



RESEARCH ARTICLE

Protocol for *in vitro* germination and micropropagation of *Himatanthus Sucuuba* (Spruce ex Müll. arg.) Woodson

Protocolo para germinação e micropropagação *in vitro* de *Himatanthus Sucuuba* (Spruce ex Müll. arg.) Woodson

Lyanna Hellen Sáenz-Ramírez^{1,2*} ; Angela Maria Imakawa¹ ; Jorge Manuel Revilla-Chávez² 
Noé Ramírez-Flores² ; Paulo De Tarso Barbosa-Sampaio³ 

¹ Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas, Av. Darcy Vargas 1200, Manaus, Brasil.

² Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP, Dirección Regional de Ucayali, Carretera Federico Basadre km 12.400, Yarinacocha, Perú.

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Avenida André Araújo 2936, Manaus, Brasil.

* Corresponding author: Isaenz@iiap.gob.pe (L. H. Sáenz-Ramírez).

Received: 19 December 2024. Accepted: 18 May 2025. Published: 3 June 2025.

Abstract

Himatanthus sucuuba is important in folk medicine and is widely used as an antitumor, antifungal, vermifuge and anti-anemic agent¹. In this context, the objective of this study was to develop a protocol for *in vitro* germination and micropropagation of *H. sucuuba*. The seeds were immersed in a 1.0% (v/v) Cabrio Top solution for one hour on a magnetic stirrer and then in a 0.1% (v/v) diluted NaOCl solution for 30 minutes under agitation, followed by immersion in 70% alcohol for 1 minute. Subsequently, the seeds were rinsed four times with sterile distilled water and then inoculated in MS medium supplemented with the auxins AIA, ANA and AIB at concentrations of 0.0; 1.0; 3.0; 5.0 mg L⁻¹. The experimental design was completely randomized, using 10 treatments with 3 replicates of 10 seeds (n = 30). It was observed that the MS medium supplemented with IAA (5.0 mg L⁻¹) resulted in 80% germination and seedlings with 5.97 cm in height and 4.2 nodal segments. To stimulate rooting, the nodal segments were cut and inoculated in MS medium supplemented with BAP (0.1 mg L⁻¹) and in interaction with the auxins IAA, 2,4-D and ANA, at concentrations of 0.0; 3.0; 5.0 and 8.0 mg L⁻¹ and kept in a growth room at 25 ± 2 °C, with a photoperiod of 16 h. The combination BAP+IAA (0.1 + 8.0 mg L⁻¹) showed the best results with 100% sprouting, 40% callus formation and 30% rooting. In conclusion, *in vitro* propagation is a promising technique to produce *H. sucuuba* seedlings, however, hormonal adjustments are necessary.

Keywords: Tissue culture; growth regulators; *in vitro* rooting; medicinal species; *sucuuba*.

Resumo

Himatanthus sucuuba possui importância na medicina popular e é amplamente utilizada como antitumoral, antifúngica, vermífuga e anti-anêmica. Nesse contexto, objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolo de germinação e micropropagação *in vitro* de *H. sucuuba*. As sementes foram imersas em solução de Cabrio Top 1,0% (v/v) por uma hora em agitador magnético e depois em solução de NaOCl diluída a 0,1% (v/v) durante 30 minutos sob agitação, seguido de imersão em álcool 70% por 1 minuto, posteriormente as sementes foram enxaguadas quatro vezes com água destilada estéril, depois foram inoculadas em meio MS suplementados com as auxinas AIA, ANA e AIB, nas concentrações de 0,0; 1,0; 3,0; 5,0 mg L⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 10 tratamentos com 3 repetições de 10 sementes (n=30). Foi observado que o meio MS suplementado com AIA (5,0 mg L⁻¹) resultou em 80% de germinação e plântulas com 5,97 cm de altura e 4,2 segmentos nodais. Para estimular o enraizamento, os segmentos nodais foram cortados e inoculados em meio MS acrescido de BAP (0,1 mg L⁻¹) e em interação com as auxinas AIA, 2,4-D e ANA, nas concentrações de 0,0; 3,0; 5,0 e 8,0 mg L⁻¹ e, mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h. A combinação BAP+AIA (0,1 + 8,0 mg L⁻¹) apresentou os melhores resultados com 30% de enraizamento, 100% de brotações e 40% de formação de calos. Em conclusão, a propagação *in vitro* é uma técnica promissora para produção de mudas *in vitro* de *H. succuba*.

Palabras clave: Cultura de tecidos; reguladores de crescimento; enraizamento *in vitro*; espécie medicinal; *sucuuba*.

DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2025.032>

Cite this article:

Sáenz-Ramírez, L. H., Imakawa, A. M., Revilla-Chávez, J. M., Ramírez-Flores, N., & Barbosa-Sampaio, P. de T. (2025). Protocolo para germinação e micropropagação *in vitro* de *Himatanthus Sucuuba* (Spruce ex Müll. arg.) Woodson. *Scientia Agropecuaria*, 16(3), 417-426.

1. Introdução

Himatanthus sucuuba (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson é uma espécie de grande interesse devido ao valor fitoterápico atribuído ao látex que possui metabólitos secundários principalmente de estrutura flavonoide que podem estar relacionados a efeitos curativos no câncer de cólon (Herrera-Calderón et al., 2021). Os fitoquímicos também são usados atualmente na medicina moderna como moléculas principais para desenvolver novas classes de medicamentos para o tratamento de doenças humanas (Patel, 2022, 2023), o que torna uma espécie com potencial para estudos de bioprospecção (Magalhães et al., 2019). No entanto, existe uma carência de protocolos de micropropagação de espécies medicinais (Oliveira et al., 2013). Alguns aspectos do seu sistema de produção *in vitro* ainda não estão bem definidos, dificultando o fornecimento de estoques de plantas de qualidade para atender às necessidades farmacêuticas e de conservação (Nilanthi & Yang, 2014).

A propagação *in vitro* visa à produção de mudas com qualidade fitossanitária em curto espaço de tempo e cultivadas em área física reduzida, garantindo um material vegetal de qualidade superior, além da propagação clonal, o qual a torna uma ferramenta poderosa para os programas de melhoramento florestal (Junghans & Souza, 2013). A cultura de tecidos oferece uma grande vantagem onde diferentes materiais são propagados e preservados. Portanto, a propagação *in vitro* é um método valioso porque oferece um meio de resolver os problemas de geração de grande número de mudas homogêneas, sendo necessário estudar diferentes fatores que afetam a produção (Abd Elaziem et al., 2022). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para a micropropagação de *H. sucuuba*, a partir de segmentos de brotos nodais obtidos de plantas germinadas *in vitro*. Os segmentos nodais foram enraizados e aclimatados.

