



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



ANA ROSA DE OLIVEIRA FARIAS

**NITRATO DE PRATA E TIOSSULFATO DE PRATA COMO INIBIDORES DA
AÇÃO DO ETILENO EM CULTIVO IN VITRO DE *Annona glabra* L.**

RIO LARGO - ALAGOAS

2019

ANA ROSA DE OLIVEIRA FARIAS

**NITRATO DE PRATA E TIOSSULFATO DE PRATA COMO INIBIDORES DA
AÇÃO DO ETILENO EM CULTIVO IN VITRO DE *Annona glabra* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
a Universidade Federal de Alagoas, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Dr^a. Cibele Merched Gallo

RIO LARGO – ALAGOAS

2019

Catálogo na fonte Universidade Federal de Alagoas

Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias

Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana

F224n Farias, Ana Rosa de Oliveira.

Nitrato de prata e tiosulfato de prata como inibidores da ação do etileno em cultivo in vitro de *annona glaba* L. / Ana Rosa de Oliveira Farias. – 2019.

34 f.; il.

Monografia de Graduação em Agronomia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2019.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Cibele Merched Gallo.

Inclui bibliografia

ANA ROSA DE OLIVEIRA FARIAS

NITRATO DE PRATA E TIOSSULFATO DE PRATA COMO INIBIDORES DA AÇÃO DO ETILENO EM CULTIVO IN VITRO DE *Annona glabra* L.; Trabalho de Conclusão de Curso, da Universidade Federal de Alagoas, na forma normalizada e de uso obrigatório.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia, aprovado em 23 de julho de 2019.



Dr.^a Cibele Merched Gallo (Orientador)

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Leila de Paula Resende



Dr.^a Taciana de Lima Salvador

Ao meu Amado Deus, por tão imenso amor.

A Maria Santíssima, doce e terna mãe.

Aos meus queridos pais:

Eduardo Venceslau de Farias e Rosiane Venceslau de Oliveira;

Por todo amor, doação, cuidado e compreensão, apoiando-me sempre.

DEDICO

Ao meu amado noivo:

Alex Henrique de Oliveira Lira;

Por todo amor, carinho, paciência e companheirismo.

Por vibrar comigo a cada pequena conquista.

Razão do meu riso a cada amanhecer.

Aos meus avós:

*José Hélio Luna e Maria de Fátima Oliveira, por me cuidarem tão bem durante toda a
graduação, dando-me abrigo e carinho sempre.*

Ao meu irmão:

Eduardo Samuel de Oliveira Farias;

Por todo apoio, carinho e incentivo.

Ao meu primo:

Marcos Paulo Santana de Oliveira;

Pelo estímulo e apoio.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A minha amada e doce vó Gracinda Monteiro de Melo Farias (em memória), por sua sabedoria, conselhos e carinho.

A minha querida amiga, Hilda Rafaella da Silva Santos, por trilhar comigo todo o percurso da jornada acadêmica, compartilhando conquistas, choros e alegrias, encorajando-me sempre.

A Prof.^a Dr.^a Cibele Merched Gallo pela amizade, confiança, conhecimentos transmitidos e dedicada orientação.

A Prof.^a Dr.^a Leila de Paula Rezende, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

Ao Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, por seus ensinamentos e técnicas transmitidas.

A todos os professores. Em especial: Iedo Teodoro, Sandro Holanda, Geraldo Veríssimo, Vilma Ferreira, Maria de Fátima Muniz, Lígia Sampaio, João Correia, Terezinha Albino e Mauro Wagner Oliveira, por terem uma bela didática e ética profissional.

Aos amigos Tatiana de Lima Salvador, Taciana de Lima Salvador, Wyslaine Larissa Almeida Santos Rocha e Silva, Maria Aline dos Santos Gomes, Yasmim Gabriele da Silva Morais, José Antônio Costa, Jhamerson Luiz dos Santos, Mauro César Bernardo, Dailson Oliveira, René Porciuncula, pelo incentivo, amizade e bons momentos vividos.

A todos os familiares, especialmente minha tia Rosângela Horácio de Oliveira, pelo carinho, torcida e apoio.

Aos colegas da turma de Agronomia 2014.2.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com minha vida acadêmica.

Muito obrigada!

Ele é como a árvore plantada na margem das águas correntes: dá fruto na época própria, sua folhagem não murchará jamais. Tudo que empreende, prospera.

Salmos 1, Versículo 3.

RESUMO

A *Annona glabra* L., espécie frutífera tropical pertencente à família Annonaceae, tem despertado o interesse por partes de pesquisadores devido a sua capacidade adaptativa a ambientes extremos, possuindo grande potencial como porta-enxerto para espécies do mesmo gênero. Uma das dificuldades relatadas na literatura na propagação sexuada dessa espécie, é a lentidão no processo germinativo, com acentuada desuniformidade. Métodos de propagação assexuada, como o cultivo in vitro, apresentam algumas limitações, dentre elas, o acúmulo de etileno no microambiente formado no interior do frasco, provocando abscisão foliar precoce nos explantes. Esse trabalho objetivou estudar dois inibidores da ação do etileno, nitrato de prata e tiosulfato de prata no cultivo in vitro de *Annona glabra* L. Os explantes foram obtidos de ramos vegetativos jovens de plantas matrizes com 3 anos de idade, cultivadas no viveiro do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, constituído de 4 tratamentos e 20 repetições. O meio de cultura utilizado nos dois experimentos foi o MS, suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose e 7g L⁻¹ de ágar. As concentrações testadas foram: 0; 0,2; 2,0 e 20,0 μmol L⁻¹ de nitrato de prata e tiosulfato de prata respectivamente, adicionadas ao meio MS. O inibidor da ação do etileno, tiosulfato de prata, foi mais eficiente para reduzir a abscisão foliar precoce no estabelecimento in vitro da espécie em estudo.

