

Abanico Agroforestal. Janeiro-Dezembro 2020; 2(1):1-11. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.5>  
Artigo Original. Recebido: 06/12/2019. Aceito: 15/04/2020. Publicado: 25/04/2020.

## Indução *in vitro* de calogênese e organogênese em explantes de *Krameria erecta* Willd

*In vitro* induction of callogenesis and organogenesis in explants of *Krameria erecta* Willd

Mc-Caughey-Espinoza Diana\*<sup>1</sup> [ID](#), Reyes-Olivas Álvaro<sup>1</sup> [ID](#), Ayala-Astorga Gloria<sup>2</sup> [ID](#),  
Lugo-García Gabriel<sup>1</sup> [ID](#), Ochoa-Meza Andrés<sup>3</sup> [ID](#), Pacheco-Olvera Antonio<sup>4</sup> [ID](#)

<sup>1</sup>Colegio de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa. México. <sup>2</sup>Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. <sup>3</sup>Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. México. <sup>4</sup>Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. México. [diana.mccaughey@unison.mx](mailto:diana.mccaughey@unison.mx), [alreo.uas@gmail.com](mailto:alreo.uas@gmail.com), [gloria.ayala@unison.mx](mailto:gloria.ayala@unison.mx), [gabriel\\_lugo9010@hotmail.com](mailto:gabriel_lugo9010@hotmail.com), [andres.ochoa@unison.mx](mailto:andres.ochoa@unison.mx) y [apontoniopo345@gmail.com](mailto:apontoniopo345@gmail.com)

### RESUMO

O objetivo da presente investigação foi avaliar *in vitro* a germinação e indução de calogênese e organogênese em explantes de *Krameria erecta*. O meio de cultura utilizado foi WPM/50 da metade de sais e constituído por vitaminas, sacarose, e ácido indolbutírico (IAB) em concentrações (0, 0.5, 1.0, 1.5 e 2 mgL<sup>-1</sup>). Os explantes foram incubados de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas-luz. O desenho experimental foi inteiramente randomizado em arranjo fatorial de 5x3 com um ANDEVA ( $P < 0.05$ ) e o teste de média de Tukey. A germinação *in vitro* não mostrou diferenças significativas, mostrando de 79 a 83%. Ocorreram diferenças na altura das plântulas, as concentrações de 1.0 e 2 mgL<sup>-1</sup> de AIB foram maiores com 11.60 to 11.65 cm. A altura e largura dos calos e nos brotos axilares apresentaram diferenças significativas de 1.0 and 2 mgL<sup>-1</sup> of AIB. Quanto ao número de raízes em folhas foi de 0.50 a 2.5 mostrando diferenças significativas nas concentrações, em brotos axilares não houve raízes então havia diferenças significativas. Na contaminação, não houve diferenças significativas apresentadas abaixo 12.50%. De acordo com a desinfecção com álcool e hipoclorito de sódio (NaClO) não houve oxidação nas sementes mas em broto axilar e folhas sim.

**Palavras-chave:** cultura de tecido, ácido indolbutírico, explantes e *Krameria erecta*

### ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate *in vitro* the germination and induction of callogenesis and organogenesis in explants of *Krameria erecta*. The culture medium used was WPM/50 with half the salts and made up of vitamins, sucrose and indolebutyric acid (IAB), in concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mgL<sup>-1</sup>). The explants were incubated in a controlled environment of 25 °C and photo period of 16 light hours. The experimental design was completely randomized with a 5x3 factorial arrangement with an ANDEVA ( $P < 0.05$ ) and the Tukey mean test. *In vitro* germination did not present significant differences, showing from 79 to 83%. There were significant differences in seedling height, the concentrations of 1.5 and 2.0 mgL<sup>-1</sup> of AIB were higher with 11.60 to 11.65 cm. The height and width of callus in axillary bud and leaf presented significant differences in concentrations of 1.0 and 2 mgL<sup>-1</sup> of AIB. Regarding the number of root in the leaf it was from 0.50 to 2.50, showing significant differences in the concentrations, in the axillary bud there was no root, therefore there were no significant differences. In contamination, there were no significant differences presented below 12.50 %. According to the disinfection with alcohol and sodium hypochlorite (NaClO), there was no oxidation in seeds, but in axillary bud and leaves.

