

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**CONTRIBUIÇÕES À PROPAGAÇÃO DE ARAÇAZEIRO (*Psidium cattleianum*  
Sab.) E GRUMIXAMEIRA (*Eugenia brasiliensis* Lam.)**

Edwin Antonio Gutiérrez Rodríguez  
Engenheiro Agrônomo/Universidad de los Llanos

Dissertação apresentada com um dos  
Requisitos à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Janeiro de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Rodríguez, Edwin Antonio Gutiérrez  
Contribuições à propagação de Araçazeiro (*Psidium  
cattleianum* Eab.) e Grumixameira (*Eugenia  
brasiliensis* Lam.) / Edwin Antonio Gutiérrez  
Rodríguez. -- 2013.  
144 f.

Orientador: Gilmar Schafer.  
Coorientador: Paulo Vitor Dutra de Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa  
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2013.

1. Produção de mudas. 2. Cultivo In Vitro. 3.  
Propagação. 4. Planta nativa. 5. Floricultura. I.  
Schafer, Gilmar, orient. II. Souza, Paulo Vitor  
Dutra de, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

EDWIN ANTONIO GUTIÉRREZ RODRIGUEZ  
Engenheiro Agrônomo - Universidad de los Llanos


## DISSERTAÇÃO


Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

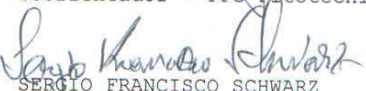
### MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

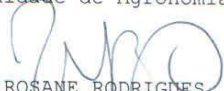
Aprovado em: 28.01.2013  
Pela Banca Examinadora

  
GILMAR SCHÄFER  
Orientador - PPG Fitotecnia

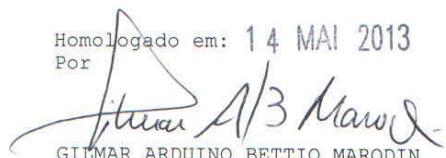
  
PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
Coorientador - PPG Fitotecnia


  
SÉRGIO FRANCISCO SCHWARZ  
PPG Fitotecnia

  
CLAUDIMAR SIDNEI FIOR  
Faculdade de Agronomia/UFRGS

  
LIA ROSANE RODRIGUES  
Fundação Estadual de Pesquisa  
Agropecuária do RS-FEPAGRO

Homologado em: 14 MAI 2013  
Por

  
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

A Dios, quien permite que se realice su obra a través del hombre y en su propósito, nos permite reconocer su grandeza a través de la ciencia.

A los profesores del Departamento, especialmente al profesor Paulo Vitor por la aceptación inicial para hacer parte del Departamento de Horticultura y Silvicultura de la UFRGS, fue un orgullo para mí, y al profesor Gilmar Schafer por la orientación personal y académica durante estos dos años.

A la banca examinadora, por su contribución para el mejoramiento del documento y sugerencias técnicas y científicas.

Al Laboratorio de Anatomía Vegetal, Profesor Mariath por habernos abierto las puertas y a todo su grupo de trabajo por la inmensa ayuda, paciencia y momentos compartidos.

A quienes de una u otra manera orientaron mi trabajo, Dra Julieta (IAC-café) su disposición y forma de ser, apoyo, palabras y orientación fueron invaluable, al Dr. Roosevelt Escobar (CIAT) y Marcos Martinez (Centro de Biotecnología-CUBA) gracias por el apoyo.

Elisandra Pradela, su amistad e invaluable apoyo durante el tiempo compartido en el laboratorio, de usted tomo grande ejemplo de compañerismo y parcería en los momentos críticos. Claudia e Daniela, muchas gracias por el apoyo personal y académico.

A todos los colegas del Departamento y de la salinha por haberme enseñado el valor de compartir, de ayuda y de la amistad, por las discusiones ni siempre provechosas, especialmente Daiane y Fabricio, de una manera particular me permitieron compartir más cosas con ustedes.

Mi familia fue sin duda, motor y pilar para la fortaleza necesaria para afrontar el reto y la oportunidad. Los consejos y oraciones de mi madre son sin duda los que en mis momentos de debilidad me alentaron a batallar

Las personas que de una u otra manera me acompañaron en esta fase con sus consejos y momentos de distracción, Florecita, Diana, Omaira, Ruth, y en general la comitiva latinoamericana, los que ya se fueron o aún quedan en PoA, mis amigos de Colombia, Perú, Venezuela, Francia, el Grupo de oración METANOIA, y demás personas.

COLOMBIA ES PAIS DE USTEDES, después que se vive en Brasil, no se es más solamente COLOMBIANO, ahora Colombo-brasileño.

Cualquier persona que se ha visto seriamente comprometida en el trabajo científico de cualquier tipo se da cuenta de que en las puertas de entrada del templo de la ciencia están escritas las palabras: "debes tener fe". Es una virtud de la que los científicos no pueden prescindir.

***Max Planck***

Dedicada a toda mi familia en la tierra y el cielo, que son mi vida, especialmente a mi mamá y mi papá, mis hermanos y mis sobrin@s.

# CONTRIBUIÇÕES À PROPAGAÇÃO DE ARAÇAZEIRO (*Psidium cattleianum* Sab.) E GRUMIXAMEIRA (*Eugenia brasiliensis* Lam.)<sup>1</sup>

Autor: Edwin Antonio Gutiérrez Rodríguez

Orientador: Gilmar Schäfer

Coorientador: Paulo Vitor Dutra de Souza

## RESUMO

Myrtaceae possui mais de 3000 espécies sendo *Acca sp*, *Eucalyptus sp*, *Myrcianthes sp*, *Myrcia sp*, *Psidium sp*, os gêneros mais representativos pela importância ambiental, econômica, farmacêutica, entre outras. O presente estudo teve como objetivo contribuir no aprimoramento das técnicas de propagação de *Psidium cattleianum* Sab e *Eugenia brasiliensis* Lam por estaquia e semeadura em condições *in vivo* e *in vitro*. Para *P. cattleianum*, na propagação *in vivo* foram testados: Doses de AIB na presença ou ausência de BAP no enraizamento de estacas herbáceas, e indução ao enraizamento de estacas de folha; na propagação *in vitro* foi testado, para organogênese: Efeito do ácido giberélico, do tempo de imersão em NaOCl (2 %) e água 55°C por 10 min na germinação das sementes; Efeito da composição do meio de cultura e da relação entre concentrações de BAP:ANA no desenvolvimento de miniestacas. Para calogênese, para desinfestação de explantes na fase de introdução, foram testados: Pré-tratamento com solução de tiofanato-metílico (49 mg L<sup>-1</sup> i.a) misturado com ampicilina (250 mg L<sup>-1</sup>); efeito do tempo de imersão e do pH da solução de NaOCl. Para desdiferenciação foi testado: Doses de cinetina na indução de calogênese em lâmina foliar e doses de 2,4-D em porções de hipocótilo. Para *E. brasiliensis*, *in vivo*, foram testados o efeito da concentração de AIB na indução de enraizamento de estacas e *in vitro* foi testado o efeito da concentração de AG<sub>3</sub> no estabelecimento de miniestacas. Os principais resultados permitem inferir que as duas espécies são passíveis de se propagar por estaquia, sendo que para *E. brasiliensis* a técnica deve ser aprimorada para aumentar o percentual de enraizamento. Na propagação *in vitro* de *P. cattleianum* o meio WPM foi mais adequado para o estabelecimento de miniestacas. A eficiência do NaOCl na desinfestação de sementes e explantes para calogênese é afetada pela concentração da solução, tempo de contato e pH da solução. A desdiferenciação celular e a indução de calo em araçazeiro diferem em função do tipo de explante e concentração de cinetina. Análise histológica evidenciou a participação da região do periciclo vascular e borda dos explantes na calogênese e a diferença na população fenotípica nos explantes foliares.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (144 p.) Janeiro, 2013.

# CONTRIBUTIONS TO THE PROPAGATION OF STRAWBERRY GUAVA (*Psidium cattleianum* Sab.) AND GRUMIXAMEIRA (*Eugenia brasiliensis* Lam.)<sup>1</sup>

Author: Edwin Antonio Gutierrez Rodriguez

Adviser: Gilmar Schäfer

Co-adviser: Paulo Vitor Dutra de Souza

## ABSTRACT

Myrtaceae has over 3000 species being *Acca* sp, *Eucalyptus* sp, *Myrcianthes* sp, *Myrcia* sp, *Psidium* sp, the most representative genus for environmental, economic, pharmaceutical importance, among others. The present study aimed to contribute to the enhancement of propagation techniques of *Psidium cattleianum* Sab. and *Eugenia brasiliensis* Lam. by cuttings and sowing conditions *in vivo* and *in vitro*. For *P. cattleianum*, propagation *in vivo* were tested: IBA doses in the presence or absence of BAP on rooting herbaceous and inducing rooting of leaf; *in vitro* propagation was tested for organogenesis: Effect of gibberellic acid, immersion time in NaOCl (2%) and water (55 ° C for 10 min) on seed germination; Effect of culture medium composition and culture concentration ratio BAP: ANA on developing shoots. For callus induction, explants disinfection stage of introduction were tested: Pre-treatment with a solution of thiophanate-methyl (49 mg L<sup>-1</sup> a.i) mixed with ampicilin (250 mg L<sup>-1</sup>); effect of immersion time and pH of NaOCl solution. For dedifferentiation were tested: doses of kinetin to induce callus formation in leaf blade and doses of 2,4-D in portions hypocotyl. *In vivo* for *E. brasiliensis* we tested the effect of IBA concentration in inducing rooting; *in vitro* was tested and the effect of GA3 concentration in establishing cuttings. The main results infer that the two species are likely to propagate by cuttings, and to *E. brasiliensis* technique should be enhanced to increase the percentage of rooting. For *in vitro* propagation of *P. cattleianum* the WPM was more suitable for the establishment of cuttings. The efficacy of NaOCl in seed disinfection and explants for callus formation is affected by the solution concentration, dwell time and solution pH. The cellular dedifferentiation and callus induction in strawberry guava differ depending on the explant type and concentration of kinetin. Histological analysis showed the pericycle and vascular edge participation of explants on callus formation and phenotypic difference in population in leaf explants.

