

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES NÍVEIS DE SACAROSE NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE *Paubrasilia echinata* LAM GERMINADAS *in vitro*

Autores: Thalya Campelo Vitor¹, Mayla Bessa Scotá, Aline dos Santos Bergamin¹, Loren Cristina Vasconcelos¹, Claudete Santa-Catarina², Milene Miranda Praça Fontes¹, Elias Terra Werner¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil.

thalyavitor26@gmail.com, mayla_scotta@hotmail.com, alinebergamin258@hotmail.com, loren-vasconcelos@hotmail.com, mlenenemiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

² Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ, Brazil, claudete@uenf.br.

Resumo

Paubrasilia echinata, conhecida popularmente como pau-brasil, é uma espécie arbórea nativa e ameaçada de extinção, cuja propagação e conservação podem ser favorecidas por técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV). O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de diferentes concentrações de sacarose (0,10, 20, 30, 40 e 50 g L⁻¹) no desenvolvimento inicial de plântulas de *P. echinata* germinadas *in vitro*. A maior altura média da parte aérea foi observada no tratamento sem sacarose (73,89 mm), seguido pelas concentrações de 20 g L⁻¹ (69,15 mm) e 10 g L⁻¹ (65,15 mm). O desenvolvimento radicular manteve-se estável entre 0 e 40 g L⁻¹, enquanto a concentração de 50 g L⁻¹ resultou na menor média de comprimento de raiz (6,72 cm). O peso fresco das plântulas não apresentou variações relevantes entre os tratamentos. Portanto, concentrações reduzidas de sacarose favorecem o crescimento aéreo e radicular de *P. echinata*, enquanto doses elevadas comprometem o desenvolvimento das raízes. Esses achados contribuem para otimizar protocolos de propagação *in vitro* da espécie pau-brasil, que atualmente, requer atenção em virtude da sua ameaça de extinção.

Palavras-chave: cultura de tecidos. conservação. mata atlântica. pau brasil.

Área do Conhecimento: Ciências biológicas, Fisiologia.

Introdução

Paubrasilia echinata Lam (pau-brasil) é uma espécie arbórea nativa do Brasil, endêmica da Mata Atlântica e ameaçada de extinção devido à exploração intensa pela indústria têxtil no passado e, atualmente, pelo uso na luteria (Kika gusmão, 2023). Além disso, suas sementes são recalcitrantes, conforme descrito por Campos (2019), e a espécie geralmente floresce uma vez ao ano em seu habitat natural (Oliveira *et al.*, 2019). Diante dessas limitações, é fundamental o desenvolvimento e a aplicação de protocolos eficazes para a coleta e propagação da espécie, visando à sua conservação e recuperação.

Neste contexto, a cultura de tecidos vegetais (CTV) destoa-se como uma abordagem biotecnológica promissora para a propagação de plantas a partir de pequenos explantes cultivados em condições controladas livre de patógenos (Kumar, 2022; Cardoso, 2014). Trata-se de uma técnica eficiente para a produção em larga escala de plantas, permitindo sua multiplicação em grande quantidade, com menor demanda de espaço e tempo, além de permitir o armazenamento de germoplasma por períodos prolongados (Klíma *et al.*, 2019; Bhojwani, 2013), tudo então, dependerá da técnica abordada e sua eficácia com a espécie em estudo.

Entre os componentes do meio de cultura, a sacarose destaca-se como a principal fonte de carbono em culturas celulares de plantas, devido à presença de transportadores e enzimas específicas que facilitam sua assimilação pelas células vegetais (Chein *et al.*, 2015). Sua elevada solubilidade em água, neutralidade elétrica e ausência de efeitos inibitórios sobre processos bioquímicos essenciais

também contribuem para sua eficácia no suporte ao crescimento dos explantes em condições *in vitro* (Gamborg; Phillips, 1995). Tais propriedades se refletem na prática conforme demonstrado por Lemes *et al.* (2017), que verificaram melhores resultados no desenvolvimento de amoreira-preta micropropagada com 20 g L⁻¹ de sacarose em biorreatores de imersão temporária. Além disso, a sacarose exerce influência sobre o potencial osmótico do meio de cultura (Chen; Dribnenki, 2004). O uso de agentes osmóticos como a sacarose, sorbitol e manitol reduz o potencial hídrico do meio, limitando a disponibilidade de água e, consequentemente, restringindo a absorção de nutrientes e a atividade metabólica das células (Huang *et al.*, 2014).