Palavras-chave: Annonaceae, Araticum-do-brejo, micropropagação, abscisão foliar.

ABSTRACT

Annona glabra L., a tropical fruit species belonging to the Annonaceae family, has attracted interest from researchers because of its adaptive capacity to extreme environments, having great potential as a rootstock for species of the same genus. One of the difficulties reported in the literature regarding the sexual propagation of this species is the slow germination process, with marked unevenness. Asexual propagation methods, such as in vitro cultivation, have some limitations, among them, the accumulation of ethylene in the microenvironment formed inside the flask, causing early leaf abscission in the explants. This work aimed to study two inhibitors of the action of ethylene, silver nitrate and silver thiosulfate on in vitro cultivation of *Annona glabra* L. The explants were obtained from young vegetative branches of 3-year-old mother plants grown in the nursery of Plant Biotechnology, Center for Agricultural Sciences, Federal University of Alagoas. The experiments were performed in a completely randomized design, consisting of 4 treatments and 20 replications. The culture medium used in both experiments was MS supplemented with 30g L⁻¹ sucrose and 7g L⁻¹ agar. The concentrations tested were: 0; 0.2; 2.0 and 20.0 µmol L⁻¹ of silver nitrate and silver thiosulfate respectively, added to MS medium. The ethylene action inhibitor, silver thiosulfate, was more efficient to reduce early leaf abscission in the in vitro establishment of the species under study.

Key words: Annonaceae, Araticum-do-brejo, micropropagation, foliar abscission.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto visual da *Annona glabra* L. (A). Planta em bandeja no viveiro BIOVEG, CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor. (B) Planta adulta. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino dos Santos.....16
- Figura 2.** (A) Fruto de *Annona glabra* L. (B) Cor da polpa. Fonte: Projeto verde.....17
- Figura 3.** Distribuição geográfica de Araticum-do-brejo. Fonte: JBRJ, 2019, adaptado pelo autor.....18
- Figura 4.** (A) Abscisão foliar precoce no cultivo in vitro de *A. glabra* L., antes de 30 dias. (B) Abscisão foliar completa em explante de *A. glabra* L. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor.....20
- Figura 5.** (A) Segmentos caulinares de *A. glabra* L com aproximadamente 10 cm. (B) Imersão de segmentos caulinares de *A. glabra* L em hipoclorito de sódio 2%. (C) Padronização de tamanho dos explantes de *A. glabra* L. (D) Visão geral do experimento em sala de crescimento. Explantes em meio de cultura contendo as concentrações de nitrato de prata. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor.....23
- Figura 6.** Explantes de *A. glabra* L., após 30 dias do cultivo in vitro com o inibidor da ação do etileno, nitrato de prata. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Cibele Merched Gallo.....26
- Figura 7.** Explantes de *A. glabra* L., enraizados após 90 dias de cultivo in vitro. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Presença de brotações, comprimento de brotações, número de folhas verdes e amareladas de *A. glabra* L., em diferentes concentrações do inibidor da ação do etileno nitrato de prata (AgNO_3), 30 dias após o estabelecimento.....25

Tabela 2. Presença de brotações, comprimento de brotações, número de folhas verdes e amareladas de *A. glabra* L., em diferentes concentrações do inibidor da ação do etileno tiosulfato de prata (STS), 30 dias após o estabelecimento.....27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Família Annonaceae	16
2.2 <i>Annona glabra</i> L.....	16
2.3 Propagação	18
2.3.1 Propagação sexuada.....	18
2.3.2 Propagação assexuada	19
2.4 Etileno.....	19
2.4.1 Abscisão foliar.....	20
2.4.2 Inibidores	21
2.4.2.1 Inibidores da síntese do etileno	21
2.4.2.2 Inibidores da ação do etileno	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Inibição da ação do etileno utilizando Nitrato de Prata no cultivo in vitro de <i>Annona glabra</i> L.....	22
3.2 Inibição da ação do etileno utilizando Tiosulfato de Prata no cultivo in vitro de <i>Annona glabra</i> L.	23
3.2 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Inibição da ação do etileno utilizando Nitrato de Prata (AgNO ₃).....	25
4.2 Inibição da ação do etileno utilizando Tiosulfato de Prata (STS).....	27
5. CONCLUSÃO	30
6. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A *Annona glabra* L., espécie frutífera tropical pertencente à família Annonaceae e nativa de solos brasileiros, é uma árvore de pequeno porte, encontrada geralmente em áreas costeiras (BRAGA, 1976; SIEBRA, 2007).

Esta espécie destaca-se entre as anonáceas cultivadas, por apresentar características agronômicas desejáveis, com potencial como porta-enxerto para outras espécies do mesmo táxon, como a gravioleira (*A. muricata*) e a pinheira (*A. squamosa*), devido a tolerância de seu sistema radicular a condições de excesso de umidade do solo, indicando capacidade adaptativa a condições adversas (BRAGA, 1976; CARVALHO et al., 2001).

Diversas pesquisas apontam também seu potencial alelopático (MATSUMOTO et al., 2010), fitofarmacológico, propriedades antibactericidas, antifúngicas, inseticidas e citotóxicas (PADMAJA et al., 1995).

Sabe-se, entretanto, que muitas espécies de anonáceas apresentam problemas na propagação sexuada, ocorrendo segregação genética em plantas heterozigóticas, longo período para a planta atingir a maturidade fisiológica (COSTA et al., 2014), e a lentidão no processo germinativo de sementes, com acentuada desuniformidade, o que sugere algum mecanismo de dormência regulando a germinação (CARVALHO et al., 2001).

