

ALINE DA COSTA NASCIMENTO

MICROPROPAGAÇÃO DE UVAIEIRA
(*Eugenia pyriformis* Cambess)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Nascimento, Aline da Costa

Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) / Aline da Costa
Nascimento. -- Lavras : UFLA, 2006.
125 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Uvaieira. 2. Micropropagação. 3. Cultivo *in vitro*. 4. Myrtaceae. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.42

ALINE DA COSTA NASCIMENTO

MICROPROPAGAÇÃO DE UVAIEIRA
(*Eugenia pyriformis* Cambess)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração
em Fisiologia Vegetal, para a
obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 25 de julho de 2006.

Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto UEMG

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra Embrapa Florestas

Prof. Renato Paiva, PhD

DBI/UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus e aos meus pais, Amadeu do Nascimento e Nelí da Costa Nascimento,

OFEREÇO.

Aos meus irmãos, Liliane e Amadeu Júnior.

Ao meu namorado, Rafael.

Aos meus avós, Nelly, José Quintino (*in memoriam*),

Francisca e Ernesto (*in memoriam*).

Aos meus tios, principalmente à tia Eloísa e à tia Vera .

Ao meu orientador, Prof. Renato Paiva.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, aos meus irmãos, meus familiares e ao Rafael, por todo amor e encorajamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de iniciação científica durante a graduação.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, por toda atenção, apoio, amizade, conselhos e incentivo.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto e Pesquisador. Dr. Leonardo Ferreira Dutra.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa da Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto, pela valiosa amizade e convivência durante toda a graduação e por todos os conhecimentos transmitidos, meus profundos agradecimentos.

Às grandes amigas Vanessa Cristina Stein, Fernanda Carlota Nery e Patrícia Matile Nicioli, pela convivência, conselhos e valiosa ajuda na minha formação profissional.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Evaristo, Ana Cristina, D'Artagnan, Izonel, Barrinha e Odorêncio, por todo o auxílio e pela simpatia sempre constante.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal: Diogo, Caroline, Gustavo, Tales, Anderson, Sidnei, Janaína, Alessandro, Girlene, Karine, Larissa, Ilisandra, Maria Isabel, Joeferson, Luiz Antônio João Paulo, Thatiane, Graciele, Paula, Maiana, Cristina, Ivana, Daiane, Fúlvia, Fernando, Marcus, Patrícia Fabian, Rodrigo Kelson, Rosângela e Plínio, por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

Às amigas Fernanda Pereira Soares e Raírys Cravo Nogueira, por serem exemplos de profissionais e pela valiosa ajuda.

Aos grandes companheiros: Franciane, Caroline, Diogo, Fúlvia e Milene, pelas inúmeras horas de alegria e pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Marcelo, Eduardo, Álvaro, Ana Cristina, Diogo, Letícia, Luciano, Rodrigo, Milene, Marcelo, Jessé, Cristiano e Gabriela e pela ajuda e companheirismo durante todos os momentos.

Às grandes amigas de Barbacena: Estefânia, Fabíola, Franciane, Olívia, Flávia, Lívia, Ana Paula, Ana Cláudia, Carol e Érika por essa grande amizade que nos une em todos os momentos de nossas vidas e por cuidarem com tanto carinho dessa amizade.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meus profundos agradecimentos, com todo o carinho.

BIOGRAFIA

ALINE DA COSTA NASCIMENTO, filha de Amadeu do Nascimento e Nelí da Costa Nascimento, nasceu em 17 de janeiro de 1983, em Juiz de Fora, MG. Mudou-se para Barbacena, MG em seguida, onde estudou na Escola Estadual “Bias Fortes”, finalizando o ensino médio em 2000, na Escola Estadual “Professor Soares Ferreira”. Em março de 2001 retornou à cidade de Juiz de Fora, onde iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), concluindo-o em janeiro de 2005. Durante este período, foi aluna de iniciação científica do Departamento de Botânica, sob a orientação do professor Paulo Henrique Pereira Peixoto, como bolsista de iniciação científica da FAPEMIG. Em março de 2005 mudou-se para Lavras, MG, onde iniciou o Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Lavras (UFLA), concluindo-o em julho de 2006.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A biodiversidade no Brasil e a mata atlântica.....	3
2.2 Caracterização geral da família Myrtaceae.....	5
2.3 Descrição da espécie.....	9
2.4 Cultura de tecidos e morfogênese <i>in vitro</i>	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO II: GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE SEMENTES DE UVAIEIRA.....	22
1 RESUMO.....	23
2 ABSTRACT.....	25
3 INTRODUÇÃO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Local dos experimentos.....	31
4.2 Material vegetal.....	31
4.3 Germinação <i>in vitro</i>	31
4.3.1 Desinfestação de sementes.....	31
4.3.2 Meios de cultura.....	32
4.3.3 GA ₃ e sacarose.....	33
4.3.4 pH.....	34
4.4 Germinação <i>ex vitro</i>	34
4.4.1 Efeito de diferentes substratos.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Germinação <i>in vitro</i>	35
5.1.1 Desinfestação de sementes.....	35
5.1.2 Meios de cultura.....	37
5.1.3 GA ₃ e sacarose.....	39
5.1.4 pH.....	41
5.2 Germinação <i>ex vitro</i>	42
5.2.1 Efeito de diferentes substratos.....	42
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

CAPÍTULO III: EFEITO DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES CAULINARES DE UVAIEIRA..... 49

1 RESUMO.....	50
2 ABSTRACT.....	51
3 INTRODUÇÃO.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Número de brotos por explante.....	55
5.2 Número de gemas por explante.....	59
5.3 Tamanho da maior brotação.....	60
5.4 Número de folhas.....	61
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

CAPÍTULO IV: EFEITO DO ANA E DO AIB NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES CAULINARES E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS..... 66

1 RESUMO.....	67
2 ABSTRACT.....	68
3 INTRODUÇÃO.....	69
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.1 Efeito do ANA e do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	74
4.2 Aclimatização de plântulas de uvaieira.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.1 Efeito do ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	76
5.2 Efeito do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	79
5.3 Aclimatização de plântulas de uvaieira.....	83
6 CONCLUSÕES.....	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

CAPÍTULO V: CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES DE UVAIEIRA..... 91

1 RESUMO.....	92
2 ABSTRACT.....	93
3 INTRODUÇÃO.....	94
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	97
4.1 Efeito do picloram e cinetina na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira cultivados em meio WPM.....	97
4.2 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares	

de uvaieira cultivados em meio MS.....	98
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
5.1 Efeito do picloram e cinetina na indução de calos em explantes foliares de uvaieira cultivados em meio WPM.....	99
5.2 Efeito do picloram e cinetina na indução de calos em explantes caulinares de uvaieira cultivados em meio WPM.....	103
5.2 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira cultivados em meio MS.....	106
6 CONCLUSÕES.....	107
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

RESUMO

NASCIMENTO, Aline da Costa. **Micropropagação de Uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A uvaieira se destaca por possuir um grande potencial como planta frutífera e propriedades para ser explorada como ornamental e na revegetação de áreas degradadas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação de plântulas de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess). Maior efetividade no processo de desinfestação de sementes de uvaieira é obtida quando é realizada uma nova assepsia com hipoclorito de sódio após a retirada do tegumento das sementes. A concentração de sais nos meios de cultura WPM e MS limita a taxa de germinação das sementes de uvaieira, sendo essa maximizada quando as sementes são germinadas em meio MS. É dispensável o uso de GA₃ e recomendável a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose. Não há influência do pH e do substrato na germinação. Maior vigor e maior velocidade no desenvolvimento de plantas são obtidos quando as sementes germinam nos substratos areia e vermiculita. O regulador de crescimento BAP não foi efetivo na formação de brotações em explantes caulinares e mesmo não sendo significativo estatisticamente, o maior número médio de folhas, gemas, e o comprimento das maiores brotações, bem como maior número de brotos, foram obtidos no tratamento suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Os reguladores de crescimento ANA e AIB não foram efetivos na formação de raízes e estas se formaram mesmo na ausência de reguladores de crescimento. O período de pré-aclimatização em sala de crescimento aumenta a proporção de sobrevivência de plântulas e a abertura gradual do saco plástico envoltório dos tubetes caracteriza um processo viável de aclimatização. Para a formação de calos, é essencial a presença de picloram, não sendo observada a formação de calos na ausência de reguladores de crescimento. A interação entre picloram e cinetina mostrou-se importante no aumento da calogênese em explantes foliares, sendo a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de picloram mais efetiva. A calogênese em segmentos caulinares foi maximizada na ausência de cinetina e na presença de 0,5 mg L⁻¹ de picloram. O 2,4-D não foi eficiente na indução de calos em explantes foliares e caulinares.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

NASCIMENTO, Aline da Costa.: **Micropropagation of *Eugenia pyriformis* Cambess.** 2006. 110 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The species *Eugenia pyriformis* Cambess presents potential to be explored as a fruity and ornamental plant as well as in environmental preservation. The objective of this research was to establish a protocol for its micropropagation. Higher effectiveness in the seed disinfestation process is achieved when seeds are treated with sodium hypochlorite after their removal from tegument. The concentration of salts on WPM and MS medium limits the germination, which is maximized when the seeds are inoculated in MS. The use of GA₃ is not required and the addition of 15 g L⁻¹ sucrose is recommended. Higher plant development and vigor are obtained when seeds germinate using sand and vermiculite as substrates. Even though the use of BAP had no effect on shoot induction, higher average number of leaves and buds, the length of the highest shoot and higher shoot number were obtained in the presence of 1.0 mg L⁻¹ BAP. The use of NAA and IBA were not effective on root formation which was observed in the absence of growth regulators. Pre acclimatization in growth room increases the rate of plant survival and the gradual opening of the tube plastic wrapper turned to be a viable acclimatization process. For callus formation, the presence of picloram is essential and no callus was observed in the absence of growth regulators. The interaction between picloram and kinetin was important to increase callus formation from leaf explants and the most effective combination was 0.1 mg L⁻¹ kinetin +1.0 mg L⁻¹ picloran. Maximization of callus formation from shoot segments was obtained in the absence of kinetin and presence of 0.5 mg L⁻¹ picloram. The use of 2,4-D had no effect on callus induction in leaf and shoot explants.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, graças a sua imensa biodiversidade de plantas lenhosas, vem, a cada ano, intensificando sua participação no mercado internacional de frutos. A exportação está baseada em frutas exóticas de clima temperado ou tropicais e subtropicais já adaptadas. As frutíferas nativas ocupam lugar de destaque e seus frutos, de grande aceitação popular, já são comercializados em feiras. Apresentam sabor *sui generis* e elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais e, apesar de serem consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes, doces e geléias., quase a totalidade delas permanece silvestre, sendo utilizada pelo extrativismo regional.

Nos dias atuais, várias espécies estão desaparecendo por diferentes motivos, entre os quais o extrativismo, o avanço das fronteiras agrícolas e o ritmo acelerado de destruição das vegetações nativas. A ação desordenada e predatória do homem sobre a natureza implica em conseqüências desastrosas para o equilíbrio ecológico do planeta, culminando com a destruição de áreas florestais riquíssimas em biodiversidade.

Atualmente, a mata atlântica brasileira é considerada o 5º bioma mais ameaçado do mundo, restando apenas 7% de sua área original devido às ações impactantes do homem em suas terras. O grande desenvolvimento humano e industrial, uma vez que este bioma concentra 70% da população brasileira, além dos maiores centros industriais e as maiores cidades do país, geram pressões altamente destrutivas sobre a imensa biodiversidade encontrada no local.

Neste contexto, insere-se a uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess), frutífera nativa, pertencente à família Myrtaceae, umas das mais importantes famílias em riqueza de espécies da mata atlântica. Além de sua importância como fonte de alimentação e de renda para populações locais, a uvaieira também se destaca por possuir características favoráveis a sua utilização para recuperação de áreas degradadas. Sua propagação sexuada se caracteriza, assim

como para outras espécies, por produzir indivíduos heterogêneos. Suas sementes sensíveis à dessecação, recalcitrantes, apresentam alto conteúdo de umidade e são intolerantes à secagem, ao congelamento e são metabolicamente ativas. Não suportam o armazenamento com baixa umidade, sem perder sua viabilidade, limitando-se, assim, a produção de mudas dessa espécie.

Paralelamente às ações conservacionistas, o cultivo *in vitro* é uma alternativa de propagação da uvaieira, trata-se de uma ferramenta importante, uma vez que essa técnica possui eficiência comprovada para muitas espécies lenhosas que possuem dificuldades na propagação sexuada, apresentando inúmeras vantagens em relação a outros métodos de propagação, como a produção de mudas saudáveis em grande escala e com maior rapidez.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação de plântulas de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A biodiversidade no Brasil e a mata atlântica

O Brasil abriga entre 10% a 20% do número de todas as espécies conhecidas pela ciência e cerca de 30% das florestas tropicais no mundo (Ministério do Meio Ambiente, 1998). Essas florestas, que ocupam menos de 7% da superfície da Terra, detêm mais da metade das espécies conhecidas da fauna e flora (Pádua, 1997). Tabulações amplamente divulgadas colocam o Brasil entre aqueles países mais ricos em biodiversidade do planeta (Mittermeier et al., 1997).

As plantas superiores, apesar de melhor catalogadas, ainda estão longe de uma contagem total confiável. Segundo estimativas apresentadas por Shepherd (2000), entre 40.000 e 45.000 espécies ainda serão descritas, mas tem

sido veiculado que este número pode ser bem maior, variando de 50.000 a 55.000 espécies. Estima-se que haja um acréscimo de espécies de cerca de 10% para o grupo de plantas (Geo Brasil, 2002).

Essa riqueza sempre gerou a idéia de que a biodiversidade brasileira é abundante e inesgotável e, por isso, vem sendo explorada de forma desordenada e predatória, desde os tempos coloniais. A ocupação de terras florestadas, seja para uso dos recursos florestais, seja para sua transformação em áreas de produção de alimentos, tem sido uma característica marcante do processo de crescimento econômico na maior parte do país. Adequar as necessidades humanas de desenvolvimento a situações que permitam a conservação dos recursos naturais e a sobrevivência de espécies e ecossistemas é um dos grandes desafios do desenvolvimento sustentável nos dias atuais.

A mata atlântica, o 5º bioma mais ameaçado do mundo, cobria, originalmente, mais de um milhão de quilômetros quadrados, distribuídos ao longo da costa brasileira, com algumas penetrações para o interior. A grande extensão geográfica e a diversidade de clima, solos e relevo proporcionaram a existência de uma incomparável diversidade biológica. De acordo com Myers et al. (2000), na mata atlântica, ocorrem 20.000 espécies de plantas (27% do total de espécies do mundo), sendo 8.000 endêmicas. Bastante diversificada, do ponto de vista fitofisionômico e florístico, a mata atlântica abrangia a totalidade da Floresta Ombrófila Densa, do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte e as Florestas Estacionais Deciduais e Semideciduais, com incursões para o interior de largura variável, abrangendo parte de Minas Gerais e do Mato Grosso do Sul. Esse bioma é o recordista mundial de diversidade de plantas lenhosas, com 458 espécies encontradas em um único hectare, na região Sul da Bahia (Geo Brasil, 2002).

Na área abrangida por esse bioma, reside 70% da população brasileira e encontram-se as maiores cidades e os mais importantes pólos industriais do

Brasil. A diversificada economia da região, aliada às zonas industriais concentradas em torno das grandes cidades e dos eixos de desenvolvimento, geram pressões sobre a biodiversidade à medida que requerem recursos naturais e energia para o suprimento de suas atividades. Com uma taxa de crescimento populacional de 1,26% ao ano (MMA, 2000), essa pressão não será facilmente reduzida. Dados recentes (Fundação SOS Mata Atlântica et al., 1998) estimaram que apenas 8% da área original do bioma ainda persiste em manchas isoladas (Conservation International et al., 2000).

Uma das famílias que mais se destacam por sua riqueza de espécies, além da importância econômica, devido à potencialidade de vários representantes serem utilizados na alimentação, fornecerem madeira, além de possuírem propriedades para serem explorados como ornamentais e medicinais, é a família Myrtaceae.

2.2 Caracterização geral da família Myrtaceae

A ordem Myrtales é constituída por cerca de 9.000 espécies agrupadas em 13 famílias (APG, 2003), dentre as quais Myrtaceae destaca-se pela riqueza de espécies. A família Myrtaceae possui cerca de 3.600 espécies agrupadas em 150 gêneros com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo também muito bem representada nas regiões temperadas da Austrália (Cronquist, 1981). Encontra-se dividida em duas grandes subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae (McVaugh, 1968). Johnson & Briggs (1984) admitem a existência de mais uma subfamília, Chamelaucioideae. Todos os representantes neotropicais de Myrtaceae estão inseridos na subfamília Myrtoideae, caracterizada por apresentar frutos bacóides e filotaxia oposta; na América, Myrtoideae distribui-se em toda a faixa tropical e subtropical e é

composta de apenas uma tribo, Myrteae (Landrum & Kawasaki, 1997; McVaugh, 1968).

No Brasil, a tribo Myrteae está representada por, aproximadamente, 1.000 espécies agrupadas em 23 gêneros. Estima-se que menos da metade das espécies tenha sido tratada por especialistas, sendo os gêneros mais representativos *Myrcia* (400 espécies), *Eugenia* (350), *Calyptranthes* (100), *Psidium* (70) e *Campomanesia* (24) (Landrum & Kawasaki, 1997).

Atualmente, aceita-se a divisão de Myrteae em três subtribos, com base na morfologia dos embriões: Eugeniinae (embriões globosos com radícula não evidente), Myrciinae (embriões com cotilédones foliáceos e radícula longa) e Myrtiinae (cotilédones reduzidos e radícula longa) (Landrum & Kawasaki, 1997; McVaugh, 1956).

