



**ERIVELTON RESENDE**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Campomanesia*  
*pubescens* (DC.) Berg.**

**LAVRAS – MG  
2017**

**ERIVELTON RESENDE**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Erivelton .  
Micropropagação de *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg. /  
Erivelton Resende. - 2017.  
89 p.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.  
Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Gabiroba. 3. Campomanesia. I. Pasqual,  
Moacir. . II. Título.

**ERIVELTON RESENDE**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg.**

**MICROPROPAGATION OF *Campomanesia pubescens* (DC.) Berg.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 21 de setembro de 2017.

Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares	UFLA
Dr. Helbert Rezende	IPTAN
Dra. Ester Alice Ferreira	EPAMIG
Dr. Ângelo Albérico Alvarenga	EPAMIG

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2017**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, à EPAMIG e à Universidade Federal de Lavras, pelas oportunidades e pela formação.

À minha esposa, Jane Daisy e a meus filhos, Ana Clara e Eriveltinho, pela compreensão e paciência.

Aos meus pais, Albertino José de Resende (*in memoriam*) e Maria Anita Silva Resende (*in memoriam*), pela educação, pela dedicação e pelo exemplo.

Aos meus irmãos, Maísa, Márcia, Maristela, Ulisses e Aroldo, pelos anos de convivência.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pela liberação e possibilitar esse momento de crescimento.

Ao meu orientador, professor Moacir Pasqual, por sempre me receber de braços abertos, pelos ensinamentos e pelo apoio.

Ao meu coorientador, Dr. Filipe Almendagna Rodrigues pelo apoio, amizade e colaboração nos trabalhos da tese.

À FAPEMIG, pela concessão de bolsas de estudos durante a graduação, o mestrado e o doutorado.

A Marli, sempre atenciosa, pela presteza e compreensão em todos os momentos.

Ao setor de Fitotecnia e a todos os professores, pelos ensinamentos e as trocas de experiências, por todo esse período.

Aos laboratoristas Vantuil e Claret, pela presteza, profissionalismo e amizade.

Às minhas bolsistas, Leidiane e Israela, pela contribuição na condução dos trabalhos.

Aos colegas do laboratório, Renata, Penoni, Adalvan, Luciana, Miriã, enfim, a todos que me receberam e colaboraram para que esse momento acontecesse, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A gabirobeira, planta nativa do cerrado, produz fruto saboroso, podendo ter várias utilidades, na mesa, em bebidas e, popularmente, como planta medicinal. Atualmente, é fonte de renda para muitas comunidades e, devido à expansão da fronteira agrícola, o desenvolvimento de tecnologias que permitam sua domesticação torna-se necessário. Dentre os insumos necessários para a implantação e a condução de plantios produtivos e rentáveis, a produção de mudas de alta qualidade sanitária, padronizadas, que reproduzam plantas produtivas, oriundas da seleção de genótipos superiores e com características agrônômicas desejáveis é muito importante. Considerando que a *Campomanesia pubescens* é espécie alógama, a produção de mudas via semente proporciona mudas heterogêneas. Desse modo, a reprodução assexuada permite reproduzir indivíduos idênticos à planta mãe. Os objetivos, neste trabalho, foram verificar, na fase de multiplicação *in vitro* de *C. pubescens*, a influência da concentração dos sais dos meios de cultura WPM e MS e da citocinina BAP, e, na fase de enraizamento *in vitro*, o efeito das concentrações dos sais do meio WPM e da auxina AIB. Conclui-se que a micropropagação de *C. pubescens* cultivada em sala de crescimento pode ser efetuada em meio de cultura WPM, MS 50% e 100%, adicionado de 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e seu enraizamento em meio WPM 75% da concentração dos sais do meio suplementado de 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, em microestacas com dois internódios.

**Palavras-chave:** Micropropagação. Gabiroba. Campomanesia. Meios de cultura.



## ABSTRACT

Gabirobeira, a native plant of the cerrado, produces tasty fruit, being able to have several utilities, in the table, in drinks and, popularly, like medicinal plant. Nowadays, it is a source of income for many communities, and due to the expansion of the agricultural frontier, the development of technologies that allow its domestication becomes necessary. Among the inputs required for the implantation and conduction of productive and profitable plantations, the production of high standard quality sanitary seedlings that reproduce productive plants, coming from the selection of superior genotypes, with desirable agronomic characteristics is very important. Considering that *Campomanesia pubescens* is an allogama species, the production of seedlings through seed provides heterogeneous seedlings, thereby, the asexual reproduction allows to reproduce individuals identical to the mother plant. The objectives of this study was to verify, in the in vitro multiplication phase of *C. pubescens*, the influence of the salts concentration of culture medium (MS and WPM) and cytokinin (BAP), and also, in the in vitro rooting phase, the effect of salt concentrations of WPM medium and IBA auxin. It is concluded that the *C. pubescens* micropropagation cultivated in the growth room can be done in the culture medium WPM, MS 50% and 100%, adding with 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP and its rooting in 75% of the salt concentration of the supplemented medium of 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA, in two-internode micro-heads .

**Keywords:** Micropropagation. Gabiroba. Campomanesia. Culture medium.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Floração de *Campomanesia* spp.....20  
Figura 2 - Mudas de gabirobeira produzidas por via sexual, germinação de semente em substrato comercial. Lavras, MG, 2017.....25

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Número de brotos de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, MG, UFLA, 2017.....51  
Figura 2 - Comprimento de brotos de *Campomanesia pubescens* em diferentes concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017.....54  
Figura 3 - Número de folhas de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017. ...56  
Figura 4 - Massa fresca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017. ....57  
Figura 5 - Massa seca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017. ....59

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Número de raízes de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ...78  
Figura 2 - Comprimento de raízes de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ....79  
Figura 3 - Massa seca de raízes de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ...80  
Figura 4 - Comprimento de brotos de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ....81  
Figura 5 - Número de folhas de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ...82  
Figura 6 - Massa fresca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ....83

Figura 7 - Massa seca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017. ....84

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Origem e distribuição geográfica da família Myrtaceae .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Distribuição geográfica do gênero <i>Campomanesia</i> e características botânicas .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Composição química, propriedades nutricionais e medicinais da <i>Campomanesia pubescens</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>A cultura da gabirobeira .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Propagação .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Propagação vegetativa .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Micropropagação .....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
	<b>CAPÍTULO 2 Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia pubescens</i>: meios WPM e MS x BAP .....</b>	<b>43</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>CAPÍTULO 3 Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia pubescens</i>: meio WPM x AIB.....</b>	<b>67</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>



## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade do Cerrado constitui uma das grandes riquezas de nosso país, devido ao elevado número de espécies. Porém, apesar do potencial dessas espécies, elas ainda continuam negligenciadas pela pesquisa. Além disso, com o constante desmatamento e a degradação do meio ambiente, perdas de diversidade genética irreversíveis ocorrem em várias espécies.

As frutíferas nativas do Cerrado representam elevado potencial econômico para a agricultura, com a possibilidade de produção de frutos diferenciados e nutritivos e para o paisagismo, podendo também ser utilizadas na arborização urbana ou em jardins, e na indústria farmacêutica. Segundo Miller et al. (1990), muitas são as espécies silvestres comestíveis, as quais constituem um patrimônio genético e cultural de inestimável valor, inclusive por suas qualidades como planta melífera.

As mirtáceas destacam-se entre as diversas famílias de plantas, particularmente entre as plantas nativas, com grande potencial ecológico e comercial. Uma das espécies promissoras da família Myrtaceae do Cerrado brasileiro é a *Campomanesia pubescens*, uma frutífera lenhosa, conhecida popularmente como gabiroba e também como guavirova, guabiroba-miúda, guabirobeira do mato e gavira.

A espécie está distribuída geograficamente desde Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o norte do Uruguai e a Província de Corrientes, na Argentina. A gabirobeira tem origem em várias regiões do Brasil, existindo várias espécies conhecidas, tais como *Campomanesia xanthocarpa*, *Campomanesia fenzliana*, *Campomanesia eugenioides*, *Campomanesia pubescens* e *Campomanesia*

*lineatifolia*, sendo a primeira nativa desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, enquanto as demais se espalham desde o Brasil Central até o sul do país.

O nome *Campomanesia* é uma homenagem ao naturalista espanhol Rodrigues de Campomanes e *pubescens* significa que uma parte da planta é coberta por pelos finos. Já o nome gabioba tem suas raízes na língua tupi-guarani, “wabiob”, e significa casca amarga.

Sua domesticação torna-se importante não somente para utilização humana, seja na alimentação ou na extração de novos compostos bioativos, mas também para a preservação da biodiversidade e para a obtenção de novos compostos químicos, carecendo de tecnologias que possibilitem a sua produção em larga escala, com qualidade e regularidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem e distribuição geográfica da família Myrtaceae

Os centros de diversidade da família Myrtaceae estão localizados na Austrália, no sudoeste da Ásia, na América do Sul e com pouca representatividade na África e na Europa (GRATTAPAGLIA et al., 2012; SOUZA; LORENZI, 2008). Wilson et al. (2005) propuseram a divisão da família em duas subfamílias, Psiloxylodeae, que compreende somente dois gêneros africanos, e Myrtoideae, que tem distribuição pantropical e centros de radiação na América do Sul, compreendendo cerca de 130 gêneros e 5.600 espécies (GRATTAPAGLIA et al., 2012; GRESSLER; IZO; MORELLATO, 2006). No Brasil existem 23 gêneros e, aproximadamente, 1.000 espécies (LORENZI et al., 2006). Do ponto de vista taxonômico, é uma das famílias mais complexas, tanto pelo número de espécies quanto pela utilização de alguns caracteres críticos na delimitação de grandes grupos (SOUZA; LORENZI, 2006).

A Myrtaceae é a oitava maior família de plantas de floração e compreende vários gêneros de destaque econômico e ecológico de relevância mundial, sendo encontrada em vários “hotspots” de biodiversidade do mundo, incluído o Bioma Cerrado (GRATTAPAGLIA et al., 2012).

A presença de glândulas translúcidas no limbo foliar é a característica mais marcante das Myrtaceae. Estas glândulas são cavidades secretoras contendo terpenoides e outros compostos aromáticos que também se distribuem em outras partes das plantas. As folhas são opostas ou alternas, usualmente com nervação pinada. As flores são, geralmente, epíginas, mas podem apresentar periginia; os estames são, comumente, numerosos e os ovários são, usualmente, ínferos a semi-ínferos, com número variável de lóculos (JUDD et al., 1999). O

potencial e o significativo interesse econômico pela referida família são reconhecidos no Brasil. Várias espécies são utilizadas na alimentação, no fornecimento de madeira, em aplicações medicinais e para ornamentação. Entre as espécies apreciadas por seus frutos, além da gabirobeira, merecem destaque a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha* L.), o jambo (*Syzygium jambos* (L.) Alston) e a jabuticaba (*Plinia cauliflora* L.), também utilizadas na fabricação de licores. Entre as grandes produtoras de madeira e também de antissépticos, destacam-se várias espécies de *Eucalyptus* L. Her. Como ornamentais, merecem destaque *Myrtus communis* L. e *Melaleuca* L. (COSTA, 2009).

Dentre esses gêneros, destaca-se o *Campomanesia*, cujo plantio em escala comercial ainda é incipiente, dependendo de estudos para possível domesticação.

## **2.2 Distribuição geográfica do gênero *Campomanesia* e características botânicas**

O gênero *Campomanesia*, composto por árvores e arbustos, está distribuído do norte da Argentina à Trindade e da costa do Brasil ao Peru, Equador e Colômbia (LANDRUM, 1986). Segundo Landrum (1986), as árvores são encontradas nas florestas subtropicais e tropicais do leste do Brasil, do norte da Argentina e nos Andes. Já os arbustos ocorrem nos campos e nos cerrados do interior do Brasil (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Segundo Forzza et al. (2010), no Brasil existem 31 espécies de *Campomanesia*, sendo 21 endêmicas e cinco nativas para o bioma Cerrado, que são *C. adamantium*, *C. eugenioides*, *C. pubescens*, *C. pabstiana* e *C. sessiliflora*.

A classificação botânica corresponde ao Reino: *Plantae*, Filo: *Magnoliophita*, Classe: *Dicotyledoneae*, Ordem: *Myrtales*, Família: *Myrtaceae* e Gênero: *Campomanesia*.