**Keywords:** tissue culture, indolebutyric acid, explants and *Krameria erecta*.

## INTRODUÇÃO

A família Krameriaceae compreende 17 espécies em um único gênero *Krameria erecta* W. (Dominguez *et al.*, 1987; Simpson *et al.*, 2004). É distribuído geograficamente no norte do México, principalmente em Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Coahuila, Baja California, Zacatecas e nos estados da Califórnia, Utah e Nevada nos Estados Unidos da América (Simpson and Salywon, 1999).

É um arbusto forrageiro com importância econômica nas zonas áridas e semi-áridas do noroeste do México (Mc-Caughey-Espinoza *et al.*, 2019). Sua importância no campo da medicina se deve ao fato de apresentar alta atividade antiproliferativa nas células cancerígenas e alto teor de flavonoides. Além disso, possui efeitos hepatoprotetores, antioxidantes e anti-inflamatórios e possui cinco vezes mais atividade antioxidante que o ácido ascórbico (Carini *et al.*, 2002; Jiménez-Estrada *et al.*, 2013, Morán-Palacio *et al.*, 2014). Vale ressaltar que a tintura da raiz é extraída dessa planta, usada pelos Seris, um importante grupo étnico no estado de Sonora.

Nos últimos 20 anos, o trabalho de propagação *in vitro* de algumas espécies florestais aumentou gradualmente; no entanto, até o momento, não foram realizados estudos que relatassem a micropropagação *in vitro* de *Krameria erecta* Willd.

A distribuição de *K. erecta* é limitada nos ecossistemas naturais, por fatores como: excesso de pastagem, mudança de uso da terra, baixa pluviosidade, presença de insetos, etc. Em seu habitat natural, se pode encontrar de zero a 70 plantas em 2.500 metros quadrados, a presença de novos indivíduos é praticamente inexistente.

Com a aplicação da biotecnologia, os ecossistemas naturais ainda presentes em nosso meio ambiente podem ser preservados. Uma das estratégias utilizadas para combater os problemas presentes na propagação de espécies florestais e sua extinção é o cultivo *in vitro* de hortaliças (Delgado *et al.*, 2008).

Diminuir a situação das baixas populações existentes nos pastos do estado de Sonora e por ser uma planta apetitosa para animais herbívoros e medicinais; o objetivo desta pesquisa é estabelecer uma metodologia para a germinação e indução de calogênese e organogênese *in vitro* em gemas axilares e folhas de *Krameria erecta* W.

## MATERIAL E MÉTODOS

A região de coleta de *Krameria erecta* Willd foi feita entre as coordenadas 29° 03'21,30" da Latitude Norte e 110° 45'12,22" da Longitude Oeste (Las Cruces fazenda). Durante o mês de setembro de 2019, as partes úteis da planta foram os caules, folhas e explantes de sementes; geralmente apenas 20% podem ser sementes fisiologicamente maduras e viáveis. O material utilizado foi uma tesoura, sacos plásticos e um baú de gelo. A pesquisa foi realizada no laboratório de biotecnologia do Programa de Educação em Engenharia Horticultural da Universidade Estadual de Sonora (UES).

### **Meio de cultivo**

O meio de cultura utilizado foi o *Woody Plant Medium* (WPM/50) (Trigiano and Gray, 2011); Este meio foi utilizado na metade de sua concentração, consistindo principalmente de sais minerais e vitaminas, como: tiamina, mio-inositol, sacarose e ágar. O fitohormônio utilizado foi: ácido indolbutírico, nas concentrações de 0, 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mgL<sup>-1</sup>. Antioxidantes não foram aplicados ao meio.

### **Câmara de fluxo laminar**

A câmara de fluxo laminar (Brand Edge Gard Hood) foi previamente desinfetada antes da realização das culturas, usando álcool a 99% e vickor; depois, por 30 minutos, uma lâmpada fluorescente de 40 W foi deixada acesa, o que proporcionou uma irradiação de 8-10 W. m<sup>-2</sup>. Foram utilizados tubos de ensaio e frascos gerber de vidro transparente. Placas de Petri de vidro, pinças e bisturi também foram utilizados; todo o material foi previamente esterilizado num autoclave modelo esterilmático, à temperatura de 120 °C e pressão de 15 kg/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

### **Cultura de explantes**

As sementes foram previamente embebidas em água deionizada, por 2 horas antes da semeadura. Os explantes (folhas, caules, brotos axilares, apicais e sementes sem pericarpo foram embebidos por 3 horas em água desionizada) e depois desinfetados com álcool etílico a 70% por 3 minutos; e subsequentemente em hipoclorito de sódio a 15% (NaClO) (CLOROX®) por 12 min, adicionando uma gota de interpolação 20. Foram realizadas três lavagens com água deionizada. Posteriormente, foram colocados numa solução antioxidante de ácido ascórbico (150 mg/L) e ácido cítrico (100 mg/L) por 5 minutos e foram posteriormente semeados.