Em geral, as espécies da subtribo Eugeniinae caracterizam-se por apresentar flores tetramêras a hexâmeras (em *Hexachlamys* O. Berg) isoladas, em dicásios, ou racemos aglomerados nos ramos ou caule. O botão floral pode apresentar-se fechado, abrindo-se por meio do rasgamento do cálice em quatro ou cinco lobos mais ou menos regulares (*Calycorrectes* O. Berg, *Plinia* L. e *Siphoneugena* O. Berg), na forma de uma caliptra (*Neomitranthes* D. Legrand, *Siphoneugena*) ou aberto, com lobos calicinais distintos antes da antese (*Eugenia* L., *Myrciaria* O. Berg, *Hexachlamys*, *Myrcianthes* O. Berg). O ovário é bi ou trilobular, com dois a muitos óvulos. As sementes apresentam testa variando de membranácea a cartácea e embrião do tipo eugenióide, com cotilédones unidos, conferruminados ou isolados (Figura 1).

Os representantes brasileiros da família são lenhosos, de hábito arbustivo a arbóreo, cujo caule pode ou não se esfoliar, apresentando numerosos canais oleíferos nas folhas, flores, frutos e sementes, folhas simples e freqüentemente opostas, com nervura marginal. Suas flores, em geral, são brancas ou, às vezes, vermelhas, efêmeras, hermafroditas, de simetria radial, em

geral pentâmeras, muitas vezes com o receptáculo bem desenvolvido, polistêmones, com anteras de deiscência rimosa, raro poricida e ovário sempre ínfero, com variado número de lóculos e óvulos. Os frutos são do tipo baga (Barroso, 1991). A família tem grande importância econômica, uma vez que várias espécies são utilizadas na alimentação, fornecem madeiras, possuem propriedades medicinais e potencial ornamental.

Entre as espécies apreciadas por seus frutos, têm-se a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a pitangueira (*E. uniflora* L.), o cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), a cerejeira (*E. bracteata* Vell.), o jameiro (*Syzygium jambos* (L.) Alston), a jabuticabeira (*Plinia cauliflora* L.) além da uvaieira (*Eugenia uvalha* L. e *E. pyriformis* Camb.). Seus frutos também são utilizados na fabricação de licores. Várias espécies de *Psidium* são utilizadas popularmente para aliviar disenterias, ou como anestésicos e por apresentar atividade fungicida (*Psidium acutangulum* DC.). Algumas espécies, como o craveiro (*Syzygium aromaticum* L.) Merr.) e a pimenteira (*Pimenta officinalis* Lindl.), fornecem condimentos. Entre as grandes produtoras de madeira e também de anti-sépticos, destacam-se várias espécies de *Eucalyptus* L'Her. Como ornamentais, merecem destaque *Myrtus communis* L., na confecção de grinaldas e também algumas espécies de *Melaleuca* L., na arborização urbana (Almeida et al., 1998; Barroso, 1991; Judd et al., 2002; Kawasaki & Landrum, 1997; Milles et al., 1990, 1991; Silva, 1998).

Inúmeros levantamentos florísticos e fitossociológicos nos mais diversos tipos de ambiente, desde formações savânicas, como o cerrado (Castro et al., 1999) e campos rupestres (Kawasaki, 1989), até formações florestais, como a mata atlântica (Oliveira-Filho & Fontes, 2000), registram Myrtaceae como uma das mais importantes famílias em riqueza de espécies. Essas formações vegetacionais, dentro de um contexto mundial, estão entre as mais ricas em

diversidade de espécies vegetais e endemismos na América do Sul (Myers et al., 2000).



FIGURA 1. Espécies de Myrtaceae, subtribo Eugeniinae. Gêneros *Eugenia* (A- *Eugenia aurata*, B - *E. bracteata*, C - *E. brasiliensis*, D - *E. dysenterica*, E - *E. hyemalis*, F - *E. mosenii*, G - *E. pitanga*, H - *E. puniceifolia*, I - *E. pyriformes* e J - *E. uniflora*) e *Myrciaria* (K - *Myrciaria delicatula* e L - *M. tenella*). Fonte: Costa, 2004. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O gênero *Eugenia*, no qual se encontra a uvaieira (*Eugenia pyriformis* Camb.), na conceituação de Landrum & Kawaasaki (1997), é caracterizado por suas inflorescências unifloras, ou raramente dicasiais, portando flores tetrâmeras ou pentâmeras com cálice aberto ou fechado, abrindo-se de maneira regular ou irregular. O ovário é sempre bilocular, com dois ou muitos óvulos por lóculo. Os lobos calicinais são persistentes no fruto, que pode ter de uma a duas sementes com um embrião sólido.

2.3 Descrição da espécie

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), popularmente denominada uvaieira, uvalha ou uvalheira, cuja sinonímia é *Pseudomyrcianthes pyriformis* (Camb.) Kaus, é uma espécie de hábito arbóreo mediano, de ocorrência no Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais, com grande potencial ornamental devido à coloração prateada de suas folhas, crescimento relativamente rápido e frutificação precoce. Possui copa alongada, formada pela folhagem serícea associada às abundantes flores brancas e frutos grandes de cor amarela ou alaranjada, formando um conjunto muito atraente (Reitz et al., 1988). É uma espécie altamente valiosa pela sua madeira dura, resistente às doenças, frutos comestíveis apreciados pelo homem e pela avifauna, úteis à industrialização na produção de sucos, licores, doces e geléias (Mattos, 1956). O seu uso é recomendado também em reflorestamentos heterogêneos (Lorenzi, 2000) (Figura 2).

Segundo Andrade & Ferreira (2000), os frutos de uvaia são indeiscentes, carnosos, piriformes, pilosos e de coloração amarela. As sementes apresentam tegumento de coloração castanha, cotilédones carnosos e justapostos. Os embriões apresentam-se como estruturas globosas, sem diferenciação entre cotilédone e eixo hipocótilo-radícula.

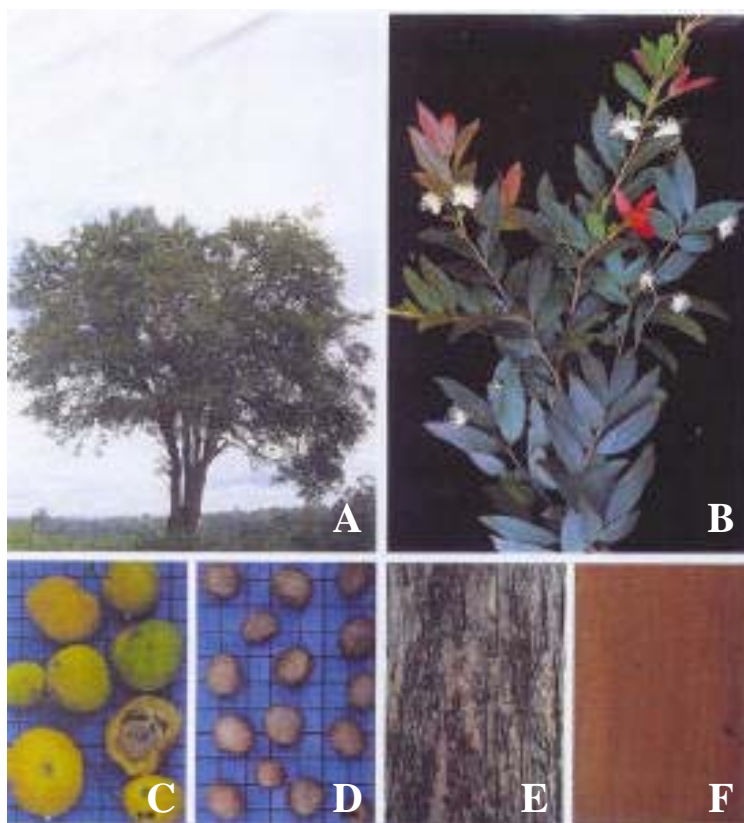


FIGURA 2. Aspecto visual de uma planta adulta (A), de um ramo com flores (B), de frutos (C), de sementes (D), da casca (E) e da madeira (F) de uvaia. Fonte: Lorenzi, 2000. UFLA, Lavras, MG, 2006.

As sementes de uvaia, imediatamente após a extração, oxidam-se rapidamente, provocando um escurecimento nos cotilédones que se inicia na periferia e segue em direção à parte central da semente. A oxidação de compostos, associada à redução do grau de umidade, pode ser uma das razões da perda rápida da viabilidade das sementes de uvaia (Andrade & Ferreira, 2000).

É provável, portanto, que, no caso das sementes de uvaia, o longo período exigido para emergência seja devido ao fato de possuir embrião globoso,

sem diferenciação dos cotilédones nem do eixo hipocótilo-radícula e alto nível de compostos fenólicos. Segundo Pinol & Palazón (1993), os compostos fenólicos podem interferir no processo de germinação, por seqüestro do oxigênio necessário ao processo respiratório.

A duração das sementes de uvaia é curta e a semeadura deve ser realizada logo após a coleta para não perder o poder germinativo (Mattos, 1956; Reitz et al., 1988). As sementes sensíveis à dessecação, recalcitrantes, apresentam alto conteúdo de umidade e são intolerantes à secagem, ao congelamento e são metabolicamente ativas. Não suportam o armazenamento com baixa umidade sem perder sua viabilidade. O período máximo de armazenamento varia entre as espécies recalcitrantes e está relacionado com a germinação (Ferrant et al., 1993).

Ainda há dificuldades na produção de mudas de uvaia pela carência de sementes. Na literatura, só foram encontrados registros de pomares experimentais, mas nenhum implantado para a produção de sementes ou para a produção comercial de frutos. Além disso, há poucas sementes por fruto (Mattos 1954) e a dificuldade na produção de mudas é ainda maior pela falta de tecnologia que permita maximizar o uso das sementes, principalmente quanto a sua conservação e multiplicação. Sementes de várias espécies de *Eugenia* apresentam baixa longevidade natural (Gentil & Ferreira, 1999; Rizzini, 1970; Von Bülow et al., 1994).

2.4 Cultura de tecidos e morfogênese in vitro

Técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelas vias clássicas. Podem-se citar como exemplo espécies que apresentam

dormência, recalcitrância ou grande variabilidade genética por meio de sua propagação sexuada, como ocorre com a uvaia.

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições assépticas em um meio artificial. O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (Torres et al., 1998).

Várias são as modalidades de cultura de tecidos, podendo ser por via direta, pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, via cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (Caldas, 1996). Podem ainda ser tratados com enzimas, obtendo-se protoplastos para a realização de trabalhos de engenharia genética ou a obtenção de híbridos somáticos.

Atualmente, a modalidade de maior interesse e aplicação na propagação de plantas é a micropropagação, que reúne características tais como multiplicação rápida de plantas selecionadas, obtenção de mudas livres de patógenos que acompanham outros métodos de propagação vegetativa, conservação e transporte de germoplasma, entre outras.

Vários estudos têm sido realizados visando à produção de mudas de plantas lenhosas, principalmente frutíferas nativas, para serem utilizadas na expansão comercial e no reflorestamento de áreas degradadas. No entanto, vários problemas, como alta perecibilidade dos frutos, assincronia no amadurecimento, alternância de safras e dificuldades de propagação, têm inviabilizado a exploração racional de várias espécies. Algumas destas

dificuldades podem ser superadas utilizando mudas uniformes, não originadas de sementes, principalmente por meio da cultura de tecidos (Paiva et al., 2002).

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivos básicos o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores ou a conservação genética por meio da criação de bancos de germoplasma, as quais têm sido realizadas principalmente via gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos.

Segundo Pierik (1990), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta cinco estágios diferentes. A fase 0 corresponde aos tratamentos dados à planta matriz, de onde são retirados os explantes. A fase 1 representa o momento em que um explante é isolado sob condições estéreis. A fase 2 é a fase de propagação, quando se objetiva conseguir a propagação do material vegetal sem a perda da estabilidade genética. A fase 3 envolve a preparação das brotações ou das plântulas obtidas na fase 2, para a transferência ao solo. Esse processo pode envolver a interrupção da formação de brotos axilares e o início do seu alongamento. Posteriormente, deve-se induzir a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A quarta e última fase é a da transferência das plântulas do tubo de ensaio para o solo e o conseqüente estabelecimento.

Segundo George (1996) e Grattapaglia & Machado (1998), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares e a composição do meio de cultura é uma das variáveis que determinam o sucesso na proliferação das partes aéreas. Diversos meios básicos são utilizados na fase de multiplicação e suas variações mais freqüentes dizem respeito à composição de macronutrientes. A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido maior atenção. O meio de cultura Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) é o mais concentrado, em termos de micro e macronutrientes e é também o mais

empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001). Já o meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) é bastante utilizado para plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais.

Outra possibilidade de micropropagação é a multiplicação mediante a indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta. A organogênese direta refere-se ao surgimento de órgãos a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vivo*, mas que, em geral, não se expressa. A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de órgãos é precedido pela formação de calos.

Entendem-se por calos um tecido tumoral parcialmente organizado que, geralmente, surge sobre feridas de órgãos ou tecidos diferenciados (Pierik, 1990), como resposta a lesões químicas ou físicas. Para a sua indução, muitas vezes, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento, sendo a necessidade do regulador, no que diz respeito ao tipo e concentração, dependente do genótipo e do conteúdo endógeno de hormônio do vegetal (Vietez & San-José, 1996). As principais classes de reguladores de crescimento são auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (George, 1996).

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento apresenta importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e ou radiculares (Kerbauy, 1999). Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra et al., 1999).

Reguladores de crescimento são usados para suportar um nível de crescimento básico e são igualmente importantes para direcionar a resposta do propágulo ao desenvolvimento. O sinergismo entre auxinas e citocininas é determinante no controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de

citocininas e baixas de auxinas induzem, em geral, à formação de gemas em detrimento da formação de raízes e, invertendo-se esta relação, as gemas são inibidas, havendo indução de raízes (Santana, 2003).

A fase de enraizamento *in vitro* se caracteriza pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplantio da plântula para condições *ex vitro*.

O enraizamento de espécies lenhosas, quando comparado ao de espécies herbáceas, geralmente, é mais difícil e se agrava à medida que não se utiliza material jovem, uma vez que a restauração da competência de enraizamento diminui ao aproximar-se da fase adulta. A qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento (Deccetti, 2000).

Alguns compostos podem ser adicionados ao meio de cultivo para auxiliar a indução da rizogênese. Uma das substâncias mais utilizadas é o carvão ativado, em concentrações que variam em torno de 0,1% a 2% (p/v).

O carvão ativado é utilizado para estimular a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Em termos químicos, o carvão ativado exerce um efeito de retenção de alguns componentes do meio de cultivo, como a fixação de citocininas residuais liberadas pelos tecidos vegetais e compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Gomes, 1999). O carvão ativado pode fixar também auxinas e reter fenóis oxidantes, sendo, de forma geral, benéfico, promovendo o alongamento das raízes.

A aclimatização envolve o transplantio da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação que, geralmente, consiste de uma fase crítica e que pode ser um fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998).

Entre os vários fatores que podem estar envolvidos no processo de aclimatização, podem-se relacionar o genótipo, o estresse hídrico, a alteração do

metabolismo heterotrófico para autotrófico, a infecção por patógenos e o estresse pela alteração na radiação (Decchetti, 2000). A mudança repentina da umidade à qual a plântula estava exposta pode causar danos mesmo em plantas que apresentem o aspecto normal.

Assim, torna-se obrigatório que a plântula, ao sair da condição *in vitro*, deva passar por um processo de aclimatização antes de ser levada para o campo. Este processo pode ser dispendioso e levar um tempo considerável, limitando-se, assim, o uso de micropropagação em escala comercial (Gomes, 1999).

Segundo McCown (1988), o período de aclimatização varia de 1 a 4 semanas e corrige as alterações ou anormalidades induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas normais, por meio da regulação da perda e da absorção de água.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado:** espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.

ANDRADE, R. N. B.; FERREIRA, A. G. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 118-125, 2000.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of Linnean Society**, London, v. 141, n. 4, p. 399-436, Apr. 2003.

BARROSO, G. M. Myrtaceae. In: **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 2, p. 114-126. Viçosa, MG: UFV, Imprensa universitária, 1991.

BARBEDO, C. J.; KOHAMA, S.; MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 184-188, 1998.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 87-132.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R.; TAMASHYRO, J. Y; SHEPERD, G. J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 86, n. 1, p. 192-225, 1999.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS, SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, SEMA/INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS-MG. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA/SBF, 2000.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERRANT, J. M.; BERJAK, P.; CUTTING, J. G. M.; PAMMENTER, N. W. The Role of plant growth regulators in the development and germination of the desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina*. **Seeds Science Research**, Wallingford, v. 3, n. 1, p. 55-63, Mar. 1993b.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS & INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995**. São Paulo: SOS Mata Atlântica, INPE, ISA, 1998.

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 29, n. 1, p. 21-31, mar. 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: Part 2 in practice**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

- GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.
- JONHSON, L. A. S.; BRIGGS, B. G. Myrtales and Myrtaceae – a phylogenetic analysis. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 71, n. 3, p. 700-756, 1984.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant Systematics – A phylogenetic approach**. 2. ed. Massachusetts, USA: Sinauer Associates Publisher, 2002.
- KAWASAKI, M. L. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 11, p. 121-170, 1989.
- KAWASAKI, M. L.; LANDRUM, L. A rare and potentially economic fruit of Brazil: cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). **Economic Botany**, Bronx, v. 51, n. 4, p. 403-407, Oct./Dec. 1997.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 519-531.
- LANDRUM, L. A monograph of the genus *Myrceugenia* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, New York, v. 29, p. 1-137, 1981.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic and identification keys. **Brittonia**, Bronx, v. 49, n. 4, p. 508-536, Oct./Dec. 1997.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. p. 78, v. 1, 2000.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, 1954.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SIPA, 1956. 82 p. (Fascículo, 2).

McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p. 289-302.

McVAUGH, R. The genera of American Myrtaceae – An interim report. **Taxon**, Berlin, v. 17, p. 354- 418, 1968.

McVAUGH, R. Tropical American Myrtaceae. Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. **Fieldiana: Botany**, Chicago, v. 29, n. 3, p. 86, 1956.

