from plastid DNA sequence data Taxon. **Journal Article**, vol. 59, n.5, p. 389- 404, 2010.

SABOORI, S.; ZAHRA N.; MASOUD, S.; MARASHI, S. SCoT molecular markers and genetic fingerprinting of date palm (*Phoenix dactylifera L.*). **Revista cultivars**, vol. n. 82, n. 2, p. 67-73, 2019.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, vol. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SILVA, T. A.; BELIZÁRIO, CANTAGALLI, L.; SAAVEDRA, J.; LOPES, A. D.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. DE F. P. DA S., Scapim, C. A. Population structure and genetic diversity of razilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 18, n. 5, p.181–187, 2015.

SILVA, C. C. P.; JESUS, E. V.; JESUS, E. V.; LEMOS, J. P.; CARVALHO, A. J. E.; SOUZA, G. A. R. Micropropagação *in vitro* do tomate (*Lycopersicon Esculentum L.*) utilizando gema apical. **Embrapa Fitotecnia e Produção de mudas**, p. 1-7, 2019.

SINGH, C. R. Review on problems and its remedy in plant tissue culture. **Asian Journal of Biological Sciences**, vol. 11, n. 2, p. 165-172, 2018.

SMITH, R.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolate shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, vol. 57, p. 562-569, 1970.

SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A. M. S. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina K. Schum.*), uma planta medicinal do Cerrado. **Rev. Bras. Plantas Med.** vol. 13, n. 3, p. 1-9, 2011.

SOUZA, A. V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A. M.

S. MICROPROPAGAÇÃO DE *Dioscorea multiflora* Grised. **Ciência e Agrotecnologia**, vol. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

SOUZA, H. A. V.; MULLER, L. A. C.; BRANDÃO, R. L.; LOVATO, M. B. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. **Genetics and Molecular Research**, vol. 11, n. 1, p. 756-764, 2012.

SOUZA, H. A. V.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilson* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 38, n. 1, p. 49-56, 2010.

SOUZA, K. A.; BOTINI, N.; ANTONIAZZI, C. A.; CHAVES, C. F.; ANEZ, R. B. Estudo etnobotânico do falso barbatimão *Dimorphandra mollis* Benth. **Rev. Bras. Plants. Med.**, vol. 18, n. 1, p. 186-190, 2015.

SOUZA, M. F. M., E. R.; FERNANDES, L. A.; NERE, P. S. Emergência e desenvolvimento inicial de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. **Rev. Bras. Plantas Med**, vol. 18, n. 1, p. 186- 190, 2016.

SOUZA, R.; RODRIGUES, E. C. A. M. S. Plantas medicinais: indicação de raizeiros para o tratamento de feridas. **Rev. Bras. em Promoção da Saúde**, vol. 29, n. 2, p. 198-203, 2019.

SUDRÉ, C. P. Recursos genéticos de fava-d'anta: caracterização morfológica e molecular, e conservação *in vitro* de acessos coletados em diferentes regiões brasileiras. **Embrapa**, vol. 1, n. 1, p. 113, 2009.

TOMAZELLE, L. C. Y. Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil paba e avobenzona: Caracterização físico-química funcional e eficácia clínica. **Rev. Bras. Plantas Med**, vol. 20, n. 2, p. 1-110, 2017.

URSULINO, M. M.; ALVES, E. U.; RIBEIRO, T. de S. Superação de dormência e vigor em

sementes de Fava-d_Anta (*Dimorphandra gardneriana* Tulasne), **Ci. Fl. Santa Maria**, vol. 29, n. 1, p. 105-115, 2019.

YADAV, K. AGGARWAL, A. SINGH, N. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induced Acclimatization and Growth Enhancement of *Glycyrrhiza glabra* L.: A Potential Medicinal Plant. **Agricultura Res**, vol. 2, n. 1, p. 43–47, 2013.

YONG, F. C.; HONG, L. J. Germplasm genetic diversity of *Myrica rubra* in Zhejiang Province studied using inter-primer binding site and start codon-targeted polymorphism markers. **Revista Scientia Horticulturae**, vol. 170. p. 169-175. 2015.

ZHANG, J.; PERREIRA, L.; CARVALHO, A.; LOPES, P. M.; MARTÍN, A., BRITO, J. E. L. Potential of Start Codon Targeted (SCoT) markers for DNA fingerprinting of newly synthesized tritordeums and their respective parents. **Journal of Applied Genetics**, vol. 55, p. 307-312, 2015.