---

<sup>1</sup>Master's of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (144 p.) January, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO ..... 1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 3
	2.1 Espécies nativas ..... 3
	2.2 Descrição das espécies em estudo ..... 4
	2.2.1 Araçazeiro ..... 4
	2.2.2 Grumixameira ..... 6
	2.3 Propagação de plantas ..... 8
	2.3.1 Propagação sexuada ..... 9
	2.3.2 Propagação assexuada ..... 9
	2.3.2.1 Macropropagação por estaquia ..... 10
	2.3.3 Propagação <i>in vitro</i> ..... 13
	2.3.3.1 Fisiologia do cultivo <i>in vitro</i> ..... 14
	2.3.3.2 Fatores que influenciam a micropropagação ..... 16
	2.3.3.3 Técnicas de propagação <i>in vitro</i> ..... 25
	2.3.3.4 Organogênese ..... 26
	2.3.3.5 Embriogênese somática ..... 28
	2.4 Estudo anatômico da propagação <i>in vitro</i> ..... 29
	2.4.1 Estudo anatômico em Myrtaceae ..... 30
3	MATERIAL E MÉTODOS ..... 31
	3.1 Germinação <i>in vitro</i> de araçazeiro ..... 32
	3.1.1 Efeito do AG3 na germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro ..... 32
	3.1.2 Efeito do tempo de imersão em solução NaOCl (2%) na germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro ..... 33
	3.2 Macropropagação por estaquia ..... 34
	3.2.1 Macropropagação de grumixameira por estaquia ... 34
	3.2.2 Macropropagação por estaquia de araçazeiro ..... 36
	3.2.2.1 Estaquia de folha ..... 36
	3.2.2.2 Miniestaquia de ramos herbáceos ..... 38
	3.3 Propagação <i>in vitro</i> por microestaquia ..... 40
	3.3.1 Efeito do meio de cultura no desenvolvimento de microestacas de araçazeiro ..... 40
	3.3.2 Avaliação da concentração auxina/citocinina no desenvolvimento <i>in vitro</i> de microestacas de araçazeiro ..... 41



	Página
3.3.3 Efeito da concentração de ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ) na propagação <i>in vitro</i> por microestaquia de grumixameira .....	42
3.4 Calogênese em araçazeiro .....	44
3.4.1 Desinfestação de explantes foliares para indução de calogênese .....	45
3.4.1.1 Pré-tratamento com solução de fungicida-antibiótico .....	46
3.4.1.2 Efeito do pH da solução NaOCl na desinfestação e qualidade de explantes foliares .....	47
3.4.1.3 Efeito do tempo de imersão em solução de NaOCl .....	48
3.4.2 Efeito da concentração de cinetina e 2,4 D na indução de calogênese em araçazeiro .....	48
3.4.2.1 Explante foliar .....	49
3.4.2.2 Explantes em camada fina de seções de hipocótilo .....	50
3.5 Estudo anatômico da desdiferenciação celular durante a calogênese .....	51
3.6 Análise estatística .....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
4.1 Germinação <i>in vitro</i> de araçazeiro .....	54
4.1.1 Efeito do AG <sub>3</sub> na germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro .....	54
4.1.2 Efeito do tempo de imersão em solução NaOCl (2 %) na germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro .....	59
4.2 Macropropagação por estaquia .....	61
4.2.1 Macropropagação de grumixameira por estaquia ...	61
4.2.2 Macropropagação por estaquia de araçazeiro .....	64
4.2.2.1 Estaquia de folha .....	64
4.2.2.2 Miniestaquia de ramos herbáceos .....	67
4.3 Propagação <i>in vitro</i> por microestaquia .....	72
4.3.1 Efeito do meio de cultura no desenvolvimento de microestacas de araçazeiro .....	72
4.3.2 Avaliação da concentração auxina/citocinina no desenvolvimento <i>in vitro</i> de microestacas de araçazeiro .....	76
4.3.3 Concentração de ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ) na propagação <i>in vitro</i> por microestaquia de grumixameira .....	80
4.4 Calogênese em araçazeiro .....	83
4.4.1 Desinfestação de explantes foliares para indução de calogênese .....	83
4.4.1.1 Pré-tratamento com solução de fungicida-antibiótico .....	87

	Página	
4.4.1.2	Efeito do pH da solução NaOCl na desinfestação e qualidade de explantes foliares ..... 91	91
4.4.1.3	Efeito do tempo de imersão em solução de NaOCl ..... 93	93
4.4.2	Efeito da concentração de cinetina e 2, 4 D na indução de calogênese em araçazeiro ..... 93	93
4.4.2.1	Explante foliar ..... 93	93
4.4.2.2	Explantes em camada fina de secções de hipocótilo ..... 102	102
4.5	Estudo anatômico da desdiferenciação celular durante a calogênese ..... 107	107
5	CONCLUSÕES ..... 122	122
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 124	124
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 126	126
8	APÊNDICES ..... 142	142

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Características gerais do ambiente in vitro na micropropagação convencional. ....	16
2. Tratamentos utilizados para indução de enraizamento de estacas de grumixameira (E. brasilienses), UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	35
3. Descrição de tratamentos em estaquia de folha de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	37
4. Tipos de meios de cultura testados para o desenvolvimento in vitro de microestacas de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	41
5. Doses de BAP/ANA testadas para o desenvolvimento in vitro de microestacas de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	42
6. Concentrações de AG3 e BAP testadas para o desenvolvimento in vitro de microestacas de grumixameira, em meio MS, UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	43
7. Tratamentos para indução de calo a partir de lâmina foliar de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	49
8. Tratamentos para a indução de calo a partir de porções de hipocótilo de mudas de araçazeiro obtidas por germinação in vitro de sementes, UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	50
9. Tratamentos para a indução de calo a partir de porções de hipocótilo de mudas de araçazeiro germinadas in vitro, Porto Alegre 2013. ....	51
10. Efeito da concentração de AIB e do tipo de explante na indução de enraizamento de estacas de grumixameira. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	62

	Página
11. Efeito do tratamento no enraizamento de estacas de folha após 120 dias de estabelecimento. Formação de calo (C), enraizamento (R), morte (M) e massa seca por estaca de raiz (R) e calo (C), UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	65
12. Percentual de enraizamento, volume radicular por estaca e número de raízes por estaca na propagação do araçazeiro por estaquia herbácea, massa seca de raiz, com a utilização de diferentes doses de BAP e AIB, UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	68
13. Efeito do tipo de corte na propagação por estaquia de ramos herbáceos de araçazeiro quanto a: a. número de raízes por estaca; b. Massa seca por estaca; c. volume de raízes por estaca, UFRGS. Porto Alegre, 2013. ....	72
14. Efeito da concentração de BAP/ ANA no meio de cultura após 45 dias de incubação de microestacas de araçazeiro na variação do pH. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	79
15. Percentual de brotação de microestacas de grumixameira propagadas in vitro em meio de cultura MS sob concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de ácido giberélico. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	80

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Planta adulta de araçazeiro ( <i>Psidium cattelianum</i> ) com ramos em estado vegetativo e reprodutivo, a. aspecto geral da árvore, b. ramo em fase vegetativa e reprodutiva, c. Frutos. ....	5
2. Planta adulta de grumixameira: a. Aspecto geral da árvore, b. detalhe da região apical, c. Fruto maduro. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	7
3. Fatores que podem influenciar no crescimento e morfogêneses das plantas <i>in vitro</i> . Kozai <i>et al.</i> , (1992) modificado por Cañal <i>et al.</i> , (2001). ....	15
4. Reações químicas na oxidação de fenóis (PFO: Processo de formação dos óxidos fenólicos, adaptado de Perone <i>et al.</i> , (2008), Porto Alegre, 2013. ....	20
5. Ramos secundário selecionados para obtenção de estacas grumixameira. Porto Alegre, 2013. ....	35
6. Macropropagação de araçazeiro por estaquia de folha. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	37
7. Propagação de araçazeiro por miniestaquia herbácea. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	38
8. Representação da obtenção de microestacas a partir de mudas obtidas por germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	40
9. Explantes foliares de araçazeiro inoculados em meio de indução. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	44
10. Grau de intensidade da oxidação dos explantes de folha de araçazeiro para indução de calogênese. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	46

11.	Percentual de germinação (% G) <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro submetidas a diferentes concentrações de ácido giberélico após 60 dias de semeadura. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	55
12.	Índice de velocidade de germinação (IVG) <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro após 60 dias de semeadura, submetidas a diferentes concentrações de ácido giberélico. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	56
13.	Aspecto inicial da protrusão da radícula de sementes de araçazeiro em meio de cultura MS 50 %: a. Oxidação fenólica antes da germinação. b. Protrusão da radícula. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	59
14.	Percentual de emergência e alongação do hipocótilo de sementes de araçazeiro após 45 dias submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação: Tempos de imersão em NaOCl (2 % i.a) (20, 40, 60 min.) e 55°±3°/ 10'. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	60
15.	Cortes a mão livre da região dos tipos de raiz observados no enraizamento de estacas de grumixameira. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	63
16.	Detalhe dos cortes das estacas de folha de araçazeiro após trinta dias de estabelecimento sob condições de sala de nebulização. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	67
17.	Cortes a mão livre da região de enraizamento de estacas ramos herbáceos de araçazeiro mostrando a formação de raiz adventícia e calo. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	70
18.	Desenvolvimento de raiz adventícia na propagação por estaquia de ramos herbáceos de araçazeiro.. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	71
19.	Efeito do meio de cultura WPM, DSD1 e MS no desenvolvimento de microestacas de araçazeiro após 30 dias de estabelecimento <i>in vitro</i> . UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	73
20.	Efeito da concentração de BAP e ANA (3:1) no meio de cultura MS sobre o percentual de estabelecimento de microestacas obtidas por germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro: Estacas vivas, enraizadas e caules deformados após 45 dias de incubação. UFRGS. Porto Alegre, 2013. ....	77

	Página
21. Alterações teratogênicas ocorridas nos tratamentos com ANA:BAP em microestacas de <i>Psidium cattleianum</i> . UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	78
22. Propagação <i>in vitro</i> de grumixameira por microestaquia. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	82
23. Indução ao aumento no número de brotações na germinação <i>in vitro</i> de sementes de grumixameira mediante incubação em meio com BAP (1,0 mg L <sup>-1</sup> ). UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	83
24. Efeito do pré-tratamento de desinfestação em solução de fungicida + bactericida sobre o percentual de contaminação em explantes foliares de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ...	84
25. Variação do pH da solução do hipoclorito de sódio (NaOCl) em função da concentração. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	88
26. Efeito do pH da solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2 % m/v) no percentual de oxidação e contaminação de explantes foliares de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre, 2013... ..	89
27. Efeito do tempo de imersão no percentual de contaminação (a) e na intensidade da oxidação dos explantes de araçazeiro ( <i>Psidium cattleianum</i> Sab) (b) em solução de NaOCl (1,5 % i.a). UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	92
28. Efeito da concentração de cinetina sobre o percentual de calogênese e oxidação em explantes de lâmina foliar. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	94
29. Aspecto geral da folha de araçazeiro diafanizada e corada com safranina (5 %). UFRGS, Porto Alegre, 2013... ..	95
30. Aspecto físico dos calos após 60 dias de incubação no meio de cultura com citocinina para indução de calogênese; a. Calos formados com 0,5 mg L <sup>-1</sup> ; b. Calos formados com 2,0 mg L <sup>-1</sup> (barra= 1 cm). UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	98
31. Aspectos gerais da formação de calos de araçazeiro a partir da lâmina foliar após 60 dias inoculados no meio de indução. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	100
32. Efeito da concentração de cinetina no meio de cultura sobre o percentual de formação de calo friável (CF), não friável (NF) e sem desdiferenciação (SC) a partir de explantes de hipocotilo de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	102

	Página
33. Explantes em camada fina de seções de hipocótilo após 45 dias de incubação. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	103
34. Efeito da concentração de cinetina no meio de cultura MS modificado no percentual de formação de calo e oxidação em explantes de hipocótilo obtidos de mudas de araçazeiro germinadas <i>in vitro</i> . UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	103
35. Percentual de formação de calo e oxidação em explantes de hipocótilo de mudas de araçazeiro desenvolvidas <i>in vitro</i> em função da concentração de 2,4 D, Porto Alegre, 2013. ....	104
36. Corte transversal da região média de folha de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	109
37. Corte transversal da região da borda da lâmina foliar de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	110
38. Corte transversal da região central de folha de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	111
39. Detalhe do feixe vascular em corte transversal da região central de lâmina foliar de araçazeiro nos primeiros dias após incubação em meio de cultura. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	111
40. Sequência do desenvolvimento do calo a partir de células associadas ao feixe vascular em folha de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre 2013. ....	114
41. Detalhe do feixe vascular em corte paradérmico da região central de lâmina foliar de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	115
42. Detalhe da região do feixe vascular de explante foliar de araçazeiro, em meio de cultura com citocinina na primeira semana de desenvolvimento de calo, submetido a teste PAS, evidenciando o acúmulo de sacarídeos nesta região. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	118
43. Detalhe do feixe vascular em corte paradérmico da região central de lâmina foliar de araçazeiro em meio de cultivo para indução de calogênese com citocinina, evidenciando pelo teste de Schiff (PAS), maior atividade mitótica nas células periféricas do tecido condutor. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	119
44. Corte transversal de porções de hipocótilo de mudas obtidas por germinação <i>in vitro</i> de sementes de araçazeiro nas fases iniciais de desenvolvimento do calo. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	120



45.	Calos obtidos a partir de secções de hipocótilos de mudas de araçazeiro, preparados mediante esmagamento entre lamina e lamínula, observados sob microscopia óptica em campo escuro. UFRGS, Porto Alegre, 2013. ....	121
-----	--	-----

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países com maior diversidade em relação ao número de espécies vegetais vasculares endêmicas (WCMC, 2000). Este reconhecimento é importante para a conservação, uso e aproveitamento dos seus recursos naturais, aquisição e desenvolvimento de conhecimento através da pesquisa nas diferentes áreas, entre elas ambiental, nutracêutica, agronômica, e afins, envolvendo a participação das diferentes instituições de pesquisa, ensino e outras que possam estimular e promover trabalhos para o conhecimento destes recursos.