MILES, D. H.; ROSA DEL MEDEIROS, J. M.; CHITTAGONG, V.; SWITENBANK, C.; LINDERT, Z.; WEEKS, J. A.; ATWOOD, J. L.; HEDIN, P. A. 3'-Formyl-2',4',6'- Trihydroxy-5''-methylhydrochalcone, A prospective New Agrochemical from *Psidium acutangulum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 53, n. 6, p. 1548-1551, Nov./Dec. 1990.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE . MMA. **Primeiro relatório Nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica: Brasil**. Brasília, 1998. 283 p.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES GIL, P.; MITTERMEIER, C. G. **Megadiversity: Earth. s biologically wealthiest nations**. CEMEX, Ciudad México: Conservation International, Agrupacion Sierra Madre, 1997. 501 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, St. Louis, v. 32, n. 4b, p. 793-810, Dec. 2000.

PÁDUA, M. T. J. Do Pronabio e do Funbio como mecanismos de implementação da Convenção sobre Biodiversidade. In: CORDANI, U. G.; MARCOVITCH, J.; SALATI, E. (Org.). **A Rio-92 cinco anos depois: avaliação das ações brasileiras em direção ao desenvolvimento sustentável cinco anos após a Rio-92**. São Paulo: Alphagraphics, 1997.

PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, P. D. de O.; DOMBROSKI, J. L. D.; SANTOS, R. S. Espécies frutíferas com potencial econômico: avanços no processo de propagação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 78-84, 2002.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PINOL, M. T.; PALAZÓN, J. **Fisiologia y bioquímica vegetal**. Madrid: McGraw Hill, 1993. 581 p.

REITZ, P.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 1988. 525 p.

RIZZINI, C. T. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, p. 381-402, 1970.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 237 pp. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, T. C. C.; CAMARA, J. B. D. (Org.). **GEO Brasil 2002**. Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil. Brasília: Edições IBAMA, 2002. 440 p.

SHEPHERD, G. J. **Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil. Relatório final para o projeto BRA97G31**. Avaliação do estado de conhecimento da diversidade biológica do Brasil., Ministério do Meio Ambiente. Brasília: SBF e PNUD, 2000. 63 p.

SILVA, S. R. **Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Fundação Pró-Natureza-FUNATURA, 1998.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA M. P.; FERREIRA C. F.; PAIVA S. A. V. de **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília – DF, 2001. 19 p. (Circular Técnica, n. 24).

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 11-20.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. ***In vitro Cellular & Developmental Biology***, Columbia, v. 32, p. 140-147, July/Sept. 1996.

VON BÜLOW, J. F. W.; CARMONA, R.; VAZ PARENTE, T. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado (*Eugenia calycina*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 961-970, jun. 1994.

CAPÍTULO II

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE UVAIEIRA E EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS *EX VITRO*

1 RESUMO

NASCIMENTO, Aline da Costa. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de uvaieira. In: **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. 2006. p.22 – 48. (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

As dificuldades encontradas no processo de propagação da uvaieira por meio de sementes indicam a cultura de tecidos como uma possível solução para os problemas encontrados na propagação dessa espécie. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da germinação de sementes de uvaieira em condições *in vitro* e *ex vitro*, tendo como precedente a obtenção de explantes para posterior utilização no cultivo *in vitro*. Neste estudo, foram avaliados diferentes formas de desinfestação de sementes, os efeitos de diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e GA₃ e de três níveis de pH e substratos na germinação. Frutos maduros foram coletados, passaram por processo de beneficiamento e tiveram suas sementes retiradas e utilizadas como explantes. Para avaliar a melhor forma de desinfestação de sementes, estas foram submetidas a dois testes de desinfestação: **T1**: foram imersas em álcool 70% por 60 segundos, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, por 20 minutos; **T2**: as sementes foram imersas em álcool 70% por 60 segundos, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, por 20 minutos, seus tegumentos foram retirados e novamente submergidas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, onde permaneceram por mais 20 minutos. As sementes foram inoculadas em meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1% de PVP. Para avaliação dos meios de cultura, as sementes foram submetidas ao teste 1 e inoculadas em frascos contendo os meios WPM e MS, acrescidos de 15 g L⁻¹ de sacarose. Para o efeito do GA₃ e da sacarose, foram testados seis níveis de GA₃ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg L⁻¹), na ausência e na presença de sacarose (15 g L⁻¹) no meio MS, acrescido de 0,1% de PVP. Também foram testados três níveis de pH (4,8, 5,8 e 6,8) no meio MS, suplementado com 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,1% de PVP, sendo observada a porcentagem de sementes germinadas. Para se testar os substratos areia, vermiculita e areia + vermiculita, as sementes foram colocadas a 1,0 cm de profundidade, em placas do tipo gerbox contendo 3 diferentes tipos de substratos: vermiculita, areia e areia + vermiculita na proporção de 1:1 (v/v). Após o período de 30 dias, a porcentagem de emergência de plântulas foi avaliada. Maior efetividade no processo de desinfestação de

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

sementes de uvaieira é obtida quando é realizada uma nova assepsia com hipoclorito de sódio após a retirada do tegumento das sementes. A concentração de sais nos meios WPM e MS limita a taxa de germinação, sendo maximizada quando estas são colocadas para germinar em meio MS. É dispensável o uso de GA₃ e recomendável a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose e germinação não é afetada pelo pH e pelo substrato. Maior vigor e maior velocidade no desenvolvimento de plantas são obtidos quando as sementes germinam nos substratos areia e vermiculita.

2 ABSTRACT

NASCIMENTO, Aline da Costa. Germination *in vitro* and *ex vitro* of uvaieira's seeds. In: **Uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) micropropagation**. 2006. p.22 – 48. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

Difficulties found in the process of uvaieira's propagation through seeds suggest tissue culture as a potential solution to the propagation problem existing in this specie. The objective of this paper is to study the uvaieira's seeds germination both *in vitro* and *ex vitro*, considering as precedent the explants first obtained from the cultivation *in vitro*. In this study, several aspects had been evaluated: different kinds of seeds disinfestation, the effects of different culture environments, concentrations of sucrose and GA₃, three levels of pH and substrates in germination. Mature fruits had been collected and passed through improvement process. Finally, their seeds had been collected and used as explants. Two tests had been carried out to evaluate the best method for seeds disinfestation. In T1 test, seeds had been immersed in 70 per cent alcohol for sixty seconds and after that in a Sodium hypochlorite solution (NaOCl) with 1% active chlorine for twenty minutes. In T2 test, seeds had been immersed in 70 per cent alcohol for sixty seconds and after that in a sodium hypochlorite solution (NaOCl) with 1% active chlorine for twenty minutes. Therefore, without teguments, they were submerged again in a sodium hypochlorite solution (NaOCl) with 1% active chlorine, where they remained for more twenty minutes. Seeds had been inoculated in the MS medium, supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose, 0,1% PVP. To evaluate the culture medium, they had been submitted to the test number one and inoculated in bottles containing WPM and MS medium, supplemented with 15 g L⁻¹ of sucrose. To evaluate the effects of GA₃ and sucrose, six levels of GA₃ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg L⁻¹) had been tested, both in the absence and presence of sucrose (15 g L⁻¹) in the MS medium, added with 0,1% of PVP. Three levels of pH (4,8, 5,8 and 6,8) had been also tested in the MS medium, supplemented with 15 g L⁻¹ of sucrose, supplemented with 0.1% of PVP. This evaluation took place at the thirtieth day, when the percentage of germinated seeds was observed. With the intention of testing the substrates sand, vermiculite and sand + vermiculite, the seeds had been placed, at 1.0 cm depth, in plastic pots (gerbox) containing 3 different kinds of substrates: vermiculite, sand and sand + vermiculite, in the ratio of 1:1 (v/v).

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser)

After 30 days, the percentage of plantules emergence was evaluated. More effectiveness in the uvaieira seeds disinfestation process is achieved when a new asepsis with sodium hypochlorite is accomplished, after the tegument of the seeds had been removed. The concentration of salts on WPM and MS medium limits the germination tax, which is maximized when the seeds are supposed to germinate in MS environment. The use of GA₃ was considered unnecessary, despite the fact that the addition of 15 g L⁻¹ of sucrose was considered recommendable. Vigor and quickness to the development of plants are better obtained when seeds germinate on sand and vermiculite substrates.

3 INTRODUÇÃO

A germinação é considerada um dos mais críticos estádios do desenvolvimento vegetal, sendo caracterizada por processos fisio-metabólicos de natureza complexa que levam à retomada do crescimento do eixo embrionário da semente e à protrusão da radícula no tegumento. Inicia-se com a absorção de água pela semente (embebição) e finaliza-se com o início da elongação do eixo embrionário, usualmente a radícula (Bewley & Black, 1994).

Santana (2003) comenta que a germinação é, basicamente, composta por três fases: embebição (quando acontece à reativação do metabolismo), indução de crescimento e protrusão da radícula.

Segundo Bewley & Black (1994), a embebição pode ser definida como o conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides e suas dimensões variam com a permeabilidade do tegumento, a composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente.

Conforme Borges & Rena (1993), para que ocorra a retomada do crescimento das estruturas essenciais do embrião, a semente deve estar madura, ser bem constituída, ter conservado o poder germinativo e, ao mesmo tempo, deve receber, do meio exterior, água e oxigênio em quantidade suficiente para assegurar um intenso metabolismo. Mayer & Poljakoff-Mayber (1989) afirmam que fatores, como composição química e balanço hormonal, influenciam sobremaneira o processo germinativo.

Uma possibilidade para a obtenção de plantas matrizes, para serem usadas como fonte de explantes em experimentos de cultura de tecidos, é a germinação *in vitro*. Quando o estabelecimento da cultura via material oriundo do campo ou de casa de vegetação traz o problema da contaminação endógena

severa, esta pode ser a única fonte de material asséptico. Segundo Gricoletto (1997), a obtenção dos explantes a partir de plântulas de sementes germinadas *in vitro* evita a contaminação do material vegetal e a baixa resposta morfogenética dos tecidos arbóreos adultos.

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.), popularmente denominada uvaieira, uvalha ou uvalheira, cuja sinonímia é *Pseudomyrcianthes pyriformis* (Camb.) Kaus, é uma espécie de hábito arbóreo mediano, de ocorrência no Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais, com grande potencial ornamental devido à coloração prateada de suas folhas, ao crescimento relativamente rápido e à frutificação precoce. Possui copa alongada formada pela folhagem serícea, associada às abundantes flores brancas e frutos grandes de cor amarela ou alaranjada, formando um conjunto muito atraente (Reitz et al., 1988). É uma espécie altamente valiosa pela sua madeira dura, resistente às doenças, frutos comestíveis apreciados pelo homem e pela avifauna, úteis à industrialização na produção de licor e outros produtos (Mattos, 1956).

A duração das sementes de uvaieira é curta e a semeadura deve ser realizada logo após a coleta para não perder o poder germinativo (Mattos, 1956 e Reitz et al., 1988). Em geral, condições de baixa temperatura e umidade são as mais recomendadas para armazenar sementes (Vertucci & Roos, 1993). Entretanto, existem exceções entre as espécies que não permitem generalizar sobre o estabelecimento de protocolos para o armazenamento de sementes sem uma prévia avaliação de determinadas características físicas e fisiológicas das sementes.

Silva et al. (2003) comentam também que ainda há dificuldades na produção de mudas de *Eugenia pyriformis* pela carência de sementes, uma vez que cada fruto apresenta apenas uma ou duas sementes. Além disso, na literatura, só foram encontrados registros de pomares experimentais, mas nenhum implantado para a produção de sementes ou para a produção comercial

de frutos. Além disso, há poucas sementes por fruto (Mattos, 1954) e a dificuldade na produção de mudas é ainda maior pela falta de tecnologia que permita maximizar o uso das sementes, principalmente quanto à sua conservação e à multiplicação. Sementes de várias espécies de *Eugenia* apresentam baixa longevidade natural (Gentil & Ferreira 1999; Rizzini 1970, Von Bülow et al., 1994). A longevidade natural das sementes de *E. pyriformis*, contudo, ainda é curta. Essas características tornam necessários estudos para maximizar o uso das sementes que se obtêm a cada safra.

O curto período de armazenamento de sementes de uvaieira se torna um fator limitante para a propagação sexuada da espécie, exigindo rápida semeadura, a fim de evitar grandes perdas na capacidade de germinação. Uma ferramenta que vem sendo amplamente utilizada para a propagação de espécies lenhosas que apresentam dificuldade de germinação é a cultura de tecidos, que pode propiciar a produção de mudas de forma efetiva. Assim, a cultura de tecidos se torna uma opção real para se tentar propagar a uvaieira.

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 1996).

Amador & Stewart (1987), trabalhando com germinação *in vitro* de várias espécies lenhosas, obtiveram sucesso no controle do potencial osmótico do meio de cultura, utilizando diferentes concentrações de sacarose.

Segundo Souza (2003), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Porém, pode ser que, ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, consiga-se manter a plântula *in vitro* por um período de tempo maior.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (Murashige & Skoog,

1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Para lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos e composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor desempenho (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio nutritivo WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980), por exemplo, apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (Pasqual, 2001).

O pH é considerado um fator crítico do meio de cultura (Murashige, 1974), influenciando na disponibilidade de nutrientes, de fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (Grattapaglia & Machado, 1990). Usualmente, é ajustado numa faixa que varia de 5,0 a 6,5 (Pierik, 1987), para o crescimento adequado da maioria das espécies; em níveis inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, geralmente ocorre paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (Murashige, 1974).

A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é também importante na regulação da germinação *in vitro*. Sabe-se, hoje, que as giberelinas têm um papel chave neste processo, estando envolvidas tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento.

Enquanto, para diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência, para outras, elas apresentam pequena resposta ou nenhum efeito. Carvalho (1997) observou que o ácido giberélico não contribuiu para acelerar a germinação *in vitro* de sementes de cafeeiro e o desenvolvimento final das mudas.

Como pouco ainda se conhece sobre os aspectos da germinação *in vitro* e *ex vitro* de uvaieira, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da

germinação de sementes de uvaieira nessas condições, tendo como precedente a obtenção de explantes para posterior utilização no cultivo *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2 Material vegetal

Frutos maduros de uvaieira foram coletados de populações naturais localizadas no município de Barbacena, estado de Minas Gerais, em agosto de 2005, acondicionados em caixas de isopor e trazidos para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA. Cerca de 24 horas após a coleta, as sementes foram despulpadas e lavadas.

4.3 Germinação *in vitro*

4.3.1 Desinfestação de sementes

Após serem retiradas dos frutos, sementes de uvaieira foram lavadas em água corrente e submetidas a dois testes de desinfestação, descritos a seguir: **T1:** em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70%, por 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 1% de cloro ativo por 20 minutos. Ao final deste tempo, foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada; **T2:** as sementes foram imersas em álcool 70%, por 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 1% de cloro ativo por 20 minutos. Ao final deste tempo, as

sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada, tendo seus tegumentos retirados e novamente submergidas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, onde permaneceram por mais 20 minutos e, então, foram submetidas à nova lavagem em água destilada e autoclavada.

Ao final desses tratamentos, as sementes foram inoculadas em frascos contendo o meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1% de PVP e solidificados com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes sadias em cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo 20 repetições, sendo cada uma composta por 2 sementes. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5%.

4.3.2 Meios de cultura

Retiradas dos frutos, as sementes, após passarem por um período de secagem à sombra, foram levadas à câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70%, por 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos. Ao final deste tempo, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada, seus tegumentos foram retirados e novamente foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 1% de cloro ativo, onde permaneceram por mais 20 minutos e, então, foram submetidas à nova lavagem em água destilada e autoclavada.

Desinfestadas, as sementes foram inoculadas em frascos contendo os meios de cultura WPM e MS, acrescidos de 15 g L^{-1} de sacarose e solidificados com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protruída.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 25 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um vidro contendo duas sementes. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

4.3.3 GA₃ e sacarose

O processo de assepsia das sementes foi semelhante ao descrito no item 4.3.2.

Foram testados seis níveis de GA₃ (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg L^{-1}), na ausência e na presença de sacarose (15 g L^{-1}), no meio de cultura MS, acrescido de 0,1% de PVP e solidificado com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

Após a inoculação em frascos, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes sadias germinadas em cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada repetição composta por 1 frasco e cada frasco contendo duas sementes. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

4.3.4 pH

O processo de assepsia das sementes foi semelhante ao descrito no item 4.3.2.

Foram testados três níveis de pH (4,8, 5,8 e 6,8) no meio de cultura MS, suplementado com 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,1% de PVP e solidificado com ágar 0,7%.

Após a inoculação, as sementes foram transferidas para sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protruída.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um frasco e cada frasco contendo duas sementes. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

4.4 Germinação *ex vitro*

4.4.1 Substratos

Após a retirada manual do tegumento e estarem devidamente secas, as sementes foram colocadas a 1,0 cm de profundidade, em placas do tipo gerbox

contendo 3 diferentes tipos de substratos: vermiculita, areia e areia + vermiculita na proporção de 1:1 (v/v). Cada tratamento foi constituído de 4 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa contendo 9 sementes.

Após o período de 30 dias em casa de vegetação, sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiância de $67\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, a percentagem de emergência de plântulas foi avaliada em cada placa.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação *in vitro*

5.1.1 Desinfestação de sementes

A análise de variância das diferentes formas de desinfestação de sementes testadas mostrou-se significativa entre os tratamentos, considerando-se um nível de significância fixado em 5%.

De acordo com esses resultados, verifica-se a eficiência do álcool 70% e do hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes, concordando com os resultados obtidos por Bonga & Aderkas (1992).

Teixeira (2004) relata que, para o controle da contaminação no estabelecimento *in vitro*, além do álcool, o hipoclorito de sódio pode ser utilizado na concentração de 0,5% a 2% de cloro ativo, por um período de 5 a 20 minutos.