2. Metodologia

Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. As sementes utilizadas nos experimentos estavam armazenadas em sacos plásticos em câmara fria a 10 °C por 14 meses e foram procedentes de árvores localizadas no Ramal do Brasileiro, Manaus, Amazonas (2°95'99" S, 59°86'20" W).

Coleta do material

Para todos os tratamentos foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado a 6,0 antes de ser levado para autoclave a 121 °C por 20 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C com 16 h de fotoperíodo e intensidade luminosa de 2,0x10⁷ µE cm⁻² s⁻² fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Concepção experimental

O primeiro experimento foi avaliar a germinação das sementes usando diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições de 10 sementes cada uma com arranjo fatorial de 3A x 4B, sendo o fator A, os tipos de auxinas, com três níveis: 1) AIA, 2) ANA e 3) AIB, e fator B, com quatro concentrações: 0,0; 1,0; 3,0; 5,0 mg/L, conforme descrito na Tabela 1. Os fatores e seus níveis foram analisadas com polinômios ortogonais com a finalidade de observar o enraizamento e as concentrações de auxinas.

Tabela 1

Tratamentos (T) com diferentes tipos de reguladores de crescimento e concentrações de AIA, ANA e AIB

Tratamento	Reguladores de crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)
T1	AIA	0,0
T2	AIA	1,0
T3	AIA	3,0
T4	AIA	5,0
T5	ANA	0,0
T6	ANA	1,0
T7	ANA	3,0
T8	ANA	5,0
T9	AIB	0,0
T10	AIB	1,0
T11	AIB	3,0
T12	AIB	5,0

Após cinco meses, as plântulas que se desenvolveram foram utilizadas como fonte de explantes estéreis. O meio de cultura utilizado foi MS (Murashige & Skoog), suplementado com 0,1 mg/L BAP em combinação com diferentes tipos de auxinas: 1) AIA, 2) 2,4-D e 3) ANA, nas concentrações de 3,0; 5,0 e 8,0 mg/L e uma testemunha (Tabela 2). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 3A x 3B, sendo o fator A, os tipos de auxinas, com três níveis: 1) AIA, 2) 2,4-D e 3) ANA, nas concentrações de 3,0; 5,0 e 8,0 mg/L com duas repetições de 10 segmentos nodais para cada tratamento.

O terceiro experimento consistiu em um comparativo da capacidade de sobrevivência de plântulas obtidas *in vitro* de *H. sucuuba* utilizando dois tipos de substratos: 1) Terra vegetal e 2) Vermiculita, avaliados aos 30, 60 e 90 dias; a comparação foi efetuada através do teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Tabela 2

Tratamentos (T) em meio de cultivo MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de BAP em interação com AIA, 2,4-D e ANA nas concentrações de 3,0; 5,0 e 8,0 mg/L

Tratamento	Reguladores de crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)	Número de explantes
T1	Testemunha	0,0	20
T2	BAP+AIA	(0,1 + 3,0)	20
T3	BAP+AIA	(0,1 + 5,0)	20
T4	BAP+AIA	(0,1 + 8,0)	20
T5	BAP+2,4-D	(0,1 + 3,0)	20
T6	BAP+2,4-D	(0,1 + 5,0)	20
T7	BAP+2,4-D	(0,1 + 8,0)	20
T8	BAP+ANA	(0,1 + 3,0)	20
T9	BAP+ANA	(0,1 + 5,0)	20
T10	BAP+ANA	(0,1 + 8,0)	20

Instalação dos experimentos

Experimento 1: Germinação

As sementes foram lavadas com cinco gotas de detergente ODD® neutro, seguido de outros dois enxágues em água corrente. Depois foram submetidas à desinfestação por imersão em solução Cabrio Top (Piraclostrobina) 1,0% (v/v) por uma hora em agitador magnético. A seguir em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação por imersão em solução de NaOCl diluída a 0,1% (v/v) durante 30 minutos sob agitação, seguido de imersão em álcool 70% por 1 minuto. Ao final do processo, as sementes foram enxaguadas quatro vezes com água destilada autoclavada (Souza, 2017).

Após a desinfestação das sementes, estas foram colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS acrescidos de 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar-ágar com pH ajustado para 6,0 e suplementados com as auxinas AIA, ANA e AIB.

Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de $2,0 \times 10^7 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-2}$, provenientes de lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W), a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com $60 \pm 5\%$ de umidade relativa. Aos 60 dias foi avaliada a porcentagem de germinação.

Experimento 2: Enraizamento *in vitro* dos segmentos nodais

Segmentos nodais obtidos de plântulas da germinação *in vitro* (3 meses) foram cortados a 1,5 cm e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio de cultivo MS suplementado com concentrações fixas de BAP a 0,1 mg/L, conforme Souza (2017), em combinação com AIA, 2,4-D e ANA. Após 90 dias foram avaliados porcentagem de enraizamento, porcentagem de calo, porcentagem de brotações e altura do broto (cm).

Experimento 3: Acimatação das plântulas originadas do cultivo *in vitro*

Para a aclimação foram utilizadas 40 plântulas transplantadas em dois tipos de substratos: T1 - terra vegetal (terriço + terra compostada + palha de arroz) e T2 - vermiculita, sendo cada tratamento composto por duas repetições de dez plântulas. Os substratos foram autoclavados por 20 minutos a $120 \text{ }^\circ\text{C}$. As plântulas com raízes obtidas da propagação *in vitro*, foram lavadas duas vezes com água destilada até se retirar totalmente os resíduos de meio de cultura, depois foram transplantadas nos substratos em bandejas de polietileno com células individuais de 34 x 21 x 6 cm (comprimento, largura e altura).