Para pesquisa com espécies nativas, no caso particular do araçazeiro e da grumixameira, o material vegetal é obtido de árvores que não têm sofrido processos antrópicos de homogeneização da expressão gênica podendo induzir ampla variabilidade de respostas nas variáveis de interesse fitotécnico, mesmo que dentro de um programa para conservação da biodiversidade genética esta não seja uma limitante e viabilize o uso de semente botânica.

Por sua parte, obtenção de mudas *in vitro* pode ser uma ferramenta para multiplicação e apoio no desenvolvimento de processos biotecnológicos. Pela condição deste tipo de espécies, estas ainda necessitam de protocolos adequadamente testados, em aspectos como a estabilidade genética, eficiência, entre outros, inseridos dentro de um processo que vai desde a seleção de plantas

matrizes, com características de interesse, até a obtenção da muda, por diferentes métodos.

Com o anteriormente exposto, o objetivo deste trabalho, foi realizar avanços no conhecimento de métodos de propagação das duas espécies, que possam servir de referência para uma linha de produção de mudas e na aplicação de ferramentas biotecnológicas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Espécies nativas

A conservação da biodiversidade de espécies nativas é um elemento chave do funcionamento de paisagens e ecossistemas. Sua redução não somente é medida pela perda de árvores, arbustos, forragens, vegetação marinha e demais espécies, mas também pela sua inter-relação com espécies de micro-organismos, qualidade da água, fauna aquática e outros aspectos como qualidade de vida das pessoas (Williams *et. al.*2001).

O Brasil é considerado como o primeiro país em megadiversidade do mundo, com mais de 17.000 espécies de plantas vasculares endêmicas, mas necessita aumentar o desenvolvimento de pesquisa em diferentes linhas que permitam uma maior aproximação no reconhecimento e aproveitamento dos seus recursos naturais (WCMC, 2000).

Dentre as famílias de plantas vasculares que ocorrem nos diferentes biomas do Brasil, destaca-se a *Myrtaceae*, que além de ser considerada como a mais ampla existente na América do Sul abarca mais de 3000 espécies (Watson & Dallwitz2007) distribuídas desde o sul do México até Uruguai e Argentina (Van der Merwe *et al.* 2005). Os gêneros mais representativos desta família botânica são: *Acca sp*, *Eugenia sp.*, *Myrcia sp*, *Myrcianthes sp*, *Psidium sp*, , entre outros (Landrum & Kawasaki,1997)

De acordo com o descrito anteriormente, o conhecimento das espécies nativas do Brasil, com potencial ornamental, frutífero, farmacêutico, nutritivo, nutracêutico, ambiental, entre outros, faz parte das ferramentas e estratégias para conservação da biodiversidade e o aproveitamento sustentável dos recursos naturais.

## **2.2 Descrição das espécies em estudo**

As espécies para o desenvolvimento do projeto foram escolhidas dentro do macroprojeto de frutíferas nativas liderado pelo Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS.

### **2.2.1 Araçazeiro**

O *Psidium cattleianum* Sab. é conhecido no Haiti, na Argentina e no sul de México como guajaba, cereza, araçá, araçá-amarelo, araçá vermelho, china-guava e no Brasil com o nome de araçazeiro (Lorenzi, 1992).

No Brasil, *P. cattleianum* encontra-se disperso desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, particularmente sob condições de restinga litorânea, locais úmidos de um modo geral, na floresta umbrófila densa e esporadicamente na Depressão Central (Vieira *et al.* 2006)

É uma árvore cuja altura oscila entre três e oito metros (Backes & Nardino, 2004), apresenta tronco liso e casca descamante, folhas simples, opostas, glabras e coriáceas; os frutos são bagas globosas, piriformes, ovoides ou achatadas, com exocarpo de coloração amarela clara ou vermelha (Figura 1) (Sanhotene, 1989). Por essa razão, sugere-se que a espécie pode se dividir em dois morfotipos: amarelo e vermelho (Lorenzi, 1992).



Fotos: Liana John / Giselda Person

FIGURA 1. Planta adulta de araçazeiro (*Psidium cattleianum*) com ramos em estado vegetativo e reprodutivo, a. aspecto geral da árvore, b. ramo em fase vegetativa e reprodutiva, c. Frutos.

Quanto aos mecanismos de reprodução natural desta espécie, existem diferentes publicações, algumas não conclusivas sobre o assunto. Proença (1920) referiu-se ao fato dessa espécie ser normalmente propagada por sementes, sendo a variabilidade entre plântulas de uma mesma matriz, menor do

que a variabilidade entre oriundas de matrizes distintas. Cheyhiyam (1988) refere-se a esta espécie como autoincompatível, enquanto Teatota *et al.* (1970) concluíram que a espécie é autofértil.

Em ensaios realizados na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) observou-se a indução de frutificação tanto pela polinização quanto por outros estímulos mecânicos como a emasculação ou ocorrência de apomixia (Franzón *et al.* 2009).

A alta produção de sementes por fruto desta espécie, que pode variar entre 5 e 250 (Franzón *et al.* 2009), é um dos fatores que facilita a reprodução com fins de repovoamento mais empregados, além da característica de pouca variabilidade genética pelo fato de que boa parte das sementes é produzida por apomixia (Franzón *et al.* 2009). Da mesma forma, diferentes estudos têm mostrado percentuais de germinação acima de 75 % (Santos *et al.* 2004; Silva *et al.* 2011) sob condições de iluminação sendo que sementes de araçazeiro são consideradas fotoblásticas positivas (Santos *et al.* 2004).

### **2.2.2 Grumixameira**

A grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.), é uma árvore da família *Myrtaceae* que apresenta folhas grandes e coriáceas, flores com ovário liso. Sua época de floração no Rio grande do Sul é desde o final do mês de setembro até novembro, com amadurecimento dos frutos em novembro e dezembro (Figura 2). A distribuição natural se reporta nas regiões da mata litorânea do Brasil, desde o sul da Bahia até Santa Catarina (Lorenzi 1992).

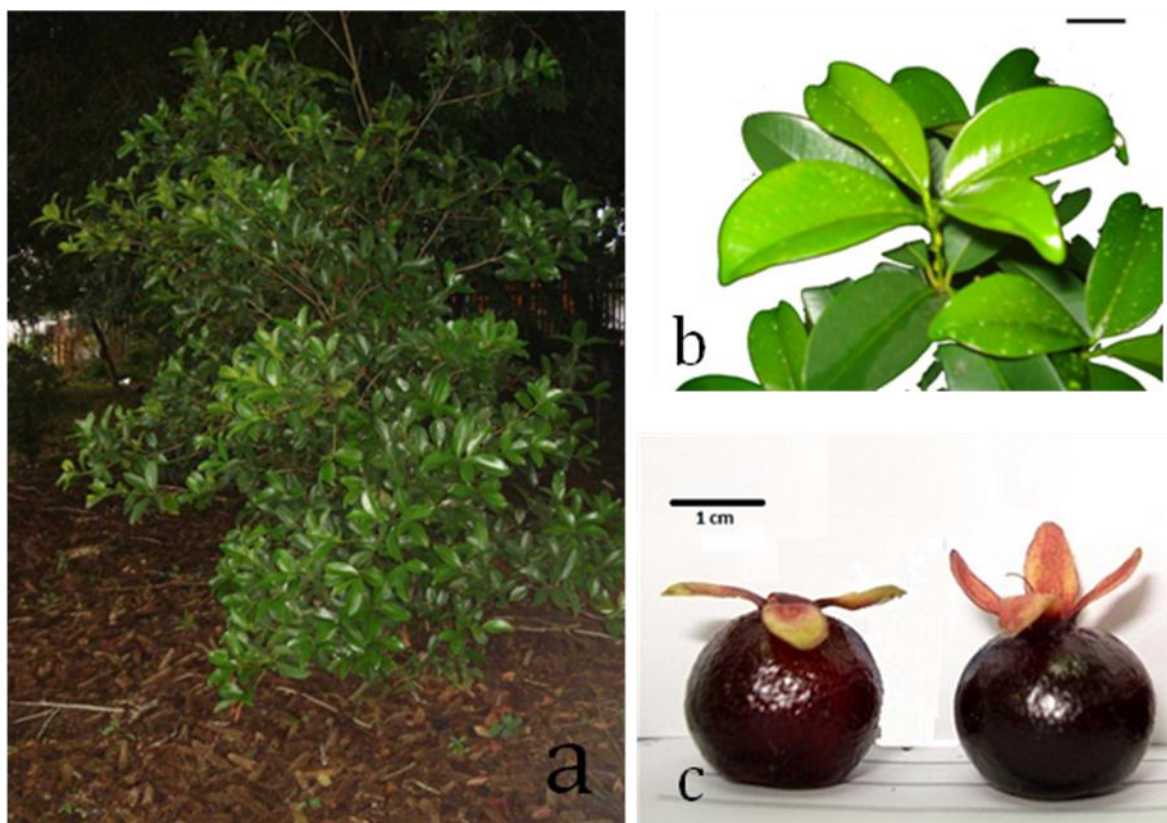


FIGURA 2. Planta adulta de grumixameira: a. Aspecto geral da árvore, b. detalhe da região apical, c. Fruto maduro, (barra = 1 cm), UFRGS, Porto Alegre, 2013.

As árvores apresentam boas características para o paisagismo, devido ao pequeno porte e forma estreita da copa enquanto os frutos, amarelos ou pretos, são saborosos, com bom potencial tanto para consumo quanto para a industrialização (Lorenzi 1992).

Segundo Donadio (1997) e Silva *et al.* (2003) a espécie apresenta valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos. Pesquisas têm mostrado que esta espécie apresenta casca e folhas aromáticas, adstringentes, antirreumáticas e diuréticas (Pio Corrêa, 1984), enquanto o óleo essencial apresenta atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (Fernandez-Ferreira *et al.* 1997).