A utilização de hipoclorito de sódio, após a retirada do tegumento, proporcionou a obtenção de 85% de sementes livres de contaminação, demonstrando ser este o tratamento mais eficiente no processo de desinfestação (Tabela 1).

TABELA 1. Percentagem de sementes de uvaieira sadias germinadas nos tratamentos realizados com assepsia sem retirada do tegumento da semente (T1) e com nova assepsia após a retirada do tegumento da semente (T2). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tratamentos	Sementes sadias (%)
T1	25 b
T2	85 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na ausência de nova assepsia com hipoclorito de sódio, após a retirada do tegumento, ocorreu elevada percentagem de sementes de uvaieira contaminadas (75%), principalmente por fungos. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a realização de uma nova assepsia com hipoclorito de sódio, após a retirada do tegumento das sementes, pode reduzir em até 75% a probabilidade de contaminação.

As menores taxas de contaminação observadas em decorrência de nova assepsia com hipoclorito de sódio após a retirada do tegumento podem ser atribuídas a uma maior efetividade na eliminação dos contaminantes, uma vez que a presença do tegumento não permite um contato direto dos desinfestantes com a superfície das sementes, resultando na ineficiência do processo e garantindo a persistência de bactérias e fungos.

Vários autores relatam o uso de álcool etílico 70% concomitantemente com o hipoclorito de sódio, com sucesso, para a desinfestação de diferentes explantes. Santana (2003) utilizou álcool etílico 70%, por 30 segundos, combinado com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), por 15 minutos, para desinfestar e estabelecer *in vitro* explantes foliares de *Annona cauliflora*,

Annona bahiensis e *Annona glabra*. Cerqueira et al. (2002) utilizaram álcool etílico 70%, por 30 segundos e hipoclorito de sódio comercial a 30%, por 10 minutos, para a obtenção de explantes foliares desinfestados de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.). Suzuki et al. (2002) utilizaram hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), por um período de 10 minutos, para desinfestar explantes foliares de liliacea ornamental (*Agapanthus praecox* ssp.) e Tsuru et al. (2000), para a indução de calos em explantes foliares de *Lavandula Vera*, utilizaram o álcool etílico 70%, por 1 minuto e o hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), por 20 minutos, para desinfestar os explantes.

5.1.2 Meios de cultura

A percentagem de sementes germinadas nos meios de cultura WPM e MS comportou-se de forma diferenciada, mostrando a superioridade do meio MS para a germinação de sementes de uvaieira, de acordo com as médias obtidas pelo teste de Tukey, a 5%, como pode ser observado na Tabela 2.

TABELA 2. Percentagem de sementes de uvaieira germinadas *in vitro* quando estas foram submetidas a diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Meio de cultura	Germinação (%)
Meio MS	88 a
Meio WPM	68 b

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Vários autores afirmam que a elevada concentração de sais do meio MS não tem apresentado resultados favoráveis ao processo de germinação de

sementes, contrariando o resultado obtido no presente trabalho. Grattapaglia & Machado (1990) afirmam que o meio MS completo não tem se mostrado satisfatório para espécies lenhosas e que composições mais diluídas, como as do meio WPM, podem apresentar melhores resultados.

Contrariamente ao resultado obtido, Bertoni et al. (2002) confirmam a eficiência do meio WPM na germinação de sementes de *Zeyheria montana* Mart., uma espécie medicinal do Cerrado. Os autores reportam que a utilização desse meio promoveu um bom desenvolvimento das plântulas e favoreceu o estabelecimento do protocolo de propagação *in vitro* da espécie destacando a importância de uma menor pressão osmótica proporcionada pela menor concentração.

Podem-se visualizar, na Figura 1, sementes de uvaieira germinadas *in vitro* em meio MS.



FIGURA 1. Plântulas de uvaieira oriundas de sementes germinadas em meio MS.UFLA, Lavras, MG, 2005.

5.1.3 GA₃ e sacarose

No cultivo *in vitro* de uvaieira, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de germinação, quando as sementes foram submetidas a diferentes concentrações de ácido giberélico e sacarose (Tabela 3).

TABELA 3. Percentagem de sementes de uvaieira germinadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose e de ácido giberélico (GA₃). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tratamentos	GA ₃ (mg L ⁻¹) e sacarose (g L ⁻¹)	Germinação (%)
T ₁	0,0 – 0,0	80 a
T ₂	0,0- 15,0	100 a
T ₃	0,2 - 0,0	100 a
T ₄	0,2 - 15,0	60 a
T ₅	0,4 - 0,0	100 a
T ₆	0,4 -15,0	80 a
T ₇	0,6 – 0,0	100 a
T ₈	0,6 – 15,0	80 a
T ₉	0,8 – 0,0	100 a
T ₁₀	0,8 – 15,0	80 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A menor percentagem de sementes germinadas (60%), embora não significativa, foi observada na presença de sacarose e GA₃ no tratamento 4, podendo não estar relacionado à suplementação fornecida pelo meio de cultura, mas, possivelmente, a uma menor viabilidade das sementes utilizadas nesse tratamento. Resultados discordantes foram obtidos por Azevedo (2003) que obteve as maiores percentagens de germinação *in vitro* de sementes de copaíba

(*Copaiba langsdorffii*) em meio de cultura MS desprovido de sacarose. Resultados semelhantes também foram obtidos em sementes de *Annona glabra* (Deccetti, 2000).

A adição de ácido giberélico (GA_3) e sacarose ao meio de cultura não interferiu na germinação, uma vez que, no tratamento 1, a ausência destes proporcionou uma boa percentagem de sementes germinadas (80%). No entanto, apesar deste resultado não ser significativo, os tratamentos 3, 5, 7 e 9, realizados na ausência de sacarose e em concentrações crescentes de ácido giberélico (0,2 mg L⁻¹, 0,4 mg L⁻¹, 0,6 mg L⁻¹ e 0,8 mg L⁻¹, respectivamente), promoveram 100% de germinação, discordando apenas do tratamento 2 em que, na ausência de ácido giberélico, 100% das sementes germinaram na presença de 15 g L⁻¹ de sacarose. Estes resultados sugerem que é economicamente viável acrescentar ao meio de cultura apenas 15 g L⁻¹ de sacarose para promover 100% de germinação, levando à redução dos custos sem afetar ou afetando pouco o potencial osmótico do meio e prejudicar o processo germinativo de uvaieira. Segundo George (1996), concentrações elevadas de sacarose podem tornar a água do meio de cultura indisponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início da germinação.

Estes resultados concordam com Pinheiro et al. (2001) e Soares (2005) que verificaram que as maiores taxas de germinação de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*) foram encontradas quando se utilizaram baixas concentrações de sacarose.

Gmitter (1986) e Rangaswamy (1963) obtiveram um significativo aumento na percentagem de germinação, variando concentrações de sacarose no meio de cultura em *Orabanche* e *Citrus*, respectivamente. Resultados semelhantes também foram observados por Komatsuda (1992), em seus trabalhos com várias espécies lenhosas.

Gomes (1999) obteve maior percentagem de germinação de sementes de moreira (*Maclura tinctoria*) em meios suplementados com sacarose, porém, em menores concentrações. Pereira (2004), trabalhando com unha-de-gato (*Uncaria guaniensis*), também obteve percentuais de germinação de 100% quando as sementes foram submetidas a 15 g L⁻¹ de sacarose.

5.1.4 pH

A percentagem de germinação de sementes de uvaieira foi semelhante nos diferentes valores de pH testados (Tabela 4), demonstrando a não significância dos tratamentos.

Os resultados obtidos corroboram com Soares (2005) que, trabalhando com mangabeira, também constatou que as sementes dessa espécie germinam independentemente dos valores de pH utilizados.

Elevada percentagem de germinação também foi obtida por Therios (1982), que constatou que sementes de *Prunus amygdalus* germinam em ampla faixa de pH, sem apresentar diferenças percentuais significantes.

Mesmo não ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos realizados, os maiores percentuais de germinação foram obtidos quando o valor de pH foi igual a 5,8. Huxley (1964) comenta que a germinação de sementes de muitas espécies não é dependente do pH, dentro dos limites fisiológicos. Sabe-se, no entanto, que ele é um fator controlador das vias metabólicas e da permeabilidade das membranas celulares, uma vez que afeta inúmeras reações enzimáticas (Davis, 1980).

TABELA 4. Percentagem de sementes de uvaieira germinadas *in vitro*, quando estas foram submetidas a diferentes níveis de pH. UFLA, Lavras, MG, 2005.

pH	Germinação (%)
4,8	80 a
5,8	100 a
6,8	75 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5.2 Germinação *ex vitro*

5.2.1 Substratos

No cultivo *in vitro* de uvaieira, não foram observadas diferenças significativas referentes à percentagem de emergência de plântulas germinadas nos diferentes substratos testados (Tabela 5).

TABELA 5. Percentagem de emergência de plântulas de uvaieira germinadas em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Substratos	Emergência (%)
Vermiculita	52,75 a
Areia	55,5 a
Areia + Vermiculita	55,5 a

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Apesar das diferenças entre os tratamentos não terem sido significativas, os maiores percentuais de emergência (55,5%) foram obtidos nos substratos areia (55,5%) e areia + vermiculita (55,5%), provavelmente por estes reunirem características necessárias a um bom substrato, como, por exemplo, porosidade adequada.

A porosidade ideal do substrato é aquela que permite o movimento de água e ar, favorecendo a germinação. Para que isso ocorra, as sementes não necessitam de nutrientes, mas apenas de hidratação e aeração, para que se procedam as reações que induzem à formação do caulículo e da radícula. Sendo assim, o substrato utilizado deve sempre manter proporção adequada entre a disponibilidade de água e a aeração, não podendo ser umedecido em excesso para evitar que a película de água envolva completamente a semente, restringindo a entrada e a absorção de oxigênio (Villagomez et al., 1979).

Nogueira et al. (2003) e Soares (2005) observaram também maior percentual de germinação de sementes de mangabeira no substrato areia.

O aspecto visual das plântulas de uvaieira oriundas da germinação nos diferentes substratos pode ser observado na Figura 2, na qual se pode perceber também que houve um desenvolvimento normal destas plântulas quanto aos caracteres morfológicos e que as mudas germinadas nos substratos areia e vermiculita apresentam um maior vigor do que aquelas germinadas no substrato areia + vermiculita. Além disso, pode ser observado que o desenvolvimento das plantas nos substratos areia e vermiculita foi superior.



FIGURA 2. Aspecto visual das plantas de uvaieira oriundas da germinação em vermiculita (A); areia (B) e areia + vermiculita (C). UFLA, Lavras, MG, 2005.

6 CONCLUSÕES

Maior efetividade no processo de desinfestação de sementes de uvaieira é obtida quando é realizada uma nova assepsia com hipoclorito de sódio após a retirada do tegumento das sementes, proporcionando 85% de explantes saudáveis.

A concentração de sais nos meios de cultura WPM e MS limita a taxa de germinação das sementes de uvaieira, sendo essa maximizada quando as sementes são colocadas para germinar em meio MS.

Para a germinação de sementes de uvaieira, é dispensável o uso de GA₃ e recomendável a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose.

Não há influência do pH e do substrato na germinação de sementes de uvaieira.

Maior vigor e maior velocidade no desenvolvimento de plantas são obtidos quando as sementes germinam nos substratos areia e vermiculita.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BONGA, J. M.; VON ADEKAS, P. ***In vitro* culture of tree**. The Netherlands: Kluwer Academic Publish, 1992. 236 p. (Forestry Science, v. 38).

CARVALHO, G. R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro***. 1997. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. D. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar./abr. 2002.

DAVIS, D. D. **Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 2, p. 581-611.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 29, n. 1, p. 21-31, mar. 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - The technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GMITTER JUNIOR, F. G.; MOORE, G. A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination, and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 139-147, 1986

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 99-169.

GRICOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomes** (Mangabeira). 1997. 76 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Brasília, Brasília.

HUXLEY, P. A. The effects of hydrogen-ion concentration temperature and seed drying method on the germination of coffee seeds. **Proceedings of the International Seed Test Association**, Wallingford, v. 29, p. 61-70, 1964.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, 1954.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SIPA, 1956. 82 p. (Fascículo, 2).

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 210 p.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B. de; JUNIOR, J. F. S. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 15-18, abr. 2003.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PEREIRA, R. C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento de biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & Schultes DC e *Uncaria gunaniensis* (Aublet) Gmelin (Unha de Gato)**. 2004. 186 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344 p.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACEDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

REITZ, P.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 1988. 525 p.

RIZZINI, C. T. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, p. 381-402, 1970.
SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. – Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221, maio/jun. 2003.

SOARES, Fernanda Pereira. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUZUKI, S.; OOTA, M.; NAKANO, M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* spp. *Orientalis* (Leighton) Leighton Histological study and response to selective agents. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 123-132, Aug. 2002.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. EMBRAPA - DF. Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc.2001/simposios/s-/joao%20batista%20teixeira./palestra%20joao%20batista%20teixeira>> Acesso em: 17 out. 2004.

THERIOS, I. N. Effects of temperature, moisture stress and pH on the germination of seeds of almond (*Prunus amygdalus*). **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 10, n. 3, p. 585-594, 1982.

TSURO, M.; KODA, M.; INOUE, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derives callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 81-88, Sept. 2000.

VILLAGOMEZ, A. Y.; VILLASENOR, R. R.; SALINAS, M. J. R. **Lineamento para el funcionamiento de um laboratório de semillas**. México: INIA, 1979. 128 p.

VON BÜLOW, J. F. W.; CARMONA, R.; VAZ PARENTE, T. Armazenamento e tratamento de sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado (*Eugenia calycina*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 961-970, jun. 1994.

CAPÍTULO III

EFEITO DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES CAULINARES DE UVAIEIRA

1 RESUMO

NASCIMENTO, Aline da Costa. Efeito do BAP na indução de brotações em explantes caulinares de uvaieira. In: **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. 2006. p. 49-65. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A uvaieira se destaca por possuir um grande potencial como planta frutífera e propriedades para ser explorada como ornamental e na revegetação de áreas degradadas. Suas sementes apresentam recalcitrância, dificultando sua propagação. O presente trabalho testou uma metodologia de indução de brotações em explantes caulinares de uvaieira. Segmentos caulinares provenientes de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,7. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados o número médio de brotos, folhas e gemas por explante e o comprimento da maior brotação. O regulador de crescimento BAP não foi efetivo na formação de brotações. Mesmo não sendo significativo estatisticamente, o maior número médio de folhas, gemas, comprimento das maiores brotações bem como maior número de brotos, foram obtidos no tratamento suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

2 ABSTRACT

NASCIMENTO, Aline da Costa. Effect of BAP induction of shoots on nodal segments of uvaieira In: **Uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) micropropagation**. 2006. p.49 – 65. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The uvaieira stands itself out by three main reasons: beyond its great potencial as a fructiferous plant, it has also properties as an ornamental plant and in the revegetation of degraded areas. However, seed's recalcitrance make its propagation harder. The present work has tested a methodology of shoots induction in stem explants of uvaieira. Stem segments taken from plantules germinated *in vitro* had been inoculated in WPM medium, supplemented with different concentrations of BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30,0 g L⁻¹ of sucrose and 7,0 g L⁻¹ of agar. The pH had been corrected to 5,7. After sixty days of growth, some aspects were evaluated: average number of shoots, leaves and gemmas for explant and the length of the longest shoot. The BAP growth regulator had not been effective in generate shoots. Even though the greatest values achieved for the average number of shoots, leaves, gemmas and for the length of the longest shoots had not been statistically meaningful, they were obtained in a treatment supplemented with 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser)

3 INTRODUÇÃO

Dentre os vários biomas existentes no Brasil, a mata atlântica ocupa, atualmente, o 5º lugar entre os biomas mais ameaçados do mundo. Dados recentes (Fundação SOS mata atlântica et al., 1998) estimaram que apenas 8% da área original da mata atlântica ainda persiste em manchas isoladas (Conservation International et al., 2000). Esse bioma é o recordista mundial de diversidade de plantas lenhosas, com 458 espécies encontradas em um único hectare, na região sul da Bahia. Uma das famílias que mais se destacam por sua riqueza de espécies, além da importância econômica, devido à potencialidade de vários representantes serem utilizados na alimentação, no fornecimento de madeira, além de possuírem propriedades para serem explorados como ornamentais, é a família Myrtaceae, na qual se insere a uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess).

O uso de espécies frutíferas nativas em programas de revegetação de áreas degradadas, como fonte de alimento e geradora de renda, requer uma produção de mudas contínua e em grande escala. Entretanto, várias espécies apresentam dificuldades de propagação por sementes, tornando necessária a obtenção de mudas por via assexuada.

A duração das sementes de uvaieira é curta e a semeadura deve ser realizada logo após a coleta, para não perder o poder germinativo (Mattos, 1956 e Reitz et al., 1988).

Técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas principalmente quando a propagação sexuada é insatisfatória, quando a progênie obtida é muito heterogênea ou em casos em que a propagação por sementes não ocorre naturalmente. Na multiplicação *in vitro* há grande economia de tempo e possibilidade de produção de clones promissores e livres de patógenos por meio de cultura de meristemas (George, 1993; Pierik, 1990).

A micropropagação de plântulas *in vitro* pode ser feita por brotos apicais ou axilares. Os brotos axilares são aqueles que emergem em suas posições normais, nas axilas das folhas, ao passo que os brotos apicais são os que ocupam a extremidade apical (Mantell et al., 1994).

Durante o desenvolvimento de um organismo, o processo de diferenciação celular reflete o efeito de, pelo menos, três fatores: o fator genético, as características originadas durante a ontogênese e as características cuja expressão dependem apenas do ambiente (Kerbaudy, 1999).

Em vários tecidos cultivados tem apresenta importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e ou radiculares (Kerbaudy, 1999). Os reguladores de crescimento exercem sua ação após o reconhecimento por receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra et al., 1999).