### **Incubação**

Os frascos de vidro do tipo Gerber foram utilizados para a semeadura. Os explantes foram previamente plantados. A sala de incubação foi subsequentemente colocada sob condições controladas, mantendo uma temperatura de 25±1 °C e um fotoperíodo de 16 horas de luz com 8 horas de escuridão e 70-75% de umidade relativa.

### **Parâmetros avaliados**

A avaliação foi realizada por observação e medição nos diferentes explantes, a partir do terceiro dia de incubação e, posteriormente, as medidas foram observadas e realizadas a cada sete dias por 2 meses.

Os parâmetros avaliados foram:

- Percentual de germinação (%), utilizando o critério [ISTA \(2019\)](#).
- Medidas de calos presentes nos explantes; foi utilizado um Vernit Mitutoyo Absolute Model CD-6CSX N° de Série 06401649 6”

- Altura das plântulas (cm)
- Largura e altura do calo (mm)
- Número de raízes
- Contaminação e oxidação

### Análise estatística

O desenho experimental utilizado neste trabalho de pesquisa foi inteiramente randomizado, com arranjo fatorial de 5x3 (5 concentrações e 3 explantes), com 10 repetições. Foi realizada análise de variância (ANDEVA), com nível de significância de  $P < 0,05$ , e comparação das médias de Tukey. Para a análise dos dados, foi utilizado o pacote estatístico JMP, versão 9.0.1 (Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc.], 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Germinação de sementes *in vitro*

A germinação *in vitro* teve início no 4º e terminou no 15º dia. Não houve diferenças significativas na porcentagem de germinação entre os tratamentos AIB utilizados neste estudo, com uma porcentagem de germinação de 79,0 a 83,0%. Esses resultados indicam que, para a germinação da semente de *Krameria erecta*, o uso de qualquer tipo de fitohormônio não é necessário no meio de cultura; como a porcentagem de germinação não é significativa, consulte a tabela 1 e a figura 1.

Em relação ao percentual de plântulas normais germinadas, foram apresentadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), entre as concentrações de AIB (0,5; 1,0; 1,5 e 2 mgL<sup>-1</sup>), em relação ao controle (sem fito-hormônio); apresentando para o controle 71,25% de plântulas normais e entre 31,25 a 32,0% com o uso de AIB, ver tabela 1. Deve-se mencionar que também foram observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) ao avaliar a porcentagem de plântulas anormais de *Krameria erecta*, com relação aos tratamentos, apresentando 11,5% de plântulas anormais no controle; enquanto nos tratamentos AIB, houve de 49,75 a 51,0% de plântulas anormais.

**Tabela 1. Germinação *in vitro* e altura de plântulas de *Krameria erecta* Willd.**

Tratamento AIB mgL <sup>-1</sup>	Sementes germinadas (%)	Plântulas normais (%)	Plântulas anormais (%)	Não germinado (%)	Altura das plântulas (cm)
0	82.75±1.49 <sup>a</sup>	71.25± <sup>a</sup>	11.50±1.29 <sup>b</sup>	8.50±1.00 <sup>a</sup>	10.07±0.21 <sup>b</sup>
0.5	81.50±1.49 <sup>a</sup>	31.25± <sup>b</sup>	50.25±2.75 <sup>a</sup>	9.75±0.50 <sup>a</sup>	10.42±0.21 <sup>b</sup>
1.0	83.00±1.49 <sup>a</sup>	32.00± <sup>b</sup>	51.00±2.44 <sup>a</sup>	9.75±0.95 <sup>a</sup>	10.52±0.21 <sup>b</sup>
1.5	79.00±1.49 <sup>a</sup>	31.75± <sup>b</sup>	49.75±2.50 <sup>a</sup>	10.50±1.29 <sup>a</sup>	11.65±0.21 <sup>a</sup>
2.0	82.00±1.49 <sup>a</sup>	31.50± <sup>b</sup>	50.50±3.10 <sup>a</sup>	10.25±0.95 <sup>a</sup>	11.60±0.21 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). Os dados apresentados são a média de 10 repetições com 3 amostras cada frasco por tratamento.