Os frutos apresentam entre uma e duas sementes (Lopes, 2009) e teores de umidade inicial alto (47 %), típico de sementes recalcitrantes (Ferreira, 2006). Segundo Matheus *et al.* (2005) a porcentagem de germinação é aproximadamente de 60 %, pelo que são consideradas de curta longevidade, e se recomenda sua semeadura imediatamente após coleta (Lorenzi, 1992). Sementes conservadas com umidade próxima a 50 % em câmara fria a 7°C mantêm-se viáveis por até 180 dias (Kohama *et al.* 2006).

Grumixameira apresenta forte dominância apical, entrenós curtos, folhas de coloração verde intenso, que são características de plantas com altos níveis de citocinina endógena o que pode repercutir no sucesso de enraizamento de estacas caulinares (Taiz & Zeiger, 2004). Na propagação por estaquia de *E. brasiliensis*, explantes induzidos com AIB (0, 1000, 2000 e 4000 mg L<sup>-1</sup>) sob condições de nebulização durante 120 dias não desenvolveram sistema radicular, da mesma forma não houve sucesso na propagação *in vitro* (Lopes, 2009).

O anteriormente apresentado sustenta a necessidade de explorar a propagação destas espécies através de ferramentas como o cultivo de tecidos, não somente para fins de multiplicação, mas também para conservação de germoplasma.

### **2.3 Propagação de plantas**

Propagação de plantas é definida como a ciência e arte de multiplicar plantas por via sexuada ou assexuada, a primeira envolve principalmente divisões celulares meióticas e a segunda divisões celulares mitóticas com a duplicação e divisão de cromossomas gerando dois núcleos idênticos. O método de propagação empregado depende da interação de muitas variáveis, entre elas

genéticas, características reprodutivas da espécie, condições ambientais, aspectos econômicos e objetivo desejado.

### **2.3.1 Propagação sexuada**

Dentre as vias conhecidas a reprodução envolve a participação da meiose que por consequência permite a progênie com novo ou diferente genótipo dependendo dos seus genitores (Scianna *et al.*, 1998). Muitas delas são altamente heterozigóticas e geram progênie com alta variabilidade genética. (Hartmann *et al.*, 2002).

### **2.3.2 Propagação assexuada**

Propagação assexuada visa à obtenção de plantas a partir de estruturas vegetativas de plantas matrizes mediante a participação de divisões celulares mitóticas com formação de núcleos geneticamente iguais. Este processo clonal é possível principalmente por duas características das células vegetais: totipotência e desdiferenciação (Scianna *et al.*, 1998).

Totipotência foi o termo proposto por Haberland (1902), para descrever a capacidade que têm as células vegetais para formar uma planta inteira e cujo princípio foi trabalhado por outros pesquisadores como White (1934), Skoog & Tsui (1948). A desdiferenciação, por sua vez, está relacionada com a competência ou diferenciação celular, o qual refere-se à regeneração, e a formação de novas linhagens de células de traslocação em organismos multicelulares (Zhao *et al.*, 2001). Nas células que começam se diferenciar, observa-se o aumentam do tamanho do vacúolo, diminuição do volume do núcleo e desaparecimento dos grãos de amido (Mroginski *et al.*, 2004), enquanto que vão sendo menos sensíveis a novos sinais de desenvolvimento (Féher, 2005).

Porém a expressão da totipotência não depende somente de condições isoladas, mantendo relação inversa com o nível de diferenciação celular, assim células mais diferenciadas são menos sensíveis aos estímulos (Neumann *et al.* 2009).

As técnicas de propagação assexuada podem se dividir em monoclonal e multiclonal dependendo do número de indivíduos que participam na formação da nova planta. A propagação monoclonal e multiclonal podem ser realizadas por duas vias básicas, mergulhia e estaquia (Floriano, 2004). Para o interesse do presente trabalho detalha-se a propagação por estaquia, que varia em função do tipo de estaca empregada.

#### **2.3.2.1 Macropropagação por estaquia**

A propagação por estaquia é amplamente pesquisada e utilizada nos processos de produção de mudas de espécies lenhosas como *Pinus spp.* (Andrejow & Higa, 2009; Alcantara, 2007) *Eucaliptus spp.* (Navarrete & Vargas, 2005), *Psidium guajava* (Zietemann & Roberto, 2007; Tavares *et al.*, 1995) espécies hortícolas medicinais (Coelho *et al.*, 2011) e ornamentais (Kämpf, 2005).

Aumentar a eficiência de cada uma das fases depende de fatores intrínsecos da espécie, mas também existem práticas que ajudam no aumento da resposta das estacas, entre elas, o uso de reguladores de crescimento, indução de rebrotes, ambiente controlado, entre outras.

Na produção de mudas de espécies hortícolas lenhosas, têm sido pesquisados diferentes métodos, especialmente no referente ao balanço hormonal das auxinas e citocininas e estímulos exógenos sob um meio adequado (Felzener *et al.*, 2007; Andrade & Martins, 2003). Do grupo das auxinas, o ácido indolbutírico é o mais empregado e eficiente (Dutra *et al.*, 2002). Outros aspectos

associados como tipo e preparação da estaca, substrato, condições de incubação, são necessários considerar pela incidência no percentual e qualidade do sistema radicular (Xavier *et al.*, 2003).

Assim também, a brotação das gemas pode ser afetada pela espécie, dimensão da planta matriz, região geográfica, época do corte, entre outras. Assim, cada espécie deve ser estudada dentro da sua condição natural e propósito de obtenção das mudas Hoppe (2004).

Alguns cuidados no preparo do material são necessários para o sucesso da técnica. Folhas presentes nos explantes, corte na base do explante, estiolamento prévio das estacas, impermeabilização das estacas, são alguns dos mais citados (Hoppe, 2004).

A presença de folhas nos explantes utilizados na propagação assexuada é necessária para o desenvolvimento de novas estruturas, sendo que elas atuam como fonte de fotoassimilados e síntese de hormônios necessários na rizogênese (Hartmann *et al.*, 2002). Retenção de folhas favoreceu drasticamente o desenvolvimento de calo e raiz na propagação por estaquia de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (Quadros, 2009).

O ambiente para enraizamento deve ser mantido com umidade acima de 80 % - 90 % e temperatura favorável, conseguido mediante o uso de nebulização intermitente (Oliveira *et al.*, 2003). A alta umidade relativa em câmara de nebulização favorece o enraizamento das estacas pela estabilização da temperatura e a redução da transpiração da folha em razão da película de água formada em torno da mesma (Hartman *et al.*, 2002).

Entre os fatores internos associados ao enraizamento, os mais relevantes são: Espécie, condições da planta matriz, tipo, localização e condições do explante, estado fisiológico, níveis endógenos de hidratos de carbono e

nitrogênio, níveis endógenos de hormônios, grau de hidratação e idade (Wendling & Xavier, 2003).

Entre os fatores ambientais controláveis durante a fase de enraizamento estão: umidade, temperatura, luminosidade, substrato, sanidade, pH, concentração de CO<sub>2</sub> no ambiente. Outros tratamentos, mecânicos como dessecação ou incisão, exposição da região procambial, e impermeabilização das estacas; fisiológicos como rejuvenescimento, estiolamento e uso de reguladores de crescimento e/ou sanitários podem ajudar no enraizamento das estacas, dependendo das condições e da causa da dificuldade (Hoppe, 2004; Wendling & Xavier, 2003).

O rejuvenescimento de plantas é considerado um processo de reversão temporária das características adultas, induzido para obtenção de material vegetal novo; assim como propósito de superar os efeitos da topófise e ciclófise geralmente recomenda-se empregar tecidos destas características e explantes pequenos (Luna, 2008; Ferreira, 1992; Olesen, 1978).

Topófise e ciclófise são dois processos independentes relacionados com as respostas dos tecidos dependentes do seu grau de desenvolvimento: Topófise refere-se ao fenômeno onde excisões de meristemas, cortes e outros mantêm, após utilização como estaca, enxerto ou outro, o hábito de crescimento dependendo da localização do ramo de onde proveio, enquanto ciclófise é o processo de maturação do meristema apical (Olesen, 1978). As duas condições podem influenciar o sucesso da técnica de propagação (Luna, 2008; Olesen, 1978).

Dentre os reguladores de crescimento de síntese química, são utilizados principalmente as auxinas e citocininas (Hartmann *et al.*, 2002), sendo a resposta

do explante dependente dos níveis endógenos do hormônio e sua sensibilidade a elas.

Auxinas correspondem a um grupo químico de hormônios vegetais que regulam diferentes respostas do crescimento e desenvolvimento vegetal. A forma mais predominante nas plantas é o ácido indolacético – AIA, outras formas são o ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IA), ácido fenilacético –AFA, ácido indolbutírico – AIB que seria a segunda auxina mais abundante, e o ácido Indolpropiónico –AIP (Ludwig-Müller & Cohen, 2002). Dentre estes, comercialmente o mais utilizado é o AIB, cujo efeito responde principalmente a três fatores: relativa estabilidade química e menor oxidação enzimática (Ludwig-Müller, 2000), transformação lenta e contínua em AIA a partir de uma reação de oxidação do AIB (Bart El *et al.*, 2001) e capacidade de induzir a translocação de auxinas endógenas (Teale *et al.*, 2006).

Por sua parte, citocininas são hormônios vegetais sintetizados naturalmente pelas plantas e são essenciais para o seu normal crescimento e desenvolvimento. A relação entre citocininas e auxinas no meio para cultura de tecidos, se traduz em variações na morfogênese de raiz e caule (Skoog & Miller, 1957).

### **2.3.3 Propagação *in vitro***

O termo propagação *in vitro* de plantas, em sentido amplo, compreende a utilização de diversas técnicas, que buscam promover a resposta celular para regeneração de plantas completas; porém este conceito não é tão simples, pois são diversos fatores os que incidem na resposta desejada, entre eles: condições do ambiente de crescimento, fatores relacionados com o explante, estabilidade genética entre outras (Levitus *et. al.* 2004).

### **2.3.3.1 Fisiologia do cultivo *in vitro***

Os mecanismos fisiológicos que envolvem a cultura *in vitro* de plantas diferem altamente dos conhecidos em condições *in vivo*. As taxas de crescimento, desenvolvimento e muitas das características fisiológicas e morfológicas das plantas formadas *in vitro* são influenciadas pelo ambiente físico, químico e gasoso dos recipientes (Cañal *et al.*, 2001).

Em relação às características do ambiente nos processos de multiplicação *in vitro* ou obtenção de qualquer outro tipo de resposta a partir de células vegetais, são muitos os fatores que incidem no crescimento, morfogêneses das plantas *in vitro*, como pode ser observado na Figura 3.