As citocininas constituem a classe dos reguladores de crescimento mais utilizados na fase de multiplicação, pelo seu efeito na quebra da dominância apical e na indução da proliferação de gemas axilares. Utilizam-se diversas citocininas ou substâncias de ação semelhantes à citocinina, tais como benzilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2iP), cinetina (KIN), thidiazuron (TDZ), entre outros. Apesar de não serem essenciais, as auxinas podem ser adicionadas ao meio nessa fase para favorecer o desenvolvimento da parte aérea. O ácido naftalenoacético (ANA) é a auxina mais utilizada nessa fase, além de outras, como o ácido indolbutírico (AIB). Auxinas mais potentes, como o 2,4-D e o picloram não são utilizadas nessa fase, a menos que seja desejável a formação de calo (Hoffmann et al., 1998).

Grattapaglia & Machado (1998) comentam que, das citocininas comercialmente disponíveis, a BAP é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo

utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo, seguida da cinetina KIN, com cerca de 23%.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação, estudando o efeito da adição de BAP na promoção da organogênese direta em segmentos caulinares de uvaieira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos caulinares de uvaieira, contendo até duas gemas laterais, foram retirados de plântulas obtidas da germinação *in vitro* com 90 dias de idade e inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 1,5g L⁻¹ de carvão ativado, 3% de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura e seu pH ajustado para 5,7, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram transferidos para sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. Foram avaliados o número médio de brotos, folhas e gemas por explante e o comprimento da maior brotação, aos 60 dias de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo um explante. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Teste de Tukey, com significância fixada em 5%

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Número de brotos por explante

Não foram observadas diferenças significativas para o número médio de brotos quando os explantes foram submetidos às diferentes concentrações de BAP testadas.

As médias obtidas pela influência de BAP na indução de brotações em segmentos caulinares de uvaieira podem ser analisadas na Figura 1. Como se pode observar, houve formação de brotações em todos os tratamentos testados, mesmo na ausência do regulador de crescimento.

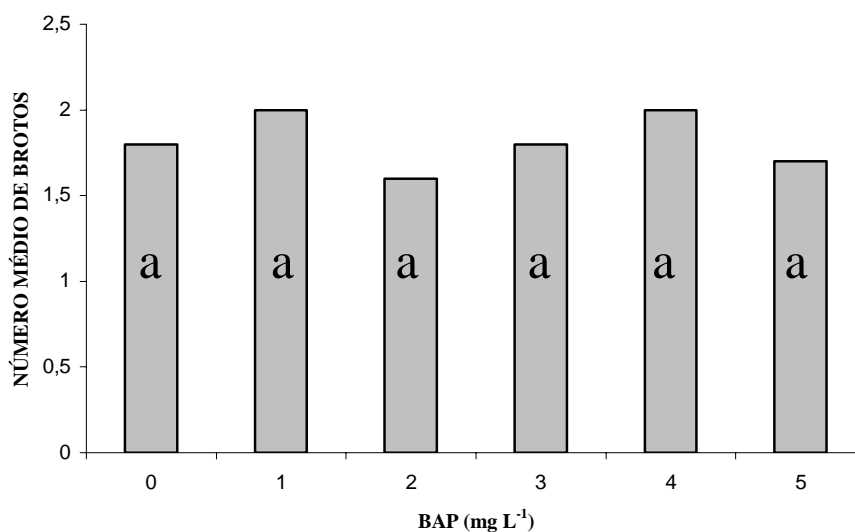


FIGURA 1 Número médio de brotos em explantes caulinares de uvaieira inoculados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2006.

De acordo com Preece (1995), as citocininas têm função primordial na divisão celular e atuam também na quebra da dominância apical e na indução e crescimento de brotações. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam, ainda, que o tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Apesar dos resultados não terem sido significativos entre as concentrações de BAP testadas, observa-se que, para o número médio de brotos, os tratamentos que se destacaram foram aqueles que utilizaram 1,0 e 4,0 mg L⁻¹. Recomenda-se para essa espécie, o uso de 1 mg L⁻¹ de BAP para a indução de brotações, uma vez que esta concentração foi eficiente, levando a uma redução de custos; além disso concentrações elevadas podem gerar desequilíbrio no balanço hormonal, prejudicando mecanismos celulares e culminando com o desenvolvimento anormal de plântulas e, até mesmo, problemas de toxidez.

O excesso tóxico de citocininas pode gerar, principalmente, demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, levando a sérios problemas na fase de enraizamento. Além disso, alguns autores citam também que o excesso de BAP inibe brotações, reduz drasticamente partes aéreas e pode promover a formação de calos.

O efeito das citocininas pode apresentar-se também de maneira residual de uma subcultura para outra. Esse efeito residual torna-se negativo quando afeta o alongamento, limita o enraizamento e diminui a capacidade de sobrevivência durante a aclimatização, reforçando ainda mais o uso de menores concentrações de citocininas, recomendando para a uvaieira o uso de 1 mg L⁻¹ de BAP para a indução de brotações, a fim de se minimizar ou até mesmo eliminar os possíveis efeitos citados.

Soares (2005) também observou a maior média no número de brotos para explantes cultivados na concentração mais elevada de BAP ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) em experimentos realizados com mangaba, ao passo que Nogueira (2003) concluiu que concentrações acima de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ dessa citocinina não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

Com os resultados encontrados para a indução de brotações em segmentos nodais de salix (*Salix humboldtiana* Willd.), em função da utilização de BAP, Santos (2001) também obteve maior número de brotações ao utilizar 1 mg L^{-1} de BAP. Chitra & Padmaja (1999) encontraram respostas semelhantes ao induzirem brotações em ápices caulinares de amora (*Morus indica* L. cultivar M-5), obtendo, como melhor resultado, a utilização de BAP nas concentrações de $0,5$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

O aspecto das brotações de uvaieira obtidas *in vitro* pode ser observado na Figura 2.

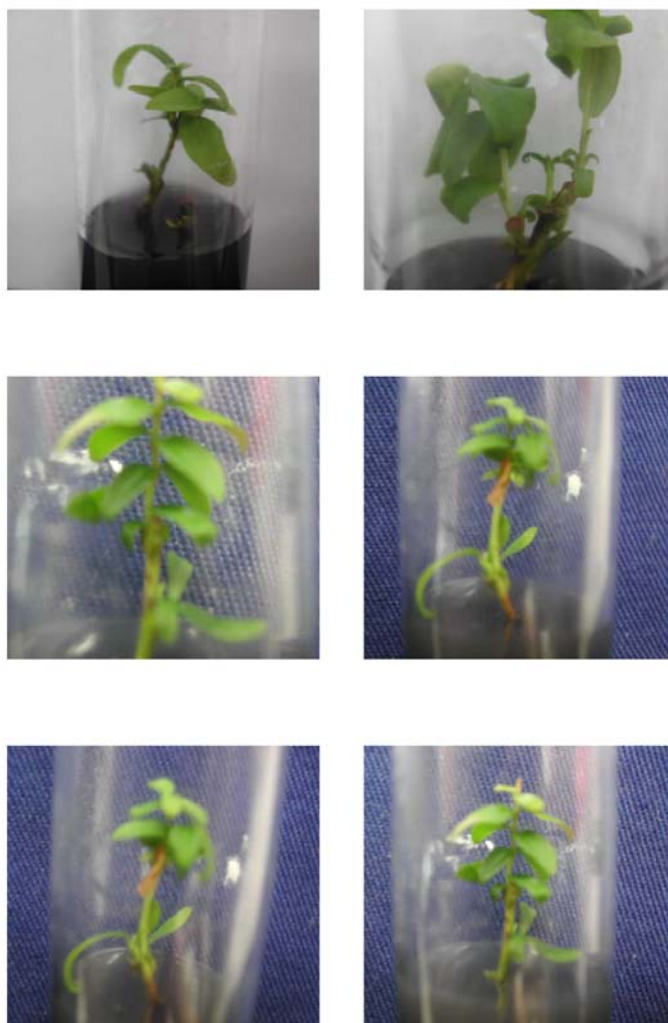


FIGURA 2. Aspecto visual de brotações de uvaieira obtidas de segmentos caulinares inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.2 Número de gemas por explante

Não foram observadas diferenças significativas no número médio de gemas quando os explantes foram submetidos às diferentes concentrações de BAP (Figura 3)

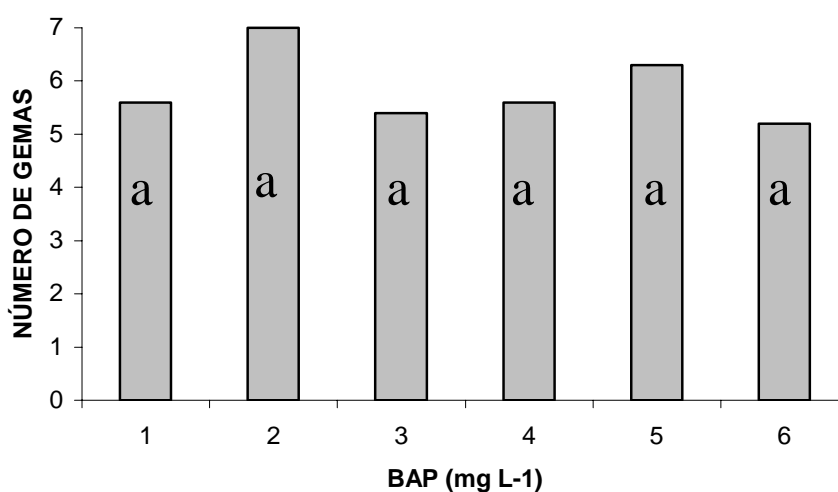


FIGURA 3. Número médio de gemas obtidos em diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio WPM. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Embora sem diferenças significativas, o maior número de gemas foi verificado na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP (7,0 gemas por explante).

Santos (2004), ao induzir brotações em segmentos nodais de pequiheiro, também verificou um maior número de gemas na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

5.3 Tamanho da maior brotação

O efeito das diferentes concentrações de BAP sobre o tamanho da maior brotação formada foi não significativo.

O maior comprimento médio das maiores brotações (1,14 cm), apesar de não significativo, foi verificado também no tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de BAP (Figura 4). Acima dessas concentrações, houve uma tendência de redução no tamanho dos brotos formados.

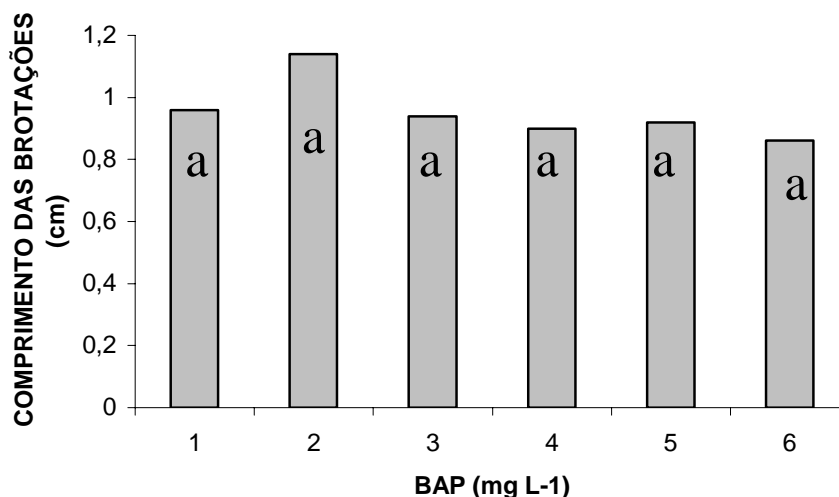


FIGURA 4. Comprimento das brotações em explantes caulinares de uvaieira obtidos em diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio WPM. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Chitra & Padmaja (1999) encontraram respostas semelhantes ao induzirem brotações em ápices caulinares de amoreira (*Morus indica* L. cultivar M-5), obtendo, como melhor resultado, a utilização de BAP nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. Também concordam com esses resultados os experimentos

realizados por Santos (2004), ao induzir brotações em segmentos nodais de pequiizeiro e Soares (2005), em experimentos realizados com mangabeira. Ambos obtiveram os melhores resultados quando utilizaram BAP nas concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Os trabalhos de Silveira et al. (1996), porém, discordam desses resultados. Trabalhando com sucupira-preta (*B. virgilioides*), observaram que segmentos caulinares dessa espécie, quando inoculados em meio de cultura suplementado com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, produziam, em média, 10 brotos de 10 mm de comprimento, enquanto que em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, o mesmo tipo de explante produzia quatro brotos de 23 mm de comprimento cada, sugerindo o uso de concentrações mais elevadas de citocinina.

Pasqual (2001) afirma que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a ocorrência de hiper-hidricidade e formação de folhas anormais.

Grattapaglia & Machado (1998) relatam que a tendência de diminuição do comprimento de brotações a partir de determinada concentração pode decorrer de um possível efeito fitotóxico da citocinina. Para Narayanaswamy (1977), a toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a eles, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento.

5.4 Número de folhas

Não foram observadas diferenças significativas nas taxas referentes ao número médio de folhas nas diferentes concentrações de BAP testadas (Figura 5).

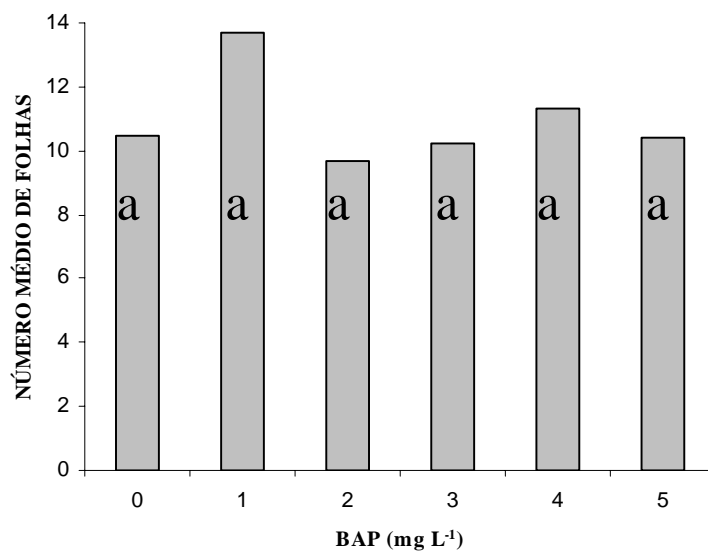


FIGURA 5. Número médio de folhas em explantes caulinares de uvaieira inoculados em meio WPM contendo diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Mesmo não sendo significativo estatisticamente, a maior média referente ao número de folhas (13,7) foi também encontrada no tratamento suplementado com BAP, na concentração de 1,0mg L⁻¹. Este resultado discorda de Santos (2004) que, em experimentos realizados com pequiheiro, obteve maior número de folhas na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

6 CONCLUSÕES

O regulador de crescimento BAP não foi efetivo na formação de brotações em explantes caulinares de uvaieira.

Mesmo não sendo significativo estatisticamente, o maior número médio de folhas e gemas e o comprimento das maiores brotações, bem como maior número de brotos foram obtidos no tratamento suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHITRA, D. S. V.; PADMAJA, G. Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) thorooung *in vitro* culturae of nodal explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 80, n. 3/4, p. 289-298, Apr. 1999.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS; INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS; SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO; SEMA/INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS-MG. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidadeda Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA/SBF, 2000.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS & INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995**. São Paulo: SOS Mata Atlântica, INPE, ISA, 1998.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. London: Exegetics, 1993. pt 1, 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações na propagação de**

plantas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 130p. (Curso de Pós-graduação: “Lato Sensu” Especialização a Distância: Cultura de Tecidos Vegetais _ Tecnologia e Aplicações).

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 519-531.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344 p.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SIPA, 1956. 82 p. (Fascículo, 2).

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 179-248.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B. de; JUNIOR, J. F. S. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 15-18, abr. 2003.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins Nijoff, 1990. 326 p.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovet, v. 1, n. 1, p. 26-37, 1995.

REITZ, P.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 1988. 525 p.

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em *Salix* (*Salix humbolditiana* Willd.)**. 2001. 89 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, B. R. **Otimização da propagação *in vitro* de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2004. 239 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVEIRA, C. E.; CALDAS, L. S.; AMARAL, L. I. V. Efeito de 6-benzilaminopurina na proliferação *in vitro* de brotos de *Bowdichia virgilioides* Kunth (sucupira-preta). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. **Resumos...** Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. 436 p.