Ao analisar o percentual de sementes não germinadas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, apresentando de 8,5 a 10,5% das sementes que não germinaram, ver tabela 1. Esses resultados mostram que o uso de auxinas estimulou o geotropismo negativo na germinação, ao apresentar acima de 50% das plântulas anormais.

[Golubov et al., \(2007\)](#), menciona que a germinação está ligada ao crescimento do embrião. A germinação de plântulas normais foi inferior a 32,00%, quando apresentou radícula bem definida e brotação de suas folhas seminais. Segundo [AOSA \(2005\)](#), indica que as plântulas que apresentaram crescimento anormal não se desenvolvem, pois apresentam deficiências no sistema radicular (falta de radícula, fototropismo negativo ou outras malformações).



Figura 1. Germinação *in vitro* de *Krameria erecta*

A porcentagem de germinação em *Krameria erecta* foi semelhante à obtida por [Golubov et al., \(2007\)](#), obtendo porcentagens de germinação *in vitro* superior a 80% em sementes de *B. recurvata*, que foram armazenadas (em desidratação com sílica gel), por seis anos, a 6 °C, com baixa umidade relativa.

### Altura das plântulas

A altura das plântulas de *Krameria erecta* apresentou diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados, ver tabela 1. As plântulas com os tratamentos de 1,5 a 2,0 mgL<sup>-1</sup> de AIB apresentaram altura de 11,60 a 11,66 cm, sem apresentar entre essas diferenças significativas; enquanto 0, 0,5 e 1,0 mgL<sup>-1</sup> de AIB, não apresentaram diferenças significativas, mostrando 10,07 a 10,52 cm. As plântulas apresentaram características próprias e foram morfológicamente semelhantes às plantas presentes em seu habitat selvagem.

### Calo e indução de raízes

De acordo com os explantes utilizados nesta investigação, foi demonstrado que existem diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) em relação à altura do calo, de 0,58 a 0,67 mm de

altura, ver Tabela 2 e Figura 2; exceto no tratamento com AIB zero  $\text{mgL}^{-1}$  (controle), não houve calo. Em relação à largura do calo, também houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), de acordo com a análise estatística, indicando 0,76 a 0,96 mm nos tratamentos de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0  $\text{mgL}^{-1}$  de AIB.

No broto axilar houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, exceto em 1,5 e 2,0  $\text{mgL}^{-1}$  de AIB; apresentando alturas em brotos de 0,93 a 0,96 mm. Em relação à largura do calo no broto axilar, houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos de 1,0, 1,5 e 2,0  $\text{mgL}^{-1}$  de AIB, em relação a 0,5 e 0  $\text{mgL}^{-1}$  de AIB. O tratamento com  $\text{mgL}^{-1}$  zero de AIB (controle) não apresentou calo, ver tabela 2. Apesar da diferença significativa que existe entre os tratamentos, vale ressaltar que a aplicação de auxina (AIB) é eficaz na indução de calo em broto foliar e axilar do cosahui do sul (*Krameria erecta*), apresentando uma cor branca inicial e voltando-se para verde claro, com consistência firme; portanto, podemos apontar que os calos são viáveis para a indução de ser um calo embriogênico.

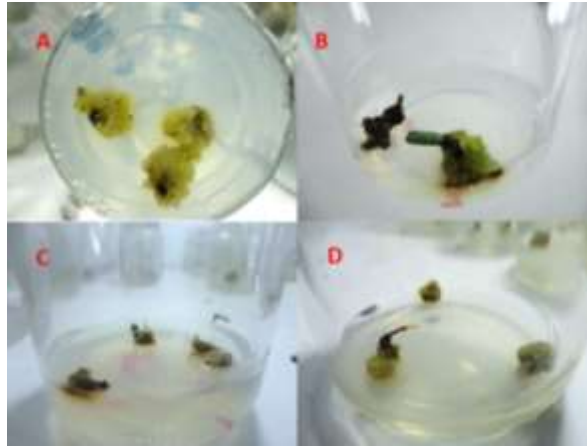
**Tabela 2. Indução de calos e raízes em explantes de *Krameria erecta* Willd**