Essa dupla função torna a sacarose um componente fundamental para o controle do crescimento e desenvolvimento das plântulas em condições *in vitro*, afetando diretamente a morfofisiológico das plântulas cultivadas *in vitro*, bem como dos explantes.

No entanto, a quantidade ideal de carboidratos a ser utilizada nos meios de cultura pode variar significativamente entre diferentes espécies, o que torna necessário o desenvolvimento de protocolos específicos e adaptados a cada uma delas (Yaseen *et al.*, 2013). No caso específico de *P. echinata*, são escassas as publicações científicas relacionadas ao cultivo *in vitro* da espécie, e inexistem registros que abordem os efeitos de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura associados a sua germinação *in vitro* e estabelecimento inicial das plântulas. Essa lacuna na literatura evidencia a necessidade e a relevância do desenvolvimento de estudos voltados à otimização de protocolos para propagação *in vitro* da espécie.

Considerando a escassez de estudos sobre o cultivo *in vitro* de *P. echinata* e a ausência de protocolos que avaliem o efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação e estabelecimento inicial de plântulas, este trabalho teve como objetivo investigar a germinação *in vitro* de sementes de *P. echinata* sob distintas concentrações de sacarose. Além disso, buscou-se otimizar o protocolo para o desenvolvimento inicial das plântulas, com foco na obtenção de indivíduos aptos a servir como doadores de explantes em futuras pesquisas de micropropagação *in vitro*.

Metodologia

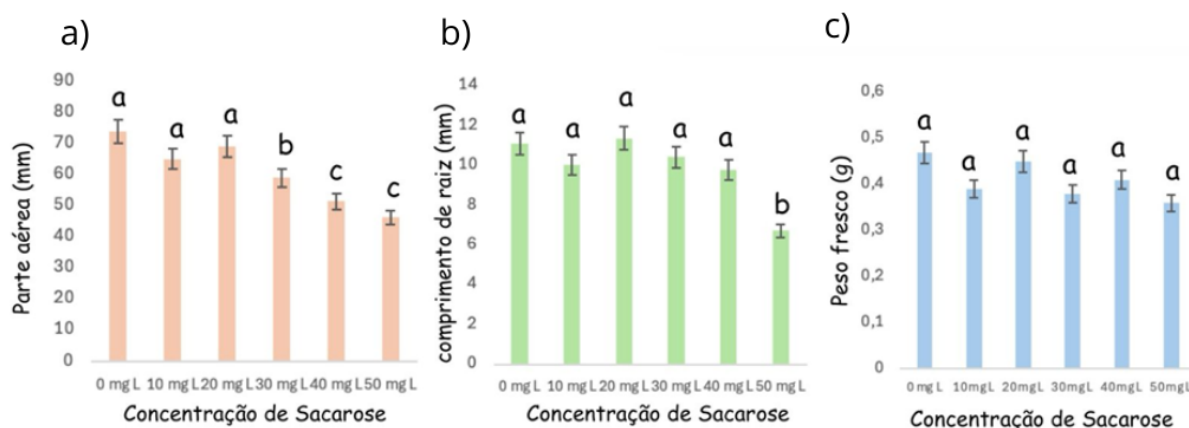
O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus de Alegre, com o objetivo de avaliar o efeito da sacarose no estabelecimento inicial de plântulas de *Paubrasilia echinata* germinadas *in vitro*. Bagas contendo sementes foram coletadas oito semanas após a floração e desinfestadas em câmara de fluxo laminar, por meio de lavagem com água corrente e detergente neutro, enxágue com água comum, imersão em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e posterior tratamento com solução de hipoclorito de sódio (2,5%) contendo 0,5 g L⁻¹ de Captan® por 60 minutos. Em seguida, realizaram-se cinco enxágues com água de osmose autoclavada. As sementes foram extraídas com utensílios esterilizados e inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) (4,4 g L⁻¹), suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 e 50,0 g L⁻¹). O meio foi solidificado com 7,5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos (concentrações de sacarose) com 30 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio contendo uma plântula (30 plantas por tratamento). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de 80 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20W, Osram®) e duas fitas LED Grow Light (comprimentos de onda 665 e 450 nm). Após 60 dias de incubação, foram avaliados o comprimento da parte aérea e da raiz principal (mm), utilizando paquímetro digital, e o peso fresco das plântulas, com balança analítica.