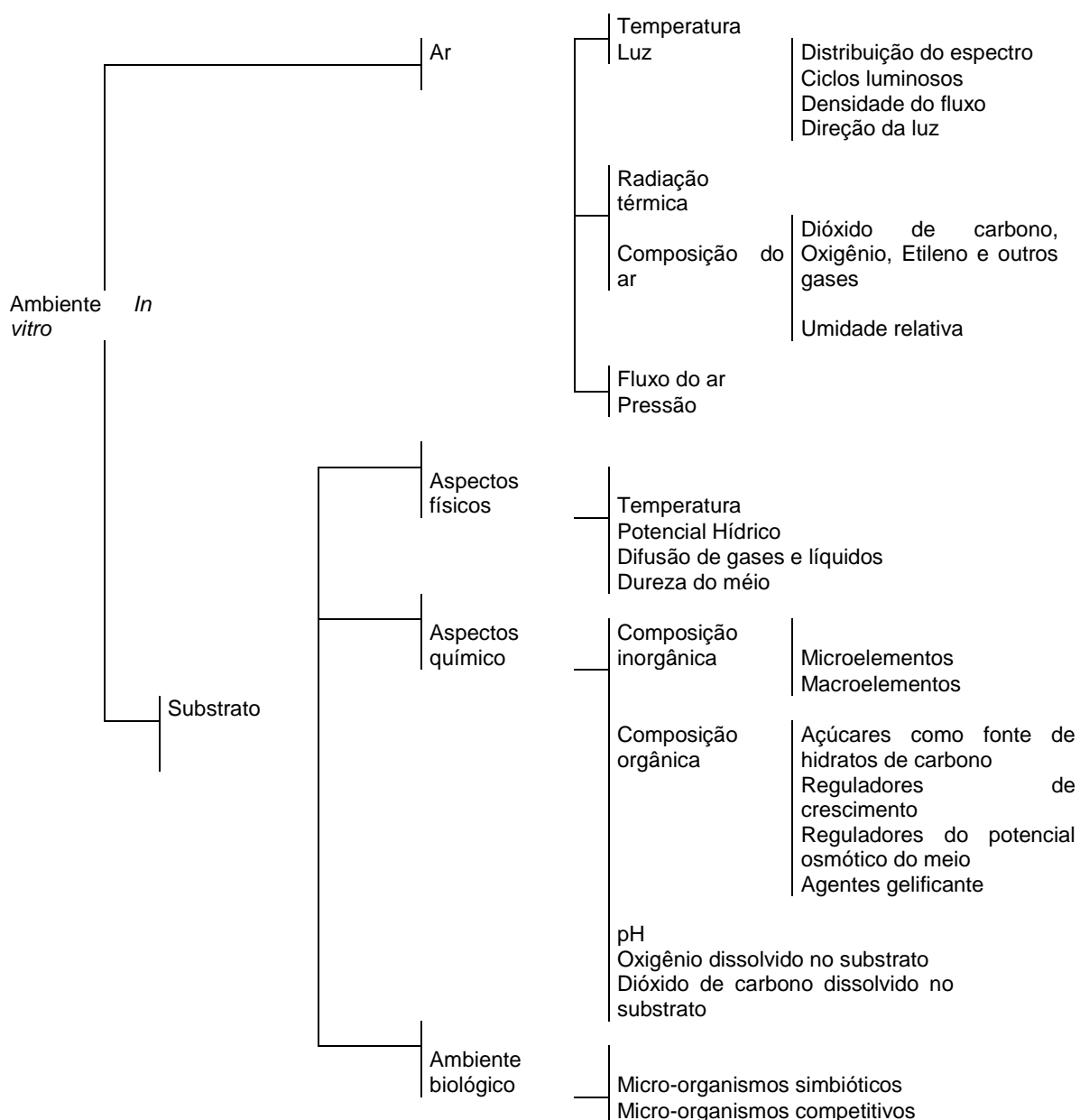


FIGURA 3. Fatores que podem influenciar no crescimento e morfogêneses das plantas *in vitro*. Kozai *et al.*, (1992) modificado por Cañal *et al.*, (2001).

Os fatores que desenvolvem estes processos morfogênicos influenciam amplamente o grau e tipo de resposta por parte do tecido estabelecido *in vitro*. Numerosos estudos de protocolos de propagação, geralmente desenvolvem projetos a partir da modificação de condições químicas do meio, mantendo como um constante geral, os fatores inerentes ao ambiente interno de cultivo, onde os



explantes se desenvolvem sob condições assépticas dentro de um recipiente hermético com baixos níveis de luz, num meio que contém nutrientes para o crescimento heterótrofo além de uma elevada umidade relativa (Seabrook 2005; Cañal *et al.*, 2001).

Nestes tipos de trabalhos procura-se uniformizar um protocolo existente sob condições ambientais e, além disso, com o propósito de melhorar a eficiência nos processos, é necessário ter claro os fatores que condicionam a morfogênese, que podem ser classificados em dois grupos, as variáveis de estado e de fluxo (Tabela 1).

TABELA 1. Características gerais do ambiente *in vitro* na micropropagação convencional.

VARIÁVEIS DE ESTADO	VARIÁVEIS DE FLUXO
<i>Ambiente aéreo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevada umidade relativa</li> <li>• Temperatura do ar.</li> <li>• Concentração elevada de CO<sub>2</sub> durante período escuro, baixa durante o período luminoso.</li> <li>• Elevada concentração de etileno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluxo de Matéria e energia</li> <li>• Taxa de transpiração baixa.</li> <li>• Taxa fotossintética baixa.</li> <li>• Elevada respiração na ausência de luz.</li> <li>• Fluxo de radiação térmica e de fótons baixo.</li> </ul>
<i>Ambiente do meio nutritivo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevada concentração de açúcar, sais, reguladores.</li> <li>• Baixa concentração de oxigênio, e liberação de exsudados tóxicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balanço negativo de CO<sub>2</sub></li> <li>• Baixa taxa de absorção de água, açúcar, íons e componentes do meio.</li> </ul>

Fonte: adaptado de Cañal *et al.*, (2001)

### 2.3.3.2 Fatores que influenciam a micropropagação

As respostas obtidas no cultivo *in vitro* são determinadas por uma série de fatores e suas interações, que determinam o êxito no processo de micropropagação, entre elas podem-se mencionar:

**a. Planta matriz:**

A planta matriz deve ter o típico fenótipo da espécie ou variedade que se deseja reproduzir, livre de sintomas de doenças, e passar pelo processo de indexação prévio ao desenvolvimento das posteriores etapas de propagação. O termo indexação deve ser entendido como o processo de registro ordenado de dados e informações para elaboração de um índice, que na produção de plantas livres de doenças, requer a combinação de técnicas de cultivo, com técnicas de detecção e eliminação de vírus e outros patógenos (George *et al.*, 2008; Cordeiro *et al.*, 2003).

**b. Tipo de explante:**

A seleção do explante deve ser feita a partir do conhecimento inicial da fisiologia das plantas, suas expressões genotípicas e a resposta esperada em condições *in vitro*. Esta seleção deve ter em conta o sistema de propagação da planta. Na produção de plantas diplóides por via direta ou indireta são usados explantes tanto polares (meristemas e estacas) quanto bipolares (embriões sexuais e somáticos), quanto excisões de folha, caule e outros; por sua parte na produção de plantas haplóides os explantes empregados são as células gametas (Olmos, 2002; Grout, 1999; Skoog, 1974).

Não somente o tecido original, mas também o tamanho do explante pode determinar a resposta *in vitro*. Em um trabalho realizado por Pedroso & Pais (1993), na indução de calo a partir de explantes foliares de *Camellia japonica* as regiões proximais e distais, geraram calos friáveis, enquanto o tecido lateral no sentido da nervura principal gerou calo embriogênico. No estabelecimento *in vitro* para propagação de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), a maior percentagem de

êxito foi obtida quando se utilizaram explantes de 1,5 cm de comprimento (Souza *et al.*, 2006).

No caso de *E. brasiliensis*, esta apresenta diferenças de tonalidades nas suas faces foliares, assim a superfície epidérmica apresenta estrias paralelas na nervura central, diferente da área restante que é homogênea, por sua vez, o tamanho das células parenquimáticas é menor na região da nervura central e a borda (Gomes *et al.*, 2009; Donato & Morretes, 2007). Este grau de especialização celular tem influência direta na resposta do explante, que é preciso levar também em consideração (Feira *et al.*, 2003; Stange, 1945).

### **c. Meio de cultivo:**

As respostas em condições *in vitro* são afetadas pela composição físico-química do meio sintético, entre elas temperatura, consistência do meio, pH, potencial osmótico, cor, entre outras. Por sua parte, a temperatura de incubação empregada geralmente oscila entre 24 e 28°C, e somente num reduzido número de espécies, a flutuação nos regimes desse fator pode estimular organogênese (Perez, 1998). George *et al.*, (1996), ainda citaram que o processo de morfogênese *in vitro* é influenciado pela composição e consistência do meio, reguladores de crescimento, meio gasoso, tamanho do recipiente, meio externo, e luminosidade.

A luminosidade é fundamental na morfogênese e envolve vários componentes como: intensidade, fotoperíodo e qualidade; deste modo, sob condições *in vitro*, a planta é considerada um ser heterótrofo que depende das fontes de carboidratos do meio (Seabrook, 2005; Villalobos *et al.*, 1991).

Da mesma forma, a qualidade de luz tem ampla influência nos mecanismos de crescimento e desenvolvimento *in vitro*. A taxa fotossintética, em condições *in*

*vitro* é muito baixa sendo afetada pela concentração de CO<sub>2</sub>, produção de etileno, inibição das enzimas do ciclo de Calvin por causa da sacarose no meio (George *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). A concentração de CO<sub>2</sub> durante o período luminoso está sob ponto da compensação e aumenta de maneira constante durante o período escuro (George *et al.*, 2005).

As vitaminas, entre elas, tiamina, piridoxina e ácido nicotínico, no meio de cultura para desdiferenciação e regeneração celular são necessárias principalmente porque as células intactas isoladas das plantas, geralmente não são capazes de produzir os componentes essenciais, principalmente para o metabolismo de carboidratos e nitrogênio (Neumann *et al.*, 2009).

Na indução de superbrotação em *Gossypium* sp., observou-se efeito diferencial no número de rebrotes por explante em relação ao complexo vitamínico utilizado, sendo que o composto LS (Linsmaier & Skoog, 1965) foi superior em comparação aos meios B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e MS (Murashige & Skoog, 1962) (Wanderley *et al.*, 2008).

#### **d. Contaminação e oxidação:**

A contaminação por micro-organismos e a oxidação do tecido doador têm sido os problemas mais severos enfrentados na micropropagação de plantas lenhosas (George *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 1993) cujo grau de limitação associa-se às condições de crescimento das plantas matrizes, ao tipo de explante, ao processo de desinfestação, à técnica empregada, entre outros. Estabilidade genética, taxa de propagação, homogeneidade das populações também devem ser considerados.

A oxidação fenólica ocorre por meio da atividade de enzimas oxidativas, sobre os fenóis exsudados pela planta (Rout *et al.*, 2000). Segundo Perone *et al.*,

(2008), estas enzimas e os correspondentes substratos (hidroxifenóis) estão separados em compartimentos diferentes dentro da célula. Por ocasião da excisão do explante, e posterior destruição de algumas células, enzima e substrato são postos em contato entre si e com o oxigênio (Figura 4.1), resultando na oxidação da hidroxila fenólica, com formação de água e quinona (Figura 4.2), sendo esta última tóxica a micro-organismos e inibidora do crescimento celular ou polimerizam-se formando melaninas (Figura 4.3)

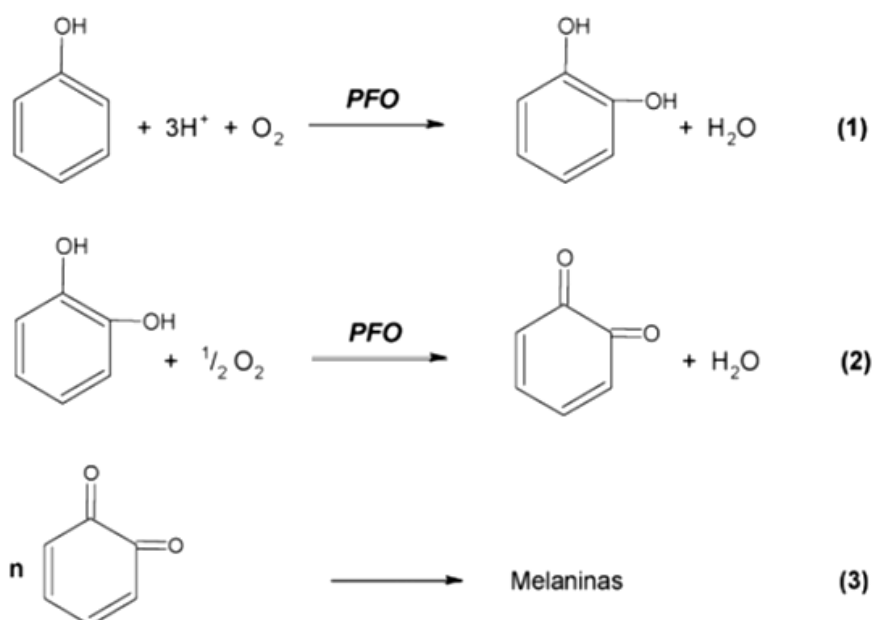


FIGURA 4. Reações químicas na oxidação de fenóis (PFO: Processo de formação dos óxidos fenólicos, adaptado de Perone *et al.*, (2008), Porto Alegre, 2013.