Tratamento AIB $\text{mgL}^{-1}$	Altura do calo (mm)		Largura do calo (mm)		Número de raiz	
	Folha	Broto axilar	Folha	Broto axilar	Folha	Broto axilar
0	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
0.5	0.58±0.00 <sup>c</sup>	0.45±0.00 <sup>b</sup>	0.76±0.01 <sup>c</sup>	0.56±0.01 <sup>b</sup>	0.50±0.57 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
1.0	0.65±0.01 <sup>b</sup>	0.46±0.00 <sup>a</sup>	0.86±0.02 <sup>b</sup>	0.58±0.00 <sup>a</sup>	1.25±0.95 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
1.5	0.67±0.00 <sup>a</sup>	0.47±0.00 <sup>a</sup>	0.96±0.03 <sup>a</sup>	0.59±0.00 <sup>a</sup>	2.50±0.57 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
2.0	0.67±0.00 <sup>a</sup>	0.47±0.00 <sup>a</sup>	0.93±0.03 <sup>a</sup>	0.59±0.00 <sup>a</sup>	2.00±0.81 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). Os dados apresentados são a média de 10 repetições com 3 amostras cada frasco por tratamento.

O percentual em relação à presença de calos nos explantes, nas folhas, apresentou até 80%; enquanto no controle apresentou 0%. O crescimento do calo ocorreu 30 dias após a incubação e sua proliferação após quatro semanas de incubação. A porcentagem de calosidades nas gemas axilares foi de até 60%, exceto pelo controle que não se apresentou. A indução de calos nas gemas axilares ocorreu após 6 semanas de incubação.

Os resultados indicam que a melhor resposta de indução de calos em folhas ou brotos axilares foi apresentada quando se aplica a concentração de 1,0 a 2,0. É importante notar que o explante ideal para a produção de calos foram as folhas, de acordo com a análise estatística aplicada.



**Figura 2- A: indução de calos nas folhas, B: indução de calos no broto axilar, C: raiz na folha e D: calo e raiz na folha**

Para o crescimento celular, as auxinas devem induzir essa indução de acordo com os genes que codificam os fatores proteicos (Córdova *et al.*, 2014); dessa maneira, as células se expandem pela pressão da água no interior do vacúolo, para continuar crescendo até haver resistência da parede celular (Azcón-Bieto y Talón 2008).

De acordo com Smith y Atkins (2002), Arellano *et al.*, (2008), a indução de calo ocorre à medida que as células crescem e armazenam nutrientes e, com a presença de auxinas e citosinas, causam acúmulo e estimulação de ciclina no nível transcricional, desencadeando a ativação de cinases; e também promover o novo ciclo celular e formação de calos. A indução de calo é independente do tipo de explante e fito-hormônio utilizado (Howell *et al.*, 2003; Shiram *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2014).

Neste estudo, a produção de calogênese foi alcançada com o uso de auxinas em brotos axilares e folhas de *Krameria erecta*; portanto, há um estímulo na mitose, promovendo a formação de tecido caloso (Smith 2012).

Em relação ao número de raízes presentes nas folhas, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando raízes com as conotações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mgL<sup>-1</sup> de AIB, exceto no tratamento de zero mgL<sup>-1</sup> de AIB (controle), que não tinham indução de raiz. Enquanto no broto axilar não houve diferenças significativas entre os tratamentos (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mgL<sup>-1</sup> de AIB), uma vez que não havia raízes presentes, ver tabela 2. A porcentagem de raiz presente na folha foi de 30%, mostrando em folhas com presença de calo.

Até hoje não existem trabalhos referentes a esse arbusto ou outros arbustos, portanto, a discussão das informações é complicada pelas poucas informações coletadas. No entanto, existem outros estudos de outras espécies e gêneros diferentes, como *Oryza sativa* (Pérez *et al.*, 2009) e *Eucalyptus globulus* (Gómez *et al.*, 2006), etc. Com o método de cultivo *in vitro*, é possível obter plantas de qualidade uniforme, de acordo com um genótipo selecionado (Levitus *et al.*, 2010). Os fitohormônios não são especializados para

induzir mutações, pois em altas concentrações acelera os processos de divisão celular e possivelmente gera variações genéticas (George *et al.*, 2008).

### Contaminação

Os explantes, devido à sua origem (área selvagem), trazem alguns fitopatógenos, que podem causar problemas no momento do plantio e se desenvolver para a sua proliferação. A contaminação ocorreu basicamente em todas as concentrações e explantes utilizados. Bactérias e fungos ambientais (bióticos e abióticos) apareceram, indicando essa contaminação a partir do terceiro dia de incubação. Ao analisar a porcentagem de contaminação presente nas sementes de *Krameria erecta*, de acordo com a concentração e o tempo de imersão tratados nesta investigação, não houve diferenças significativas entre os tratamentos avaliados, uma vez que foi apresentada uma taxa de contaminação de 7,25 a 8,75 %.