SOARES, Fernanda Pereira. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO IV

EFEITO DO ANA E DO AIB NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES CAULINARES E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE UVAIEIRA

1 RESUMO

NASCIMENTO, Aline da Costa. Efeito do ANA e do AIB no enraizamento *in vitro* de explantes caulinares e aclimatização de plântulas de uvaieira. In: **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. 2006. p. 66-90. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A uvaieira é uma espécie arbórea nativa da mata atlântica, pertencente à família Myrtaceae. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a influência dos reguladores de crescimento ANA e AIB sobre o enraizamento de brotações e estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas enraizadas *in vitro*. Brotações obtidas *in vitro* foram transferidas para meio WPM sem reguladores de crescimento, contendo 3% de sacarose, 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Após 15 dias, as brotações foram transferidas para meio WPM, suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado e acrescido de diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). Aos 40 dias, a formação de raízes, o número e o comprimento da maior raiz foram avaliados. Para a aclimatização, plântulas foram transferidas diretamente ou após passarem por um período de 7 dias de pré-aclimatização, para tubetes contendo Plantmax e envoltas com saco plástico transparente para a manutenção da umidade. As sacolas de polietileno foram sendo perfuradas até a total remoção das mesmas. Aos 31 dias, a avaliação de sobrevivência das plântulas foi realizada. Os reguladores de crescimento ANA e AIB não foram efetivos na formação de raízes em segmentos caulinares e estas se formaram, mesmo na ausência de reguladores de crescimento, demonstrando que apenas a auxina endógena do explante é suficiente para promover o enraizamento. O período de pré-aclimatização em sala de crescimento aumenta a proporção de sobrevivência de plântulas e a abertura gradual do saco plástico envoltório dos tubetes caracteriza um processo viável de aclimatização.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

2 ABSTRACT

NASCIMENTO, Aline da Costa. Effect of NAA and IBA *in vitro* rooting induction on nodal segments and seedling acclimatization. In: **Uvaieira *Eugenia pyriformis* Cambess micropropagation**. 2006. p.66 – 90. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The uvaieira is a arboreal specie native from the atlantic forest, belonging to the Myrtaceae family. This present work has the proposal to evaluate the influence of the growth regulator NAA and IBA about the root from sprouting and established an acclimatization methodology to the rooted plants *in vitro*. *In vitro* sprouting obtained were transferred to WPM medium without growth regulators, contains 3 % Sucrose, 0.5 g L⁻¹ activated coal. 15 days later, the sprouting were transferred to WPM medium, supplement with 30 g L⁻¹ sucrose, 0.5 g L⁻¹ of activated coal and accompanying from different concentrations of NAA (0; 1; 2 and 3 mg L⁻¹) and IBA (0; 1; 2; 3; and 4 mg L⁻¹). After 40 days, the roots formation, the number and the length of the upper root was evaluated, for the acclimatization, plants have directly been transferred or after spend by the period of 7 days of pre-acclimatization, for little tube containing Plantmax and wrapped with transparent plastic sack for humidity maintenance. The plastic sacks with polymer were being broached until the total removal of them. After 31 days, the surviving evaluation of the plants was done. The NAA and IBA growth regulators weren't effective at the roots formation in calluses segments and these ones which had formed, even in the absence of growth regulators, showing that only the inside from the explant is enough to promote the root. The pre acclimatization in growing room increases the surviving rate of plants and the gradual opening of the plastic sack wrapper of little tube characterizes a viable acclimatization process.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser)

3 INTRODUÇÃO

Inúmeros levantamentos florísticos e fitossociológicos nos mais diversos tipos de ambiente, desde formações savânicas, como o cerrado (Castro et al., 1999) e campos rupestres (Kawasaki 1989), até formações florestais, como a mata atlântica (Oliveira-Filho & Fontes 2000), registram Myrtaceae como sendo uma das mais importantes famílias em riqueza de espécies. Essas formações vegetacionais, dentro de um contexto mundial, estão entre as mais ricas em diversidade de espécies vegetais e endemismos na América do Sul (Myers et al., 2000.)

Pertencente a essa família de riqueza indiscutível, pode-se citar *Eugenia pyriformis* Cambess, espécie arbórea nativa da mata atlântica, popularmente conhecida como uvaia e que pode ser encontrada desde o estado de São Paulo até o do Rio Grande do Sul. Mattos (1956) cita que a uvaia é uma espécie altamente valiosa pela sua madeira dura, resistente às doenças e, principalmente, por seus frutos comestíveis, importantes nutricionalmente, apreciados pelo homem e pela avifauna, utilizada pela indústria na produção de sucos, licores, doces e geléias. É uma espécie que também tem seu uso recomendado em casos de reflorestamentos heterogêneos (Lorenzi, 2000).

O enraizamento é uma etapa decisiva da micropropagação e influencia diretamente a sobrevivência durante o transplântio e a aclimatização. Quando comparado com espécies herbáceas, o enraizamento de espécies lenhosas é mais difícil e se agrava à medida que o material utilizado aproxima-se da fase adulta, visto que ocorre uma diminuição da competência de enraizamento.

No caso das maiorias das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil da micropropagação (Hu & Wang, 1983).

Lopes et al. (2001) relatam que a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongação. A duração destas fases pode ser de uma a

três semanas. A indução de raízes *in vitro* é um importante passo na micropropagação e em protocolos de transformação genética de plantas (George, 1993).

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo de rizogênese, principalmente nas espécies lenhosas que possuem dificuldades para enraizar (Gaspar & Hofinger, 1988).

A maioria dos trabalhos de indução de enraizamento adventício de espécies lenhosas envolve tratamentos com auxinas exógenas, tais como ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolacético (AIA) (George, 1993).

As auxinas mais utilizadas são o AIB e o ANA (Assis & Teixeira, 1998). As respostas às auxinas não são universais. Certas espécies enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de auxinas no seu enraizamento (Rohr & Hanus, 1987). Gattapaglia & Machado (1998) comentam que a auxina é importante nas duas fases iniciais da rizogênese, que esta pode ser inibidora na última fase e que o uso desse regulador de crescimento no meio de cultivo e a posterior transferência do explante para outro isento de auxina são indicados para a indução e o desenvolvimento de raízes.

Na formação de raízes adventícias em espécies lenhosas, o uso de carvão ativado, adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam em torno de 0,1% a 2% (p/v), tem auxiliado a indução da rizogênese. Por apresentar uma alta capacidade de adsorção, esta substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presentes no ágar, que possam afetar negativamente o crescimento. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado é o favorecimento do processo de enraizamento, devido à redução da

intensidade de luz na região de formação da raiz (Assis & Teixeira, 1998). Amin & Jaiswal (1987), Anderson (1980) e Damiano (1978), relataram o efeito do carvão, quando utilizado em baixas concentrações, no enraizamento de brotações de morangueiro, framboeseira e goiabeira, respectivamente.

Grattapaglia & Machado (1998) comentam que a fixação de auxina pelo carvão tem, em geral, uma ação benéfica no alongamento das raízes. As raízes crescem rapidamente, ramificando-se bastante e mantendo uma cor mais clara do que quando expostas à luz

A composição do meio de cultura é outra importante variável que determina o sucesso nas diversas fases da micropropagação. Os nutrientes presentes no meio são necessários ao metabolismo das células e aos fatores de crescimento, responsáveis pela diferenciação em brotos e raízes (Schuch & Peters, 1993). A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido grande atenção (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) é bastante utilizado em plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais, representando apenas 45% da força iônica do meio MS.

Além das características ligadas às plantas doadoras de explantes, fatores relacionados com o próprio explante podem exercer influência no seu enraizamento *in vitro* (Santana, 2003).

É bem conhecido que a presença de folhas nas estacas exerce um forte estímulo sobre o enraizamento (Hartmann et al., 1997). Folhas e gemas produzem auxinas, que são transportadas para a base, o que é essencial para o enraizamento. Neste caso, a sua ausência não é suprida por auxinas, sacarose ou compostos nitrogenados. Esses compostos estimulam o enraizamento na presença de folhas, nas quais são produzidas auxinas e outros fatores de crescimento (Assis & Teixeira, 1998). Esses autores afirmam que o número de

folhas tem influência, principalmente, na velocidade de enraizamento e no número de folhas formadas (Santana, 2003).

A obtenção de uma plântula com um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento nas novas condições ambientais (Pio et al., 2002).

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, o que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatização.

A fase de enraizamento *in vitro* se caracteriza pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplantio da plântula para condições *ex vitro*.

Após a etapa de enraizamento, as plântulas devem ser aclimatizadas para terem condições de sobreviverem em ambiente com alta luminosidade e baixa umidade. A aclimatização envolve o transplantio da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação que, geralmente, consiste de uma fase crítica e que pode ser um fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998).

A aclimatização é apontada como uma das fases mais críticas do processo de micropropagação de plantas, ocorrendo um grande número de perdas de mudas. Durante essa fase, as plantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais devido à transferência de um ambiente *in vitro* para o meio externo. Assim, torna-se obrigatório que a plântula, ao sair da condição *in vitro*, passe por um processo de aclimatização antes de ser levada para o campo.

Entre os vários fatores que podem estar envolvidos no processo de aclimatização, podem-se relacionar o genótipo, o estresse hídrico, a alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, a infecção por patógenos e o estresse pela alteração na radiação (Deccetti, 2000). A mudança repentina da

umidade à qual a plântula estava exposta pode causar danos, mesmo em plantas que apresentem o aspecto normal (Soares, 2005).

O desenvolvimento das características fisiológicas e anatômicas de plântulas micropropagadas é necessário para a gradual aclimatização destas ao ambiente da casa de vegetação ou à condição de campo. Um reduzido desenvolvimento da cutícula, o funcionamento anormal dos estômatos (Fuchigami et al., 1981) e um sistema vascular pouco desenvolvido (Fabri & Bartolini, 1985; Leshem, 1983; Ziv et al., 1981) são as causas sugeridas para a suscetibilidade das plântulas ao estresse hídrico durante essa fase.

Em muitas espécies, o sucesso da transferência de plantas para a casa de vegetação ou para o campo, durante a aclimatização, depende da interação e do manejo adequado dos diversos fatores envolvidos na adaptação da planta à nova condição ambiental, bem como da formação de novas estruturas, principalmente folhas, mais adaptadas às novas condições (Carvalho & Amâncio, 2002).

Preece & Sutter (1991) afirmam que a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água, quando submetidos a condições adversas, como o ambiente natural.

Nesse contexto, o controle e a otimização da luz, após a transferência, têm sido essenciais para a sobrevivência da planta, sendo o período de decréscimo gradual da umidade relativa acompanhado pelo incremento progressivo na irradiância (George, 1996).

A sobrevivência e o crescimento das plantas cultivadas *in vitro* são ainda problemáticos para algumas espécies. Embora muitas não tenham problemas durante a aclimatização e o período seja suficiente para corrigir alterações induzidas *in vitro* e garantir a sobrevivência após a transferência, em muitas

outras ocorre significativa perda de mudas durante esse período (Bag et al., 2000).

Segundo McCown (1988), o período de aclimatização varia de 1 a 4 semanas e corrige as alterações ou anormalidades induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas normais, por meio da regulação da perda e da absorção de água.

As técnicas de aclimatização podem ser iniciadas ainda durante o cultivo *in vitro* (Preece & Sutter, 1991). A pré-aclimatização consiste de técnicas que permitam tornar o ambiente *in vitro* semelhante ao ambiente natural, bem como manusear a muda para favorecer a sua sobrevivência e crescimento (George, 1993). Dami & Hughes (1997) e Deng & Donnelly (1993) citam, como método de pré-aclimatização, o aumento do intercâmbio de gases entre o recipiente e o meio externo, pelo afrouxamento ou retirada das tampas dos recipientes de cultivo. Segundo George (1993), o tempo ideal para a pré-aclimatização é de 4 a 5 dias, podendo ir até 6 a 9 dias, e apresenta como vantagens a economia de trabalho, tempo e espaço, quando comparado aos métodos convencionais.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a influência dos reguladores de crescimento ANA e AIB sobre o enraizamento de brotações de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) e estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas dessa espécie enraizadas *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito do ANA e do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas do cultivo *in vitro* foram transferidas para meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) na ausência de reguladores de

crescimento, contendo 3% de sacarose, 0,5g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 0,7% de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura e na presença de luz, por um período de 15 dias, com o objetivo de eliminar o efeito residual dos reguladores de crescimento utilizados anteriormente. Decorrido esse período, as brotações, com aproximadamente 15mm, foram transferidas para meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), contendo diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) ou AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e também suplementado com de 3% de sacarose, 0,7% de ágar e 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Os explantes foram reinoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura e seu pH ajustado para 5,7, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Decorridos 40 dias, a porcentagem de enraizamento nos diferentes tratamentos, bem como o número de raízes e o comprimento da maior raiz foram avaliados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo uma brotação. A comparação das médias foi feita usando-se o Teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%.

4.2 Aclimatização de plântulas de uvaieira germinadas *in vitro*

Plântulas de uvaieira oriundas do enraizamento *in vitro* (Capítulo IV) com 40 dias de idade, foram transferidas diretamente ou após passarem por um período de 7 dias de pré-aclimatização, com abertura do recipiente de cultivo, para tubetes com volume de 250 mL, contendo Plantmax e envoltas com saco plástico transparente para a manutenção da umidade relativa no ambiente. A

bandeja com os tubetes foi mantida em sala de crescimento à temperatura controlada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de fótons de $67\ \mu\text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Gradativamente, as sacolas de polietileno transparente foram sendo perfuradas até a total remoção das mesmas, aos 30 dias, quando se considerou a plântula totalmente aclimatizada.

Aos 31 dias, a avaliação de sobrevivência das plântulas foi realizada. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constando de 2 tratamentos (plântulas transferidas diretamente após enraizamento e plântulas provenientes da etapa de enraizamento submetidas a um período de 7 dias de pré-aclimatização) e 35 repetições, sendo cada repetição composta por uma planta. A comparação das médias foi realizada por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do ANA no enraizamento *in vitro* de brotações

A análise estatística das diferentes concentrações de ANA testadas mostrou-se não significativa entre os tratamentos, tanto para o número de raízes quanto para o comprimento da maior raiz, considerando-se um nível de significância fixado em 5%.

Apesar dos resultados observados não terem se apresentado de forma significativa, o enraizamento foi obtido em todos os tratamentos utilizados. Raízes foram contabilizadas até mesmo na ausência de reguladores de crescimento, demonstrando que a auxina endógena do explante foi suficiente para estimular o enraizamento, mesmo tendo se formado raízes em menores quantidades.

Segundo Kulescha (1988), o nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz à formação de raízes.

As médias observadas pelo teste de Tukey, para cada tratamento testado, estão representadas na Figura 1.

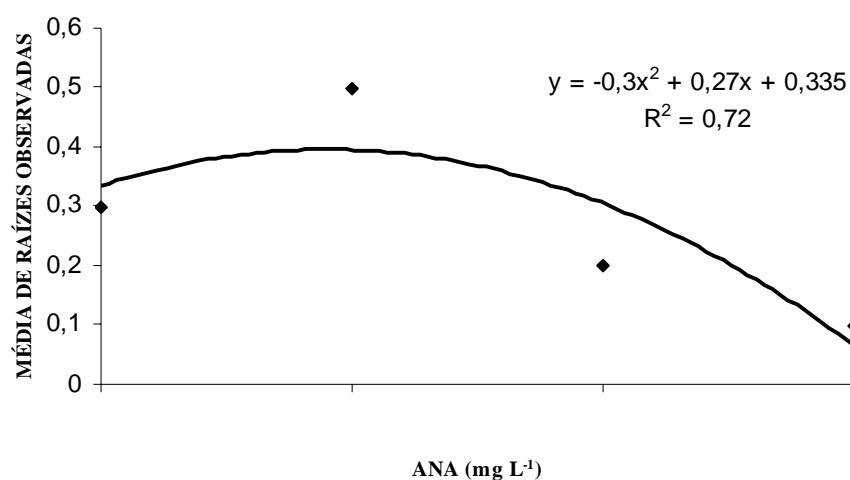


FIGURA 1. Médias de raízes formadas em brotações de uvaieira inoculadas em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Como pode ser observado, apesar de não significativo, os maiores números de raízes foram encontrados no tratamento 1,0 mg L⁻¹ de ANA; concentrações maiores que esta, possivelmente, são tóxicas, uma vez que o número de raízes foi decrescente.

A análise do comprimento da maior raiz também mostrou-se não significativa estatisticamente quando testadas a 5% de probabilidade (Figura 2).

Também foram observados os melhores resultados no tratamento em que foi adicionado $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, apesar de este não ter se demonstrado significativo. Da mesma forma que para o número de raízes, concentrações de ANA superiores a esta apresentaram um comportamento possivelmente fitotóxico, uma vez que estas reduziram drasticamente o comprimento da maior raiz.

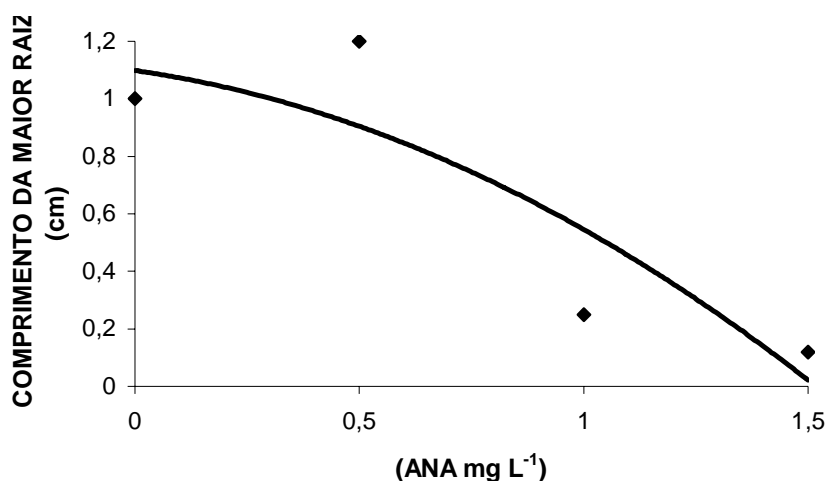


FIGURA 2. Médias de comprimento da maior raiz formada em brotações de uvaieira inoculadas em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O carvão ativado pode ter beneficiado a formação de raízes, uma vez que vários autores citam sua alta capacidade de adsorver substâncias tóxicas, bem como reguladores de crescimento, que poderiam estar em concentrações inibitórias. Outra propriedade importante desta substância se refere à redução de intensidade luminosa na região formadora de raízes, fato que pode beneficiar o enraizamento.

Pio et al. (2002) comentam que a formação de raízes bem desenvolvidas é de grande importância para a sobrevivência e a adaptação das plântulas cultivadas *in vitro*. Assim, o enraizamento é uma etapa essencial para a continuidade do cultivo de várias espécies, uma vez que é de grande importância para a fase de aclimatação.

O aspecto visual das raízes formadas pode ser observado na Figura 3.



FIGURA 3. Aspecto visual de plântulas de uvaieira enraizadas *in vitro* na presença de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.2 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações

A análise estatística das diferentes concentrações de AIB testadas mostrou-se não significativa entre os tratamentos, tanto para o número de raízes quanto para o comprimento da maior raiz, considerando-se um nível de significância fixado em 5%.

Foi observada formação de raízes em todas as concentrações testadas, até mesmo no tratamento testemunha, no qual ocorreu formação pontual de raízes em apenas uma repetição, fato que comprova a eficiência da auxina endógena em promover o enraizamento.

Mesmo não sendo significativo, as maiores médias quanto à variável número de raízes foram observadas nos tratamentos contendo 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de AIB, sendo a média igual a 1,0 em ambos os tratamentos, como pode ser observado na Figura 4.