Após o transplante para as bandejas, as plântulas foram individualmente cobertas com frascos de vidro transparente por 15 dias e permaneceram no viveiro com tela de sombreamento 70% por 30 dias. Posteriormente, por mais 60 dias consecutivos foram aclimatados com tela de sombreamento 50%. Na Figura 1 observa-se todo o processo de germinação até a obtenção de plântulas aclimatadas. As plantas foram molhadas diariamente por sistema de aspersão. Ao final do experimento foram avaliadas a taxa de sobrevivência, altura (cm), diâmetro do caule (mm) e o desenvolvimento das raízes.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade com o teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Levene. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; assim as concentrações de cada fator foram analisadas com polinômios ortogonais. Quando os dados não atendiam aos pressupostos de normalidade, foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis e as médias comparadas com o teste de Rank. As análises estatísticas foram realizadas através do programa SISVAR.

3. Resultados e discussão

Experimento 1: Germinação

Foram analisadas diferentes concentrações de reguladores de crescimento na germinação *in vitro* de *H. sucuuba*, sendo que pela ANOVA, diferença altamente significativa é observada entre os tratamentos ($p < 0,0001$). Os tratamentos de ANA e AIB apresentaram baixa germinação, tardia e não uniforme a partir de 30 dias com 10,5% e 13,0% respectivamente, em comparação com o AIA que iniciou aos 16 dias, promovendo a melhor taxa de

germinação com 80,2%. A nível das concentrações de: 1,0; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹, em ambos tipos de hormônios, foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,05$). Sendo que o melhor resultado foi obtido no tratamento T2: AIA 1,0 mg L⁻¹ com 80,2% de germinação, seguido de T4: AIA 5,0 mg/L e de T3: AIA 3,0 mg/L, com 77,7% e 67,1%, respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 3).

As técnicas de germinação *in vitro* são ferramentas valiosas, pois permitem gerar explantes assépticos com a vantagem de oferecer mudas confiáveis, principalmente para espécies com alta incidência de patógenos (Merkle et al., 2023). Além disso, a escolha do meio de cultura adequado também é essencial porque diferentes concentrações de sais podem influenciar positiva ou negativamente o processo de germinação das sementes, enquanto a adição de agentes enriquecedores e reguladores de crescimento pode ser necessária para o sucesso da germinação (Miranda et al., 2018). Nesse sentido, neste estudo encontramos taxas de germinação de até 79,4% após 16 dias, usando AIA, valor semelhante obtido por Souza (2017) na germinação de sementes após 45 dias de inoculação em meio MS sem adição de hormônios. Para outras espécies da família Apocynaceae, Cordeiro et al. (2014) obteve 61% de germinação em sementes de *Mandevilla moricandiana*, após 3 meses de cultivo em meio MS sem adição de hormônios, sendo que as plântulas desenvolveram

a parte aérea, mas as raízes não se formaram. Ferreira et al. (2006) verificou que a germinação de sementes de *H. succuba* em condições naturais, ocorreu em um período de 15 dias, o que se assemelha ao resultado obtido neste estudo da germinação *in vitro* para a espécie.

Na Figura 2 pode observar-se a resposta da germinação a diferentes concentrações hormonais. No entanto, a aplicação de maiores concentrações de AIA na germinação de sementes de *H. succuba* apresenta efeito positivo (Figura 2A); sob este modelo encontramos um valor preditivo crítico máximo de 7,25 mg/L de IAA, com o qual seria alcançada até 99,7% de germinação de sementes. Ao contrário, tanto os hormônios ANA quanto AIB tiveram efeitos negativos na germinação de *H. succuba*, a partir da aplicação da primeira dose, e diminuíram à medida que as concentrações aumentaram (Figuras 2B e 2C). Desta maneira pode-se corroborar a importância da adição de reguladores de crescimento no meio MS para a germinação e o posterior desenvolvimento das plântulas.

Experimento 2: Enraizamento *in vitro* dos segmentos nodais

As médias alcançadas pelas combinações de ambas as auxinas e seus níveis de aplicação ao longo de três meses de cultivo são mostradas na Figura 3. Esses tratamentos não mostraram diferença significativa ($p = 0,2249$) no teste de Kruskal- Wallis.

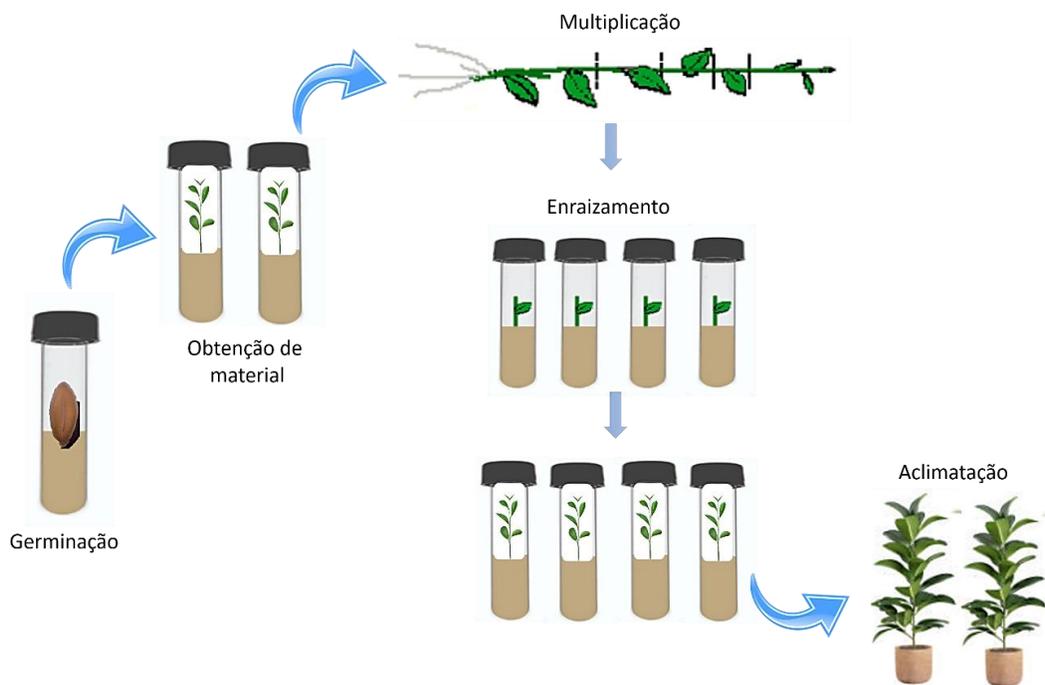


Figura 1. Processo de germinação, multiplicação, enraizamento e aclimação *in vitro* de *Himatanthus succuba*.