É importante notar que as plântulas desenvolvidas *in vitro* ficaram livres de contaminação por mais de 3 meses; portanto, o método de desinfecção das sementes de *Krameria erecta* foi adequado. Também não houve diferenças significativas em relação à contaminação presente nos explantes axilares de brotos e folhas, mostrando de 11,25 a 12,50% de contaminação, ver tabela 3. Podemos destacar que o tratamento de desinfecção dos explantes foi eficaz quando se utilizou etanol em 70% por 3 minutos e, em seguida, por 12 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 15%. A morte de microrganismos se deve à combinação de hipoclorito de sódio com as proteínas das membranas celulares e enzimas (Flores *et al.*, 2008).

Tabela 3. Contaminação e oxidação em explantes de *Krameria erecta* Willd.

Tratamento AIB mgL <sup>-1</sup>	Contaminação (%)			Oxidação (%)		
	Sementes	Folha	Broto apical	Sementes	Folha	Broto apical
0	8.75±1.08 <sup>a</sup>	11.25±2.50 <sup>a</sup>	11.25±2.50 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	28.7±2.5 <sup>a</sup>	26.2±7.50 <sup>a</sup>
0.5	8.75±1.08 <sup>a</sup>	12.50±2.88 <sup>a</sup>	12.50±2.88 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	28.7±4.7 <sup>a</sup>	30.0±7.07 <sup>a</sup>
1.0	7.25±1.08 <sup>a</sup>	11.25±2.50 <sup>a</sup>	11.25±2.50 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	28.7±2.5 <sup>a</sup>	26.2±7.50 <sup>a</sup>
1.5	8.00±1.08 <sup>a</sup>	11.25±2.50 <sup>a</sup>	12.50±2.88 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	30.0±4.0 <sup>a</sup>	26.2±7.50 <sup>a</sup>
2.0	7.75±1.08 <sup>a</sup>	11.25±2.50 <sup>a</sup>	12.50±2.88 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	28.7±2.5 <sup>a</sup>	26.2±7.50 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (P <0,05). Os dados apresentados são a média de 10 repetições com 3 amostras cada frasco por tratamento.

O estágio fisiológico do tecido da planta tem grande influência no processo de desinfecção. O material vegetal em crescimento é desinfetado mais facilmente do que o material vegetal maduro; seus depósitos de cera e lignina são maiores e são uma barreira à ação do agente desinfetante em microrganismos endógenos (López *et al.*, 2010; Pedroza *et al.*, 2007). Entre os contaminantes mais comuns *in vitro* estão as bactérias, estas são difíceis de detectar e causam problemas sérios (Orlikowska *et al.*, 2017). Muitos



microrganismos precisam de tempo para se adaptar a novas condições, antes de manifestar sua presença, isso geralmente ocorre na fase de multiplicação (Hernández y González, 2010).

### **Oxidação**

Em relação à taxa de oxidação (escurecimento), nos explantes em geral, não houve diferenças significativas ao analisar essa variável nos diferentes explantes (broto axilar e folha), mostrando nas folhas 28,7 a 30,0% de oxidação; enquanto no broto axilar houve 26,2 a 30,0%. Em relação às sementes, elas não apresentaram oxidação, ver tabela 3. De acordo com a baixa porcentagem de oxidação presente, pode ser atribuída à mistura de antioxidantes utilizados (ácido ascórbico + ácido cítrico). Neste trabalho, resultados favoráveis foram obtidos.

Segundo Vatanpour-Azghandi *et al.*, (2002); Tang y Newton, (2004); Gratão *et al.*, (2005); Pompeu *et al.*, (2008), a enzima e o substrato ao entrar em contato com a célula, ocorrem danos, estresse ou senescência, resultando na morte das células do explante. Existem alguns fatores ou substâncias que podem desencadear o estresse oxidativo e nitrosativo, como: intensidade da luz, cortes, herbicidas, senescência, patógenos, metais pesados, lesões ou substâncias abrasivas (Mittler *et al.*, 2004; Pompeu *et al.*, 2008) Os explantes de espécies lenhosas apresentam essa reação de oxidação Azofeifa (2009).