Segundo Lorenzi et al. (2006) e Mendes e Ferrão (1999), as espécies do gênero *Campomanesia* e os nomes populares são os seguintes: *Campomanesia adamantium*, gabiroba-branca; *Campomanesia durea*, gabiroba-do-campo; *Campomanesia corymbosa*, gabiroba; *Campomanesia cyanea*, gabiroba; *Campomanesia desertorum*, gabiroba-do-sertão; *Campomanesia dichotoma*, ubucaba; *Campomanesia fenzliana*, gabiroba; *Campomanesia grandiflora*, gabiroba; *Campomanesia guaviroba*, gabiroba; *Campomanesia guazumifolia*, sete-copas, gabiroba-da-mata; *Campomanesia klotzschiana*, gabiroba-do-campo; *Campomanesia lineatifolia*, gabiroba; *Campomanesia phae*, cambuci; *Campomanesia pubescens*, gabiroba; *Campomanesia reticulata*, gabiroba; *Campomanesia rivularis*, gabiroba; *Campomanesia rufa*, gabiroba e *Campomanesia xanthocarpa*, gabiroba-do-campo.

As plantas arbóreas medem entre 8 e 15 m, podendo chegar a 25 m, e as arbustivas, entre 0,80 e 1,5 m, ocorrendo, normalmente, em moitas. Durante o período de inverno, há caducifolia e, na primavera, as plantas rebrotam e florescem abundantemente (ALMEIDA; NAVES; XIMENES, 2000). A inflorescência da gabirobeira apresenta-se em racemo axilar altamente modificado, no qual a ráquis continua o crescimento vegetativo e produz folhas normais abaixo de cada botão, de modo a aparecer um ramo vegetativo normal com uma série de flores ou frutos axilares isolados (racemo precoce). Brácteas e bractéolas são, geralmente, persistentes no fruto (PROENÇA, 1991). Suas flores são pequenas, de coloração creme-esbranquiçado, sendo hermafroditas. Almeida, Naves e Ximenes (2000) destacaram que insetos são responsáveis pela polinização das flores, sendo as abelhas os principais agentes polinizadores. A floração (Figura 1) ocorre, normalmente, de setembro a novembro e a

frutificação, de outubro a dezembro, em alguns anos até em fevereiro, começando a produzir frutos a partir de um a dois anos após o plantio (LORENZI et al., 2006). Seus frutos são arredondados e de coloração verde-amarelada. A polpa é amarelada, suculenta, envolvendo numerosas sementes (AVIDOS; FERREIRA, 2003). Produz de 30 a 100 frutos por planta, com dimensões de 1 a 3 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro.

Figura 1 - Floração de *Campomanesia* spp.



Fonte: Imagem cedida por Filipe Almendagna Rodrigues (2013).

Especificamente em relação à espécie *C. pubescens*, Almeida et al. (1998) observaram que sua floração ocorre no período de setembro a novembro. A *C. pubescens* apresenta flores com cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento; os

frutos são do tipo bagas, de cerca de 1 a 2 cm de diâmetro, de cor amarelo-esverdeada.

A espécie *C. pubescens* é autoincompatível, sendo polinizada por abelhas do gênero *Bombus* (PROENÇA; GIBBS, 1993). A gabiroba é uma planta caducifólia. Seu florescimento ocorre de modo bem intenso, por um curto período de tempo. As flores duram um dia apenas, têm estigma do tipo seco, não produzem néctar e a liberação do pólen ocorre nas primeiras horas da manhã (ALMEIDA et al., 1998).

A principal forma de multiplicação das espécies do gênero *Campomanesia* se dá por meio de sementes (LORENZI et al., 2006). A gabirobeira se assemelha com a mangaba, em relação à germinação de suas sementes, e podem perder rapidamente o poder germinativo. Por isso, devem ser semeadas logo após a extração dos frutos (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003). Melchior et al. (2006) constataram que, na espécie *Campomanesia adamantium* Camb., a sementeira de sementes recém-retiradas do fruto apresentou melhores taxas de germinação. Os mesmos autores consideraram que a espécie estudada pode ser classificada como recalcitrante, por não suportar armazenamento à baixa temperatura e ser intolerante à dessecação. Relataram, ainda, que o grau Brix da polpa da fruta é um parâmetro importante de se observar para ter melhores resultados na germinação das sementes, sendo indicada à colheita dos frutos com, no mínimo, 15,75° para se obter 95% de germinação. Isso significa colher frutos mais maduros, nos quais a concentração de açúcares é maior.

### **2.3 Composição química, propriedades nutricionais e medicinais da *Campomanesia pubescens***

Os frutos da gabirobeira podem ser consumidos *in natura* e ser aproveitados pela indústria de alimentos para a produção de doces e sorvetes

(ÁVIDOS; FERREIRA, 2003), bem como servir de matéria-prima para a produção de licores, devido aos seus atributos de qualidade, como elevada acidez, ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos ( $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\beta$ -( $z$ ) ocimeno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, proporcionando aroma cítrico. Devido à alta concentração de ácido ascórbico (vitamina C) nos frutos de *C. adamantium*, seus frutos constituem importantes fontes dessa substância para animais e habitantes que dela se alimentam (VALLILO et al., 2006).

Propriedades aromáticas encontradas nos frutos das gabirobeiras favorecem a sua utilização como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas (ADATI, 2001). Segundo Vallilo et al. (2005), na espécie *C. phae*, os frutos são suculentos, com sabor e odor cítrico, pH igual a 2,91 e alto teor de umidade (88,80%), o que indica ser uma característica comum aos frutos da família Myrtaceae. Foram detectados elevados teores de fibras alimentares (4,00%), quando comparados aos de outras espécies popularmente conhecidas, da mesma família botânica. Foram obtidos valores baixos de proteína (0,44%), carboidratos totais (5,00%), lipídios (1,53%) e valores razoáveis de ácido ascórbico (33,37 mg 100 g<sup>-1</sup>). Entre os elementos inorgânicos, os que destacaram foram sódio (171,50 mg kg<sup>-1</sup>), potássio (622,65 mg kg<sup>-1</sup>), fósforo (123,69 mg kg<sup>-1</sup>) e cálcio (61,26 mg kg<sup>-1</sup>).

Vallilo et al. (2004) verificaram a predominância dos sesquiterpenos espatuleno (27%) e do óxido de B-cariofileno (29,0%) em *C. guazumifolia*; o biciclogermacreno (13,6%) e o globulol (10,8%) em *C. rombea* e o (E)-nerolidol (28,8%), em *C. Xanthocarpa*. Vallilo et al. (2006) avaliaram a composição dos óleos essenciais dos frutos de *C. adamantium* e identificaram 30 componentes entre monoterpênicos e fórmulas moleculares C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O, C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub> e sesquiterpenos com fórmulas moleculares C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> e C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O. Estas substâncias

apresentam atividade farmacológica, as quais podem ser encontradas nos frutos e também nas folhas.

Adati (2001), por meio de um estudo fitoquímico e farmacológico com folhas de plantas de *C. phaea*, detectou grande quantidade de óleo essencial, rico em linalol (11,11%), óxido de cariofileno (11,77%), betacariofileno (6,33%), betasselineno (6,33%) e alfacadinol (1,94%). As folhas podem ser utilizadas na medicina popular como depurativo, antidiarreico, antirreumático e redutor de colesterol no sangue (BIAVATTI et al., 2004) e, de acordo com Coutinho, Gentil e Bertolin (2008), as raízes também são empregadas no tratamento de diabetes.

Possui também compostos bioativos com efetiva ação antimicrobiana contra *Streptococcus aureus*, *S. Pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Candida albicans* (MARKMAN et al., 2000). Apresentam valor medicinal no combate à disenteria, febre, escorbuto e doenças das vias urinárias. Estudos indicaram a presença de flavonoides, taninos, saponinas e óleo essencial nas folhas dessa espécie (MARKMAN et al., 2000).

#### **2.4 A cultura da gabirobeira**

A cultura da gabirobeira encontra-se em fase de domesticação e, portanto, todos os aspectos relacionados ao seu cultivo ainda necessitam de mais estudos, podendo-se citar propagação vegetativa, seleção de genótipos superiores promissores, desenvolvimento e adaptação de práticas culturais, estudos sobre a fenologia da planta, adubação e nutrição, controle de pragas e doenças e aspectos relacionados com a pré e a pós-colheita do fruto. Tecnologias de propagação *in vitro* bem desenvolvidas e/ou adaptadas para a *Campomanesia* são também de grande importância para programas de conservação de recursos

genéticos e melhoramento genético da espécie, merecendo prioridade, inicialmente, estudos relacionados à sua propagação.

## **2.5 Propagação**

A produção de mudas de qualidade tem como objetivo propagar genótipos superiores, com características agronômicas desejáveis, possibilitando a obtenção de plantas adaptadas, precoces, com frutos aceitos pelo mercado. Quando o destino for o paisagismo, sua arquitetura de copa deve obedecer a padrões que possibilitem sombreamento adequado e não danifiquem a calçada ou obstruam a rede de captação de água pluvial, bem como seu cultivo em vasos.

As mudas podem ser obtidas por via sexuada ou assexuada, e a propagação de espécies alógamas via sementes resulta em mudas heterogêneas de baixa qualidade em virtude da variabilidade genética, o que, conseqüentemente, pode ser prejudicial ao manejo e à produtividade dos plantios (DIAS et al., 2012). A propagação da gabirobeira ocorre pelo uso de sementes (LORENZI et al., 2006) (Figura 2), logo após a extração (ALMEIDA et al., 1998). No entanto, essas sementes não suportam nenhum armazenamento e são intolerantes à dessecação (MELCHIOR et al., 2006; SOUZA, 2014). Sementes que não são tolerantes à dessecação têm períodos de vida limitados no armazenamento e perdendo a sua viabilidade devido à secagem, sendo classificadas como recalcitrantes (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

Figura 2 - Mudas de gabirobeira produzidas por via sexual, germinação de semente em substrato comercial. Lavras, MG, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Segundo Fachinello, Hoffmann e Nachtigal (2005) e Seo et al. (2009), diversos fatores influenciam a germinação de sementes. Destacam-se, entre os principais, a dormência, o teor de umidade, a qualidade da semente, a recalcitrância e a presença de gases como oxigênio e gás carbônico.

Outro fator que influencia diretamente o processo germinativo é o teor de água nas sementes, alterando seu armazenamento e sua longevidade. As sementes, quando analisadas em relação à tolerância a secagem, podem ser classificadas em dois grandes grupos, ortodoxas e recalcitrantes. Se, por um lado, as sementes recalcitrantes apresentam elevado teor de água na maturidade, não suportando a dessecação e começando a germinar imediatamente após a fase de maturação, sem passar pela fase de secagem e quiescência metabólica, por

outro lado, as sementes ortodoxas toleram a dessecação no final de seu amadurecimento na planta, mantendo seu potencial de germinação por longos períodos de armazenamento em níveis adequados de umidade.

A sensibilidade da semente à luz está correlacionada à ação do fitocromo, o qual altera a sua sensibilidade em função da temperatura (FRANKLIN, 2009). Como os níveis endógenos de giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA) são nodulados pelos fitocromos e, conseqüentemente, a capacidade de resposta de giberelinas (SEO et al., 2009) e o potencial de crescimento do embrião e dos níveis hormonais são alterados pela temperatura (PENFIELD, 2008; TOH et al., 2008), há uma correlação direta entre demanda por luz e temperatura (SEO et al., 2009).

Em relação ao ponto de colheita de gabirobeira, Melchior et al. (2006) estudaram o comportamento de sementes de *Campomanesia adamantium* e relacionaram a maturidade dos frutos e a germinação, recomendando a colheita dos frutos, necessariamente, com o mínimo de 15,65° Brix, e a semeadura logo após a extração dos frutos.

Esse procedimento também é recomendado por Scalon et al. (2009), que avaliaram o potencial germinativo das sementes de *Campomanesia adamantium* e o crescimento inicial das plantas, observando que o processo germinativo das sementes foi elevado e ocorreu três dias após a retirada do fruto e não variou em função da temperatura de incubação e do processamento. Os autores notaram, ainda, perda da qualidade fisiológica, diminuindo a viabilidade e o vigor das sementes, quando não extraídas do fruto.

Dresch et al. (2012) avaliaram o efeito da temperatura e da umidade do substrato sobre a germinação de *Campomanesia adamantium* e observaram que o recém-processamento das sementes proporcionou maior germinação e vigor, quando comparadas às sementes secas e armazenadas, e que a qualidade

fisiológica das sementes foi prejudicada pela redução do grau de umidade para 27% e pelo armazenamento.

Por outro lado, as técnicas de propagação vegetativa, e, dentre elas, a estaquia, constituem uma alternativa de superação das dificuldades na propagação de espécies nativas alógamas, padronizando as mudas, podendo ser utilizadas para fins comerciais, assim como auxiliar no resgate e na conservação de recursos genéticos florestais (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). O uso da estaquia na formação de mudas poderá garantir a antecipação do período reprodutivo, que é uma vantagem da propagação vegetativa, e contribuir para a exploração econômica da gabirobeira. Além disso, a propagação proporciona a manutenção das características da planta-matriz nos descendentes, assegurando a formação de pomares comerciais homogêneos e facilitando a condução do plantio (SASSO; CITADIN; DANNER, 2010).