Tabela 3

Efeito de diferentes concentrações de AIA, ANA e AIB na germinação média de sementes por tratamento aos 60 dias de inoculação em meio MS

Tratamentos	Hormônios	Concentração (mg/L)	Germinação (%)	Intervalo de confiança (95%)
T1	AIA	0	39,5 bcde	±10,00
T2	AIA	1	80,2 a	±13,33
T3	AIA	3	67,1 abc	±3,33
T4	AIA	5	77,7 ab	±8,82
T5	ANA	0	50,4 abcd	±5,77
T6	ANA	1	16,6 de	±3,33
T7	ANA	3	11,7 e	±1,67
T8	ANA	5	10,5 e	±0,67
T9	AIB	0	43,4 abcde	±3,33
T10	AIB	1	13,0 de	±3,33
T11	AIB	3	26,4 cde	±3,33
T12	AIB	5	19,7 de	±0,67

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

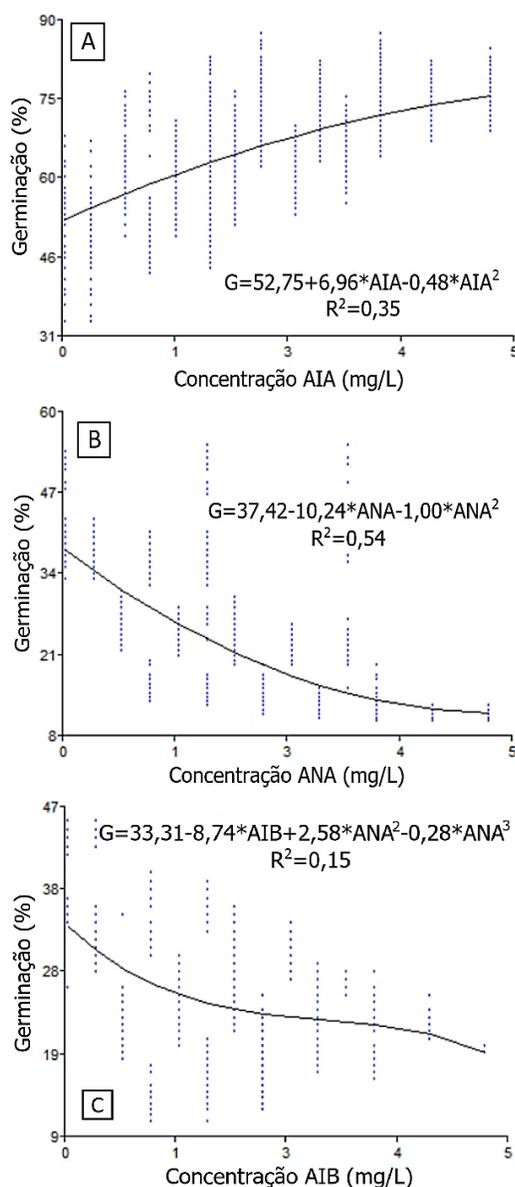


Figura 2. Modelos matemáticos representativos que expressam a resposta da germinação de *H. sucuuba*, segundo as concentrações em mg/L, Ácido Indol Acético - AIA (A); ANA (B) e AIB (C).

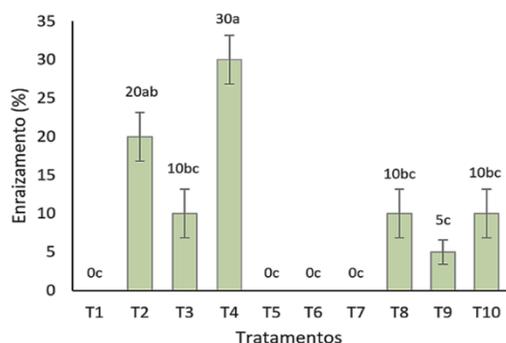


Figura 3. Porcentagem de enraizamento nos segmentos nodais de *H. sucuuba* após 3 meses de cultivo em meio MS suplementado com BAP em interação com AIA, 2,4-D e ANA.

Em relação ao enraizamento dos segmentos nodais, foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos hormonais. Porém foi alcançado até 30% de enraizamento em 75 dias com o AIA. Esse resultado é semelhante ao observado por Souza (2017), que constatou germinação de 10,33% e 20% após 45 dias utilizando AIA em estudos com *H. sucuuba*, ambos considerados muito baixos. O que pode ser atribuído à necessidade de um balanço citocinina/auxina adequado para o enraizamento e desenvolvimento de mudas cultivadas *in vitro* (Santos et al., 2022). Neste estudo os resultados demonstram e confirmam a essencialidade da interação de reguladores de crescimento para a eficiência no enraizamento de segmentos nodais. Esse fato possivelmente está relacionado à ocorrência de compostos fenólicos, sendo comum na iniciação de culturas lenhosas, mesmo quando se empregam tecidos muito jovens como plântulas geradas por germinação *in vitro* (Lemos et al., 2019), que podem estar ligadas a processos de regulação do crescimento, especialmente às auxinas, que dependendo da concentração endógena no tecido induzem a síntese desses compostos. Este comportamento pode ser atribuído ao balanço hormonal entre as concentrações utilizadas de

auxina e citocinina que poderiam ter favorecido a calogênese, interferindo diretamente no desenvolvimento de brotos da parte aérea (Ai et al., 2024). Por outro lado, a formação de calos e brotações dos segmentos nodais (Figura 4A) entre os tratamentos mostram diferenças significativas ($p = 0,0436$ e $p = 0,0401$, respectivamente) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Os melhores resultados na produção de calos foram obtidos da interação BAP + 2,4-D em concentrações de 0,5 e 0,8 mg L⁻¹, com 100% de calos (Figura 4), seguido da auxina ANA em todas as concentrações (0,3, 0,5 e 0,8 mg L⁻¹) alcançando entre 90% e 95% de produção de calos, além de apresentar rizogênese (Figura 4C). Observou-se, ainda, que a interação favoreceu a formação de calos com diferenças na pigmentação e a presença de calos friáveis (Figura 4B), nos segmentos nodais. Formação de calos nos explantes, seja este do tipo segmento nodal ou ápice caulinar, é muito comum em espécies lenhosas (Soares et al., 2007). Nesse sentido, pode-se inferir que as respostas obtidas no presente estudo corroboram os trabalhos realizados por Oliveira et al. (2016a) com a espécie *Hancornia speciosa* Gomes, ao afirmarem que a combinação de BAP + ANA utilizadas em segmentos nodais, fomenta a elevada formação de calos. Verma et al. (2012) constataram que, a interação de BAP + ANA (0,5 + 1,0 mg L⁻¹) promoveu 59% de calos em explantes foliares de *Catharanthus roseus*. Além disso, Gang et al. (2023) demonstraram que o crescimento e desenvolvimento dos explantes são controlados pela composição do meio de cultura e adição dos reguladores de crescimento. Além disso o requisito ideal de concentração de nutrientes difere entre as espécies. No presente estudo, a combinação da auxina e citocinina atendeu de maneira ideal a