Na cultura de tecidos *in vitro*, a oxidação é causada principalmente pelo agente desinfetante durante a assepsia do explante, cortes, composição do meio de cultura, volume e qualidade do frasco de cultura (Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006; Abdelwahd *et al.*, 2008). O escurecimento do explante ou o estresse oxidativo têm sido associados a outros distúrbios fisiológicos, morfológicos, epigenéticos e genéticos que os explantes cultivados apresentam, como recalcância, hiper-hidridade, variação somaclonal e habituação (Cassells y Curry 2001; Van Staden *et al.*, 2006)

Portanto, podemos apontar que a oxidação nos explantes de *K. erecta* utilizados neste estudo pode ser devida a vários fatores, como os mencionados acima; bem como o tempo de exposição à temperatura presente na câmara de fluxo.

### **CONCLUSÕES**

De 79 a 83% de germinação *in vitro* em sementes de *Krameria erecta* ocorreu. As concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 1,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB utilizadas nas plântulas apresentaram fototropismo negativo, exceto na concentração zero. As plântulas *in vitro* apresentaram alturas de 10,07 a 11,65 cm. Ao usar a concentração de 1,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB, apresentaram calos e raiz das folhas. As condições assépticas manipuladas foram ideais, pois não houve contaminação acima de 15% nos diferentes explantes utilizados. A oxidação ocorreu de 26,2 a 30%, apenas nos brotos e folhas axilares.

## AGRADECIMENTOS

Para os Dras. Claudia Vanessa Baldenegro García e Ana Dolores Armenta Calderón, por suas atenções e apoio na realização desta pesquisa, assim como a Dra. Gloria Irma Ayala Astorga, por seu apoio e aconselhamento.

## LITERATURA CITADA

ABDELWAHD R, Hakam N, Labhilili M, Udupa S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*. 7:997-1002. ISSN 1684–5315

ARELLANO Y, García E, Vázquez J. 2008. Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia*. 42(6):637-644. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n6/v42n6a4.pdf>

AOSA. Association of Official Seed Analysts. 2005. "Rules for testing seeds". Association of Official Seed Analysts, USA. [Fecha de consulta: 05 Dic 2019]. <https://www.analyzeseeds.com/about-us/>

AZCON-BRIETO J, Talon M. (eds). 2008. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Editorial McGraw - Hill - Interamericana. 2da Ed. Madrid. ISBN 978-84-481-5168-3

AZOFEIFA Álvaro. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175. ISSN: 1021-7444

CARINI M, G. Aldini G, Orioli M. Facino M. 2002. Antioxidant and photoprotective activity of a lipophilic extract containing neolignans from *Krameria triandra* roots. *Planta Medica*. 68: 193-197. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2002-23167>

CASSELLS A, Curry R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64:145-157. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010692104861>

CÓRDOVA Ana M, Cobos Marianela, Imán SA, Castro Juan C. 2014. Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*. 5(1):25-34. ISSN 2077-9917. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172014000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172014000100003&lng=es&tlng=es).

DELGADO MF, Cuba M, Hechenleitner P, Thiers O. 2008. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosá*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque (Valdivia)*. 29(2):120-126. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002008000200004>

DOMINGUEZ XA, Rombold C, Verde Star J, Achenbach H, Grob J. 1987. Hermosillo, an 8,3'-Neolignan from *Krameria sonorae*. *Phytochemistry*. 26(6):1821-1823. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82296-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82296-7)

FLORES García A, Álvarez Moctezuma JG, Rodríguez de la OJL, Corona Ambris A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*. 10(2):27-33. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49711436004>

GRATÃO PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 32(6): 481-494. <https://doi.org/10.1071/FP05016>

GÓMEZ C, Uribe M, Ríos D, Sánchez-Olate M. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *INCI*. 31(10). ISSN: 0378-1844

GOLUBOV J, Mandujano MC, Arizaga S, Martínez-Palacios A, Koleff P. 2007. Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae. En: Colunga Garcia Marín P, Larqué-Saavedra A, Eguiarte LE, Zizumbo-Villarreal D (Eds.). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. Pp. 133-152. ISBN: 978-968-6532-18-0.