A oxidação fenólica pode ser minimizada com a adoção dos seguintes procedimentos:

1. Uso de tecido jovem como explante, pois os mais juvenis apresentam menos problemas de oxidação quando comparados com os adultos (Perone *et al.*, 2008);

2. Redução dos danos mecânicos e químicos aos explantes, remoção de substâncias fenólicas por meio da adição de, por exemplo, polivinilpirrolidona-PVP ao meio nutritivo (Perone *et al.*, 2008);
3. Modificação do ambiente, com incubação inicial no escuro ou em baixa intensidade luminosa, bem como a variação da composição do meio nutritivo, utilizando-se meios salinos diluídos (Perone *et al.*, 2008);
4. Modificação do potencial REDOX por meio da lavagem dos explantes com ácido cítrico ou ácido ascórbico (Perone *et al.*, 2008);
5. Trocar os explantes de meio de cultivo frequentemente nos primeiros dias após introdução. (Rout *et al.*, 2000).

Além disso, existe a possibilidade de tratamentos prévios das plantas matrizes na predisposição das condições fisiológicas para obtenção de uma melhor resposta na fase de incubação. Para isso pode-se realizar anelamento dos ramos secundários, com o objetivo de aumentar a concentração de fotoassimilados na parte aérea. Também pode-se fazer aplicação localizada de citocininas, incubação em ausência de luz, estiolamento localizado dos explantes, entre outros; todos os anteriores com o propósito de reduzir o grau de especialização celular.

O carvão ativado no meio de cultivo tem sido amplamente usado para o cultivo de diversas espécies que apresentam problemas de oxidação na introdução do tecido (Motoike *et al.*, 2007; Pan & Staden, 1998). Seu emprego na propagação *in vitro* obedece particularmente a que provê um meio escuro, absorve substâncias inibitórias ou indesejadas, reguladores de crescimento, entre outras. A limitação para seu uso, além da baixa possibilidade de observar a presença de contaminantes, é sua alta afinidade por compostos fenólicos e os seus óxidos, auxinas como AIA, AIN, ANA, e citocininas (BA, Cinetina), estes últimos requeridos ao desenvolvimento do explante (Pan & Staden, 1998).

No concernente à contaminação por micro-organismos em cultura de tecidos, esta pode ser originada a partir de duas fontes: transportados na superfície e no interior dos explantes, ou serem introduzidos por falhas nos procedimentos de laboratório, para isto, segundo Debergh & Zimmerman (1991), o controle deve ser feito basicamente em três pontos do processo: nas plantas matrizes ou fonte dos explantes, durante o procedimento de introdução ao meio de cultura e para determinados grupos de micro-organismos e vírus, durante as fases iniciais de crescimento *in vitro*.

A cultura de meristemas é uma técnica empregada em conjunto com a termoterapia nos protocolos de limpeza, procurando-se recuperar tecidos afetados por micro-organismos endofíticos ou patógenos (Grout, 1998). A germinação *in vitro*, por sua vez, é uma via de obtenção de mudas a partir de sementes com limitações na germinação ou faz parte básica de protocolos de enxertia *in vitro* de espécies como *Citrus sp* (Hassanein & Azooz, 2003; Afele & Langhe, 1991).

Sustentando o anterior, alguns trabalhos desenvolvidos, por exemplo, com goiabeira (*Psidium guajaba*), mostraram que a diversidade da microbiota presente no material vegetal e o grau de contaminação característico das plantas no campo, dificulta o isolamento axênico. Isso ocorre possivelmente pelas características anatômicas dos tecidos deste tipo de plantas, que diminuem a efetividade dos processos de desinfestação tradicional (Viloria *et al.*, 1993; Parra *et al.*, 1991).

Por sua vez Collado *et al.*, (2004) na micro-propagação de *Swietenia macrophylla*, obtiveram 83 % de explantes *in vitro* livres de contaminação aparente e a sobrevivência foi superior a 70 %, mediante imersão destes em solução de NaOCl 3 % por um período de 30 min.

Resultados anteriores assemelham-se com o apresentado por Portal *et al.*, (2003) no estabelecimento *in vitro* de *Psidium guajaba*, onde 76,47 % dos explantes incubados mostraram contaminação bacteriana, 5,88 % por leveduras e 17,64 % não apresentavam contaminantes detectáveis, e sim escurecimento do meio de cultivo. Os contaminantes mais frequentes pertencem às famílias *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*. Estes resultados revelaram que tanto a contaminação microbiana quanto a acumulação de fenóis no meio podem se constituir no principal limitante.

Estudos preliminares realizados em outras espécies lenhosas como *Acacia meamsii*, ressaltam a interação dos fatores meio de cultura e tamanho do explante para o sucesso da limpeza, sendo que foram alcançados níveis inferiores a 10 % de contaminação quando utilizados explantes de cinco milímetros de comprimento em meios de cultura, como o WPM, com baixa concentração total de íons (Correia & Cortezzi, 1995).

Para a limpeza dos contaminantes exógenos, os produtos de síntese química mais utilizados são hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, álcool, soluções de fungicidas, entre outras, porém geralmente estes tratamentos são aplicados em conjunto (Donini *et al.*, 2005; Lattuada 2011).

O hipoclorito de sódio (NaOCl), que é a solução mais empregada, é relatada por diversos autores para desinfestação de pequenos explantes, em concentração que podem variar entre 0,5 % (Ferreira, 2003; Dodds & Roberts, 1999) e 1-1,5 % de cloro ativo (Vargas *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2003), explantes de maior tamanho poderiam precisar maior concentração e tempo de tratamento.

Segundo Emmanuel *et al.*, (2004), a atividade biocida do cloro é influenciada pela concentração, temperatura, qualidade da água, pelo tempo de contato e pelo pH. O poder biocida do cloro diminui substancialmente com o



aumento do pH e aumenta em função da redução do pH, facilitando assim sua capacidade de translocação através das membranas celulares.

Soluções contendo hipoclorito de cálcio -  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  (nas concentrações de 6 a 12 %), Iodo e antibiótico juntamente com fungicida, também são utilizadas para desinfestar explantes foliares de espécies como goiabeira (*P. guajaba*), teca (*Tectona grandis*), caoba (*Swietenia macrophylla*) (Abdelnour & Muñoz, 2005; Rodriguez *et al.*, 2003).

Outra alternativa para limpeza de material vegetal é mediante o uso de antibióticos, que são compostos químicos com atividade de supressão ou inibição do crescimento de micro-organismos e que em baixa dose são capazes de inibir seus processos vitais por ação bacteriostática, bactericida, fungistática e fungicida, sendo que esses compostos podem ser sintetizados naturalmente por várias espécies (Waksman & Schatz, 1943).

#### **e. Variação genética:**

O estabelecimento de explantes, em condições *in vitro*, para formação de embriogênese ou organogênese implica na desdiferenciação celular, como passo prévio, no processo de reprogramação celular caracterizado pela alta taxa de divisão mitótica (Neumann, 2009).

Variação, *lato sensu*, e a mudança fenotípica estável e herdável. A estabilidade refere-se à persistência na ausência do evento que induz a mudança, enquanto a herdabilidade refere-se a que o fenótipo se mantém após divisão celular. Mudanças no fenótipo que persistem no tecido ou células tanto tempo quanto são mantidos no meio, são chamadas de respostas fisiológicas (Meins, 1983).

Em princípio, a variação celular poderia resultar em mutações genéticas, mudanças epigenéticas, ou da combinação dos dois processos. Mutações genéticas envolvem alterações aleatórias na constituição genética tais como pontos de mutação, supressões, duplicações, e rearranjos do material genético, enquanto mudanças epigenéticas, são alterações que não resultam em mudanças permanentes no genoma vegetal além de não serem transmitidas na meiose (Meins, 1983).

Ditas variações tem sido atribuídas ao uso de tecido infetado por microorganismos, altas quantidades de repicagem, altas concentrações de reguladores de crescimento, entre outras. Porém estas expressões podem ser reduzidas com ligeiras mudanças na composição do meio de cultivo, principalmente no referente às concentrações hormonais (Rocca & Mroginski, 1991). Também são significativos os efeitos dos ferimentos, esterilização da superfície dos materiais e as funções naturais e artificiais (George *et al.*, 2008).

Atualmente têm sido avaliados procedimentos tendentes à redução das fontes de variabilidade e homogeneização do material celular empregado, entre eles: Cultura de camada fina de células (Thin Cell Layering –TCL), Dupla coloração e separação por peneira. (Gupta & Holmstrom, 2005; Tan *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2001).

O conhecimento desses fatores mencionados anteriormente é necessário para levar em consideração na análise das vias de propagação estudadas.

### **2.3.3.3 Técnicas de propagação *in vitro***

As técnicas *in vitro*, utilizam duas vias prioritárias: organogênese direta, caracterizada pela formação de órgãos e estruturas sem necessidade da formação de calo, e organogênese indireta, caracterizada pela necessidade de

induzir desdiferenciação celular, formação de calo e posterior re-indução de especialização celular. Nesta última, dependendo do tipo de calo, pode-se diferenciar em calogênese embriogênica ou friável (Olmos *et al.*, 2003; George, 2008).

Entre as técnicas mais empregadas na obtenção de mudas para o objetivo do presente estudo, detalham-se alguns aspectos da organogênese e embriogênese somática.

#### **2.3.3.4 Organogênese**

Organogênese, em reprodução vegetal, se define como a formação de estruturas organizadas a partir dos processos de divisão celular (Hartmann *et al.*, 2002); neste sentido, a formação de raízes, caules, frutos, e demais órgãos estão imersos neste conceito. Roca & Mroginski (1991) definem a organogênese como o desenvolvimento de gemas ou meristemas radiculares diretamente de explantes ou a partir de calos friáveis.

Uma das técnicas na propagação *in vitro* que envolvem a organogênese direta é a microestaquia, mediante a qual objetiva-se a propagação em massa por subcultivos e posterior enraizamento. A técnica, segundo Alfenas *et al.*, 2004 pode ser dividida em cinco fases:

- Produção de brotos;
- Enraizamento;
- Aclimatização;
- Crescimento;
- Rustificação a céu aberto.

A propagação *in vitro* por microestaquia tem permitido o desenvolvimento de numerosos estudos em diferentes espécies, principalmente mediante duas vias: organogênese e embriogênese somática (Roca & Mroginski 1991).