formação de calos de segmentos nodais de *H. succuba*, e este comportamento pode ser atribuído ao balanço hormonal entre as concentrações utilizadas de auxina e citocinina que poderiam ter favorecido a calogênese, interferindo diretamente no desenvolvimento de brotos e da parte aérea (Figura 5).

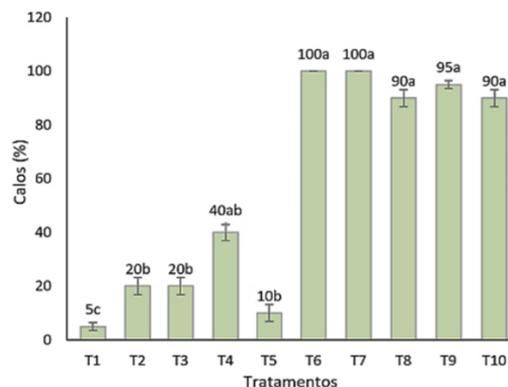


Figura 5. Porcentagem de calos desenvolvidos em segmentos nodais de *H. succuba* após 3 meses de cultivo em meio MS suplementado com BAP em interação com AIA, 2,4-D e ANA. Médias consecutivas de uma mesma letra não diferem entre si com base no teste Ranks, a 5%.

Os tratamentos que responderam com a maior formação de brotações, foram T1: BAP + AIA (0,1 + 3,0 mg L⁻¹) e T3: BAP + AIA (0,1 + 8,0 mg L⁻¹), em ambos apresentando 100% de brotações, seguido de T3: BAP + AIA (0,1 + 5,0 mg L⁻¹) com 85%, e o controle com 76,6%, que parecem semelhantes ($p = 0,05$). Enquanto a interação de BAP + 2,4-D em todos os tratamentos obteve-se 0% de brotações, devido ao fato dos segmentos nodais formarem 100% de calos (Figura 6). A interação BAP + ANA resultou em baixa porcentagem de brotações, além de apresentar rizogênese.

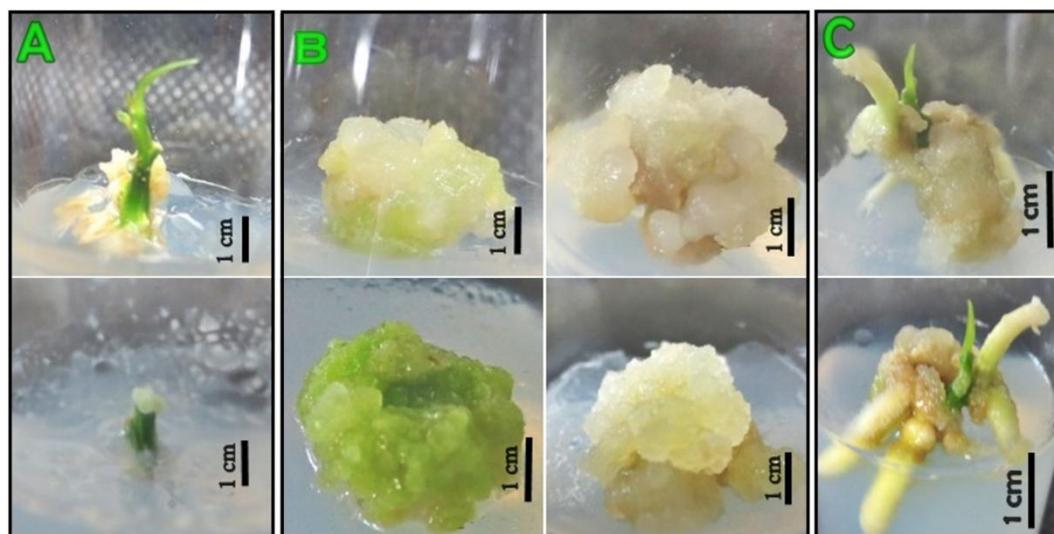


Figura 4. Aspecto dos calos desenvolvidos a partir de segmentos nodais de *H. succuba*, inoculados em meio MS, com BAP 0,1 mg L⁻¹ suplementado com 2,4-D após 3 meses de cultivo. A) BAP + AIA, B) BAP + 2,4-D, C) BAP + ANA.

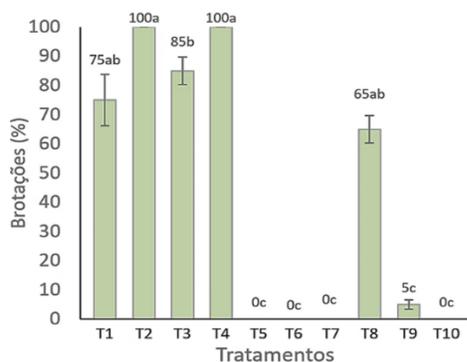


Figura 6. Formação de brotos de *H. succuba* a partir de segmentos nodais, cultivados em meio MS, com BAP 0,1 mg L⁻¹ suplementado com 2,4-D após 3 meses de cultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Ranks, ao 5%.

Singh et al. (2011) constataram que a interação de BAP + AIA (1,5 + 1,0 mg L⁻¹) promoveu 86% de brotações. Entretanto, neste mesmo experimento foram obtidos baixos índices de brotações na interação de BAP + ANA. Resultados similares foram encontrados por Oliveira et al. (2016b) que, ao estudarem o efeito conjugado de BAP e ANA em explantes de *Hancornia speciosa*, verificaram que a interação promoveu o baixo índice de brotações nos explantes. Além disso, essas brotações não se desenvolveram satisfatoriamente. De acordo com Gang et al. (2023), a adequação do BAP no meio de cultivo favoreceu na formação ou proliferação de brotações. Entretanto Komakech et al. (2020) afirmam que as citocininas são hormônios vegetais responsáveis pela formação dos brotos e pela proliferação dos brotos axilares, bem como pelo alongamento e que vários tecidos vegetais requerem uma citocinina específica para a morfogênese, fato que não aconteceu com *H. succuba*.