Todavia, nos últimos anos o interesse por métodos de propagação assexuada de anonáceas tem crescido, a partir de técnicas como enxertia de *A. muricata* L. (CARVALHO et al., 2000), enxertia precoce de *A. squamosa* L. (LEMOS et al, 2010), estaquia em anonáceas (SCALOPPI JÚNIOR; MARTINS, 2014) e estaquia de *A. squamosa* L., utilizando ácido indolbutírico (SALVADOR et al, 2014).

Embora, o número de estudos visando a multiplicação *in vitro* de *A. glabra* L. ainda sejam restritos, algumas pesquisas demonstram a possibilidade dessa forma de cultivo, como alternativa a propagação assexuada, por meio da técnica de micropropagação, visando a multiplicação em larga escala desse material, mantendo as características genéticas da planta matriz (DECCETTI, 2000; MOREIRA, 2008).

Todavia, uma das dificuldades relatadas por Lemos (2000) na micropropagação de anonáceas, é o acúmulo de etileno nos tecidos confinados no ambiente *in vitro*, provocando a abscisão foliar precoce dos explantes, prejudicando o vigor e o crescimento das brotações.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de dois inibidores da ação do etileno, nitrato de prata e tiosulfato de prata, no cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae compreende mais de 120 gêneros e aproximadamente 2.100 espécies. No Brasil há registro de 29 gêneros e 372 espécies, dos quais são explorados comercialmente pela fruticultura, os gêneros *Annona* e *Rollinia* (MAAS et al., 2015).

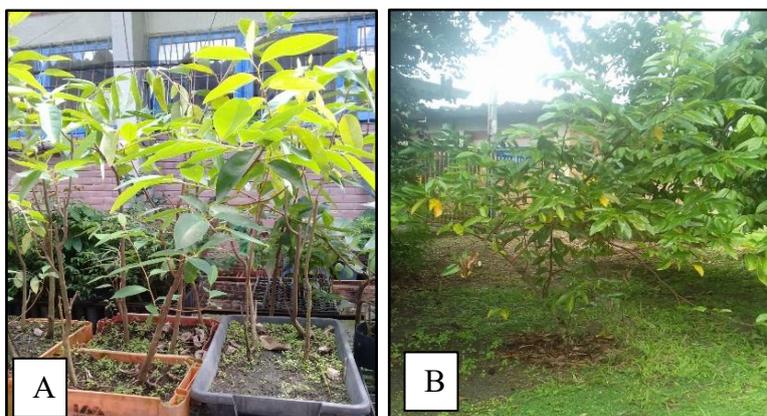
As principais espécies cultivadas no Brasil do gênero *Annona*, são a graviola (*A. muricata* L.), a pinha (*A. squamosa* L.), a cherimólia (*A. cherimola*), e a atemóia (híbrido de *A. cherimólia* x *A. squamosa*) (SÃO JOSÉ et al., 2014). Na região do semiárido nordestino, o plantio de anonáceas tem se expandido, destacando-se os estados da Bahia, Pernambuco e Alagoas, com plantios irrigados e de bom nível tecnológico (SOBRINHO, 2010).

2.2 *Annona glabra* L.

Trata-se de uma espécie frutífera tropical, nativa do Brasil, pertencente à família Annonaceae, popularmente conhecida como Araticum do brejo, Araticum liso, Araticum do mangue, Araticum bravo ou Araticunzeiro (BRAGA, 1976; SIEBRA, 2007; MOREIRA, 2008).

É uma árvore de pequeno porte (Figura 1 A), semidecídua, encontrada principalmente em áreas costeiras, com aproximadamente 12 a 15 metros de altura (Figura 1 B). Suas folhas possuem de 7 a 12 cm de comprimento, pecíolo cilíndrico, lâmina oblonga, cartácea, base obtusa, ápice acuminado, margem plana, com 9 a 13 pares de nervuras secundárias (SIEBRA, 2007).

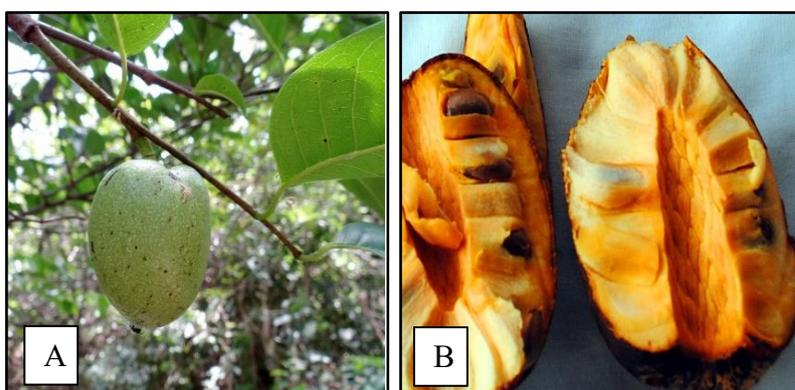
Figura 1. Aspecto visual da *Annona glabra* L. (A). Planta em bandeja no viveiro BIOVEG, CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor. (B) Planta adulta. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino dos Santos.



As flores geralmente com 2 a 3 cm de diâmetro, apresentando coloração de amarelo pálido a creme, com três pétalas maiores externas encouraçadas e três pétalas pequenas internas (Protection, 2004).

O fruto é esférico (Figura 2 A), com cerca de 5 a 15 cm de diâmetro, naturalmente verde, o qual, após a queda, torna-se amarelado, escurecendo em seguida. A cor da polpa é alaranjada (Figura 2 B). Contém pouco mais de 100 sementes, com aproximadamente 1 cm de comprimento (SIEBRA, 2007).

Figura 2. (A) Fruto de *Annona glabra* L. (B) Cor da polpa. Fonte: Projeto verde.