HERNÁNDEZ Yuniét, González María E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos tropicales*. 31(4). ISSN 0258-5936. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000400015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015)

HOWELL SH, Lall S, Che P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science*. 8:453-459. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00191-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00191-2)

ISTA. International Seed Testing Association. 2019. International Rules for Seed Testing. Zurich, Switzerland: Seed Science & Technology. ISBN: 3906549275

JIMÉNEZ-ESTRADA M, Velázquez-Contreras C, Garibay-Escobar A, Sierras-Canchola D, Lapidco-Vázquez R, Ortiz-Sandoval C, Burgos-Hernández A, Robles-Zepeda RE. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13: 329. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-12>

LEVITUS G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/\\_archivos/000011\\_INTA%20Biotecnologia/000000\\_Inta%20-%20B%20C3%ADotecnolog%C3%ADa.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/_archivos/000011_INTA%20Biotecnologia/000000_Inta%20-%20B%20C3%ADotecnolog%C3%ADa.pdf)

LÓPEZ-GÓMEZ P, Iracheta-Donjuan L, Castellanos-Juárez M, Méndez-López I, Sandoval-Esquivez A, Aguirre-Medina JF, Gutiérrez-Díez A. 2010. Influencia del explante

y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotecnia mexicana*. 33(3):205-213. ISSN: 0187-7380.

MC-CAUGHEY-ESPINOZA D, Reyes-Olivas Á, Ayala-Astorga G, Lugo-García G, Ochoa-Meza A, Pacheco-Olvera A. 2019. Análisis químico proximal de *Krameria erecta* del Estado de Sonora. *Abanico Veterinario*. 9(1):1-12. ISSN 2448-6132. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.923>

MITTLER R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9:490-498. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162008000500015>

MORÁN-PALACIO EF, Zamora-Álvarez LA, Stephens-Camacho NA, Yáñez-Farías GA, Virgen-Ortiz A, Martínez-Cruz O, Rosas-Rodríguez JA, 2014. Antioxidant capacity, radical scavenging kinetics and phenolic profile of methanol extracts of wild plants of Southern Sonora, Mexico. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13: 1487-1493. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.15>

ORLIKOWSKA T, Nowak K, Reed B. 2017. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 128(3):487-508. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1144-9>

PEDROZA-MANRIQUE JA, González-Molina SR, Téllez-Ortiz DC. 2007. Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2):33-44. ISSN 1909-8758.

PÉREZ M, Hernández C, Teresa M, Delgado M. 2009. Expresión transitoria GUS en callos de arroz (var. J-104) mediante la optimización de las condiciones de cultivo in vitro. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 11(2):75-84. ISSN 0123-3475.

POMPEU Georgia G, Vitorello P, Azevedo V. 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Sciencia Agricola*. 65: 548-552. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162008000500015>.

RODRÍGUEZ Beraud MM, Latsague Vidal MI, Chacón Fuentes MA, Astorga Brevis PK. 2014. Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*. 35(1):111-118. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>

SIMPSON BB, Salywon A. 1999. Families of the vascular Plant of *Krameria*. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*. 32(1):57. ISSN: 1931-3616.

SIMPSON BB, Weeks A, Helfgott DM, Larkin LL. 2004. Species relationships in *Krameria* (*Krameriaceae*) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. *Systematic Botany*. 29: 97-108. <https://doi.org/10.1600/036364404772974013>

SMITH PM, Atkins CA. 2002. Purine biosynthesis: Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*. 128:793-802. <https://doi.org/10.1104/pp.010912>

SMITH R. 2012. Plant tissue culture: Techniques and experiments. Londres, UK. Academic Press Elsevier. Pp. 208. ISBN:978-0-12-415920-4

SHIRAM V, V Kumar, M Shitole. 2008. Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 44:186. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9108-3>.

SAS. Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc]. 2011. JMP versión 9.0.1. Statistical Discovery. From SAS. USA: Author. A Business Unit of SAS Campus Drive Cary, NC 27513.

TABIYEH D, Bernard F, Shacker H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*. 726: 201-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.31>

TANG W, Newton R. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*. 167: 621-628. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.024>

TRIGIANO RN, Gray DJ. 2011. Plant tissue culture, development, and biotechnology. Eds. CRC Press Boca Raton, Florida, USA. Pp. 359-364. ISBN 9781420083262. <https://doi.org/10.1201/9781439896143>

VAN Staden J, Fennell C, Taylor N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*. 725:55-62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.2>

VATANPOUR-AZGHANDI A, Villiers T, Ghorbani A, Tajabadi A. 2002. The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. *Acta Horticulturae*. 591: 377-388. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.591.58>