Entretanto, quanto ao desenvolvimento da altura do broto os tratamentos não mostraram diferenças significativas ($p = 0,0695$) na prova de Kruskal-Wallis; no entanto, obteve-se com a utilização de T4: BAP + AIA (0,1 + 8,0 mg L⁻¹), que apresentou 1,25 cm de altura (Figura 7).

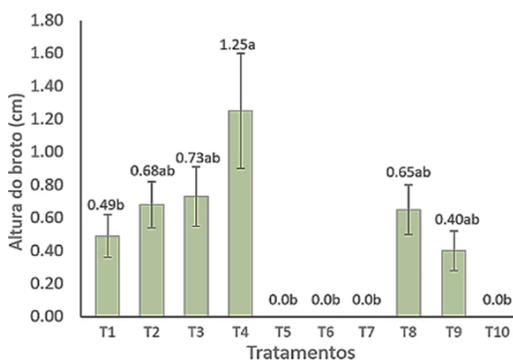


Figura 7. Crescimento de *H. succuba* a partir de segmentos nodais, inoculados em meio MS, com BAP 0,1 mg L⁻¹ suplementado com 2,4-D após 3 meses de cultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Ranks, ao 5%.

Experimento 3: Acimação das plantas micropropagadas

Os resultados das plântulas enraizadas *in vitro*, foram analisados estatisticamente com teste de t Student, e revelou que houve diferença significativa ($p = 0,0475$) entre os substratos avaliados, quanto à porcentagem de sobrevivência após 30, 60 e 90 dias do transplante. O substrato de vermiculita proporcionou o maior percentual de sobrevivência (85%), porém houve diferença significativa somente no primeiro mês. Se verificou que o menor percentual de sobrevivência ocorreu no substrato terra vegetal (68%). Além disso, pode-se verificar uma queda da sobrevivência de plantas aclimatadas de 85% para 60% nos 60 dias de aclimação e manteve-se até os 90 dias. Verificou-se que o processo de aclimação das plantas enraizadas foi gradual e constante. A proteção das plântulas com tela de sombreamento de 70% nos primeiros 30 dias foi eficiente, visto que permitiu abrandar as condições iniciais críticas de luminosidade e temperatura para a aclimação. Enquanto a tela de sombreamento de 50% nos seguintes 60 dias permitiu diminuir gradualmente a umidade aumentando gradualmente a intensidade da luz. Deste modo, pode-se aferir que estas grandes diferenças de índices de sobrevivência ocorreram devido ao tipo de sombreamento e substrato utilizado, sendo que T1: vermiculita, permitiu a retenção de mais água, devido à sua estrutura e granulidade, e T2: terra vegetal, favoreceu a fase fotoquímica. Portanto, durante o processo de aclimação, a qualidade espectral da luz e o tipo de substrato podem afetar significativamente o crescimento, desenvolvimento e morfogênese dos órgãos vegetativos desta espécie. Além disso, como observado em outros estudos, esses fatores afetam sobremaneira a expansão foliar, apresentando alto grau de plasticidade anatômica e fisiológica nas plantas durante a aclimação (Braga et al., 2011).

O modelo que representa o comportamento de sobrevivência de acordo com o passar dos dias é visto na Figura 8, onde com o passar do tempo a capacidade de sobrevivência diminuiu em ambos os substratos. Porém, as mudas de *H. succuba* apresentam melhor aclimação com vermiculita, o que proporcionou melhor sobrevivência, após 90 dias de aclimação, pois as mudas não se desenvolveram vigorosamente, quando comparadas ao solo vegetal, que proporcionou mais recursos nutricionais.

Em relação ao crescimento em altura e diâmetro das plantas de *H. succuba*, ajustou-se um modelo quadrático, e observou-se comportamentos diferentes nos dois tratamentos. Quanto ao crescimento em altura após 60 e 90 dias, o substrato terra vegetal proporcionou o maior

crescimento (8,41 cm), e verificou-se que o menor crescimento (6,87 cm) ocorreu na vermiculita, após 90 dias de aclimação (Figura 9A).

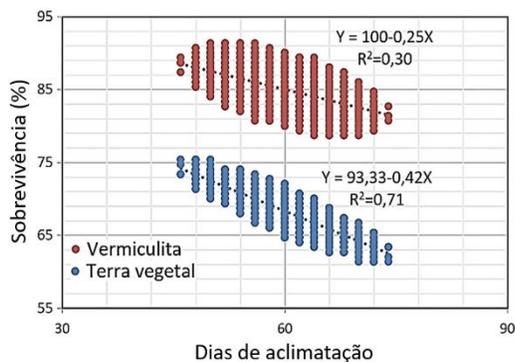


Figura 8. Sobrevivência de plântulas de *H. sucuba* em dois tipos de substratos (terra vegetal e vermiculita), após 30, 60 e 90 dias de aclimação em viveiro.

Nessa mesma figura, pode-se verificar que o crescimento em diâmetro foi maior na terra vegetal em todos os períodos avaliados. Foi possível observar também o desenvolvimento das raízes em cada um dos tratamentos, constatando-se melhor desenvolvimento na terra vegetal (Figura 9B). Ainda não existem trabalhos realizados na fase de aclimação *ex vitro* de plantas de *H. sucuba*, motivo pelo qual não ser possível avaliar comparativamente.

A utilização da terra vegetal como substrato foi favorável ao crescimento vegetativo em altura e diâmetro das plântulas aclimatadas de *H. sucuba*. No entanto, **Alvino & Rayol (2007)** mencionam que o substrato deve proporcionar adequado equilíbrio de umidade, aeração, consistência, nutrientes, e ausência de patógenos para o bom desenvolvimento da muda. Além o aumento da percolação e do escoamento superficial podem causar estresse hídrico e lentidão no crescimento das plantas. **Komakech et al. (2020)** constataram em plântulas provenientes do cultivo *in vitro* de *Prunus africana* com raízes bem desenvolvidas semeadas em substrato de solo hortícola estéril e mantidos em casa de vegetação

alta taxa de sobrevivência após dois meses de crescimento. Diversos estudos reportam que o sucesso da fase de aclimação está diretamente relacionado a plântulas que apresentam raízes bem desenvolvidas *in vitro* (**Boato Da Silva et al., 2008; Sungkumlong & Deb, 2009**) o qual foi comprovado com a espécie *H. sucuba*. Desta forma pode-se observar o processo de obtenção de plantas novas desde sementes e terminando com a multiplicação ou clonagem de plantas de interesse medicinal (Figura 10).