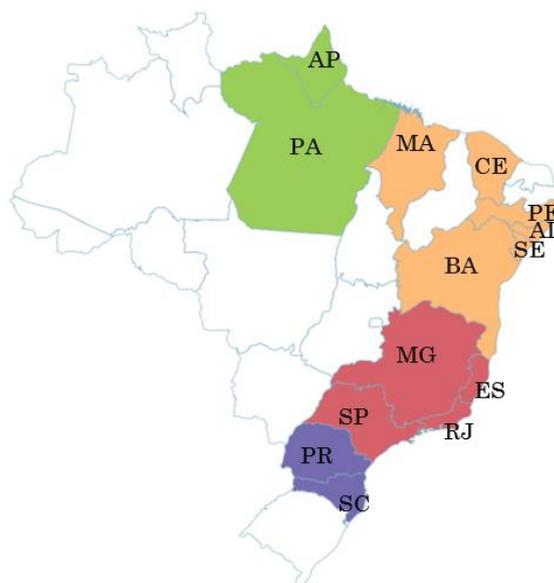
Diferente das espécies comerciais dessa família que apresentam frutos saborosos, a *Annona glabra* L. não possui valor comercial como fruta. No entanto, esta espécie tem sido muito utilizada como porta-enxerto para outras espécies do mesmo gênero como a graviola (*A. muricata*) e a pinha (*A. squamosa*), cujos frutos possuem valor comercial (CARVALHO et al., 2000).

Têm despertado interesse por parte de diversos pesquisadores brasileiros, por se tratar de uma planta com capacidade adaptativa a condições adversas, apresentando sistema radicular tolerante a ambientes encharcados (BRAGA, 1976). Além disso, possui características genéticas do tipo anão, conferindo, porte baixo para a planta enxertada (CARVALHO et al., 2000).

Diversas pesquisas apontam seu potencial alelopático (MATSUMOTO et al., 2010), fitofarmacológico, propriedades antibactericidas, antifúngicas, inseticidas e citotóxicas. Possui ainda propriedades biológicas através de substâncias isoladas de suas folhas, frutos e sementes (PADMAJA et al., 1995).

A *A. glabra* L., ocorre em toda América tropical. No Brasil, possui distribuição geográfica confirmada nas regiões norte, nordeste, sul e sudeste com ocorrência em 14 estados (Figura 3), dentre eles, Alagoas (FLORA DO BRASIL; JBRJ, 2019).

Figura 3. Distribuição geográfica de Araticum-do-brejo. Fonte: Flora do Brasil; JBRJ, 2019, adaptado pelo autor.



2.3 Propagação

2.3.1 Propagação sexuada

Para a propagação sexuada, sementes devem ser obtidas de frutos provenientes de plantas matrizes saudáveis, livre de problemas fitossanitários. Sementes de baixa qualidade implicam em um pomar pouco produtivo e desuniforme. Há, portanto, alguns entraves na propagação sexuada de anonáceas, tais como, longo período para atingir a maturidade em plantas perenes e segregação genética em plantas heterozigóticas (COSTA et al., 2014).

Uma dificuldade relatada na literatura, na propagação sexuada de *A. glabra* L., é a lentidão no processo germinativo de sementes, com acentuada desuniformidade, o que sugere algum mecanismo de dormência regulando a germinação, impedindo desta forma a produção em larga escala de mudas, que podem ser usadas como porta-enxerto (CARVALHO et al., 2001).

2.3.2 Propagação assexuada

O processo de propagação assexuada, baseia-se no princípio de regeneração de partes da planta por meio de mecanismos de diferenciação e divisão celular. Esse tipo de propagação resulta em clones, ou seja, plantas com características idênticas a planta matriz (FACHINELLO et al., 2005).

Métodos de propagação assexuada de anonáceas, tem sido realizado, a partir de técnicas como enxertia de *A. muricata* L. (CARVALHO et al., 2000), enxertia precoce de *A. squamosa* L. (LE MOS et al, 2010), estaquia em anonáceas (SCALOPPI JÚNIOR; MARTINS, 2014) e estaquia de *A. squamosa* L., utilizando ácido indolbutírico (SALVADOR et al, 2014). Esse tipo de propagação evita possíveis influências de variabilidade genética, já que esta espécie geralmente não produz plantas idênticas ao parental quando propagadas via sexuada (SCALOPPI JÚNIOR; MARTINS, 2014).

A micropropagação, por meio da técnica de cultivo in vitro permite a multiplicação de órgãos, tecidos ou partes de uma planta, quando submetidos a assepsia e colocados em um meio nutritivo. Baseia-se na totipotência celular, ou seja, na capacidade de regeneração das células, formando um novo indivíduo (CARVALHO, 1999). Todavia, para se obter êxito na micropropagação de plantas faz-se necessário a obtenção de um material isento de contaminação, pois esta pode comprometer todo o trabalho in vitro, sendo assim, é utilizada substâncias como hipoclorito de sódio para desinfestação, seguindo um protocolo de esterilização (PEREIRA et al. 2009). A contaminação pode ser exógena ou endógena. Quando exógena os agentes contaminantes como fungos e bactérias, possuem maior possibilidade de controle, entretanto, quando endógena o controle é limitado, havendo maiores chances de perda de tempo e de recursos financeiros (SOUZA et al., 2006).

O número de pesquisas visando a multiplicação in vitro de *A. glabra* L., tem se tornado crescente, dentre as quais podemos citar os trabalhos de Deccetti (2000), sobre a propagação in vitro de *Annona glabra* L.; e o de Moreira (2008), em seu estudo sobre o ambiente de cultivo na micropropagação de *A. glabra* L.; demonstrando assim, o interesse por parte dos pesquisadores pela multiplicação em larga escala desse material.