### **2.5.1 Propagação vegetativa**

A propagação vegetativa, assexuada ou clonal, consiste na produção de mudas por meio de segmentos vegetativos da planta proporcionados pela capacidade de regeneração dos órgãos vegetativos. Nesse tipo de propagação as plantas são oriundas da mesma planta matriz, portanto, apresentam as mesmas necessidades climáticas, de solo, de manejo e nutricionais, propiciando mudas padronizadas para a implantação de áreas produtivas com plantas desejadas pelo mercado (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

Para Hartmann et al. (2011), fatores como a manutenção do valor agrônômico da planta matriz; a fixação de genótipos selecionados; a redução do período improdutivo, com diminuição da fase juvenil e a antecipação do período de florescimento e, ainda, a obtenção de plantios uniformes, com multiplicação

de plantas provenientes de cruzamentos e selecionadas para características desejáveis, são vantagens da propagação vegetativa.

Mas, segundo Mantelli, Santos e Costa Netto (2010), a utilização de estacas como alternativa para a propagação de gabirobeira não produziu resultados satisfatórios, mesmo quando foram utilizados reguladores de crescimento no enraizamento de estacas lenhosas e herbáceas de *Campomanesia* obtidas em três épocas diferentes. Foram observados baixos índices de sobrevivência e influência da época de coleta.

### **2.5.2 Micropropagação**

Devido à importância econômica e ecológica da espécie *Campomanesia pubescens* e os decorrentes problemas para a propagação, o cultivo *in vitro* se torna uma ferramenta útil para a propagação desta frutífera. Por meio desta técnica podem ser obtidas mudas em quantidades suficientes e com qualidade fitossanitária, livres de doenças, em curto período de tempo (ARDITTI; ERNST, 1993), para atender à demanda do mercado.

A micropropagação é utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de plantas ornamentais, frutíferas e eucalipto, além de contribuir para a conservação de germoplasma (EKE; AKOMEAH; ASEMOTA, 2005) e impedir a extinção de muitas espécies vegetais (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001). Em muitos casos, a técnica é direcionada para a produção comercial, sendo realidade em diversos países, destacando-se Holanda, França, Espanha, Japão e, mais recentemente, o Brasil.

Segundo Bastos et al. (2007), a micropropagação envolve algumas etapas, que vão desde a desinfestação do material vegetal para o estabelecimento *in vitro*, passando pela multiplicação das brotações, enraizamento e, posteriormente, a aclimatização do explante. A composição do meio nutritivo e a

combinação dos reguladores de crescimento são fatores fundamentais para a produção de plantas em larga escala (SMITH, 2013). Entretanto, as respostas variam conforme a espécie, as classes, os tipos e as doses do regulador de crescimento utilizado (PINHAL et al., 2011).

O meio de cultura mais utilizado em cultura de tecidos para a propagação de várias espécies vegetais é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), embora sua concentração de nutrientes seja considerada elevada, principalmente com relação à concentração de nitrogênio e, nesse sentido, muitos ajustes estão sendo sugeridos, com o objetivo de obter melhores respostas das culturas e redução de custos. Um dos fatores importantes para o sucesso do sistema de micropropagação é a interação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. Especificamente em relação aos fatores ambientais, busca-se ajustar os componentes do meio de cultura, utilizando diversas formulações de meios básicos (VILLA et al., 2010). A composição do meio de cultura está diretamente correlacionada com o desenvolvimento da planta, sendo constituído por macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose e agente gelificante, carvão ativado e reguladores de crescimento. A concentração de sais minerais nos meios de cultura tem sido amplamente variada, buscando-se obter o ajuste mais adequado para a micropropagação da espécie estudada, proporcionando um bom desenvolvimento da cultura no cultivo *in vitro*.

Na fase de multiplicação, o 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina de maior uso em várias espécies, inclusive lenhosas, como o eucalipto, que respondem diferentemente à sua adição ao meio (ARAGÃO; ALOUFA; COSTA, 2010).

Rodrigues et al. (2013) relataram que a adição de 1,30 mg L<sup>-1</sup> BAP no meio MS com 50% dos sais foi eficiente para a multiplicação *in vitro* da *Physalis peruviana*, que é uma frutífera fina, com elevado potencial econômico, a exemplo do mirtilo, framboesa, cereja, amora e pitaya. Já em espécies da

família Myrtaceae foram encontradas respostas diretamente relacionadas à indução de brotação, quando as microestacas foram submetidas a tratamentos contendo BAP. Rai, Jaiswal e Jaiswal (2009) observaram, em *Psidium guajava* L., que houve indução de brotos em concentrações inferiores a  $0,23 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Porém, em *Eugenia uniflora* L., a concentração de  $1,13 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP proporcionou maior número de brotos (2,3) por explante.

Em experimentos com gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*), Faria et al. (2010) observaram que melhores resultados em todas as variáveis analisadas foram obtidos com  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Contudo,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP é suficiente para a obtenção de brotações.

Já o enraizamento é uma etapa caracterizada por dificuldades, apresentando limitações para algumas espécies em função de diversos fatores. Porém, para outras espécies e, até mesmo, para cultivares de uma mesma espécie, tem oferecido bons resultados (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

O processo de formação de raízes adventícias *in vitro* ocorre de uma a três semanas, podendo ser dividido em três fases que são indução, iniciação e alongamento das raízes. Cada fase é influenciada pela concentração de auxina e tempo de exposição ao regulador de crescimento (MERCIER, 2004), sendo, muitas vezes, fator limitante no processo da micropropagação de plantas lenhosas (BORGES et al., 2012). Segundo Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2003), as raízes podem ser originadas de células parenquimáticas vivas, calos, câmbio, raio vascular ou medular, floema, córtex, lenticelas ou canais resiníferos.

A indução e a formação de raízes adventícias são processos importantes para a posterior transferência dos explantes às condições *ex vitro*, para maximizar a sobrevivência das plantas (KRISAN et al., 2007), facilitando o estabelecimento da muda no substrato e melhorando o processo de aclimatização (PATI et al., 2006).

As plantas lenhosas têm menor adaptabilidade à micropropagação e poucas espécies são micropropagadas com sucesso (ROUT et al., 1999), pois possuem mais camadas de floema e xilema secundário e as raízes adventícias se formam a partir de células vivas do parênquima, primeiramente do floema secundário mais jovem. O tempo de desenvolvimento das raízes iniciais de lenhosas varia amplamente entre as espécies, e sua resposta ao enraizamento depende de muitos fatores endógenos e exógenos que, isolados ou conjuntamente, influenciam a porcentagem de enraizamento. Entre os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro* estão os níveis de auxina endógena; as características inerentes à planta matriz, como juvenilidade e genótipo e o tamanho do segmento nodal, dentre outros, como meio de cultura, presença de reguladores de crescimento e carboidratos, nutrição mineral, presença de poliaminas, substâncias como carvão ativado, compostos fenólicos, presença de folhas e gemas e condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros.

O processo de enraizamento busca obter raízes homogêneas, padronizadas, em menor intervalo de tempo. Dessa forma, a determinação do tamanho do explante, a idade e a origem determinam o sucesso da rizogênese (DANTAS; NESI; MACHADO, 2002). Explante juvenil tem um conteúdo maior de auxina e de cofatores de enraizamento, aumentando, assim, a capacidade de enraizamento (MONCOUSIN, 1991b), sendo que materiais adultos podem ser rejuvenescidos por meio de sub cultivos, com a finalidade de promover o enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A concentração dos reguladores de crescimento é um dos fatores internos que afetam o enraizamento (ALFENAS et al., 2011). Em mirtáceas como a goiabeira, para potencializar o processo de enraizamento, recomenda-se a aplicação de reguladores de crescimento, como o ácido indolbutírico (AIB), que apresentam o maior efeito estimulante na formação de raízes em estacas

(ZIETEMANN; ROBERTO, 2007). Nachtigal e Fachinello (1995) e Souza, Schuch e Silva (2006) trabalharam com araçazeiro e também verificaram a influência do AIB no enraizamento dessa espécie.

Meios de cultura suplementados com auxinas correlacionam-se diretamente com o enraizamento *in vitro*. A auxina endógena mais bem caracterizada em plantas é o ácido indol-3-acético (IAA), no entanto, as moléculas sintéticas, tais como ácido 1-naftaleno-acético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido indol-3-butírico (AIB) podem provocar respostas bioquímicas, moleculares e fisiológicos semelhantes às do IAA (DE RYBEL et al., 2012).

Entre as auxinas, o AIB tem sido eficiente e utilizado na indução de raízes adventícias em uma grande variedade de espécies frutíferas (SCHMILDT et al., 2010), porém, a utilização de concentração excessiva no meio de cultura pode ser tóxica.

O AIB é o mais utilizado devido à sua menor mobilidade e maior estabilidade química na estaca (SARZI; PIVETTA, 2005), além de estabilidade à fotodegradação, menor fitotoxidez e capacidade de promover a formação de primórdios radiculares (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; HARTMANN et al., 2002). Segundo Borges et al. (2012), o AIB tem sido utilizado com sucesso no enraizamento *in vitro* de diferentes espécies, inclusive em mirtáceas, como o eucalipto.

Entretanto, no Brasil, em alguns trabalhos realizados com o gênero *Campomanesia* foi demonstrado que a adição do AIB no meio de enraizamento não tem sido eficiente para promover acréscimo na porcentagem de enraizamento (ROSSATO et al., 2016; SCUTTI; ZANETTI, 2000).

Outros fatores exógenos também contribuem para o processo de enraizamento. Algumas espécies são influenciadas pela presença de luz nas etapas de indução e iniciação do enraizamento. Durante estas fases faz-se

necessário que as partes aéreas sejam mantidas em condições de pouca ou nenhuma luminosidade, pois a presença de luz pode diminuir os níveis endógenos de auxina, inibindo o processo de formação de raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A luminosidade pode inativar fatores que promovem o enraizamento e aumentar a atividade de peroxidase (HARTMANN et al., 1990). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o efeito benéfico do carvão ativado pode ser físico, já que simula uma condição de escuro, situação mais adequada ao desenvolvimento de raízes adventícias, e, ainda, químico, por adsorver substâncias inibidoras do enraizamento, como os compostos fenólicos. Entretanto, pode também adsorver auxinas e nutrientes do meio, necessários ao enraizamento e ao desenvolvimento normal da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MCCOWN, 1988; PASQUAL, 2001).

A temperatura também tem efeito sobre o enraizamento. Segundo Moncousin (1991a), altas temperaturas contribuem para o aumento do metabolismo, favorecendo o desenvolvimento do primórdio radicular.

A composição do meio de cultura também é um fator de importância direta influenciando o processo de enraizamento adventício *in vitro*, em função da concentração de sais minerais contidos no preparo do mesmo e da presença de reguladores vegetais. Geralmente, o uso de meios menos concentrados tem possibilitado resultados superiores no enraizamento de plântulas *in vitro* (PASQUAL, 2001; SOUZA et al., 2005). Grimaldi et al. (2008), em um trabalho de revisão, afirmam que, durante a rizogênese, o meio de enraizamento utilizado deve ser diluído cerca de 50% a 75% em relação ao meio de multiplicação.

Várias formulações de meios básicos têm sido utilizadas, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido adotado com sucesso para diversas espécies. Entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos e composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor resultado (GRATTAPAGLIA;

MACHADO, 1998). O meio nutritivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 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 meio de cultura disponibiliza aos explantes nutrientes essenciais ao processo de enraizamento. O nitrogênio é disponibilizado para o explante na forma de amônio e nitrato, porém, quando fornecido somente na forma de amônio, pode causar toxidez (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Woodward, Bennett e Pusswonge (2006) observaram que o nitrato, como fonte principal de nitrogênio, produz maiores raízes em relação ao amônio. Explantes que apresentam deficiência em nitrogênio apresentam um melhor enraizamento, no entanto, deficiências severas são prejudiciais, pois afetam a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Segundo Moncousin (1991a), existe efeito positivo no enraizamento de explantes em relação aos micronutrientes, principalmente no crescimento de raízes, estando associado ao transporte de carboidratos, e ao metabolismo de auxinas e de fenóis.

O micronutriente zinco é fornecido na forma de sulfato de zinco e favorece o aumento de AIA endógeno (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

No processo de enraizamento adventício, a energia é exigida em grande quantidade, por envolver a divisão celular, na qual as células predeterminadas alteram a rota morfogênética para formar os primórdios radiculares (BRONDANI et al., 2012). Ela é fornecida pelos carboidratos, principalmente na forma de sacarose e também contribui para o equilíbrio do potencial osmótico do meio de cultura (PATI et al., 2006).