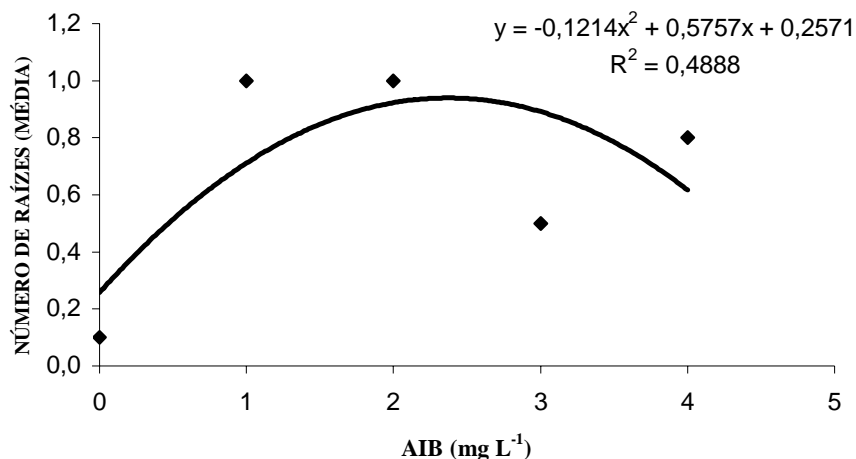


FIGURA 4. Médias de raízes formadas em brotações de uvaieira inoculadas em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Estes resultados concordam com os obtidos por Bonilla (2002) que também obteve maior número de raízes em *Rudgea viburnoides*, na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Já em *Coffea arabica* e *C. canephora*, maior número de raízes foi observado em explantes cultivados na presença de 6,0 mg L⁻¹ de AIB (Santos, 2001). Em moreira (*Maclura tinctoria*), também se obteve

enraizamento em meio WPM 50% acrescido de 4,8 mg L⁻¹ de AIB e 4,7 g L⁻¹ de carvão ativado (Gomes, 1999).

A análise da variável comprimento da maior raiz também mostrou-se estatisticamente não significativa nos testes realizados. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5.

Apesar da não significância dos tratamentos realizados, os maiores comprimentos de raiz foram observados nos tratamentos contendo 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ de AIB sendo, em ambos de 1,23 cm.

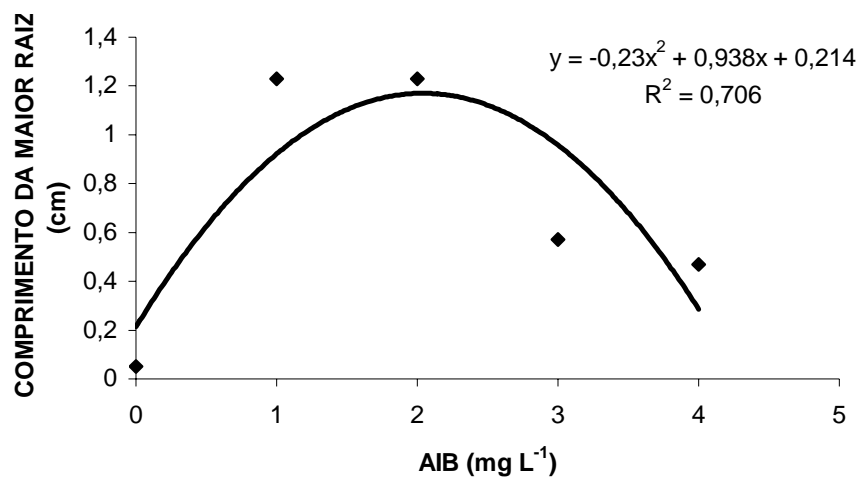


FIGURA 5. Médias do comprimento da maior raiz formada em brotações de uvaieira inoculadas em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Alguns autores relatam o efeito de níveis crescentes de AIB no incremento do comprimento de raízes. Sudha et al. (1998), em experimentos realizados com *Holostemma annulare*, obtiveram aumento até o nível de 0,3 mg L⁻¹ de AIB.

Um efeito fitotóxico parece ter sido causado por concentrações superiores a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, uma vez que foram observados engrossamento das raízes e uma diminuição do comprimento das mesmas.

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), durante a fase de enraizamento *in vitro*, uma toxidez de auxina, pela alta concentração ou pelo longo período de exposição dos brotos ao meio indutor, pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das raízes.

Segundo Pasqual (1998), diferenças genotípicas na resposta à auxina podem ser causadas pela habilidade diferenciada do tecido em absorver e ou metabolizar a auxina sintética, convertendo-a para auxina endógena (AIA).

O aspecto visual das raízes formadas, bem como o engrossamento das raízes em concentrações elevadas de AIB, podem ser observados na Figura 6.



FIGURA 6. Aspecto visual de plântulas de uvaieira enraizadas *in vitro* na presença de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.3 Aclimatização de plântulas de uvaieira

A proporção de plântulas sobreviventes foi similar nos dois tratamentos (pré-aclimatização e aclimatização direta). Não foram observadas diferenças significativas, considerando-se um nível de significância fixado em 5% (Tabela 1).

TABELA 1. Proporção de sobrevivência de plântulas de uvaieira submetidas ao processo de pré-aclimatização (T1) e aclimatização direta (T2). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tratamentos	Proporção de sobrevivência (%)
1	85,71 a
2	68,57 a

A maior percentagem de sobrevivência das plântulas pré-aclimatizadas em relação às diretamente submetidas à fase de aclimatização, mesmo não havendo diferenças significativas entre os tratamentos, pode ser justificada pelo maior tempo de adaptação às novas condições de cultivo que, provavelmente, conferiram a essas plântulas melhores condições de tolerar o estresse causado pela transferência para as novas condições. Broome & Zimmerman (1984) comentam que a remoção das tampas dos tubos auxilia as trocas gasosas e pode favorecer a sobrevivência *ex vitro* quando as plantas são transferidas para ambiente com baixa umidade e substrato poroso.

Ziv (1986) relata que, quando os recipientes que continham plântulas de craveiro foram abertos e a umidade relativa mantida a 50%-70%, houve aumento no desenvolvimento de cera epicuticular e, após nove dias de abertura dos recipientes, a taxa de sobrevivência aumentou de 75% para 90%. Entretanto,

Hoffmann (1999) constatou que a abertura antecipada dos frascos ou o selamento destes com algodão desfavoreciam a sobrevivência e o crescimento das mudas de macieira durante a aclimatização.

Segundo Díaz-Pérez et al. (1995), durante o processo de aclimatização ocorre a conversão da condição heterotrófica para autotrófica e um gradual retorno às características naturais da planta. As novas folhas formadas durante este processo já apresentam características intermediárias entre aquelas apresentadas *in vitro* e *ex vitro*, com mudanças na morfologia, redução na condutância estomatal, incremento no conteúdo de clorofila e maior eficiência na carboxilação. A abertura parcial do saco plástico envoltório dos tubetes também demonstrou ser viável de aclimatização de plântulas de uvaieira, uma vez que também favoreceu a percentagem de sobrevivência de plântulas.

Soares (2005) obteve resultados semelhantes a estes no processo de aclimatização de mangabeira. O período de pré-aclimatização de plântulas de mangabeira em sala de crescimento também aumentou a proporção de sobrevivência de plântulas à aclimatização.

O aspecto visual de plântulas de uvaieira aclimatizadas e de parte do processo de aclimatização pode ser observado na Figura 7.

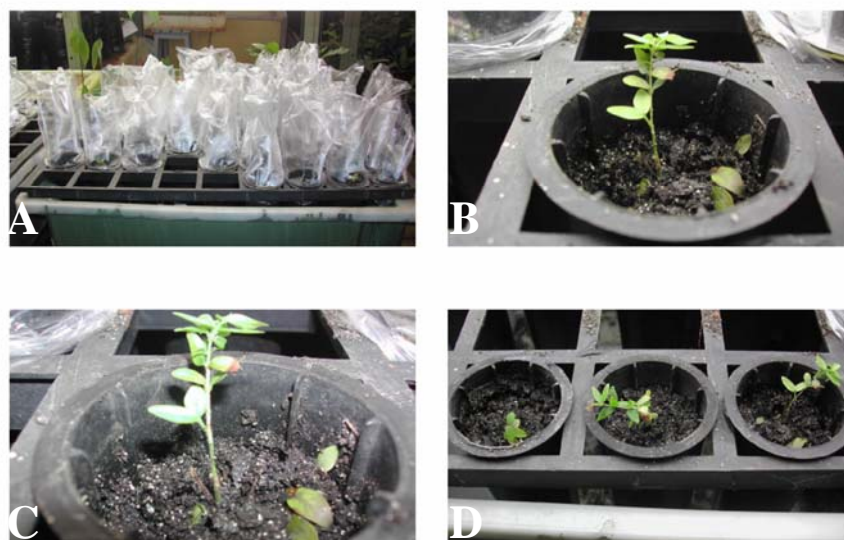


FIGURA 7. Aspecto visual do processo de aclimatização de plântulas de uvaieira. (A) experimento de aclimatização montado (B) , (C) e (D) plântulas de uvaieira aclimatizadas em tubetes com substrato Plantmax. UFLA, Lavras, MG, 2006.

6 CONCLUSÕES

Os reguladores de crescimento ANA e AIB não foram efetivos na formação de raízes em segmentos caulinares de uvaieira.

Mesmo na ausência de reguladores de crescimento, foi observada a formação de raízes, demonstrando que apenas a auxina endógena do explante é suficiente para promover o enraizamento.

O período de pré-aclimatização em sala de crescimento aumenta a proporção de sobrevivência de plântulas de uvaieira à aclimatização.

A abertura gradual do saco plástico envoltório dos tubetes caracteriza um processo viável de aclimatização de plântulas de uvaieira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, M. N.; JAISWAL, V. S. Rapid Clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 235-243, 1987.

ANDERSON, W. C. Tissue culture cultivation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 20, n. 1/2, p. 112-113, 1980.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 261-296.

BAG, N.; CHANDRA, S.; PALMI, L. M. S.; NANDI, S. K. Micropropagation of Devringal [*Thamnochalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 156, N. 2, p. 125-135, July 2000.

BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vivo*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BROOME, O. C.; ZIMMERMAN, R. H. Culture of shoots meristems: fruit plants *in vitro*: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants** – Laboratory procedures and their applications, v. 1. Orlando: Academic Press, 1984. p. 111-122.

CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defence system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 1, p. 33-40, 2002.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R.; TAMASHYRO, J. Y.; SHEPERD, G. J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 86, n. 1, p. 192-225, 1999.

DAMI, I.; HUGHES, H. G. Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* of 'Valiant' grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 97-101, 1997.

DAMIANO, C. Il carbone attivo nella coltura *in vitro* della fragola. **Frutticoltura**, Genn, v. 40, n. 1, p. 49-50, 1978.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DENG, R.; DONNELLY, D. J. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 1048-1051, Oct. 1993.

DÍAZ-PÉREZ, J.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, n. 2, p. 225-232, Oct. 1995.

FABRI, A.; BARTOLINI, G. Osservazioni anatomiche su radichi di barbetelle di Paradox moltiplicate agamicamente. **Frutticoltura**, Genn, v. 47, n. 1, p. 43-46, 1985.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, July 1981.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portlant: Discorides, 1988. p. 117-131.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture** – Part 1: The technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture** - Part 1: The technology. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR. F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. et al. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

KAWASAKI, M. L. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 11, 121-170, 1989.

LESHEM, B. Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation, **Annals of Botany**, London, v. 52, n. 6, p. 413-415, 1983.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v. 1, p. 78.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **CERNE**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SIPA, 196. 882 p. (Fascículo, 2).

McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p. 289-302.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. . Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, St. Louis, v. 32, n. 4b, p. 793- 810, Dec. 2000.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de tecidos vegetais: Tecnologias e aplicações: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 1998. 116 p.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PIO, R. **Ácido indolbutírico e sacarose no enraizamento de estacas apicais e desenvolvimento inicial da figueira (*Ficus carica* L.)**. 2002. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, May 1987.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, Fernanda Pereira. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Xilld, Borkh) e Meggumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433-437, abr. 1993.

SUDHA, C. G.; KRISHNAN, P. N.; PUSHANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare*(Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. **In vitro Cellular and Development Biology Plant**, Largo, Columbia, v. 33, n. 1, p. 57-63, Jan./Mar. 1998.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis in plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL. 1985. p. 79-105.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.

ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**. London: Butterworths, 1996. p. 187-196.

ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A. Hardening carnation plants regenerated from shoot tips cultured *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 21, n. 3/4, p. 423, 1981

CAPÍTULO V

CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES DE UVAIEIRA

1 RESUMO

NASCIMENTO, Aline da Costa. Calogênese em explantes foliares e caulinares de uvaieira. In: **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. 2006. p. 91-110. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A coleta de plantas, no Brasil, realiza-se de forma intensa e não sustentável, levando a reduções drásticas das populações naturais de espécies nativas. Dentre essas espécies, insere-se a uvaieira, tendo nas técnicas de cultura de tecidos uma ferramenta importante para propagação dessa espécie, destacando-se a formação de calos. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de calos a partir de segmentos foliares e caulinares de uvaieira. Foram utilizados como explantes segmentos foliares e caulinares oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. Para os estudos do efeito de diferentes combinações de picloram (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e cinetina (0,0; 0,1 mg L⁻¹), os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio WPM, suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 1,5g L⁻¹ de carvão ativado. Para os estudos do efeito de diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; e 7 mg L⁻¹), os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose. Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento na ausência de luz e aos 60 dias, a porcentagem da área dos explantes coberta por calos foi avaliada. Para formação de calos, é essencial a presença de picloram, não sendo observado a formação de calos na ausência de reguladores de crescimento. A interação entre picloram e cinetina mostrou-se importante no aumento da calogênese em explantes foliares, sendo a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de picloram mais efetiva. A calogênese em segmentos caulinares foi maximizada na ausência de cinetina e na presença de 0,5 mg L⁻¹ de picloram. O 2,4-D não foi eficiente na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

2 ABSTRACT

NASCIMENTO, Aline da Costa. Callus induction on leaf and nodal segments of uvaieira. In: **Uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) micropropagation**. 2006. p.91 – 110. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The plants collect, in Brazil, achieve in a intense way and non sustainable, driving to drastic reductions from the natural populations of native species. Among these species, insert the uvaieira, which at the culture technique important tool for propagation of this specie, detaching the callus formation. The proposal of this work was the callus attainment with leaf segments and calluses of uvaieira. It's applied as leaf explants segments originating from germinated plants in vitro. For the studies of the effect in different combinations of picloram (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) and kinetin (0,0; 0,1 mg L⁻¹), the explants were inoculated in test tubes containing WPM medium, supplemented with 30,0 mg L of sucrose and 1,5g L of activated coal. For the studies of the effect in different combinations of 2,4-D (0,0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; and 7 mg L⁻¹), the explants were inoculated in tests tubes containing medium MS, supplemented with 30,0 gL of sucrose. After the inoculation, the explants remained in a growth room with absence of light and on 60 days, the area's percentage of the explants covered by callus was evaluated. For the callus formation, is essential the presence of picloram, not being observed the callus formation at the absence of growth regulators. The interaction between picloram and cinetina have shown important about the increase of calluses in leaf explants, they being the combination of 0,1 mg L⁻¹, kinetin and 1,0 mg L⁻¹ of most effective picloram. The calluses in shoot segments was maximized at the absence of kinetin and at the 0,5 mg L⁻¹ presence of picloram. The 2,4-D has not effective at the callus induction in leaf explants and shoot segments of uvaieira.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser)

3 INTRODUÇÃO

A coleta de plantas, no Brasil, realiza-se de forma intensa, desordenada e não sustentável. Essa realidade tem levado a reduções drásticas das populações naturais de espécies nativas. O Brasil, apesar de ser o país com maior diversidade biológica vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, pelo acelerado processo de devastação dos ecossistemas tropicais tem comprometido a preservação de sua flora (Pereira, 2000).

Como ferramenta única e de grande potencial, a biotecnologia vem despertando o interesse de diversas áreas do conhecimento, tais como química, bioquímica, botânica, genética e farmacologia. Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se as de cultura de tecidos.

Uma das metodologias de cultura de tecidos aplicada para a propagação *in vitro* é a calogênese. Calos são definidos como aglomerados de células parenquimáticas não organizados, irregularmente diferenciados, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas, podendo diferenciar-se em tecidos e órgãos (Torres et al., 1998).

Na cultura de calos distinguem-se três fases: indução, divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, as células preparam-se para a divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, preparam-se para a divisão, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante (Aitchison et al., 1977).

Para a indução de calo, qualquer tecido pode ser utilizado como explante. Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, pelo meio nutritivo, acrescido ou não de reguladores de crescimento e por fatores externos,

como luz e temperatura. Esses fatores agem acelerando, retardando ou mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento do calo. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. Pierik (1990) ainda comenta que explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de tecidos por possuírem alta capacidade de regeneração.

Desdiferenciação, indução e regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo. Espécies lenhosas, por exemplo, são mais difíceis de se propagarem *in vitro*, comparadas à espécies herbáceas, por apresentarem maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, menor taxa de multiplicação e maior concentração de fenóis (Santana, 2003).

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. Essa indução é regulada pela interação e balanço entre os reguladores sintéticos fornecidos e os hormônios produzidos internamente pelo explante.

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e, geralmente, dependendo da concentração, causam alongação celular e expansão ou divisão celular. Em geral, com o uso de baixas concentrações de auxinas, predomina a formação de raízes adventícias, enquanto que altas concentrações induzem a formação de calos. A interação entre auxinas e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese (Gomes, 1999).