A análise estatística foi conduzida no software RStudio (versão 2024.12.1-563). Inicialmente, verificou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Para os dados quantitativos, realizou-se análise de regressão polinomial em função das concentrações de sacarose. Quando não foi possível ajuste significativo, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados

A análise de variância (ANOVA) revelou diferença estatística significativa entre as plântulas de *P. echinata* germinadas sob diferentes concentrações de sacarose (Fig. 1).

Figura 1 - Médias de altura da parte aérea, comprimento da raiz e peso fresco de plântulas de *P. echinata*, obtidas a partir de sementes coletadas 8 semanas após a floração e cultivadas por 60 dias em meio de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose



Fonte: elaborado pela própria autora (2025). Legenda: Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Para a variável de comprimento da parte aérea (Fig. 1a) ($p < 4.1302e-08$) e de raiz (Fig. 1a) ($p < 2.086e-05$) o efeito foi significativo em função das diferentes concentrações de sacarose, exceto para a variável de peso fresco (Fig. 1b) ($p < 0.052584$). Observou-se que a concentração de 0 mg L⁻¹ de sacarose proporcionou a maior altura média da parte aérea (73,89 mm), sendo estatisticamente igual a concentração de 10 mg L⁻¹ (65,15 mm) e 20 mg L⁻¹ (69,15 mm). O comprimento da raiz entre os tratamentos com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30, 40 e 50 g L⁻¹) apresentaram valores estatisticamente iguais, indicando que essas concentrações não interferiram negativamente no desenvolvimento radicular.

Por outro lado, o tratamento com 50 mg L⁻¹ de sacarose resultou no menor comprimento de raiz (6,72 cm) e foi estatisticamente inferior aos demais. Em relação ao peso fresco das plantas, apesar das variações numéricas, os valores entre os tratamentos foram estatisticamente iguais, não havendo diferença significativa.

A germinação *in vitro* de *P. echinata* apresentou variações significativas conforme a concentração de sacarose utilizada. As plântulas cultivadas sem sacarose ou em baixas concentrações (Fig. 2) exibiram maior desenvolvimento, com estruturas bem formadas, enquanto concentrações mais elevadas como a de 40 e 50 mg L⁻¹ resultaram em crescimento reduzido, folhas menores e raízes pouco desenvolvidas, indicando possível estresse osmótico (Figura 2).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 2. Aspecto morfológicos das plântulas de *P. echinata* germinadas *in vitro* após 60 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com 0, 10, 20, 30, 40 e 50 g·L⁻¹ de sacarose. Barra ao lado da última plântula representa escala de 1 cm.



Fonte: elaborado pela própria autora (2025).

Discussão

A sacarose é amplamente utilizada como fonte de carbono nos meios de cultura *in vitro*, desempenhando papel fundamental como substrato energético e regulador osmótico durante o desenvolvimento das plântulas (Thorpe *et al.*, 2008). No entanto, sua eficácia está diretamente relacionada à concentração utilizada, visto que concentrações excessivas podem reduzir o potencial hídrico do meio, restringindo a absorção de água e nutrientes pelas células (Huang *et al.*, 2014; Chen; Dribnenki, 2004), o que pode acarretar um desenvolvimento inadequado das plântulas, assim como visto nesse experimento em condições mais elevadas de sacarose quando adicionadas ao meio.

Além disso, a quantidade ideal de carboidratos a ser adicionada ao meio de cultura pode variar significativamente entre diferentes espécies, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos específicos e ajustados às exigências fisiológicas de cada planta (Yassen *et al.*, 2013). Tal variabilidade reforça a importância da experimentação com diferentes concentrações, uma vez que o excesso pode induzir estresse osmótico, afetando negativamente a morfogênese e o desenvolvimento de estruturas como brotações, raízes e folhas (Pepe, 2022).

Espécies da família Fabaceae apresentaram respostas contrastantes à presença de sacarose no meio de cultivo. Em *Amburana cearensis*, por exemplo, observou-se que concentrações elevadas de sacarose reduziram o número de brotações e a massa seca, além de acelerarem a senescência foliar (Alvim *et al.*, 2020). Também foi relatado no estudo de Souza *et al.* (2020) que altas concentrações de sacarose podem impactar negativamente o crescimento, embora a dose ideal varie entre espécie. Ambos os estudos corroboram com os achados na germinação *in vitro* da espécie em questão, *P. echinata*.