## REFERÊNCIAS

- ADATI, R. T. **Estudo biofarmagnóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum. Myrtaceae.** 2001. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacognosia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, M. J. O. F.; NAVES, R. V.; XIMENES, P. A. Influência das abelhas (*Apis mellífera*) na polinização da Gabiroba (*Campomanesia* spp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 25-28, 2000.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis.** Embrapa. Planaltina, DF, 1998. 464p.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLOGUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2003. 438 p.
- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. D. Effect of BAP (6-benzilaminopurine) on shoot induction in explants of Brazil wood. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2010.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids.** New York: J. Wiley, 1993. 682 p.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. parte II, p. 261-296.
- ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. **Frutos dos Cerrados: preservação gera muitos frutos.** 2003. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/bio15/frutos.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007.

BIAVATTI, M. W. et al. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) JF Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 93, n. 2, p. 385-389, 2004.

BORGES, S. R. et al. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012.

BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 48, p. 478-487, 2012.

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 transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1998. p. 87-132.

COSTA, C. J. **Armazenamento e conservação de sementes de espécies do cerrado**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 2009. 30 p.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; BERTOLIN, M. N. T. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. s332-s340, 2008. Suplemento 2.

DANTAS, A. C. M.; NESI, A.; MACHADO, L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 19-23, jan./abr. 2002.

DE RYBEL, B. et al. A role for the root cap in root branching revealed by the nonauxin probe naxillin. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 8, p. 798-805, 2012.

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

DRESCH, D. M. et al. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 94, p. 223-229, jun. 2012.

EKE, C. R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, n. 3, p. 244-246, 2005.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: [s.n.], 2005. 221 p.

FARIA, C. V. N. et al. Indução de brotações a partir de segmentos caulinares de gabirobeira. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19., 2010, Lavras. **Anais...** 2010. 1 CD-ROM.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2, 873 p.

FRANKLIN, K. A. Light and temperature signal crosstalk in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 63-68, 2009.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 8, p. 463-508, 2012.

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, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. parte II, p. 183-260.

GRESSLER, E.; IZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GRIMALDI, F. et al. *In vitro* rooting of fruit trees of the Rosaceae family. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 5<sup>th</sup> ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990. 647 p.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8<sup>th</sup> ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer, 1999.

KRISAN, B. et al. Effects of paclobutrazol and indole- 3-butyric acid on in vitro rooting and growth of some rootstocks of the genus *Prunus* L. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v. 72, n. 5, p. 198-201, 2007.

LANDRUM, L. R. **Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae)**. New York: The New York Botanical Garden, 1986. 178 p. (Flora Neotropica Monograph, 45).

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, Bronx, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

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

LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura***. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

MANTELLI, M.; SANTOS, S. C.; COSTA NETTO, A. P. Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas de gabioba (*Campomanesia* spp.), sob nebulização intermitente. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO - CONPEEX, 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2010. 1 CD-ROM.

MARKMAN, B. E. O. et al. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Campomanesia xanthocarpa*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 36, p. 55-57, 2000.

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.

MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MENDES, V. L.; FERRAO, J. E. **Fruticultura tropical**: espécies com frutos comestíveis. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical - Missão de Macau em Lisboa, 1999.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 217-249.

MILLER, D. J. et al. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 42, n. 6, p. 899-915, 1990.

MONCOUSIN, C. H. Rooting of microcuttings: general aspects. **Acta Horticulturae**, Georgia, v. 289, p. 301-308, 1991a.

MONCOUSIN, C. H. Rooting of microcuttings: unmanipulated factors. **Acta Horticulturae**, Georgia, v. 289, p. 319-327, 1991b.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.

NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C. Efeito de substratos e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 34-39, 1995.

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

PATI, P. K. et al. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 94-114, 2006.

PENFIELD, S. Temperature perception and signal transduction in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, n. 3, p. 615-628, 2008.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PROENÇA, C. E. **The reproductive biology and taxonomy of the Myrtaceae of the Distrito Federal (Brazil)**. Saint Andrew: University of Saint Andrews, 1991. 28 p.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, n. 2, p. 343-340, 1993.

RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.

RODRIGUES, F. A. et al. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 77-82, jan./fev. 2013.

ROSSATO, M. et al. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* Camb. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2016.

ROUT, G. R. et al. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 201-228, 1999.

SARZI, I.; PIVETTA, K. F. L. Efeito das estações do ano e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de variedades de miniroseira (*Rosa* spp.). **Científica**, Jaboticabal, v. 332, n. 1, p. 62-68, 2005.

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 571-576, 2010.

SCALON, S. de P. Q. et al. Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb.: efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 31, n. 2, p. 96-103, 2009.

SCHMILDT, E. R. et al. Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SCUTTI, M. B.; ZANETTE, F. Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) vegetative propagation *in vitro* and by cutting. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 1, n. 1/2, p. 75-82, 2000.

SEO, M. et al. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 463-472, 2009.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. Texas: College Station, 2013.

SOUZA, A. V. et al. Enraizamento in vitro de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 86-91, 2005.

SOUZA, G. C. **Qualidade fisiológica de sementes de duas espécies frutíferas do gênero *Campomanesia***. 2014. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2014.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento in vitro de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1920-1922, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de Orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Ornamental Horticulture**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.

TOH, S. et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in arabidopsis seeds. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, p. 1368-1385, 2008.

VALLILO, M. I. et al. Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 241-244, 2005.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência Tecnologia e Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

VALLILO, M. J. de et al. Identificação de terpenos no óleo dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. Landrum-Myrtaceae. **Arquivos de Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 1-749, 2004. Suplemento.

VILLA, F. et al. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 109-117, 2010.

WILSON, P. G. et al. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 251, p. 3-19, 2005.

WOODWARD, A. J.; BENNETT, I. J.; PUSSWONGE, S. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. **Scientia Horticulturae**, Ohio, v. 110, p. 208-213, 2006.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009. 272 p.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S. R. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2007.

## CAPÍTULO 2 Multiplicação *in vitro* de *Campomanesia pubescens*: meios WPM e MS x BAP

### RESUMO

A gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) é uma espécie frutífera nativa do Cerrado pertencente à família Myrtaceae. Seu ecossistema tem sido ameaçado pela expansão da fronteira agrícola e por queimadas frequentes, reduzindo as áreas nativas de gabirobeira. Como forma de se evitar a extinção dessa espécie, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de mudas em larga escala, sendo possível por meio da micropropagação. Objetivou-se verificar a influência da concentração dos sais do meio de cultura WPM e MS e da citocinina BAP na multiplicação de *C. pubescens*. Segmentos nodais com dois internódios foram utilizados como explantes. Os meios de cultura foram compostos de 50% e 100% dos sais do meio WPM e MS e concentrações de BAP de 0; 0,5; 1 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 com quatro repetições e quatro microestacas por repetição, totalizando 16 microestacas por tratamento. Aos 90 dias após a implantação, avaliaram-se o número de brotos, o comprimento de maior broto (cm), o número de folhas e a massa fresca e seca de parte aérea (g). Conclui-se que a multiplicação de *C. pubescens* pode ser efetuada em meio de cultura WPM, com 100% da sua concentração de sais, suplementada com 0,5-1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, utilizando-se microestacas com dois internódios.

**Palavras-chave:** Micropropagação. Regulador de crescimento. Gabiroba.

## ABSTRACT

Gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) is a fruitful native species of the Cerrado belonging to the *Myrtaceae* family. Its ecosystem has been threatened by the expansion of the agricultural frontier and frequent burnings, reducing the native areas of gabirobeira. As a way to avoid the extinction of this species, it is necessary to develop technologies that allow the production of seedlings on a large scale, being possible through micropropagation. Therefore, the objective of this study was to determine and correlate the influence of salt concentrations of WPM and MS (50 and 100%) culture medium and cytokinin BAP (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) in the multiplication of *C. pubescens*. Nodal segments with two internodes were used as explants. The culture media were composed of 50, 100% of the WPM and MS medium salts and BAP concentrations (0, 0.5, 1, 2.0 mg L<sup>-1</sup>). The experimental design was completely randomized in a 4 x 4 factorial scheme with four replicates and four replicate micro - sections, totaling 16 microplants per treatment. Ninety days after implantation, the number of shoots, shoot length (cm), number of leaves, shoot fresh and dry mass (g) were evaluated. It is concluded that the multiplication of *C. pubescens* can be done in WPM culture medium, with 100% of its salt concentration, supplemented with 0.5-1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP, using two internodes.

**Keywords:** Micropropagation. Growth regulator. Gabiroba.

## 1 INTRODUÇÃO

A gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) é uma frutífera típica do cerrado. Sua distribuição natural se estende desde Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o norte do Uruguai e a província de Corrientes, na Argentina. Seu ecossistema tem sido ameaçado pela expansão da fronteira agrícola, agravada pelo extrativismo dos seus frutos, e por queimadas frequentes que têm reduzido as áreas nativas de gabirobeira. Essas ocorrências, somadas ao pouco investimento em pesquisa nessa espécie e à característica fisiológica da semente, como recalcitrância (MELCHIOR et al., 2006) e reprodução alógama, dificultam a obtenção de mudas padronizadas de genótipos superiores, componente primordial para a implantação de cultivos saudáveis, produtivos e rentáveis.

As espécies do gênero *Campomanesia* apresentam grande potencial econômico, tanto para fins paisagísticos como para aproveitamento em geleias, sorvetes e licores, pois seus frutos têm polpas abundantes e suculentas (KIM; TENG; WICKER, 2005), também sendo potencial para a extração de biocompostos. Suas características são elevada acidez, presença de ácido ascórbico, minerais e hidrocarbonetos monoterpênicos, fatores que lhe conferem aroma cítrico (VALLILO et al., 2006), proporcionando a produção de bebidas.

Sua propagação pode ser sexuada ou assexuada, sendo que, por sementes, devido à alogamia, é caracterizada pela desuniformidade de sua progênie e ainda agravada pela recalcitrância de suas sementes, que impossibilita a produção de mudas em outros períodos. Entretanto, pela via assexuada por meio de estacas, sua propagação também é desuniforme. No trabalho de Martins et al. (2015), as estacas lenhosas foram superiores às herbáceas na porcentagem de enraizamento de estacas de *Campomanesia adamantium*, que foi influenciada pela época de colheita, demandando, assim, desenvolvimento de pesquisas no cultivo *in vitro*.

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das principais aplicações da cultura de tecidos e destina-se, principalmente, à produção de plantas geneticamente uniformes com qualidade superior em curto período de tempo (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 1997). Ela tem algumas etapas que vão do estabelecimento *in vitro* à multiplicação, ao enraizamento e à posterior aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007). Os explantes são inoculados em meio de cultura contendo macro e micronutrientes juntamente com uma fonte de carbono, a exemplo da sacarose, que é a mais utilizada, além de vitaminas e reguladores de crescimento e reagentes, que são indispensáveis para o cultivo *in vitro* de explantes vegetais. Após a inoculação fica submetido a condições de temperatura e luminosidade adequadas e controladas.

O meio de cultura mais utilizado na propagação *in vitro* de múltiplas espécies foi desenvolvido e otimizado por Murashige e Skoog (1962), para o cultivo *in vitro* de calos de tabaco. Entretanto, o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), muito utilizado em propagação *in vitro* de espécies lenhosas, foi desenvolvido para induzir brotações axilares em ápices de *Kalmia latifolia*, planta ornamental de crescimento arbustivo.

Na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro* dos tecidos vegetais, em diversos estudos foram propostos a redução ou o incremento de alguns macros e/ou micronutrientes que compõem esses meios de cultura, suprimindo melhor as exigências nutricionais de cada espécie, a exemplo dos 23 meios modificados para amoreira-preta (*Rubus* sp.) e videira (*Vitis* sp.) (VILLA et al., 2008, 2009).

Segundo Bielach et al. (2012), o uso de reguladores de crescimento pode influenciar a atividade biológica, semelhante às substâncias naturais produzidas pelas plantas, sendo influenciada pela relação entre auxina e citocinina e suas concentrações endógenas e exógenas, induzindo brotações ou enraizamento. George, Hall e De Klerk (2008) também afirmam que a combinação dos reguladores de crescimento são fatores fundamentais para a produção de plantas

em larga escala, sendo que, de acordo com Smith (2013), as citocininas são mais utilizadas na indução de brotações e as auxinas na indução de rizogênese, sendo a resposta também influenciada por outros fatores, como espécie, classe, tipo, concentração e regulador de crescimento utilizado.

Na fase de multiplicação, o BAP (6-benzilaminopurina) é a citocinina de maior uso em várias espécies, inclusive lenhosas, como o eucalipto, e elas respondem diferentemente a sua adição ao meio (ARAGÃO; ALOUFA; COSTA, 2010).

Na família Myrtaceae, várias respostas foram encontradas na indução de brotação, quando submetida a tratamentos contendo BAP. Segundo Rai, Jaiswal e Jaiswal (2009), concentrações inferiores a  $0,23 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP promoveram indução de brotos em goiabeira (*Psidium guajava* L.). Entretanto, de acordo com Souza et al. (2008), a concentração  $1,13 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP possibilitou a formação de maior número de brotos (2,3) por explante em pitangueira (*Eugenia uniflora* L.).

O desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a utilização em larga escala de frutíferas nativas do cerrado na recuperação de áreas degradadas, no paisagismo, além de contribuir para a implantação de lavouras comerciais, tem sido objetivo de vários estudos (PINHAL et al., 2011). Considerando a escassez das pesquisas nas quais foi utilizada a cultura *in vitro* para a propagação de frutíferas nativas do gênero *Campomanesia*, principalmente sobre seu comportamento e desenvolvimento *in vitro*, observa-se a necessidade da condução de projetos que investiguem e consolidem uma técnica de micropropagação de *C. pubescens*. Sendo assim, objetivou-se, neste trabalho, verificar a influência da concentração dos sais do meio de cultura WPM e MS, e da citocinina BAP na multiplicação de *C. pubescens*.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), no Campo Experimental Risoleta Neves, no município de São João del Rei, MG

Microestacas (segmentos nodais com dois internódios) oriundas de plantas pré-estabelecidas *in vitro* por sementes e subcultivadas duas vezes foram utilizadas como explantes.

Os meios de cultura avaliados foram compostos com concentrações de 50% e 100% dos sais dos meios WPM e MS e concentrações de BAP de 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4, sendo quatro concentrações de meio de cultura e quatro concentrações de BAP, em todas as combinações possíveis. Foram utilizadas quatro repetições, compostas por quatro microestacas por repetição, totalizando 16 microestacas por tratamento.

As microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio. Em todos os tratamentos o meio de cultura foi suplementado com 3% de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, solidificado com 0,6% de ágar, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e pH ajustado para 5,8±0,1. Em seguida, o meio foi autoclavado, a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação dos explantes os tubos foram vedados com parafilme e mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes e irradiância média de 49,4 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Aos 90 dias da inoculação foram avaliados número de brotos, número de folhas, comprimento de maior broto (cm) e massa fresca e seca de parte aérea (g). Para a determinação da massa seca, as brotações foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 60 °C,

por 5 dias. Após este período, o material vegetal foi pesado em balança de precisão.

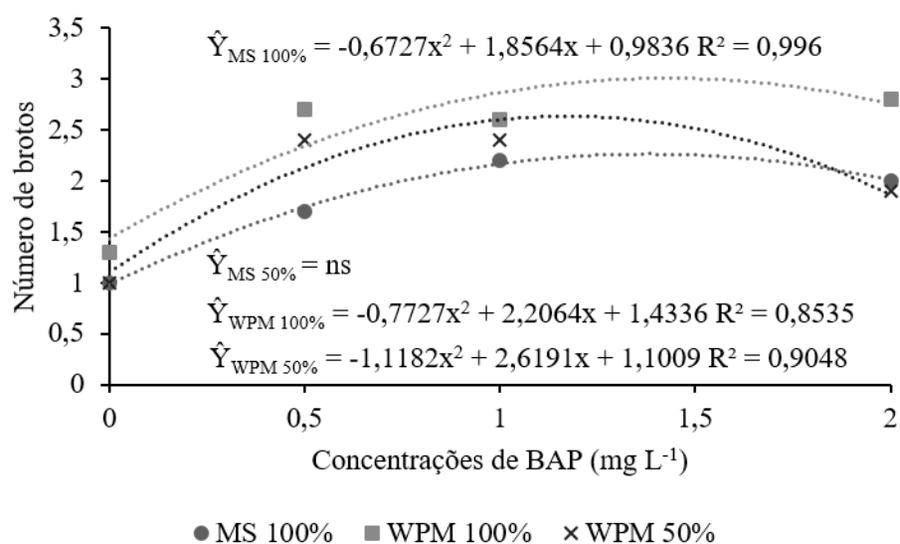
Os dados foram submetidos à ANAVA com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias analisadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância e regressão polinomial.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Número de brotos

A utilização de diferentes concentrações de BAP e das concentrações 100% e 50% de WPM e 100% do meio MS influenciou significativamente o número de brotos, sendo superior ao dos demais tratamentos (Figura 1). Para o meio MS 100%, o número máximo de brotos por microestaca foi de 2,26, proporcionado pela aplicação de 1,38 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Figura 1 - Número de brotos de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, MG, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Quanto ao meio WPM 50% e 100% da concentração dos sais, os maiores números de brotações foram 2,63 e 3,087 por microestaca, atingidos com a adição de 1,17 e 1,43 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente (Figura 1). Esses

resultados concordam com Scutti e Zanette (2000) que verificaram a influência da citocinina BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia*, discordando apenas quanto à melhor concentração para promover a maior taxa de indução de brotações.

Maldonado (2014) avaliou a multiplicação *in vitro* de *Campomanesia* spp. e concluíram que a aplicação de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP em meio MS 1/4 (25% do meio MS básico) foi mais eficaz para a propagação *in vitro* dos segmentos nodais de gabirobeira. Já Brunner Scutti (2000) estudou a espécie *Campomanesia xantocarpa* e também observou que maior número de brotações foi obtido na presença de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, utilizando de 57% a 65% menos citocinina, que gerou melhores resultados neste trabalho.

Sant'Ana (2016) avaliou o efeito do BAP em segmentos nodais de casaqueira (*Campomanesia rufa*), quando cultivados em meio MS suplementado com  $0,23 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, obtendo 4,9 brotos/estacas. Em eucalipto, Brondani et al. (2009) concluíram que a faixa de concentração de BAP que resultou em maior taxa de proliferação de gemas axilares por explante foi estabelecida entre  $0,25$  e  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ .

Já Rodrigues et al. (2013) relataram que a adição de  $1,30 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP no meio MS com 50% dos sais apresentou eficiência para a multiplicação *in vitro* da *Physalis peruviana*. Contudo, Maldonado (2014), trabalhando com a espécie *Campomanesia* spp. e Campos (2014), com *Campomanesia pubescens*, observaram maior número de brotos quando o meio foi suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

Resultados contrastantes foram observados por Rossato et al. (2016), que não verificaram influência do BAP sobre o número de brotos de *Campomanesia adamantium* em meio WPM 100%. Tal divergência talvez possa ser explicada pelo maior tamanho dos segmentos nodais utilizados, aumentando

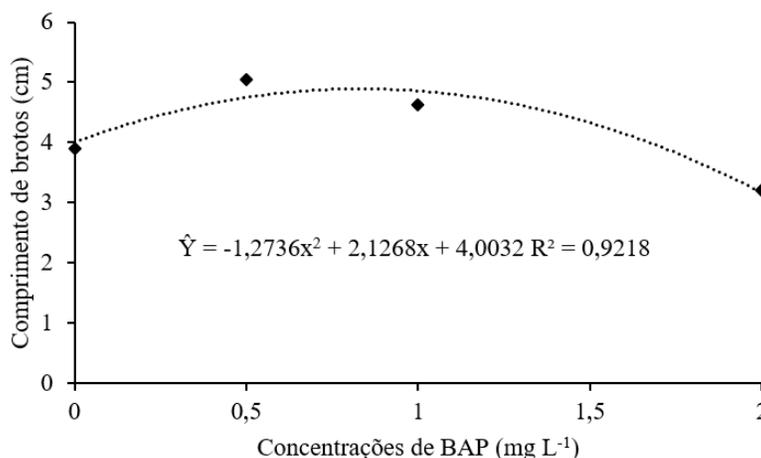
a reserva endógena da planta ou, também, minimizando a oxidação das gemas e a possível morte das microestacas.

As citocininas, quando em concentrações elevadas no meio de cultura, podem provocar um balanço hormonal favorável ao desenvolvimento de brotações *in vitro*, já que a manifestação dessa variável é altamente dependente da relação entre auxinas e citocininas (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Elevadas concentrações de citocininas, combinadas com baixas concentrações de auxinas, podem estimular a indução de brotos por promover ainda mais as divisões celulares (CHENG et al., 2013).

### **Comprimento de brotos**

Houve diferença significativa somente entre as concentrações de BAP para o comprimento de brotos, atingindo tamanho máximo de 5,06 cm, em média, com a adição de  $0,83 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Figura 2), não sendo observada interação entre esses fatores. Após a melhor dosagem, houve efeito negativo desta citocinina, à medida que se adicionou mais BAP ao meio de cultura, caracterizado pela redução do comprimento, provavelmente, possibilitando um crescimento maior dos internódios, facilitando a sua posterior multiplicação, evitando, assim, maior oxidação do explante em função do seu tamanho.

Figura 2 - Comprimento de brotos de *Campomanesia pubescens* em diferentes concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Resultados semelhantes a estes também foram obtidos por Maldonado (2014) que concluiu que a concentração máxima 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP permitiu maior crescimento e desenvolvimento dos brotos do explante de segmentos nodais da gabirobeira (64,57%), ao passo que, acima desta concentração, ocorreu oxidação do explante. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o alongamento pode ser inibido pelo efeito acumulativo do regulador de crescimento presente no meio, no caso BAP.

Os resultados encontrados no presente trabalho discordam dos resultados encontrados por Brunner Scutti (2000), que obteve maior incremento no comprimento de brotos na ausência de reguladores de crescimento na micropropagação de *Campomanesia xanthocarpa*, espécie pertencente ao mesmo gênero, popularmente denominada de gabirobeira.

Já em relação aos meios de cultura, maiores incrementos no comprimento de brotos ocorreram em meio MS 50 e 100% (Tabela 1).

Tabela 1 - Comprimento de brotos (cm) de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura. UFLA, 2017.

Meio de cultura	Comprimento de brotos (cm)
MS 100%	4,50 a
MS 50%	5,06 a
WPM 100%	3,59 b
WPM 50%	3,62 b
Média	4,19
CV (%)	51,91

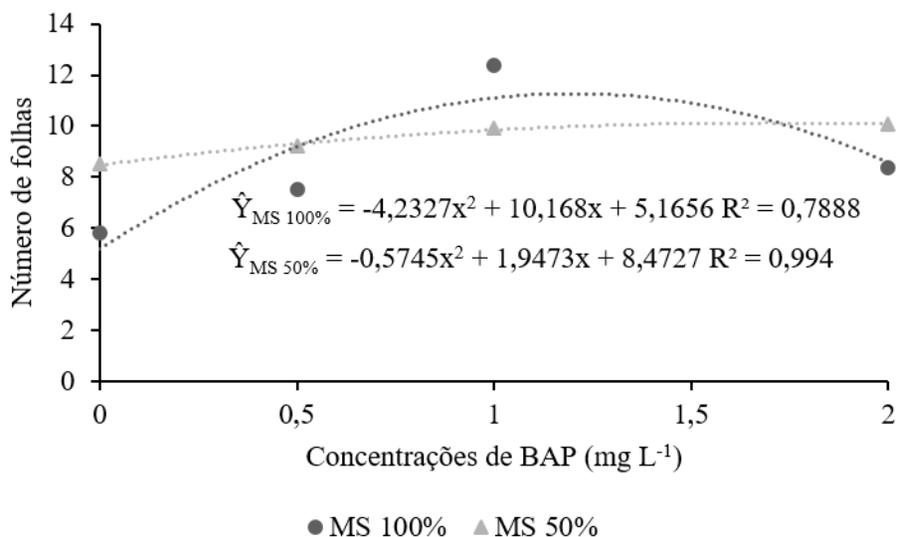
Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade

Fonte: Do autor (2017).

### Número de folhas

Em relação ao número de folhas, observa-se que os meios MS 50% e 100% foram significativamente superiores aos demais tratamentos (Figura 3). Maiores respostas para número de folhas (12 e 8 pares de folhas/explante) foram obtidas com a utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Este resultado corrobora os obtidos por Campos (2014) que recomenda a suplementação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio MS para a indução de brotações em *Campomanesia pubescens*, por promover maior número de folhas (8 folhas/explante).

Figura 3 - Número de folhas de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Número de folhas e número de gemas têm correlação direta, influenciando, conseqüentemente, a taxa de multiplicação da espécie micropropagada. Dessa forma, explantes produzidos em meio de cultura que proporcionam maior número de gemas com internódios curtos devem ser transferidos, posteriormente, para condições que estimulem o alongamento. Essa técnica propicia a obtenção de segmentos nodais mais longos, dificultando a sua oxidação, sendo esperado um comprimento maior dos brotos, induzido, principalmente, pela concentração hormonal e pela translocação da maior parte de seus recursos metabólicos para crescerem em altura, em busca de luz (DARDENGO et al., 2013).