2.4 Etileno

Produzido pelas plantas, o etileno, é um hidrocarboneto gasoso e volátil, de molécula química simples (C₂H₄). É bastante empregado nas práticas de pós-colheita, já que é responsável pelo amadurecimento de frutos, quando expostos a concentrações eficazes em sua

forma gasosa, estimulando sua biossíntese. Tecidos meristemáticos e regiões nodais, em sua maioria, apresentam uma alta produção de etileno, sendo observado também na abscisão foliar e senescência de flores (KERBAUY, 2017).

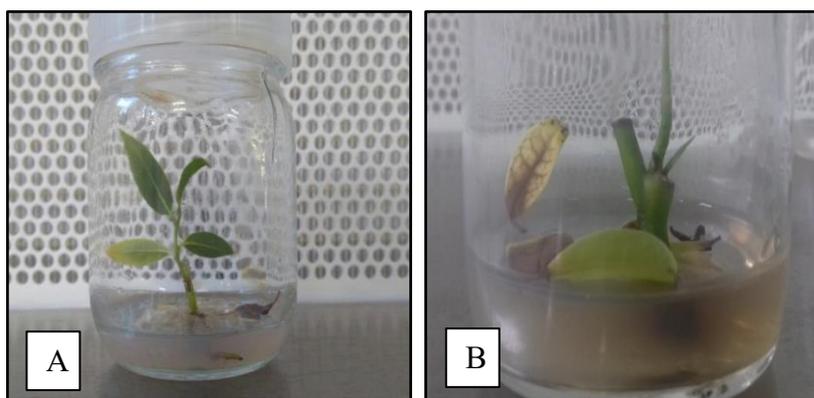
2.4.1 Abscisão foliar

O processo de abscisão, é geralmente relacionado com frutos maduros, órgãos senescentes ou danificados, ocorrendo na camada ou zona de abscisão. As zonas de abscisão localizam-se entre o órgão e o ramo da planta e se estabelecem precocemente, durante o desenvolvimento do órgão. A interação entre etileno e auxina, é responsável para que esse evento ocorra nas plantas (KERBAUY, 2017).

No cultivo in vitro de anonáceas, a abscisão foliar foi verificada precocemente, sendo o etileno o principal responsável por esse fenômeno. No ambiente in vitro, o acúmulo de etileno nos tecidos confinados, provoca a abscisão foliar precoce dos explantes, prejudicando o vigor e o crescimento das brotações (LEMOS; BLAKE, 1994; LEMOS, 2000).

Em *A. glabra* L., antes de trinta dias (Figura 4 A), é possível verificar o fenômeno de abscisão foliar precoce no cultivo in vitro desta espécie (Figura 4 B), provocada pelo acúmulo de etileno no microambiente do interior do frasco.

Figura 4. (A) Abscisão foliar precoce no cultivo in vitro de *A. glabra* L., antes de 30 dias. (B) Abscisão foliar completa em explante de *A. glabra* L. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor.



2.4.2 Inibidores

2.4.2.1 Inibidores da síntese do etileno

Dentre os inibidores da biossíntese do etileno, estão aminoetoxivinilglicina (AVG) e o ácido aminooxiacético (AOA), bloqueando a conversão do AdoMet (s- adenosilmetionina) a ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) (KERBAUY, 2017).

2.4.2.2 Inibidores da ação do etileno

Os íons de prata (Ag^+), na forma de nitrato de prata e tiosulfato de prata, são inibidores potentes e específicos da ação do etileno. A prata altera a capacidade dos receptores em transduzir o sinal para os componentes seguintes da cadeia de sinalização. O Etileno é produzido normalmente no final de sua rota biosintética, mas ao penetrar a membrana plasmática da célula e ir ao encontro de seu receptor, localizado no retículo endoplasmático, ele não consegue se ligar ao receptor devido a ação dos íons prata (KERBAUY, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no período de novembro de 2017 a julho de 2018, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas em Rio Largo-AL (9° 27' 57" S, 34° 50' 1" W e 127 m de altitude).

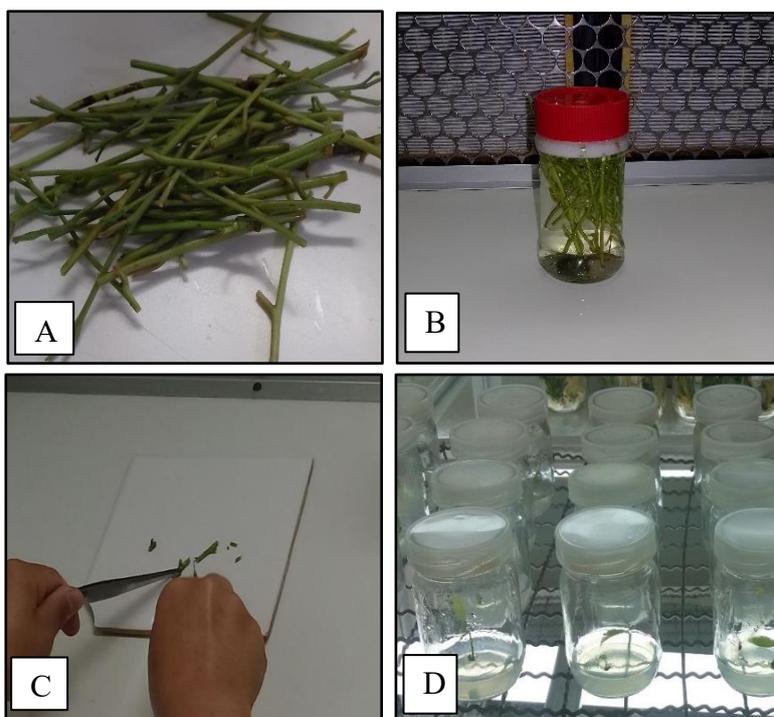
As plantas matrizes de *A. glabra* L., com 3 anos de idade, utilizadas para obtenção do material vegetal, foram propagadas por sementes provenientes de Garça Torta-Maceió-AL, cultivadas em vasos e mantidas no viveiro do respectivo laboratório.