Dessa forma, observa-se que, embora a sacarose seja indispensável ao crescimento *in vitro*, sua concentração deve ser cuidadosamente ajustada, pois pode atuar como fator limitante ao

desenvolvimento vegetal quando aplicada em excesso. É importante destacar que a qualidade morfofisiológica dessas plântulas influencia diretamente o sucesso dos protocolos subsequentes de multiplicação *in vitro*. Plântulas vigorosas, com sistema radicular bem formado e folhas funcionalmente ativas, tendem a gerar explantes mais responsivos, com maior capacidade de regeneração e menor incidência de oxidação ou necrose durante o cultivo.

Conclusão

A concentração de sacarose no meio de cultura influenciou significativamente o desenvolvimento morfofisiológico das plântulas de *P. echinata*. As melhores respostas foram observadas nas concentrações de 0, 10 e 20 g/L, que proporcionaram maior comprimento da parte aérea e estruturas bem formadas. Em contrapartida, concentrações elevadas (40 e 50 g/L) reduziram o crescimento e induziram sinais de estresse osmótico.

Portanto, concentrações mais baixas de sacarose são recomendadas para o estabelecimento *in vitro* da espécie, contribuindo para protocolos mais eficientes de propagação e conservação de *P. echinata*.

Referências

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer, 2013. p. 245-274.

CAMPOS, P. F. *Estudo da expressão gênica em células-tronco de Paubrasília echinata sob diferentes condições de cultivo in vitro*. 2023. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 32, p. 383-384, 2014.

CHEN, L.-Q. et al. Transporte de açúcares. *Annual Review of Biochemistry*, [S. l.], v. 84, p. 865-894, 2015. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033904.

CHEN, Y.; DRIBNENKI, P. A. Effect of medium osmotic potential on callus induction and shoot regeneration in flax anther culture. *Plant Cell Reports*, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 272-276, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0831-x>. Acesso em: 26 maio 2025.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Requisitos nutricionais de culturas em suspensão de células de raiz de soja. *Experimental Cell Research*, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968. DOI: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.

GUSMÃO, K. *Pau Brazil, an endangered species from Brazil - Global Tree Initiative*. [S. l.], [2025?]. Disponível em: <https://plantgrowsave.org/pau-brazil-an-endangered-species-from-brazil/>. Acesso em: 23 maio 2025.

HUANG, H.-P. et al. Preservação de germoplasma *in vitro* de *Polygonum multiflorum* Thunb. *Revista Pharmacognosy*, [S. l.], v. 10, p. 179-184, 2014. DOI: 10.4103/0973-1296.131032. Acesso em: 23 maio 2025.

KLÍMA, P. et al. Plant cell lines in cell morphogenesis research: from phenotyping to -omics. In: OPATRŇ, Z. (org.). *Plant cell morphogenesis: methods and protocols*. [S. l.]: Springer, 2019. p. 367-376.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

KUMAR, M. et al. Métodos e fatores que influenciam a eficiência da propagação in vitro de tuberosa ornamental (*Polianthes*): uma revisão sistemática de desenvolvimentos recentes e perspectivas futuras. *Horticulturae*, [S. l.], v. 8, p. 998, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8110998>. Acesso em: 26 maio 2025.

LEMES, R. S. et al. Sucrose concentration and volume of liquid medium on the in vitro growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, [S. l.], v. 60, p. e17160149, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160149>. Acesso em: 26 maio 2025.

OLIVEIRA, W. et al. Flowering and fruiting synchronization, pollen number, floral visitors and reproductive success of *Paubrasilia echinata* (brazilwood; Leguminosae) in tropical urban ecosystem in comparison to Atlantic forest remnant: a dataset description. *Urban Forestry & Urban Greening*, [S. l.], v. 40, p. 1-7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2019.04.020>. Acesso em: 23 maio 2025.

SOUZA, L. M. de et al. Influência da sacarose no crescimento e no perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas cultivadas in vitro. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 2933-2943, jan. 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/6090>. Acesso em: 12 ago. 2025.

THORPE, T. A. et al. The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. (eds.). *Plant propagation by tissue culture*. 3. ed. [S. l.]: Springer, 2008. p. 115-173.

YASEEN, M. et al. Revisão: papel das fontes de carbono para o crescimento e desenvolvimento de plantas in vitro. *Molecular Biology Reports*, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), por meio da concessão de bolsa e do financiamento (T.O. nº 860/2023).