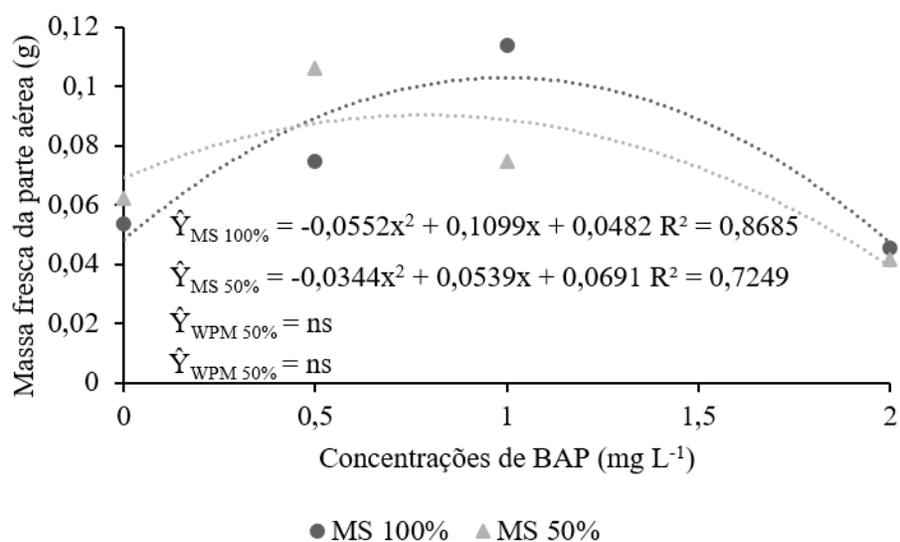
Villa et al. (2005) também verificaram maior número de folhas em amoreira-preta na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Porém, com o aumento da concentração houve um declínio na produção de folhas.

Como a relação citocinina/auxina é determinante nos resultados de desenvolvimento do explante, maiores concentrações de BAP podem promover um balanço favorável ao desenvolvimento da planta, visto que esta relação pode proporcionar desenvolvimento ou não de brotações (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

### Massa fresca da parte aérea

Para a massa fresca da parte aérea, o meio MS nas concentrações 50% e 100% também foi significativamente superior ao meio WPM nas mesmas concentrações (Figura 4). A máxima resposta foi obtida com a adição de 0,78 e 0,99 mg L<sup>-1</sup> de BAP, tratamentos que proporcionaram a produção de 0,09 e 0,10 g de peso fresco de parte aérea, respectivamente.

Figura 4 - Massa fresca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Esses resultados concordam com os de Villa et al. (2010) que avaliaram o efeito de concentrações de BAP adicionadas a diversos meios de cultura na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.), recomendando o meio MS adicionado de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Provavelmente, o aumento na massa obtida deve-se ao maior comprimento médio dos brotos, uma vez que a mesma superioridade estatística da composição de meios foi encontrada para as duas variáveis analisadas (comprimento de brotos e massa fresca de parte aérea). Tal relação pode estar relacionada ao teor de nutrientes contidos no meio MS. A composição de sais do MS parece ser mais adequada às necessidades de crescimento e desenvolvimento que aquela do WPM, cuja concentração de sais é menor que a do MS, não suprimindo seus requerimentos nutricionais. Erig e Schuch (2005) trabalharam com marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) e observaram o mesmo comportamento superior do MS em relação ao número de gemas.

Como também observado em número de folhas, sua massa foi influenciada pelo meio de cultura e pela dosagem de BAP. Possivelmente, essa resposta está associada ao nível de macro e micronutrientes contidos no meio MS, como nitrogênio, encontrados em quantidades superiores ao meio WPM.

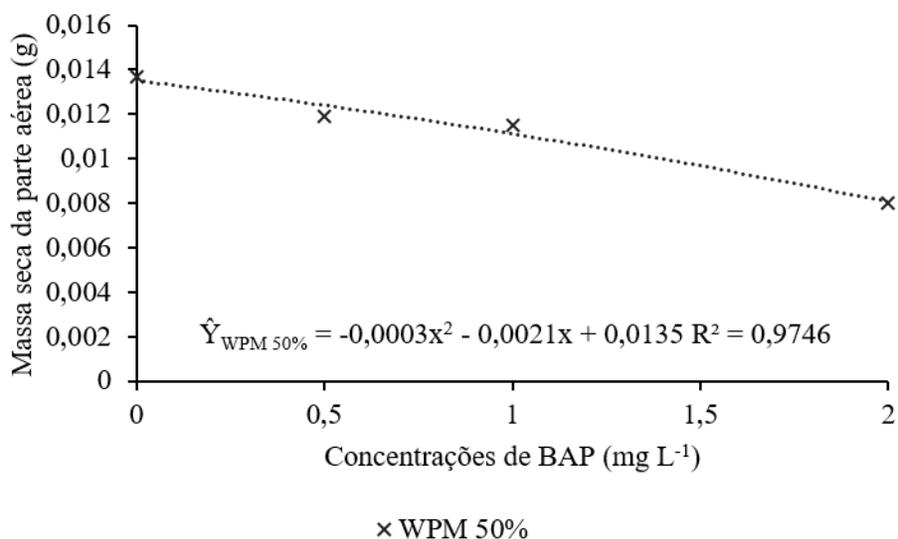
Já em relação ao BAP, a suplementação dessa citocinina correlaciona-se positivamente com o crescimento vegetativo

### **Massa seca da parte aérea**

Em relação à massa seca de parte aérea, houve diferença significativa entre os meios de cultura avaliados, tendo o meio WPM 50% sido inferior aos demais meios. À medida que as concentrações de BAP foram aumentadas, a massa foi decrescendo, sendo influenciadas negativamente pela adição da

citocinina. Nota-se, na Figura 5, que a ausência do regulador resultou em maior peso de matéria seca.

Figura 5 - Massa seca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. Lavras, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Quando a massa seca de parte aérea é analisada conjuntamente com a massa fresca de parte aérea, pode-se observar discordância entre os resultados, sugerindo uma probabilidade de maior absorção hídrica, quando as microestacas foram submetidas ao meio de cultura com maiores níveis de BAP.

Resultados semelhantes foram observados por Melo (2000), em pesquisa com guarirobeira (*Syagros oleraceae*), que testou diferentes níveis do meio MS em combinação com diferentes concentrações de BAP, observando também redução gradativa no peso médio da matéria seca da plântula à medida que a concentração de BAP foi aumentada.

Posteriormente, mais estudos ajustando as relações nutricionais dos meios de cultura às necessidades específicas permitirão aprimorar ainda mais o protocolo de micropropagação da espécie.

#### **4 CONCLUSÃO**

A multiplicação *in vitro* de *Campomanesia pubescens* é um processo regulado pela composição do meio e a concentração de regulador vegetal, em que as melhores respostas foram obtidas em meio nutritivo WPM suplementado com 0,5-1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.



## REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. D. Effect of BAP (6-benzilaminopurine) on shoot induction in explants of Brazil wood. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2010.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007.
- BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, June 2012.
- BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 11-19, fev. 2009.
- BRUNNER SCUTTI, M. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 78-78, dez. 2000.
- CAMPOS, N. A. **Estratégias para conservação *in vitro* de guabirobeira (*Campomanesia pubescens*):** micropropagação, unidades encapsuláveis e criopreservação. 2014. 110 p. Tese (Doutorado em Fisiologia vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- CHENG, Z. J. et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor 3. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 161, n. 1, p. 240-251, Jan. 2013.
- DARDENGO, M. C. J. D. et al. Crescimento e qualidade de mudas de café conilon produzidas em diferentes recipientes e níveis de sombreamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 4, p. 500-509, 2013.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação in vitro de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) CV. MC: efeito do tipo e concentração da formulação salina do meio de cultura. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 10, n. 1, p. 71-77, 2005.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 709 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, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 43-76.

KIM, Y.; TENG, Q.; WICKER, L. Action pattern of Valencia orange PME de-esterification of high methoxyl pectins and characterization of modified pectins. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, n. 17, p. 2620-2629, 2005.

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.

MALDONADO, A. C. D. **Propagação *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.)**. 2014. 114 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

MARTINS, W. A. et al. Estaquia e concentração de reguladores vegetais no enraizamento de *Campomanesia adamantium*. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 38, n. 1, p. 58-64, 2015.

MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MELO, B. de. **Cultivo de embriões *in vitro* da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart) Becc.]**. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. UFLA, 1997. 159 p.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.

RODRIGUES, F. A. et al. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 77-82, jan./fev. 2013.

ROSSATO, M. et al. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* Camb. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2016.

SANT'ANA, C. R. de O. **Indução de brotação e calogênese *in vitro* de Casaqueira [*Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied.]**. 2016. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SCUTTI, M. B.; ZANETTE, F. Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) vegetative propagation *in vitro* and by cutting. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 1, n. 1/2, p. 75-82, 2000.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. Texas: College Station, 2013.

SOUZA, J. A. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2046-2048, 2008.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência Tecnologia e Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

VILLA, F. et al. Cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira preta cv. tupy. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, jan./fev. 2008.

VILLA, F. et al. Efeito do sulfato de adenina e de 6-benzillaminopurina no crescimento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Dois Portos, v. 24, n. 1, p. 41-46, 2009.

VILLA, F. et al. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 109-117, 2010.

VILLA, F. et al. Multiplicação in vitro da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, maio/jun. 2005.

### **CAPÍTULO 3 Enraizamento *in vitro* de *Campomanesia pubescens*: meio WPM x AIB**

#### **RESUMO**

A gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) é uma espécie frutífera nativa do Cerrado pertencente à família Myrtaceae e utilizada como fonte de renda para muitas comunidades. Devido à expansão da fronteira agrícola, várias espécies estão ameaçadas de extinção. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam a conservação da espécie. Contudo, como a espécie *C. pubescens* é lenhosa e apresenta dificuldades no enraizamento *in vitro*, tornam-se necessários estudos envolvendo a micropropagação. Sendo assim, objetivou-se, neste trabalho, verificar a influência da concentração dos sais do meio WPM e da auxina AIB no enraizamento *in vitro* de *C. pubescens*, utilizando como explantes segmentos nodais com dois internódios. Os meios de cultura foram compostos de 25%, 50%, 75% e 100% dos sais do meio WPM e concentrações de AIB de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5, com quatro repetições e três plantas por repetição, totalizando 12 plantas por tratamento. Aos 120 dias após a implantação foram avaliados o enraizamento de estacas (%), o número de raízes, o comprimento de raízes (cm), a massa fresca e seca de raízes (g), o número de brotações, massa fresca e seca de parte aérea (g), o número de folhas e o comprimento do maior broto (cm). O enraizamento de segmentos nodais de *C. pubescens* micropropagadas pode ser efetuado em meio de cultura WPM com 75% da sua concentração de sais suplementada com 05-1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, utilizando microestacas com dois internódios.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos. Micropropagação. Gabiroba.

## ABSTRACT

Gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) is a fruitful native species of the Cerrado belonging to the *Myrtaceae* family and used as a source of income for many communities. Due to the expansion of the agricultural frontier several species are being threatened with extinction. In this way, it is necessary to develop technologies that allow the conservation of the species. However, as the species *C. pubescens* is woody and presents difficulties in *in vitro* rooting, studies involving micropropagation are necessary. Therefore, the objective of this study was to verify the influence of the concentration of WPM and auxin AIB salts on the *in vitro* rooting of *C. pubescens* using explant nodal segments with two internodes. The culture medium were composed of 25, 50, 75, 100% WPM medium salts and IBA concentrations (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg L<sup>-1</sup>). The experimental design was completely randomized, in a 4 x 5 factorial scheme with four replications and three plants per replicate, totaling 12 plants per treatment. After 120 days of planting, root rooting (%), root number (cm), fresh and dry mass of roots (g), number of shoots, ), number of leaves and length of largest shoot (cm). Rooting of nodal segments of micropropagated *C. pubescens* can be performed in WPM culture medium with 75% of its salt concentration supplemented with ABI 05 - 1.0 mg L<sup>-1</sup> using micro-section with two internodes.

**Keywords:** Tissue culture. Micropropagation. Gabiroba.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido à expansão da fronteira agrícola e a queimadas, várias espécies estão sendo ameaçadas de extinção. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam a conservação da espécie. Contudo, como a espécie *C. pubescens* é lenhosa e apresenta dificuldades no enraizamento *in vitro*, tornam-se necessários estudos envolvendo a micropropagação.

O cerrado é considerado a savana mais rica do mundo, detendo 5% da biodiversidade do planeta. Contudo, é um dos biomas mais ameaçados do Brasil, com perda estimada de cerca de 47,84% de sua cobertura vegetal até o ano de 2008 (BRASIL, 2010).

Atualmente, existem no cerrado inúmeras espécies vegetais com potencial de serem exploradas economicamente, incluindo as frutíferas nativas, que são utilizadas tanto na culinária, para o preparo de sucos, geleias, sorvetes, bebidas, como no paisagismo, na recuperação de áreas degradadas, bem como na obtenção de novos compostos ativos para a indústria farmacêutica (AVIDOS; FERREIRA, 2003).