3.1 Inibição da ação do etileno utilizando Nitrato de Prata no cultivo in vitro de *Annona glabra* L.

O material vegetal utilizado foi obtido de ramos vegetativos jovens de *A. glabra* L., realizando-se em seguida a remoção de suas folhas. A desinfestação foi realizada em câmara de fluxo laminar, onde os segmentos caulinares com aproximadamente 10 cm (Figura 5 A), foram imersos em álcool 70% por 1 minuto. Depois, foram imersos em hipoclorito de sódio 2% (Figura 5 B) por 15 minutos e lavados, por 3 vezes, em água destilada e estéril.

Cada repetição foi representada por um explante, padronizado em torno de 3 cm e com uma gema axilar (Figura 5 C). Colocados em meio MS suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 7g L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 121° C por 20 minutos, com diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO₃) testadas, (0; 0,2; 2,0 e 20,0 µmol L⁻¹). Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento (Figura 5 D) à 25 ± 2°C, em fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 36 µmol m⁻² s⁻¹.

Figura 5. (A) Segmentos caulinares de *A. glabra* L com aproximadamente 10 cm. (B) Imersão de segmentos caulinares de *A. glabra* L em hipoclorito de sódio 2%. (C) Padronização de tamanho dos explantes de *A. glabra* L. (D) Visão geral do experimento em sala de crescimento. Explantes em meio de cultura contendo as concentrações de nitrato de prata. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor.



Após 30 dias foram avaliados presença de brotações, número de brotações, comprimento de brotações, número de folhas verdes e/ou amarelas, presença de raiz e presença de oxidação.

3.2 Inibição da ação do etileno utilizando Tiosulfato de Prata no cultivo in vitro de *Annona glabra* L.

Foram utilizados segmentos caulinares com aproximadamente 10 cm, obtidos de ramos vegetativos jovens de *A. glabra* L., suas folhas removidas, seguindo-se da assepsia em câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, com posterior imersão em hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos, realizando-se em seguida a tríplice lavagem em água destilada e estéril. Cada repetição foi representada por 1 explante, padronizado com aproximadamente 3 cm de comprimento e com uma gema axilar.

O meio utilizado foi MS, suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 7g L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 121° C por 20 minutos, testando-se diferentes concentrações

de tiosulfato de prata (STS) (0; 0,2; 2,0 e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 30 dias. Ao final foram avaliados presença, número e comprimento de brotações, número de folhas verdes e/ou amarelas, presença de raiz e presença de oxidação.

3.2 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, constituído por 4 tratamentos e 20 repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo um explante. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inibição da ação do etileno utilizando Nitrato de Prata (AgNO_3)

Após 30 dias do estabelecimento in vitro de *Annona glabra* L., observou-se que para todas as variáveis não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1).

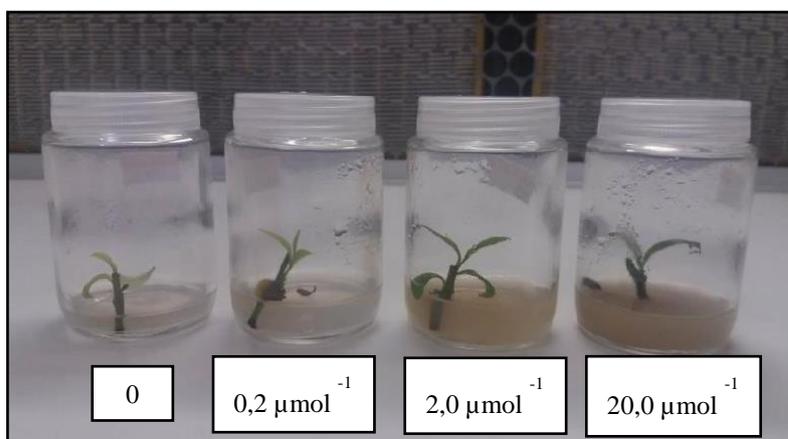
Tabela 1. Presença de brotações, comprimento de brotações, número de folhas verdes e amareladas de *A. glabra* L., em diferentes concentrações do inibidor da ação do etileno nitrato de prata (AgNO_3), 30 dias após o estabelecimento.

Concentração de AgNO_3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Presença de brotação (%)	Comprimento de brotação (cm)	Número de folhas verdes	Número de folhas amarelas
0,0	80 a*	0,30 a	1,6 a	0,15 a
0,2	90 a	0,32 a	2,1 a	0,0 a
2,0	84 a	0,32 a	2,2 a	0,1 a
20,0	80 a	0,24 a	1,9 a	0,0 a

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O uso de nitrato de prata como antagonista do etileno, tem sido relatado na literatura, pois inibe componentes da cadeia de sinalização deste hormônio (SAINÉ, 2013). Os íons Ag^+ alteram a capacidade dos receptores de se ligarem ao etileno (SRIDHAR et al., 2011) impedindo que, durante o cultivo in vitro, haja acúmulo deste gás e conseqüentemente o efeito do mesmo no material vegetal utilizado. Apesar de não haver diferença significativa, visualmente foi possível observar que a presença de AgNO_3 no meio de cultura, na concentração de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, resultou em maior média de folhas verdes (Figura 7).

Figura 6. Explantes de *A. glabra* L., após 30 dias do cultivo in vitro com o inibidor da ação do etileno, nitrato de prata. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Cibele Merched Gallo.