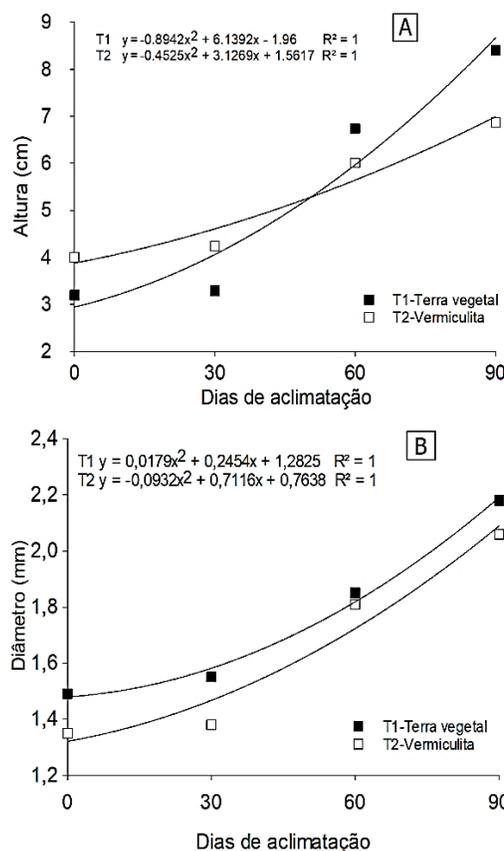


Figura 9. Crescimento em altura (A) e diâmetro (B) das plantas de *H. sucuba* avaliadas aos 30, 60 e 90 dias de idade, durante as etapas de aclimação em viveiro em função dos tratamentos terra vegetal e vermiculita.

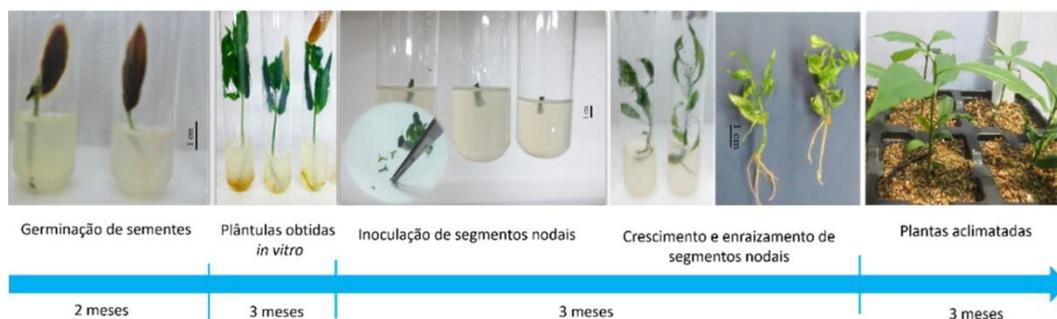


Figura 10. Etapas da obtenção de plantas *in vitro* de *Himatanthus sucuba*.

4. Conclusões

Em nossa pesquisa testamos três tipos de auxinas (AIA, ANA e 2,4-D) que poderiam influenciar na germinação, enraizamento e posterior aclimação em dois substratos de *H. succuba*, pois esses eventos são fundamentais para antecipar seu potencial de desenvolvimento na propagação *in vitro*. A aplicação de AIA teve efeito positivo na germinação, atingindo taxa de germinação de 80,2%, na concentração de 1,0 mg/L. Pelo contrário, ANA e AIB apresentam efeitos negativos, pois reduzem significativamente a taxa de germinação à medida que aumenta a concentração aplicada.

O modelo preditivo sugere que uma concentração de 7,25 mg/L de IAA poderia atingir uma taxa de germinação de 99,7%, nesse sentido o hormônio IAA superou significativamente na promoção da germinação. Dentre as diferentes combinações de hormônios testadas, a interação BAP + IAA (0,1 + 8,0 mg L⁻¹) induziu ou melhor enraizamento de dois segmentos nodais de *H. succuba*. Por outro lado, embora não tenha havido diferenças significativas na altura dos brotos, o tratamento com BAP e IAA (0,1 + 8,0 mg/L) produziu brotos com crescimento de 1,25 cm. Por fim, a melhor aclimação das plantas micropropagadas no viveiro foi alcançada no substrato vermiculita com 85% de sobrevivência no primeiro mês, mas esta taxa diminuiu para 60% após 90 dias. O substrato solo superficial favoreceu maior crescimento em altura e diâmetro das plantas em comparação à vermiculita, destacando a importância dos elementos nutricionais fornecidos pelo solo, assim como estimulou o desenvolvimento radicular. Por fim, o protocolo se mostrou eficiente para a germinação e propagação *in vitro* de *Himatanthus succuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson.

Agradecimento

Los autores agradecem a Organización dos Estados Americanos (OEA) e ao CNPq, pelas bolsas de pesquisa e apoio logístico que possibilitou o trabalho de campo e de laboratório.

Contribuições do autor

L. H. Sáenz-Ramírez: Escritura – borrador original; **J. M. Revilla-Chávez:** Investigación, visualización; **A. M. Imakawa:** Validación, supervisión; **N. Ramírez-Flores:** Curación de datos, análisis formal; **P. T. Barbosa-Sampaio:** Metodología, Recursos.