No bioma Cerrado destaca-se a família Myrtaceae, que inclui gêneros de grande importância econômica, a exemplo do gênero *Campomanesia*. Entre suas várias espécies, a *Campomanesia pubescens* é conhecida popularmente como gabirobeira, com elevado potencial para utilização por humanos. Entretanto, é recorrente em espécies lenhosas a grande dificuldade de enraizamento de estacas, apresentando limitações. Porém, em outras espécies, e até mesmo em cultivares de uma mesma espécie, esta técnica tem oferecido bons resultados (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A indução e a formação de raízes adventícias são processos importantes para a posterior transferência dos explantes às condições *ex vitro*, maximizando

a sobrevivência das plantas na aclimatização (KRISAN et al., 2007), facilitando o estabelecimento da muda no substrato e melhorando a adaptação das plantas no ambiente externo (PATI et al., 2006).

No processo de enraizamento busca-se obter raízes homogêneas, padronizadas, em menor intervalo de tempo. Dessa forma, a determinação do tamanho do explante, a idade e a origem determinam o sucesso da rizogênese (DANTAS; NESI; MACHADO, 2002). O explante juvenil tem maior conteúdo de auxina e de cofatores de enraizamento, aumentando, assim, a capacidade de enraizamento (MONCOUSIN, 1991). Materiais adultos podem ser rejuvenescidos por meio de subcultivos, com a finalidade de promover o enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Estacas são utilizadas tanto na propagação *in vitro* quanto *ex vitro*. Contudo, devem, essencialmente, apresentar pelo menos uma gema para sintetizar substâncias e cofatores de enraizamento. Porém, o uso preferencial de meristemas e gemas apresentam melhores resultados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Um dos fatores que podem afetar o enraizamento de estacas é a concentração dos reguladores de crescimento. Em mirtáceas, como a goiabeira, tem-se recomendado a aplicação de reguladores de crescimento, a exemplo do ácido indolbutírico (AIB), como forma de potencializar o processo de enraizamento, apresentando maior efeito estimulante na formação de raízes em estacas (ZIETEMANN; ROBERTO, 2007). O AIB é a auxina mais comumente utilizada, e com sucesso, no enraizamento *in vitro* de diferentes espécies, inclusive para espécies de eucalipto (BORGES et al., 2012).

No Brasil, em alguns trabalhos realizados com o gênero *Campomanesia adamantium* foi demonstrado que a adição do AIB no meio não tem sido eficiente para promover acréscimo na porcentagem de enraizamento (ROSSATO et al., 2016; SCUTTI; ZANETTI, 2000).

A composição do meio de cultura é outro fator de importância direta influenciando o processo de enraizamento adventício *in vitro*, devido à presença de sais minerais e de reguladores vegetais. Geralmente, o uso de meios menos concentrados tem possibilitado resultados superiores no enraizamento *in vitro* (PASQUAL, 2001). Segundo Grimaldi et al. (2008), durante a rizogênese o meio de cultura deve ser diluído cerca de 50% a 75% em relação ao meio de multiplicação, possibilitando melhor enraizamento.

Várias formulações de meios de cultura básicos têm sido utilizadas, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido adotado com sucesso em diversas espécies. Entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos. Com isso, composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor resultado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dessa forma, podem-se utilizar outros meios, como o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), que apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia em relação ao meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo amplamente empregado para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001).

Diante do que foi relatado, objetivou-se verificar a influência da concentração dos sais do meio WPM e da auxina AIB no enraizamento *in vitro* de *C. pubescens*, utilizando como explantes segmentos nodais com dois internódios.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) do Campo Experimental Risoleta Neves, em São João Del Rei, MG.

Microestacas (segmentos nodais com dois internódios) de *Campomanesia pubescens* cultivados em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), oriundas de plantas já estabelecidas *in vitro* por sementes e sub cultivadas duas vezes, foram utilizadas como explantes.

Os tratamentos foram compostos de 25%, 50%, 75% e 100% dos sais do meio WPM e concentrações de AIB de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5, sendo quatro concentrações dos sais do meio WPM e cinco concentrações de AIB, em todas as combinações possíveis. Foram utilizadas quatro repetições, utilizando três plantas por repetição, totalizando 12 plantas por tratamento.

As microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio WPM. Em todos os tratamentos o meio de cultura foi suplementado com 3% de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, solidificado com 0,6% de ágar, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e pH ajustado para 5,8±0,1. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado, a 120 °C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação dos explantes os tubos foram vedados com parafilme e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes e irradiância média de 49,4 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Após 100 dias da instalação do experimento foram avaliados enraizamento de microestacas (%), número de raízes, comprimento de raízes (cm), massa fresca e seca de raízes (g), número de brotações, massa fresca e seca de parte aérea (g), número de folhas e comprimento de maior broto (cm). Para a determinação da massa seca, as brotações foram colocadas em sacos de papel

kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 60 °C, por 5 dias. Após este período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Porcentagem de enraizamento de microestacas**

O tratamento constituído de 75% da concentração de WPM adicionada de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB proporcionou maior percentagem de enraizamento (83,33%) e foi significativamente superior aos demais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de enraizamento *in vitro* de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura, aos 100 dias de inoculação. Lavras, UFLA, 2017.

Tratamentos	Enraizamento (%)
WPM 25% + 0,0 AIB	25,00 g
WPM 25% + 0,5 AIB	0,00 i
WPM 25% + 1,0 AIB	0,00 i
WPM 25% + 2,0 AIB	0,00 i
WPM 25% + 4,0 AIB	41,67 f
WPM 50% + 0,0 AIB	50,00 e
WPM 50% + 0,5 AIB	25,00 h
WPM 50% + 1,0 AIB	58,33 d
WPM 50% + 2,0 AIB	50,00 e
WPM 50% + 4,0 AIB	41,67 f
WPM 75% + 0,0 AIB	50,00 e
WPM 75% + 0,5 AIB	83,33 a
WPM 75% + 1,0 AIB	75,00 b
WPM 75% + 2,0 AIB	41,67 f
WPM 75% + 4,0 AIB	41,67 f
WPM 100% + 0,0 AIB	50,00 e
WPM 100% + 0,5 AIB	66,67 c
WPM 100% + 1,0 AIB	33,33 g
WPM 100% + 2,0 AIB	50,00 e
WPM 100% + 4,0 AIB	50,00 e
Média	41,67
CV (%)	2,21

Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2017).

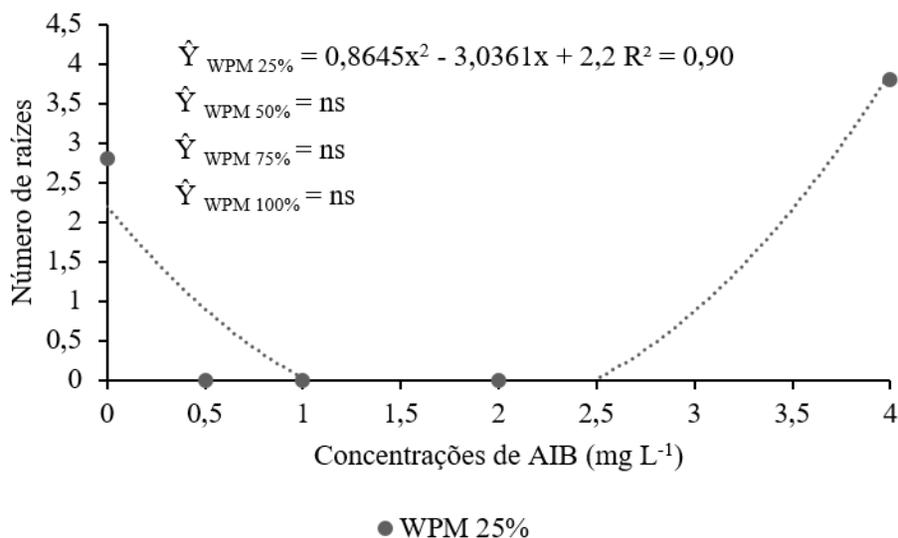
Em média, a porcentagem de enraizamento foi de 41,67%, o que leva esta espécie a ser considerada de difícil enraizamento. Esses resultados discordam dos de Rossato et al. (2016), que avaliaram a influência do AIB no enraizamento de outra espécie do gênero, *Campomanesia adamantium*, e verificaram impossibilidade de estabelecer um protocolo eficiente para a indução de rizogênese.

No presente trabalho utilizaram-se microestacas com maior tamanho e dois internódios, apresentando maiores reservas de carboidratos, bem como maior teor endógeno de precursores ou cofatores de enraizamento. A utilização de explantes oriundos de brotações induzidas e alongadas pelo processo de micropropagação e a menor lignificação dos tecidos podem facilitar a protrusão de raízes adventícias (CARVALHO et al., 2009).

#### **Número e comprimento de raízes**

Para o número de raízes houve interação significativa entre porcentagem do meio de cultura WPM e concentrações de AIB (Figura 1).

Figura 1 - Número de raízes de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.



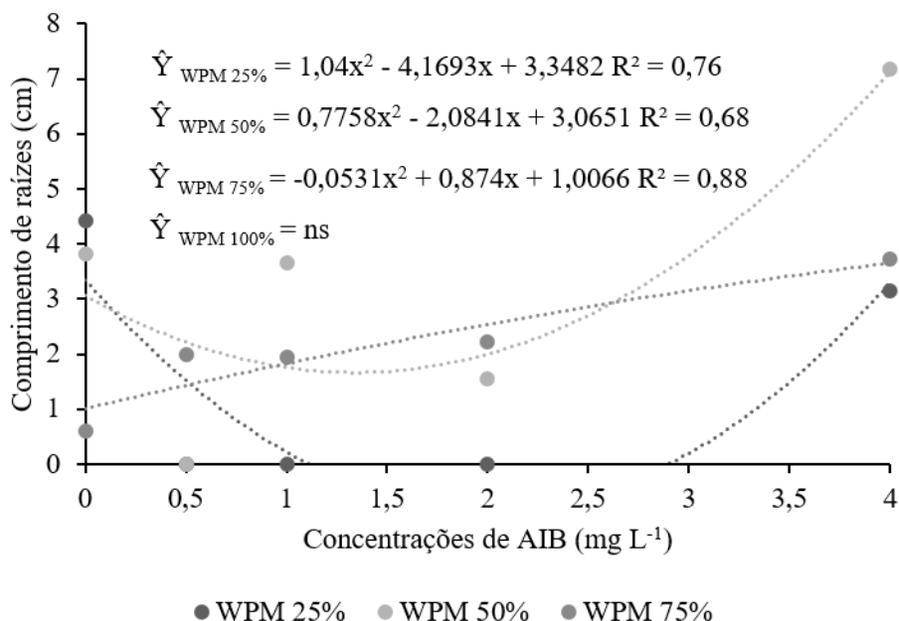
Fonte: Do autor (2016).

Maiores incrementos no número de raízes foram observados nos meios WPM 25% + 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB e WPM 25% + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 1). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Brunner Scutti (2000) que também observou raízes em *C. xanthocarpa* em meio MS sem adição de fitorreguladores. Contudo, o referido estudo foi realizado com espécie diferente, mas pertencente ao mesmo gênero. Portanto, essa diferença no comportamento *in vitro* pode ser explicada pela diferença nos genótipos, e também pelo meio de cultura utilizado.

Maior comprimento de raízes ocorreu em meio WPM 50% + 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 2), resultado discordante dos obtidos por Rossato et al. (2016), que não encontraram efeito do AIB sobre o número e comprimento de raízes de *C. adamantium*, quando avaliadas aos 80 dias após a inoculação. De acordo com Mercier (2004), a formação de raízes adventícias ocorre no período de uma a

três semanas após a inoculação e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que as duas primeiras etapas dependem de auxina no meio de cultura, enquanto o alongamento pode ser inibido nestas condições *in vitro*. Raízes bem formadas têm correlação direta com a sobrevivência das plantas no campo após o plantio (OLIVEIRA et al., 2006) e seu comprimento pode estar associado ao grau de juvenildade, além de ser considerado um indicativo de vigor da muda (WENDLING; XAVIER, 2005).

Figura 2 - Comprimento de raízes de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.