A organogênese direta caracteriza-se pela formação de gemas e desenvolvimento de meristemas axilares e adventícios para posterior formação de uma estrutura polar (Singh *et al.*, 2004). A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo, esta última pode se dividir, de maneira geral, nas seguintes etapas: desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação, formação do órgão (Christianson & Warnick, 1988).

As características do calo gerado podem-se direcionar para o processo subsequente manejando condições do meio. A formação e o cultivo de calo é a primeira resposta desejada nesta via e têm grande importância, não somente na obtenção de plantas, mas também pode-se utilizar para regeneração de órgãos, cultivo de protoplastos, produção de metabólitos secundários, processos de manipulação genética, entre outros (Olmos *et al.*, 2002).

Assim por exemplo, na propagação de diferentes espécies nativas da Amazônia tem se avançado na avaliação de explantes para formação de calo e indução de organogênese e embriogênese indireta (Pasquale *et al.*, 2012) e em outras espécies com maior profundidade de pesquisa nesta área tem permitido a obtenção de plantas completamente desenvolvidas (Bakry *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2001), obtenção de metabólitos secundários (Smetanska 2008), entre outras.

No caso das Mirtáceas, são poucas as pesquisas publicadas com o uso desta técnica, e principalmente nas espécies em estudo, porém as noções que reportam o comportamento *in vitro* de espécies lenhosas, podem orientar o manejo de problemas comuns como recalcitrância, lenta estiolação, oxidação

entre outras. Visando o estabelecimento de protocolos de reprodução por esta via, têm sido publicados trabalhos em espécies como pitangueira (Lattuada, 2010), jabuticabeira (Picolotto *et al.*, 2007) e goiabeira (Singh *et al.*, 2002).

### **2.3.3.5 Embriogênese somática**

Embriogênese somática é o processo de formação de estruturas bipolares a partir de células do tecido somático que pode ocorrer naturalmente ou ser induzido em condições *in vitro* por diversos estímulos. Este processo pode se considerar como direto quando divisões celulares levam diretamente ao embrião somático, ou indireto quando a estruturação de embriões somáticos é precedida da formação de calo (Fehér *et al.*, 2003).

A indução do potencial celular para formação de calo, pela desdiferenciação ou reprogramação de células somáticas, conforme o caso, é uma condição previa obtida pelas condições do meio, sob condições *in vitro* (Newmann *et al.*, 2009).

De maneira geral a resposta a produção de células embriogênicas é dividida em duas fases (Namasivayam, 2007):

- Indução, onde células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica e proliferam;
- Expressão, onde células embriogênicas adquirem sua competência e se diferenciam em embriões somáticos.

Porém, vários autores citam como uma grande limitação a baixa frequência da formação de embriões associada a diversos fatores. Frequência de indução deste processo não somente depende das condições da cultura, mas também do

genótipo, tecido e estágio de desenvolvimento da fonte do explante (Carman, 1990).

O termo células embriogênicas refere-se a células que completaram sua transição da condição somática para um estágio onde um estímulo como aplicação de reguladores de crescimento não é necessário para produção do embrião somático (Olmos *et al.*, 2002). Estas células embriogênicas são caracterizadas pelo tamanho reduzido, citoplasma denso, formato isodiamétrico, e núcleo e nucléolo grandes e densos (Namasivayam, 2007) enquanto que célula em estado de transição, que precisam de um mínimo estímulo aplicado para virar embriogênicas, chamadas de competentes, tem aparência variável que dificulta sua identificação baseado simplesmente na sua morfologia (Toonen *et al.*, 1994)

Alguns exemplos de obtenção de embriões em Myrtaceae são descritos. Em goiabeira (*Psidium guajaba*) foram obtidos embriões somáticos, empregando meio basal MS, acrescentado com 2,4-D (4,52  $\mu$ M), sem citocininas (Rai *et al.*, 2010). Stefanello *et al.*, (2005) reportaram também pela primeira vez em *Acca sellowiana* a obtenção de 18 % de embriões somáticos, induzidos na formação de calos, empregando meio de cultivo LP (Quorin & LePoivre, 1977) acrescentado com Picloram (10  $\mu$ M) e Cin (1  $\mu$ M). Por sua vez, Motoike *et al.*, (2007) visando a obtenção de embriões somáticos de jaboticabeira (*Myrciaria aureana*) observaram que a taxa de produção destes é afetada pelo uso de carvão ativado.

#### **2.4 Estudo anatômico da propagação *in vitro***

O entendimento da ontogenia e do desenvolvimento dos primeiros eventos na desdiferenciação celular para formação de calo ou de estruturas definidas tem sido alvo de pesquisa em varias espécies para o aprimoramento das técnicas de propagação *in vitro* (Almeida *et al.*, 2012; Menéndez-Yuffa & Garcia, 1997).

Existem dentro do mesmo explante, características divergentes relacionadas com sua estrutura anatômica que influenciam na resposta aos tratamentos. Entre os procedimentos que podem auxiliar o estudo anatômico dos processos celulares *in vitro*, ressalta-se o uso de corantes básicos, ácidos, e outros reagentes específicos para grupos químicos presentes nos tecidos e células como ligninas, sacarídeos, compostos lipídicos, entre outros (Cutler, 2011).

Alguns testes químicos podem ajudar no entendimento das primeiras respostas associados ao desenvolvimento de calos e órgãos. Teste de iodo, reação de ácido periódico de Schiff, o uso de corantes como azul de toluidina, azul de astral, entre outros, auxiliam pela sua especificidade no contraste histológico (Feder & O'brien, 1968; Lillie, 1965).

#### **2.4.1 Estudo anatômico em Myrtaceae**

Os estudos anatômicos em *Myrtaceae* foram voltados principalmente para o reconhecimento de padrões taxonômicos e variações histológicas em função de fatores ambientais como incidência de luz, idade, poluição, entre outros (Gomes *et al.*, 2009; Alves, 2008). Algumas características comuns referidas para a *Myrtaceae* são, por exemplo, a ocorrência frequente de cavidades secretoras subepidérmicas, distribuídas nas duas faces da lâmina foliar, adaxial e abaxial.

Para o caso de araçazeiro, alguns padrões gerais de estruturas presentes, tamanho e espessura da lamina foliar, padrão de venação, variações fenotípicas, tem sido os mais reportados (Silva, 2005; Arruda & Fontenelle, 1994).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura e em casa de nebulização do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre – RS, visando estudar métodos de propagação de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam).

Entre os equipamentos utilizados para registro e avaliação dos experimentos, encontram-se:

- Potenciômetro marca DIGIMED, referência DM 20 com eletrodo de vidro combinado de pH (DME-CV1) e precisão relativa 0,05 %;
- Autoclave WEBECO de paredes simples com cilindro metálico vertical. As condições de trabalho foram de  $\pm 120^{\circ}$  C e pressão para esterilização de  $\pm 1,3$  ATM. O tempo de autoclavagem, variou dependendo do volume de meio nos recipientes, sendo mínimo de 15 minutos para as quantidades menores, contando o tempo no ciclo a partir do momento de atingir a pressão requerida. O ciclo completo de esterilização refere-se às três etapas: Aquecimento, esterilização e secagem;
- Deionizador VEXER de coluna deionizadora com capacidade de 50 L/H;
- Microscópio DMC 500 Leica.



Nos experimentos de propagação assexuada, as plantas matrizes para fornecimento de folhas e estacas permaneceram em condições de casa de vegetação mantidas com adubação de base e irrigação por gotejamento e foram tratadas com fungicida sistêmico (tiofanato metílico 49 mg L<sup>-1</sup> i.a) aplicado oito dias antes de extração de explantes foliares.

### **3.1 Germinação *in vitro* de araçazeiro**

Com o intuito de conhecer o comportamento germinativo em condições *in vitro* das sementes de araçazeiro e possibilitar o desenvolvimento eficiente de mudas por esta via para posteriores estudos de propagação foram realizados dois testes que serão descritos a seguir.

#### **3.1.1 Efeito do AG<sub>3</sub> na germinação *in vitro* de sementes de araçazeiro**

O experimento foi instalado em novembro de 2011. Como fonte de sementes frutos de araçá vermelho foram coletados de um único indivíduo, cultivado a céu aberto, na região metropolitana de Porto Alegre no mês de outubro de 2011.

As sementes foram extraídas da região equatorial dos frutos após a remoção da mucilagem que as recobria, mediante abrasão com calcário e posterior enxágue por dez minutos seguido da submersão destas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (1 %) por dez minutos. Após, as sementes foram secas à sombra e armazenadas em geladeira (4°C) por aproximadamente um mês.

A semeadura *in vitro* foi realizada em câmara de fluxo laminar estéril realizando um primeiro tratamento por imersão de dez minutos em solução de NaOCl (2 % i.a) e posterior enxágue por triplicata com água deionizada estéril (ADE). As sementes foram estabelecidas individualmente em tubos de ensaio

com 10 mL de meio de cultivo. Adotou-se o meio LPm (50 %) (Von Arnold e Eriksson, 1981), acrescido de sacarose ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ) e ágar (0,8 %) e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem sob 1,3 ATM por 15 min. Após três dias da inoculação foram removidas dos tubos e imersas por 18 horas em soluções estéreis de ácido giberélico (Progibb®) (0; 2; 10; 20 e  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Em seguida, as sementes tratadas foram devolvidas ao mesmo recipiente.

As sementes permaneceram em sala climatizada de condições detalhadas no apêndice 2 com fotoperíodo de 16 horas (lâmpadas OSRAM 40W). A cada quatro dias, avaliou-se a emergência e, após 64 dias, foram avaliados o percentual de germinação (% G) e o índice de velocidade de germinação (I.V.G); para o qual foi adotada a fórmula  $I.V.G = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ ; onde G1, G2, Gn = número de plântulas computadas na primeira, na segunda e na última contagem; e N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem, respectivamente (Maguire, 1962).

O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso, sendo a unidade experimental composta por dez tubos com uma semente, tendo quatro repetições em cada tratamento.

### **3.1.2 Efeito do tempo de imersão em solução NaOCl (2 %) na germinação *in vitro* de sementes de araçazeiro**

As sementes utilizadas foram obtidas de acordo com o procedimento descrito no experimento anterior.

Em câmara de fluxo, as sementes foram mantidas em solução de NaOCl nos tempos e temperatura testadas, segundo os tratamentos: T1- NaOCl (2 %) por 20 minutos, T2- por 40 minutos e T3 - por 60 minutos, T4 - Tratamento com termoterapia, constando da imersão das sementes em água quente ( $55^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por

10 minutos. Posteriormente as sementes foram enxaguadas em ADE, por triplicata, e semeadas no meio básico MS e mantidas em sala climatizada sob fotoperíodo contínuo de 12 horas, segundo as condições descritas no apêndice 2.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso, sendo que a unidade experimental foi composta por cinco frascos de vidro, contendo cinco sementes por frasco, em 15 mL de meio básico MS (50 %) acrescentado com sacarose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) sem a adição de reguladores de crescimento, correção do pH para 5,8 e gelificado com ágar ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ).

As variáveis avaliadas foram: percentual de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), percentual de sementes com hipocotilo maior a dois cm (%F).

### **3.2 Macropropagação por estaquia**

Diante da necessidade de obterem-se métodos de propagação assexuada, pelas suas vantagens na obtenção rápida de mudas com características conhecidas da matriz, realizaram-se os seguintes testes.