Tecidos meristemáticos e regiões nodais geralmente apresentam uma produção mais elevada do etileno, observado durante a abscisão foliar, estimulado pela interação entre auxina e etileno. A auxina regula a expressão de um gene de uma ou mais isoformas da ACC (ácido 1-caboxílico -1- aminociclopropano), que codifica para uma enzima chave na biossíntese de etileno. O papel desempenhado pelo aumento de etileno dependente de auxina ainda não é claro, mas curiosamente, a biossíntese de auxinas e a sinalização de etileno são inibidas pela proteína CTR1 (SAINÉ, 2013). Tendo em vista que o material vegetal neste estudo foi proveniente de ramos vegetativos jovens, com uma gema axilar, há comprovadamente elevada produção do etileno no cultivo in vitro de *A. glabra* L (LEMOS; BLAKE, 1994).

A desinfestação é uma etapa de grande importância para o sucesso do cultivo in vitro. É um processo de esterilização da superfície do explante, visando a eliminação de microrganismos como fungos, bactérias e leveduras. As soluções mais comuns, utilizadas na desinfestação dos explantes são o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio, por um tempo específico, seguindo-se a lavagem do material vegetal em água destilada autoclavada, podendo estes agentes desinfestantes causar toxidez no material vegetal, durante o processo (ANDRADE, 2002; FLORES et al., 2006).

O estresse é uma alteração fisiológica causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio (GASPAR et al, 2002). A coleta do material vegetal, seguida do processo de desinfestação e o estabelecimento in vitro, provavelmente promoveu maior estresse dos explantes, ocasionando como consequência maior produção de etileno no ambiente de cultivo de *A. glabra* L.

No estudo acerca do controle da abscisão foliar e morfogênese in vitro em cultura de Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan), a presença de nitrato de prata em meio de cultura promoveu maior número de gemas e brotações, embora esse inibidor tenha sido pouco eficiente no controle da abscisão foliar (NEPOMUCENO, 2006). Em Oliveira (*Olea europaea* L.), cultivar “Arbequina”, o uso de AgNO_3 ao meio de cultura, promoveu maior comprimento de brotações (DONINI et al, 2011). Em *A. glabra* L., não houve diferença significativa na indução de brotações, embora tenha ocorrido alta percentagem, porém, baixo comprimento. Isso pode ser explicado devido ao trabalho ter sido realizado na etapa de estabelecimento in vitro.

O uso de nitrato de prata pode apresentar efeitos inibitórios na produção e função do etileno no cultivo in vitro, mas, é possível que as plantas adquiram alguma estratégia para aumentar a tolerância a este componente (TAHOORI, 2018). Dessa forma, observa-se que explantes de *Annona glabra* L. submetidos a concentrações de nitrato de prata, apresentaram um possível efeito inibitório da ação do etileno, porém, há necessidade de outras pesquisas com outras concentrações, para comprovação e obtenção de mais resultados.

4.2 Inibição da ação do etileno utilizando Tiosulfato de Prata (STS)

Aos 30 dias do estabelecimento in vitro de *Annona glabra* L., observou-se diferença estatística somente para a variável folhas amarelas (Tabela 2).

Tabela 2. Presença de brotações, comprimento de brotações, número de folhas verdes e amareladas de *A. glabra* L., em diferentes concentrações do inibidor da ação do etileno tiosulfato de prata (STS), 30 dias após o estabelecimento.

Concentração de STS $\mu\text{mol L}^{-1}$	Presença de brotação (%)	Comprimento de brotação (cm)	Número de folhas verdes	Número de folhas amarelas
0,0	80 a*	0,22 a	1,9 a	0,73 b
0,2	86 a	0,16 a	2,1 a	0,26 b
2,0	86 a	0,25 a	2,6 a	0,0 a
20,0	86 a	0,26 a	2,0 a	0,0 a

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As concentrações de 2,0 e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de tiosulfato de prata foram os tratamentos mais eficientes para a reduzir o número de folhas amarelas (abscisão foliar), durante os 30 dias de cultivo in vitro de *A. glabra* L. Em contraste, na ausência de STS e em sua menor concentração no meio de cultura, observou-se número significativo de folhas amarelas,

provocado pelo acúmulo de etileno e possivelmente pela sua maior produção devido ao estresse gerado desde a coleta do material até o seu estabelecimento.

O ciclo de vida das plantas compreende três fases distintas, que são elas: crescimento, reprodução e senescência. Quando as folhas estão totalmente expandidas, no estágio maduro do desenvolvimento foliar, a senescência é ativada, compreendendo as fases de iniciação, degradação e morte das folhas (IQBAL et al., 2017).

No cultivo *in vitro*, o etileno pode se acumular em grandes quantidades, influenciando no crescimento e desenvolvimento do explante, acelerando o processo de senescência foliar, o que é observado em algumas espécies da família Annonaceae. A via de transdução de sinal do etileno é bloqueada pelos íons de prata, substituindo os íons de cobre nos receptores de etileno, recurso esse muito relatado (GUPTA, 2014; LEMOS; BLAKE, 1996)

Em explantes de *Annona squamosa* L., cultivados *in vitro*, Lemos & Blake (1994) verificaram que íons prata como o STS, foram eficientes para bloquear a ação do etileno, na micropropagação em massa e comercial dessa espécie que apresenta abscisão foliar precoce. Corroborando com os resultados obtidos no cultivo *in vitro* de *A. glabra* L.

Os resultados já obtidos com *A. squamosa* e *A. glabra* podem estar associados a maior mobilidade do STS nas plantas, apresentando menores problemas de fitotoxidez, com resultados superiores ao uso de nitrato de prata (VEEN; VAN DE GEIJN, 1978).

O uso de tiosulfato de prata apresenta ação protetora sobre o estresse oxidativo nos tecidos (PIMENTA et al., 2013), pois explantes com oxidação podem apresentar dificuldades de absorção de componentes do meio de cultura, acarretando inibição de seu crescimento ou morte (COELHO, 2013).