O balanço auxina/citocinina é, na maioria das vezes, determinante na calogênese. Ozias-Akins & Vasil (1985) mencionam, no entanto, que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas. A escolha dos compostos e a

concentração necessária dependem do tipo de crescimento ou do desenvolvimento necessário, do nível da auxina endógena do explante, da capacidade do tecido cultivado de sintetizar auxina naturalmente e da interação entre a auxina sintética e da auxina endógena (George, 1993). As principais auxinas são ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,6 tricloropicolínico (picloram), ácido 4-clofenoxi acético (CPA) e ácido naftoxiacético (NOA). Em muitas culturas de tecidos, em que o crescimento de calos é normal, a adição de auxinas torna-se necessária para o crescimento contínuo de tais calos. A quantidade de tecido caloso formado está relacionada à concentração de auxina aplicada, entretanto, altas concentrações causam maior desenvolvimento do tecido caloso (Devlin & Witham, 1983). Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos, destacam-se o 2,4-D, ANA, BAP e, mais recentemente, TDZ, picloram e cinetina.

O estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas, tais como a oxidação. Os danos da oxidação fenólica podem também ser reduzidos pelo cultivo em meio líquido, no qual os produtos da oxidação se diluem, e pela ausência de ágar. O carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas evitando a oxidação dos explantes (Teixeira, 2006).

A formação de calos, normalmente, ocorre no escuro (Camargo et al., 1999), considerando que a luz pode favorecer a produção de compostos fenólicos, os quais interferem na atividade do regulador de crescimento, comprometendo a divisão celular. Entretanto, há relatos de algumas espécies em que a formação de calos foi indiferente à luminosidade (Faria, 1996).

Espécies, como a uvaieira, têm, no cultivo de calos, um aliado para sua propagação, uma vez que possibilita a sua propagação em massa. A obtenção de

calos, neste caso, pode ser o ponto de partida para futuros trabalhos de regeneração de plantas sadias.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de combinações de auxina/citocinina na indução e manutenção de calos por meio de segmentos nodais e foliares de plantas cultivadas *in vitro* em explantes de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito do picloram e cinetina na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira cultivados em meio WPM

Segmentos foliares com $1,0 \text{ cm}^2$, contendo a região da nervura central e oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM, suplementado com picloram (0,0; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) e cinetina (0,0; $0,1 \text{ mg L}^{-1}$), 3% de sacarose e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem.

Para o experimento de indução de calos em explantes caulinares, segmentos caulinares com aproximadamente 1cm, oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM, suplementado com a auxina picloram (0,0; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) e a citocinina cinetina (0,0; $0,1 \text{ mg L}^{-1}$), 3% de sacarose e $1,5 \text{ g/L}^{-1}$ de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem.

Foram efetuados cortes nas superfícies adaxial e abaxial dos explantes, sendo a incubação realizada no escuro e em temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

A avaliação foi feita 60 dias após a inoculação, observando-se a porcentagem da área dos explantes coberta por calos nos diferentes tratamentos.

Foram atribuídas notas de acordo com a porcentagem da área dos explantes coberta por calos, sendo 0 (zero) correspondente à ausência de calos, nota 1 quando até 50% do explante encontrava-se coberto por calos, nota 2 quando de 50% a 100% do explante estava coberto por calos e nota 3 quando mais de 100% do explante encontrava-se coberto por calos.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

A comparação dos dados foi realizada com a utilização do teste Kruskal-Wallis, a 5% de significância.

4.2 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira cultivados em meio MS

Segmentos foliares com 1,0 cm², contendo a região da nervura central e oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS, suplementado com 2,4-D (0; 1 ;2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem.

Para o experimento de indução de calos em explantes caulinares, segmentos caulinares com aproximadamente 1cm, oriundos de plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS, suplementado com 2,4-D (0; 1 ;2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi corrigido para 5,7, antes da autoclavagem.

Foram efetuados cortes nas superfícies adaxial e abaxial dos explantes, sendo a incubação realizada no escuro e em temperatura de 25±2⁰C.

A avaliação foi feita 60 dias após a inoculação, observando-se a porcentagem da área dos explantes coberta por calos nos diferentes tratamentos.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do picloram e cinetina na indução de calos em explantes foliares de uvaieira

A porcentagem de área dos explantes foliares coberta por calos comportou-se de forma diferenciada nos tratamentos utilizados, demonstrando a significância destes de acordo com as médias (Figura 1).

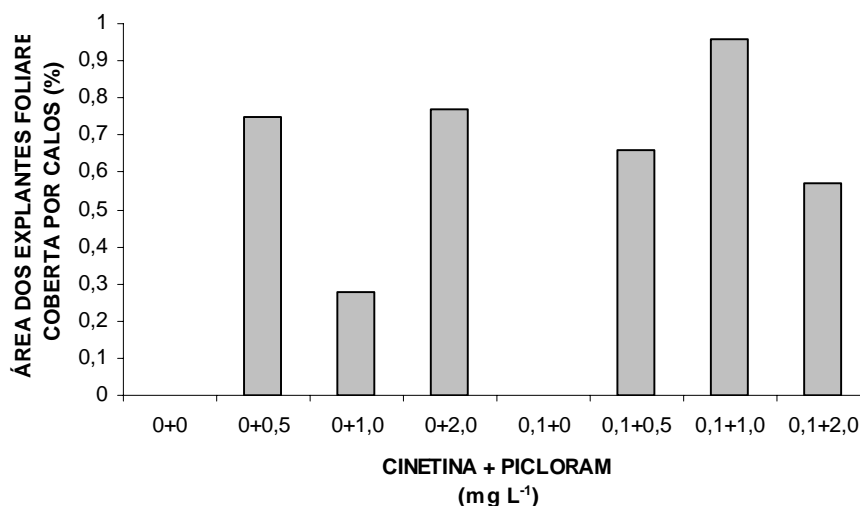


FIGURA 1. Teste de Kruskal Wallis para a porcentagem de área dos explantes foliares de uvaieira coberta por calos de acordo com os efeitos de picloram + cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Na ausência do regulador de crescimento picloram não houve formação de calos nos explantes foliares de uvaieira, mesmo na presença de cinetina. Este resultado corrobora com estudos realizados por Deccetti (2000), que reportam a ausência de calos em *Annona glabra*, quando a auxina não estava presente. Também concordam com os resultados dos estudos realizados por Soares (2005) que não obteve calogênese em explantes foliares de *Hancornia speciosa* na ausência da auxina 2,4-D. Da mesma maneira, Vietez & San-José (1996) também não observaram a formação de calos em explantes de *Fagus silvatica*, quando BAP foi utilizada isoladamente no meio de cultura. Resultado contrário foi encontrado por Cordeiro (1999) que obteve maior calogênese utilizando explantes foliares de *Coffea arabica*, induzidos apenas com BAP.

Grattapaglia & Machado (1998) relatam que as auxinas tendem a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações. Este fitorregulador apresenta efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de codificar proteínas requisitadas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, a formação de calos (George, 1996). A indução de calos na ausência desse regulador, como os obtidos em *Coffea arabica*, pode ser decorrente da elevada concentração de auxinas naturais no tecido utilizado como explante.

A interação entre picloram e cinetina mostrou-se importante no aumento da calogênese, proporcionando maiores percentagens de área foliar coberta por calos quando submetidos à combinação de 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de picloram. Pasqual (2000) menciona resultados positivos da adição de citocinina ao meio de cultura para a indução de calo embriogênico, confirmando que a formação de calos observada no presente experimento, provavelmente, foi favorecida pelo efeito sinérgico entre os fitorreguladores, favorecendo um incremento da divisão celular.

Cunha & Ferreira (1996), Gomes (1999) e Soares (2005) observaram também a necessidade de interação entre auxina e citocinina para uma eficiente indução de calos em explantes de *Maclura tinctoria*, *Linum usitatissimum* L. e *Hancornia speciosa* G., respectivamente. O aspecto visual dos calos formados em explantes foliares de uvaieira pode ser visualizado na Figura 2.



FIGURA 2. Aspecto visual dos calos formados em explantes foliares de uvaieira cultivados em meio WPM na presença de picloram + cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2005.

5.2 Efeito do picloram e cinetina na indução de calos em explantes caulinares de uvaieira

A porcentagem de área dos explantes caulinares coberta por calos comportou-se de forma diferenciada nos tratamentos utilizados, demonstrando a significância destes, de acordo com as médias (Figura 3).

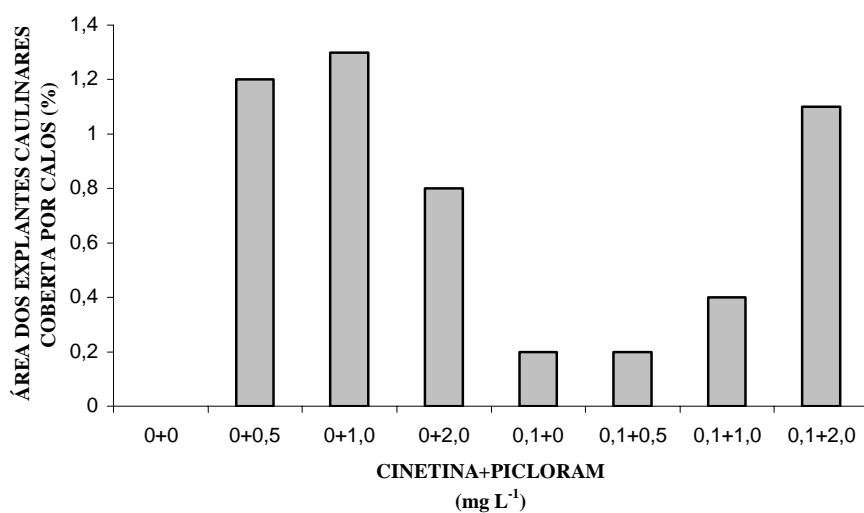


FIGURA 3. Teste de Kruskal Wallis para a porcentagem de área dos explantes caulinares de uvaieira coberta por calos de acordo com os efeitos de picloram + cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Na ausência dos reguladores de crescimento testados, não foi observada a formação de calos, corroborando com a idéia de que *Eugenia pyriformis* é dependente da adição externa de reguladores de crescimento capazes de promover um balanço interno auxina/citocinina favorável à calogênese.

Ferreira (2006), trabalhando com a figueira cultivar Roxo de Valinhos, também relatou a formação de calos em segmentos caulinares apenas nos tratamentos que continham auxinas.

A interação entre picloram e cinetina não teve efeito significativo no aumento da calogênese, uma vez que as maiores percentagens da área do explante caulinar coberta por calos foi encontrada na ausência de cinetina e presença de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram. Resultados similares foram observados por Santos (2001) que, utilizando também as auxinas 2,4-D e AIB, em um experimento de indução de calos em explantes foliares de cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), observou que a interação entre esses reguladores de crescimento não influenciou nos resultados. Neste caso, a produção máxima de calos obtida foi com apenas $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, para as cultivares Rubi e Topázio e com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, para a cultivar Apatã. Também Duskova & Dusek (1995) observaram maior formação de calos em explantes foliares de *Leuzea carthamoides* DC. inoculados somente na presença de AIB ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$).

Contrariamente a este resultado, a influência positiva da relação auxina/citocinina foi verificada por Santos et al. (2000), em ensaios envolvendo calogênese em diversos cultivares de cafeeiro. De modo similar, Maciel (2001), em estudos de calogênese em explantes caulinares de cafeeiro testando diferentes concentrações de 2,4-D e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina, também verificou maior formação de calos primários nodulares à medida que se aumentou a concentração de auxina. Cunha & Ferreira (1996) e Gomes (1999) observaram também a necessidade de interação entre auxina e citocinina para uma eficiente indução de calos em explantes de *Maclura tinctoria* e *Linum usitatissimum* L., respectivamente.

As auxinas são indispensáveis à formação de calos, uma vez que são responsáveis pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de

crescimento e alongamento celular (Taiz & Zeiger, 2004). Além disso, as citocininas também são necessárias para a divisão celular das plantas.

Santana (2003) obteve resultados contrários ao deste trabalho. Utilizando altas concentrações da citocinina TDZ e na ausência de auxina, a calogênese foi alta nas duas espécies estudadas, *Anona glabra* e *Anona bahiensis*.

Estes resultados corroboram com outros descritos na literatura em que, para indução de calogênese, há necessidade de um fator físico (ferimento) e um químico (regulador de crescimento), uma vez que, raramente, os fitormônios (endógenos) no explante são suficientes para induzir a formação de calos.

O aspecto visual dos calos formados em explantes caulinares de uvaieira pode ser visualizado na Figura 4.

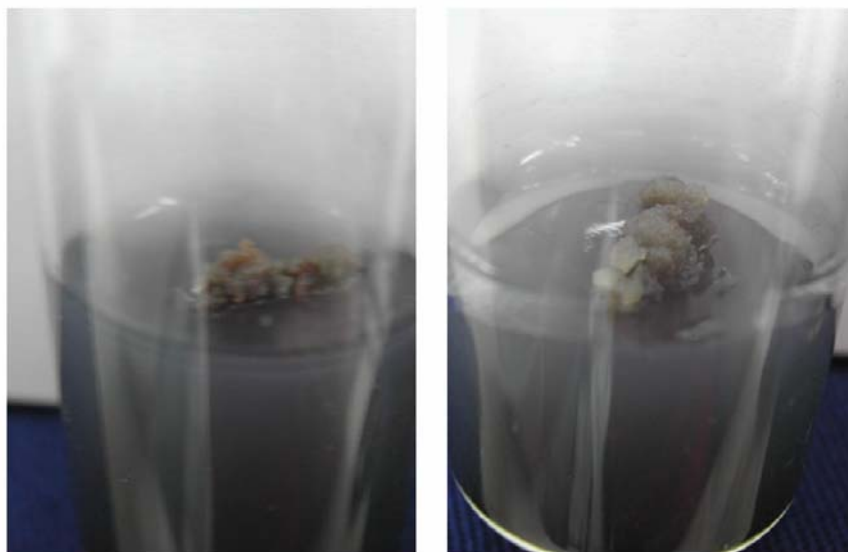


FIGURA 4. Aspecto visual dos calos formados em explantes caulinares de uvaieira cultivados em meio WPM, na presença de picloram + cinetina. UFLA, Lavras, MG, 2005.

5.3 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira

Apesar de ser amplamente conhecida a utilização do 2,4-D na indução e no desenvolvimento de calos em explantes caulinares e foliares de várias espécies, este regulador de crescimento não foi efetivo, nas concentrações testadas, na indução de calos em explantes caulinares e foliares de uvaieira. Assim, aos 60 dias de cultivo, não foi observada a formação de calos em explantes inoculados na presença de 2,4-D.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o 2,4-D tende a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações. Este fitorregulador apresenta efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de codificar proteínas requisitadas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, a formação de calos (George, 1996). A indução de calos na ausência desse regulador, como os obtidos em *Coffea arabica*, pode ser decorrente da elevada concentração de auxinas naturais no tecido utilizado como explante.

Em seus trabalhos com cagaiteira (*Eugenia dysenterica*), espécie pertencente à família Myrtaceae, Martinotto (2004) também não obteve calogênese em explantes foliares, atribuindo tal fato a um possível balanço auxina/citocinina desfavorável para o desenvolvimento de calos. Mas, este mesmo autor, ao induzir calos em explantes caulinares na presença de 2,4-D, obteve valores máximos de percentagem de área do explante coberta por calos na presença de 3,0 mg L⁻¹, tendo concentrações superiores a esta ocasionado uma redução na percentagem de área do explante coberta por calos.

Vários autores relatam a obtenção de calogênese, tanto em explantes foliares quanto em explantes caulinares, na presença de 2,4-D. Santos (2001) obteve calogênese em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana*) nas

concentrações de 2,4-D testadas, mas observou também que concentrações superiores a 6,0 mg L⁻¹ ocasionaram a diminuição da percentagem de formação de calos. Para copaíba (*Copaifera langsdorffii*), Azevedo (2003) somente obteve calogênese utilizando 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Também os resultados dos estudos realizados por Soares (2005) demonstraram a necessidade do uso de 2,4-D para a indução de calos em explantes foliares e caulinares de *Hancornia speciosa*.

6 CONCLUSÕES

É essencial a presença de picloram para a formação de calos em explantes caulinares e foliares de uvaieira.

Não foram observadas formações de calos na ausência de reguladores de crescimento, comprovando a necessidade da adição exógena dos mesmos.

A interação entre picloram e cinetina é importante no aumento da calogênese em explantes foliares, sendo a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de picloram mais efetiva.

A calogênese em segmentos caulinares é maximizada na ausência de cinetina e na presença de 0,5 mg L⁻¹ de picloram.

O 2,4-D não foi eficiente na indução de calos em explantes foliares e caulinares de uvaieira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A.; YEOMAN, M. N. Growth patterns in tissue (callus) culture, In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. California: Blackwell Scientific, 1977. p. 267-306.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p.

Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAMARGO, J. T. et al. Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese *in vitro* **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5 n. 2, p. 81-83, maio/ago. 1999.

CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplasto em *Coffea***. 1999. 111 p. (Tese-Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CUNHA, A. C. G.; FERREIRA, M. F. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth Kinectis of flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 1-8, 1996.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DUSKOVA, J.; DUSEK, J. *Leuzea carthamoides* DC. *in vitro*. **Herba Polonica**, Praha, v. 41, n. 2, p. 165-169, May 1995.

FARIA, J. T. C. **Calogênese e organogênese *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh.)**. 1996. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FERREIRA, E. A. **Micropropagação, Calogênese e Irradiação da Figueira ‘Roxo De Valinhos’**. 2006. 103 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: Part 2 in practice**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture – Part 1: The technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MACIEL, A. L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MATTOS, J. R. **Estudo pomológico dos frutos indígenas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, 1954.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p. (Textos Acadêmicos).

PEREIRA, A. M. S. Biotecnologia de plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 46, jul. 2000. Suplemento.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins Nijoff, 1990. 326 p.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *annonaceae***. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, A. C. P. et al. Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, MG: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v. 1, p. 156- 159.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, F. P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. EMBRAPA - DF. Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc.2001/simposios/s-joao%20batista%20teixeira./palestra%20joao%20batista%20teixeira>>. Acesso em: 21 jan. 2006.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. ***In vitro Cellular & Developmental Biology***, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, July/Sept. 1996.