ORCID

L. H. Sáenz-Ramírez  <https://orcid.org/0000-0002-6597-3626>

J. M. Revilla-Chávez  <https://orcid.org/0000-0001-5978-5146>

A. M. Imakawa  <https://orcid.org/0000-0002-5655-5625>

N. Ramírez-Flores  <https://orcid.org/0000-0002-6683-728X>

P. T. Barbosa-Sampaio  <https://orcid.org/0000-0003-0254-7651>

Referências bibliográficas

- Abd Elaziem, T. M., Ahmed, M. E. salato A. E. naby, & Abou El-Dis, G. R. (2022). *In vitro* propagation for conservation of the rare date palm (*Phoenix dactylifera* L.) "Amri" using immature inflorescence. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 58(6), 1048–1056. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10296-3>
- Ai, Y., Chen, Y., Zhu, S., Jiang, L., Chen, J., Li, C., Li, P., Zeng, W., Kuang, D., Liu, Q., & Yang, Y. (2024). The Impacts of Plant Growth Regulators on the Rapid Propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis. in Tissue Culture. *Forests*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/f15030446>
- Alvino, F. de O., & Rayol, B. P. (2007). Efeito de diferentes substratos na germinação de *Chroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. (Bombacaceae). *Ciência Florestal*, 17(1), 71–75. <https://doi.org/10.5902/198050981937>
- Boato Da Silva, F. A., Pereira, A. R., Dos, E., & Silveira, S. (2008). Brazilian archives of biology and technology micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Braz. Arch. Biol. Technol.* V, 51(6), 1103–1114.
- Braga, F. T., Pasqual, M., Castro, E. M. de, Rafael, G. C., Favero, A. C., & Valente, T. C. T. (2011). Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimação. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(5), 863–868. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000500001>
- Cordeiro, S. Z., Simas, N. K., Henriques, A. B., & Sato, A. (2014). Micropropagation and callogenesis in *Mandevilla guanabara* (Apocynaceae), an endemic plant from Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(2), 108–115. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n2a19>
- Ferreira, C. da S., Piedade, M. T. F., & Bonates, L. C. (2006). Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus succuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 36(4), 413–418. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672006000400003>
- Gang, R., Komakech, R., Chung, Y., Okello, D., Kim, W. J., Moon, B. C., Yim, N. H., & Kang, Y. (2023). *In vitro* propagation of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. using apical shoot segments and phytochemical assessments of the maternal and regenerated plants. *BMC Plant Biology*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03950-w>
- Herrera-Calderón, O., Calero-Armijos, L. L., Cardona-G, W., Herrera-R, A., Moreno, G., Algarni, M. A., Alqarni, M., & Batiha, G. E. S. (2021). Phytochemical screening of *Himatanthus succuba* (Spruce) woodson (apocynaceae) latex, *in vitro* cytotoxicity and incision wound repair in mice. *Plants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102197>
- Junghans, T. G., & Souza, S. A. (2013). *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. 407.
- Komakech, R., Kim, Y. G., Kim, W. J., Omujal, F., Yang, S., Moon, B. C., et al. (2020). A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook f.) Kalkman: Genetic fidelity and physiological parameter assessment. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.548003>
- Lemos, S. D. D. C., Santana, I. C., Marques, M., & Albarello, N. (2019). Desenvolvimento e produção *in vitro* de compostos fenólicos de *Ruta graveolens* L. exposta a fenantreno e benzo[a]pireno. *Revista Virtual de Química*, 11(5), 1418–1432. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190098>
- Magalhães, K. do N., Guarniz, W. A. S., Sá, K. M., Freire, A. B., Monteiro, M. P., Nojosa, R. T., Bieski, I. G. C., Custódio, J. B., Balogun, S. O., & Bandeira, M. A. M. (2019). Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. *Journal of Ethnopharmacology*, 237(March), 314–353. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.032>

- Merkle, S. A., Koch, J. L., Tull, A. R., Dassow, J. E., Carey, D. W., Barnes, B. F., Richins, M. W. M., et al. (2023). Application of somatic embryogenesis for development of emerald ash borer-resistant white ash and green ash varieties. *New Forests*, 54(4), 697–720. <https://doi.org/10.1007/s11056-022-09903-3>
- Miranda, N. A., Titon, M., Pereira, I. M., Sebastião, J., Fernandes, C., Santos, M., & Oliveira, R. N. De. (2018). Antioxidants, sucrose and agar in the *in vitro* multiplication of *Eremanthus incanus*. *Floresta*, 48(3), 311–320. <https://doi.org/10.5380/ufv48i3.51365>
- Murashige, T., & Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473–497.
- Nilanthi, D., & Yang, Y. (2014). Efeitos da sacarose e outros aditivos no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de coneflower roxo (*Echinacea purpurea* L.). *Av. Biol.* 2014, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/402309>
- Oliveira, L. S. de, Dias, P. C., & Brondani, G. E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(76), 439–453. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>
- Oliveira, K. S., Aurélio, F., Freire, D. M., Ahmed, M., & Aloufa, I. (2016a). Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Floresta*, 46, 335–342. <https://doi.org/10.5380/ufv46i3.43993>
- Oliveira, K. S., Freire, F. A. de M., & Aloufa, M. A. I. (2016b). Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Floresta*, 46(3), 335–342. <https://doi.org/10.5380/ufv46i3.43993>
- Patel, D. K. (2023). Biological importance, therapeutic benefits, and analytical aspects of active flavonoid compounds ‘corylin’ from *Psoralea corylifolia* in the field of medicine. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 23(1), e250822208005. <https://doi.org/10.2174/1871526522666220825160906>
- Patel, D. K. (2022). Biological importance, therapeutic benefit, and medicinal importance of flavonoid, cirsiolol for the development of remedies against human disorders. *Current Bioactive Compounds*, 18(3), Article e240821195804. <https://doi.org/10.2174/1573407217666210824125427>
- Santos, T. P., Sá, M. E., Malagutti, E. S., et al. (2022). Effects of gibberellic acid concentration and fruit maturation stage on seed germination and vigor of pitahaya seedlings. *Brazilian Journal of Biology*. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.260650>
- Singh, R., Kharb, P., & Kanta, R. (2011). Rapid micropropagation and callus induction of *Catharanthus roseus in vitro* using different explants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(6), 699–704.
- Soares, F. P., Paiva, R., Alvarenga, A. A. de, Nogueira, R. C., Emrich, E. B., & Martinotto, C. (2007). Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4), 1048–1053. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542007000400016>
- Souza, K. P. (2017). *Propagação in vitro de Himatanthus succuba WOOD uma espécie medicinal da amazônia*. Universidade do Estado do Amazonas.
- Sungkumlong, & Deb, C. R. (2009). Regeneration competence of *Tainia latifolia* (Lindl.) Benth ex Hook pseudobulb segments: An *in vitro* study. *Indian Journal of Biotechnology*, 8(1), 121–126.
- Verma, A. K., Singh, R. R., & Singh, S. (2012). Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. *Botanica Serbica*, 36 (2), 123–130.