O etileno provoca inibição do crescimento das raízes, sendo estas consideradas um sistema de órgãos vitais das plantas devido a aquisição de água e nutrientes. (SAINI et al., 2013). Sendo assim, foi possível observar após dois subcultivos do material proveniente do experimento com tiosulfato de prata que explantes de *A. glabra* L., formaram raízes (Figura 8).

Figura 7. Explantes de *A. glabra* L., enraizados após 90 dias de cultivo in vitro. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Autor.



No crescimento in vitro do porta-enxerto de Macieira Morubakaido (*Malus domestica*), Medeiro (2002), verificou que a potencial inibição do mecanismo de ação do etileno não estimula a proliferação de brotações laterais quando submetida a diferentes concentrações de STS.

Diante do exposto, observa-se que explantes submetidos a concentrações de tiosulfato de prata, apresentam melhores resultados, devido a inibição da ação do etileno diminuindo a abscisão foliar precoce no cultivo in vitro de *Annona glabra* L.

5. CONCLUSÃO

O uso do inibidor da ação do etileno tioossulfato de prata (STS), é eficiente na fase de estabelecimento in vitro de *Annona glabra* L.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E), 2002.

Annona in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB117159>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3.ed. Mossoró: ESAM, 540 p. 1976. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

CARVALHO, J.E.U.; RIBEIRO, M.A.C.; NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C.N. **Enxertia da gravioleira (*Annona muricata* L.) em porta-enxertos dos gêneros *Annona* e *Rollinia***. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p.4, 2000. (Comunicado Técnico, 27).

CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de micropropagação**. Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E), 1999.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MÜLLER, C. H. **Tolerância de sementes de Araticum-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecamento e ao congelamento**. Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2001. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal- SP, v. 23, n. I, p. 179-182, abril 2001.

COELHO, F. A. A. Avaliação morfogênica da micropropagação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) sob indução de estresse oxidativo. Tese (Doutorado em Ciências, Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

COSTA, J. G. et al. **Recomendações técnicas para produção de sementes e mudas de Pinheira**. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E), 2014.

DECETTI, S. F. C. Propagação in vitro de *Annona glabra* L. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. **Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação in vitro de oliveira 'Arbequina'**. Ciência Rural, v. 41, n. 9, 2011.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 69-109.

FLORES, R. et al. **Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. Ciência Rural, 2006.

GASPAR, T. et al. **Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures**. Plant Growth Regulation, v. 37, n. 3, p. 263-285, 2002.

GUPTA, G. Effects of Silver Nitrate and Silver Thiosulfate on Growth Characteristics of Micropropagated Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plantlets and Regeneration Efficiency of the Explants. Dissertação, 2014.

IQBAL, N. et al. **Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones**. Frontiers in plant science, v. 8, p. 475, 2017.

JOSÉ, A. R. S. et al. **Actuality and perspectives of Annonaceous in the world**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, n. SPE1, p. 86-93, 2014.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Leaf abscission in micropropagated sugar apple (*Annona squamosa* L.). In: **Physiology, growth and development of plants in culture**, 1994. p. 227-233.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. **Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L.** Journal of Horticultural Science, v. 71, n. 5, p. 721-728, 1996.

LEMOS, E. E. P. **Organogênese e micropropagação em anonáceas**. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 3., Lavras. Anais. Lavras: UFLA, p. 4-21. 2000.

MAAS, P., Lobão, A., Rainer, H. **Annonaceae in Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

MATSUMOTO, R. S. et al. **Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae)**. Acta Botanica Brasilica, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.

MEDEIRO, S. A. **Moduladores da biossíntese e do mecanismo de ação do etileno sobre o crescimento in vitro do porta-enxerto de macieira Marubakaido**. Scientia Agrária, v. 3, n. 1, p. 122-122, 2002.

MOREIRA, C. V. Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

NEPOMUCENO, C. Crescimento in vitro e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb.) Altschul. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. **Biological activities of *Annona glabra***. Journal of Ethnopharmacology, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, 1995.

PEREIRA, G. A. et al. **Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira IAC 2001 em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio**. Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PIMENTA, M. R. et al. **Ethylene synthesis inhibition effects on oxidative stress and in vitro conservation of *Lippia filifolia* (Verbenaceae)**. Brazilian Journal of Biology, v. 73, n. 3, p. 617-621, 2013.

Protection, L. 2004. **Pond apple *Annona glabra* declared class 2**. In Facts Sheets. Vol. PP58.

SAINI, S. et al. **Auxin: a master regulator in plant root development**. Plant cell reports, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SALVADOR, T. L. et al. **Enraizamento de estacas de pinheira (*Annona squamosa* L.) com ácido indolbutírico**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, p. 310-314, 2014.

SCALOPPI JR, E. J.; MARTINS, A. B. G. **Estaquia em Anonas**. Revista Brasileira de Fruticultura, p. 147-156, 2014.

SIEBRA, C. A. Atividades biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 2007.

SOBRINHO, R. B. **Potencial de exploração de anonáceas no nordeste do Brasil**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2010.

SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S; SILVEIRA, D.G; SOUZA, F.V.D; FARIA, G.A; NETO, H.P.S; SANTOS SEREJO, J.S; SILVA, K.M; COSTA, M.A.P.C; SOARES, T.L; JUNGHANS, T.G; ALMEIDA. W.B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. p. 11-151.

SRIDHAR, T. M.; PREETHI, D.; NAIDU, C. V. **Effect of silver thiosulphate on In Vitro plant regeneration of *Solanum nigrum* (Linn.) - An important antiulcer medicinal plant**. Current Botany, 2011.

TAHOORI, F. et al. **Effects of silver nitrate (AgNO₃) on growth and anatomical structure of vegetative organs of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under in'vitro'condition**. Plant Omics, v. 11, n. 3, p. 153, 2018.

VEEN, H.; VAN DE GEIJN, S. C. **Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations**. Planta, v. 140, n. 1, p. 93-96, 1978.