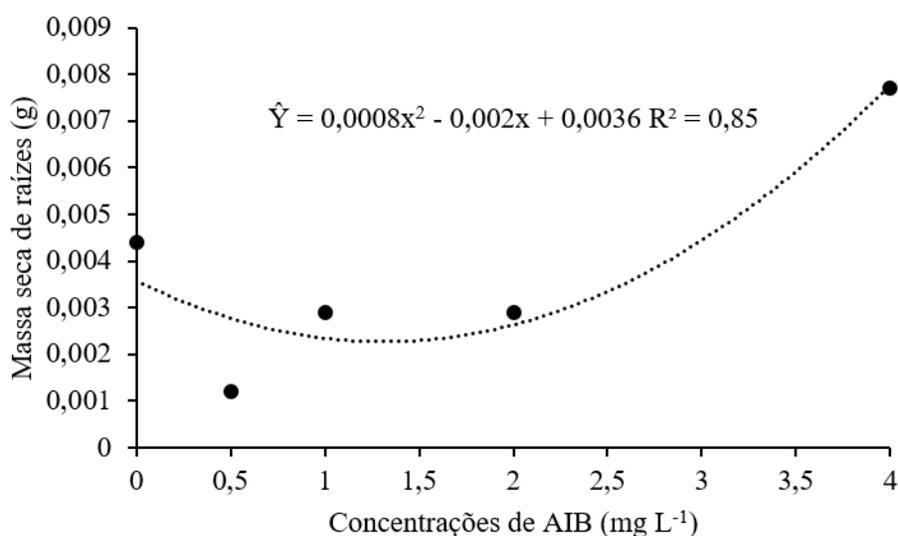
Fonte: Do autor (2016).

### Massa fresca e seca de raízes

Quanto à massa fresca de raízes, não houve diferença significativa da concentração do meio WPM, das concentrações de AIB e nem da interação entre

os fatores. Entretanto, quando se analisou a massa seca de raiz observou-se efeito significativo entre as concentrações de AIB (Figura 3). Melhor resultado para massa seca de raízes foi observado em meio de cultura com a suplementação de 4 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Figura 3 - Massa seca de raízes de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.



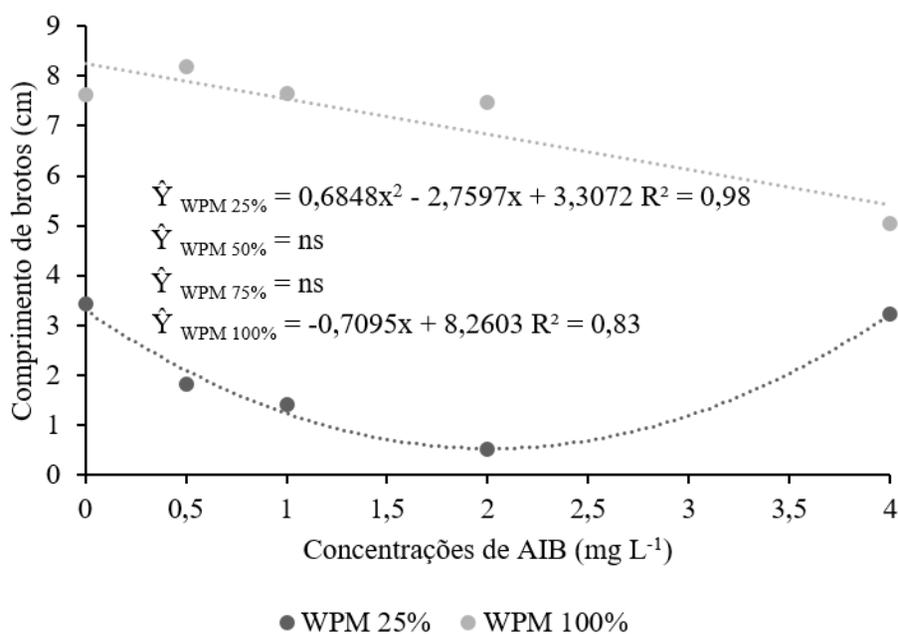
Fonte: Do autor (2016).

### Número e comprimento de brotos

Para o número de brotos não houve efeito significativo nos fatores avaliados. Entretanto, interação significativa entre as concentrações de meio WPM e de AIB foi observada para comprimento de brotos. Resultados superiores foram obtidos quando os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM 25% e WPM 100%, na ausência do AIB. As brotações com maior comprimento contribuem para o aumento da taxa de multiplicação, inclusive

com a possibilidade de enraizamento de microestacas maiores, possivelmente pelo maior teor de reserva e menor de oxidação, devido ao seu tamanho. Xu, Zhang e Chai (2008) e Yan et al. (2010) também verificaram, em diferentes espécies, que a eficiência do enraizamento de microestacas é fortemente influenciada pelo tamanho inicial dos propágulos.

Figura 4 - Comprimento de brotos de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.



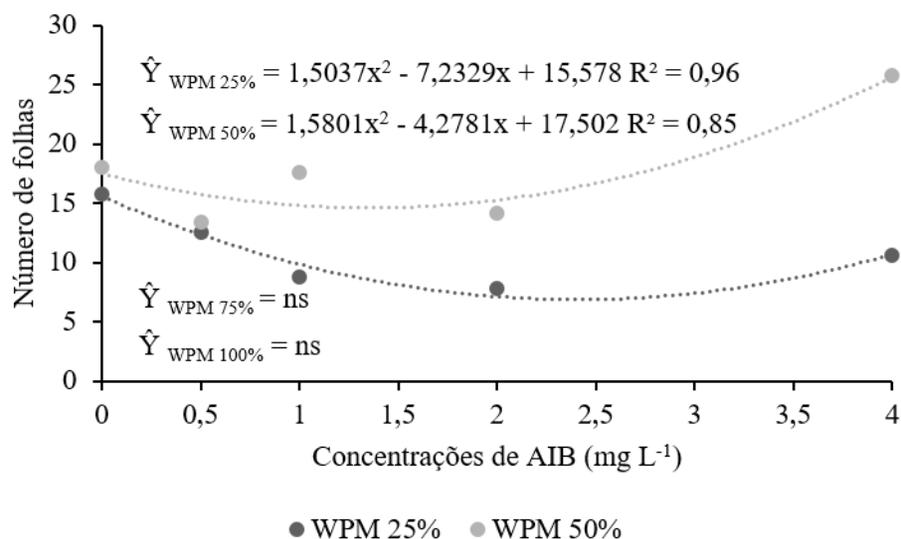
Fonte: Do autor (2016).

### Número de folhas

Com relação ao número de folhas, houve interação significativa entre as concentrações do meio e de AIB (Figura 5). Maior número de folhas foi observado no meio WPM 50% + 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Dessa forma, esses resultados

mostraram que o AIB, juntamente com diferentes concentrações do meio de cultura WPM, proporcionaram maior número de folhas.

Figura 5 - Número de folhas de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.

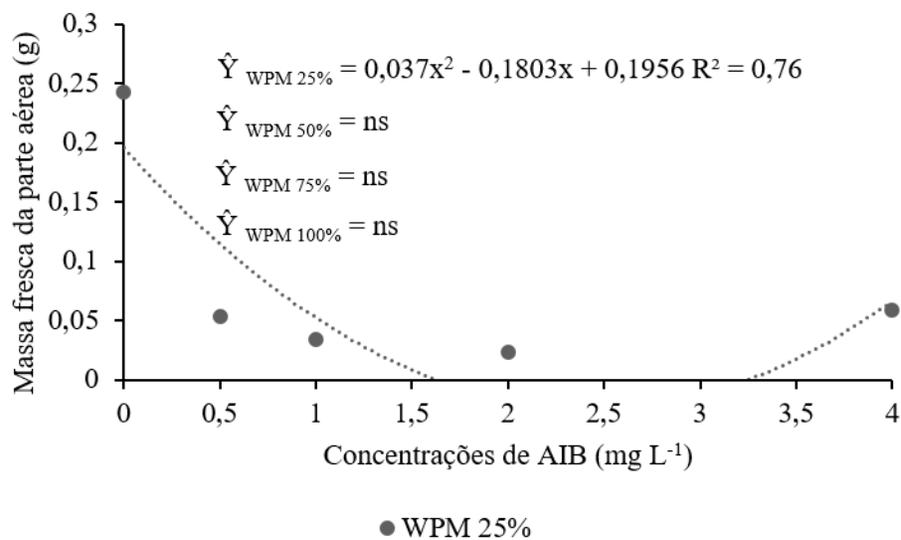


Fonte: Do autor (2016).

### Massa fresca e seca da parte aérea

Para a massa fresca de parte aérea houve interação significativa entre as concentrações de WPM e AIB, tendo o melhor resultado sido obtido no tratamento composto por WPM 25% + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 6).

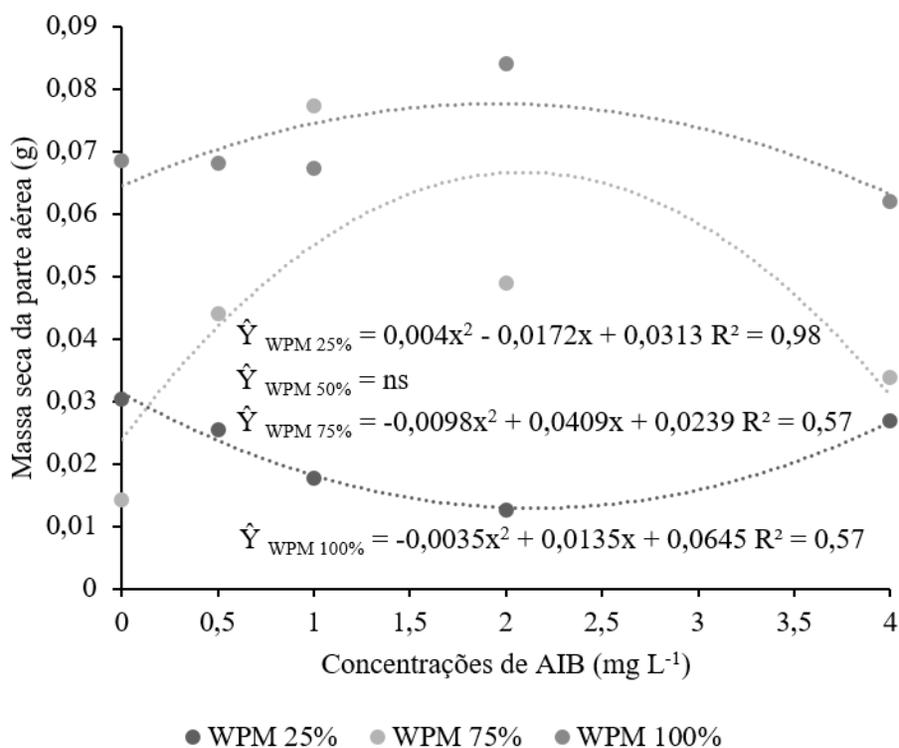
Figura 6 - Massa fresca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Para a massa seca de parte aérea também houve interação significativa entre as concentrações de meio e de AIB (Figura 7), possibilitando maior incremento na massa seca em meio WPM 100% + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Figura 7 - Massa seca da parte aérea de *Campomanesia pubescens* em diferentes meios de cultura e concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 2017.



Fonte: Do autor (2016).

Neste estudo também foi observado que o melhor tratamento para o desenvolvimento de parte aérea não proporcionou a maior porcentagem de enraizamento. Contudo, novos estudos, objetivando definir ajustes melhores e mais específicos, são necessários para otimizar os resultados da micropropagação de microestacas de *C. pubescens*.

#### **4 CONCLUSÃO**

Microestacas de *Campomanesia pubescens* com dois internódios podem ser enraizadas *in vitro* em meio de cultura WPM com 75% da sua concentração de sais, suplementado com 0,5-1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.



## REFERÊNCIAS

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. parte II, p. 261-296.

ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. **Frutos dos Cerrados**: preservação gera muitos frutos. 2003. Disponível em:  
<<http://www.biotecnologia.com.br/bio15/frutos.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

BORGES, S. R. et al. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado, “Conservação e Desenvolvimento”**. Brasília, DF, 2010. Disponível em:  
<<http://www.mma.gov.br/estruturas/182/arquivos/ppc cerradovcc1 outubro182.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BRUNNER SCUTTI, M. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 78-78, dez. 2000.

CARVALHO, A. C. P. P. et al. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.

DANTAS, A. C. M.; NESI, A.; MACHADO, L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 19-23, jan./abr. 2002.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GRATTAPLAGLIA, 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, DF: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. parte II, p. 183-260.

GRIMALDI, F. et al. *In vitro* rooting of fruit trees of the Rosaceae family. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.

KRISAN, B. et al. Effects of paclobutrazol and indole- 3-butyric acid on *in vitro* rooting and growth of some rootstocks of the genus *Prunus* L. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v. 72, n. 5, p. 198-201, 2007.

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

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 217-249.

MONCOUSIN, C. H. Rooting of microcuttings: unmanipulated factors. **Acta Horticulturae**, Georgia, v. 289, p. 319-327, 1991b.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.

OLIVEIRA, M. L. et al. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 4, p. 503-512, 2006.

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

PATI, P. K. et al. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 94-114, 2006.

ROSSATO, M. et al. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* Camb. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2016.

SCUTTI, M. B.; ZANETTE, F. Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) vegetative propagation *in vitro* and by cutting. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 1, n. 1/2, p. 75-82, 2000.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005.

XU, J.; ZHANG, Y.; CHAI, T. Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 129-132, 2008.

YAN, H. et al. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 115-120, 2010.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S. R. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2007.