#### **3.2.1 Macropropagação de grumixameira por estaquia**

O experimento foi estabelecido em fevereiro de 2012 em casa de vegetação com sistema de irrigação por nebulização intermitente. O material foi coletado no final do dia de uma única planta matriz localizada na Faculdade de Agronomia da UFRGS. Ramos intermediários da região central da árvore foram utilizados para obtenção das estacas (Figura 5).

Estacas semilenhosas de cinco centímetros de comprimento e duas folhas inteiras foram estabelecidas em bandejas alveoladas de policloreto de vinil - PVC, com células de 70 mL, contendo substrato de casca de arroz carbonizada. As

bases das estacas foram cortadas em bisel duplo e mergulhadas por 18 horas nas soluções de AIB (Tabela 2), e imediatamente antes do plantio, em solução de ácido ascórbico ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) por dez segundos. Além disto, foi feita aplicação mensal do fungicida sistêmico (tiofanato-metílico,  $49 \text{ mg L}^{-1}$  i.a) para evitar a proliferação de fungos durante a fase de enraizamento das estacas.



FIGURA 5. Ramos secundário selecionados para obtenção de estacas grumixameira (Barra = 1 cm). Porto Alegre, 2013.

TABELA 2. Tratamentos utilizados para indução de enraizamento de estacas de grumixameira (*E. brasilienses*), UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Tratamento	Tipo de estaca	AIB ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	Semilenhosa	0,0
2	Semilenhosa	100
3	Semilenhosa	250
4	Semilenhosa	500
5	Herbácea	0,0

As variáveis avaliadas foram o percentual de enraizamento e o comprimento das raízes (mm).

O delineamento utilizado foi de blocos completos ao acaso, sendo o fator de bloqueamento o aspecto geral da estaca, com quatro repetições, sendo a unidade experimental composta por dez estacas.

### **3.2.2 Macropropagação por estaquia de araçazeiro**

A propagação assexuada por estaquia foi realizada a partir de estacas de folha e por miniestacas herbáceas. As plantas matrizes foram mantidas em sacos de 5L em ambiente de casa de vegetação com adubação periódica e com irrigação por gotejamento. Como substrato utilizou-se casca de arroz carbonizada, previamente desinfestada por calor úmido em autoclave sob 1,3 atmosfera de pressão, temperatura de  $\pm 120^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.

#### **3.2.2.1 Estaquia de folha**

Este experimento foi estabelecido em fevereiro de 2012, utilizando-se como explante, folhas adultas, em média com  $22\text{ cm}^2$  de área, provenientes de plantas em fase juvenil sem presença de ramos florais dispendo-as em ângulo de  $135^{\circ}$  aproximadamente, para aumentar a área de percepção da luz (Figura 6a).

Os ramos para extração das gemas foram mantidos sob condições de nebulização por três dias antes da preparação das estacas, que posteriormente foram isoladas mantendo uma gema e porção de lenho da região do xilema cortada aproximadamente um centímetro acima e abaixo do ponto de inserção do pecíolo (Figura 6b). Os tratamentos se constituíram do contato do corte basal com produtos para indução de rizogênese (Tabela 3).



FIGURA 6. Macropropagação de araçazeiro por estaca de folha: a. disposição das estacas no substrato, b. detalhe do corte da estaca de folha na região do caule, UFRGS, Porto Alegre 2013.

TABELA 3. Descrição de tratamentos em estaca de folha de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

TRATAMENTOS	DESCRIÇÃO
1	Imersão por 18 horas em solução de AIB ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ )
2	Imersão por 18 horas em solução de $\text{H}_2\text{PO}_4$ ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) e ácido ascórbico $5 \text{ g L}^{-1}$ por 10 segundos.
3	Pó comercial para enraizamento (AIB $10 \text{ g kg}^{-1}$ )

As variáveis avaliadas foram: percentual de formação de calo, de enraizamento e de estacas mortas e massa de calo ou raiz por estaca (g).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, sendo o fator de bloqueamento o aspecto geral das folhas, com quatro repetições e 10 explantes por parcela.

### 3.2.2.2 Miniestaquia de ramos herbáceos

Sendo que não só o estímulo com reguladores de crescimento, mas também o preparo das estacas podem influenciar no percentual e qualidade do enraizamento, foram realizados os seguintes testes:

#### a. Doses de AIB na presença de BAP no enraizamento de miniestacas de araçazeiro

O experimento foi estabelecido em abril de 2012 a partir de brotações laterais das plantas matrizes descritas anteriormente (Figura 7a), utilizando-se estacas de cinco centímetros de comprimento com duas folhas completas sem meristema apical (Figura 7b). A base das miniestacas foi cortada em bisel duplo com o objetivo de retirar parte de tecido de floema, posteriormente foram submersas nas soluções testadas por dez segundos e dispostas nas bandejas em angulo de 45°.



FIGURA 7. Propagação de araçazeiro por miniestaquia herbácea: a. Rebrotos utilizados como explantes, b. detalhe da estaca (Barra = 1 cm). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Foram testadas quatro concentrações de auxina (AIB) (zero, 1,5; 3,0 e 6,0 g L<sup>-1</sup>), em solução hidroalcoólica, com tratamento ou não em solução de citocinina (BAP 0 e 500 mg L<sup>-1</sup>), sendo elas aplicadas isoladamente.

As variáveis avaliadas foram: percentual de enraizamento, volume (mL), número e massa seca (g) de raízes por estaca.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso em arranjo de parcelas subdivididas, sendo a parcela principal o BAP e como subparcelas as doses de AIB. Utilizou-se quatro repetições e a subparcela foi composta de dez estacas.

#### **b. Tipo de corte na base da miniestaca**

A partir das observações realizadas no experimento anterior, foi estabelecido em agosto de 2012 o experimento testando o efeito do tipo de corte na base da estaca sobre o enraizamento.

A partir das matrizes mantidas em casa de vegetação foram coletadas estacas de aproximadamente cinco centímetros, sem o meristema apical com duas folhas completamente desenvolvidas, o corte em bisel simples e duplo foram feitos aproximadamente em um centímetro na região proximal e após o corte, as estacas foram dispostas nas bandejas em ângulo de 45° aproximadamente.

Foram propostos três tratamentos:

- Corte em bisel simples.
- Corte reto.
- Bisel duplo superficial.



As variáveis avaliadas foram: número, massa (g) e volume (mL) de raízes por estaca. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições sendo a parcela composta por 10 estacas.

### 3.3 Propagação *in vitro* por microestaquia

Para os testes apresentados a seguir, utilizou-se como explantes, microestacas obtidas de mudas provenientes de sementes germinadas *in vitro*. Cada explante correspondeu tinha aproximadamente dois centímetros de comprimento com duas folhas desenvolvidas sem gema apical (Figura 8).

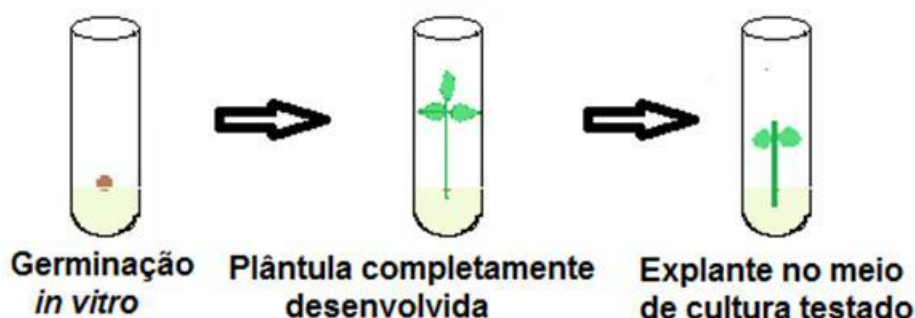


FIGURA 8. Representação da obtenção de microestacas a partir de mudas obtidas por germinação *in vitro* de sementes de arcazeiro, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

#### 3.3.1 Efeito do meio de cultura no desenvolvimento de microestacas de arcazeiro

O experimento foi estabelecido em junho de 2012. Durante 45 dias foi testado o desenvolvimento das microestacas em três meios de cultura, segundo a descrição da Tabela 4 sendo a eles acrescentados vitaminas, sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e gelificados com o Phytigel® ( $2,4 \text{ g L}^{-1}$ ). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos. Os explantes foram mantidos no escuro por dois dias e posteriormente dispostos em sala climatizada nas condições previamente

descritas. A composição básica do meio e condições de cultivo estão descritas nos apêndices 1 e 2, respectivamente.

TABELA 4. Tipos de meios de cultura testados para o desenvolvimento *in vitro* de microestacas de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre 2013.

Tratamentos	Composição
1	Meio WPM (Wood Plant médium, Lloyd & Mc Cown, 1981)
2	Meio DSD1 (Silva & Doazan, 1995)
3	Meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

As variáveis avaliadas foram: Percentual de sobrevivência, crescimento (mm), comprimento do entre nó basal (mm), diâmetro na base (mm), percentual de enraizamento.

O delineamento adotado foi em blocos completos ao acaso, sendo o fator de bloqueamento a disposição das grades sob a área iluminada das estantes. Estabeleceram-se quatro blocos, e cada tratamento foi constituído por 10 tubos de ensaio de vidro com 10 mL do meio.

### **3.3.2 Avaliação da concentração auxina/citocinina no desenvolvimento *in vitro* de microestacas de araçazeiro**

Microestacas de araçazeiro obtidas de plantas provenientes de sementes germinadas *in vitro* foram inoculadas em meios de cultura MS básico com adição de diferentes concentrações de BAP e ANA (Tabela 5) acrescentado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), glicina ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), biotina ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ), e gelificados com Phytigel® ( $2,4 \text{ g L}^{-1}$ ) após correção do pH para 5,8. Os meios foram autoclavados por 15 minutos.

TABELA 5. Doses de BAP/ANA testadas para o desenvolvimento *in vitro* de microestacas de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Tratamentos	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )
1	0,0	0,0
2	0,3	0,1
3	0,6	0,2
4	0,9	0,3
5	1,5	0,5

O delineamento foi em blocos completos ao acaso, sendo a unidade experimental composta por 10 tubos de 50 mL, com 10 mL de meio de cultura e quatro repetições por tratamento.

Os tratamentos foram mantidos no escuro por dois dias e posteriormente expostos à iluminação artificial em sala de crescimento.

Após 45 dias, as microestacas foram avaliadas quanto ao: percentual de sobrevivência, percentual de enraizamento, percentual de encurvamento do caule, considerando encurvamento quando maior de 90°.

Ainda aos 45 dias, foi medido o pH dos meios de cultura de cada tratamento. Para isso, todos os frascos contendo os meios foram misturados, dividindo-se em três frascos para avaliação por triplicata.

### **3.3.3 Efeito da concentração de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) na propagação *in vitro* por microestaquia de grumixameira**

Em março de 2012 foi realizado um teste prévio para indução do desenvolvimento das estacas utilizando o meio MS básico acrescentado de sacarose, vitaminas e gelificado com Phytigel®, testando quatro concentrações de BAP (0,05; 0,1; 0,5; 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Como resultado, todos os tratamentos geraram alto percentual de necrose dos explantes. A partir disso testou-se o uso de AG<sub>3</sub> como indutor da brotação, que se descreve a seguir.

Foram testadas cinco doses de AG<sub>3</sub> em meio MS básico acrescentado de BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>), vitaminas utilizadas no 3.3.2, sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e gelificado com Phytigel® (2,4 g L<sup>-1</sup>), o pH do meio foi corrigido para 5,8 e posteriormente autoclavado por 15 minutos. (Tabela 6).

TABELA 6. Concentrações de AG<sub>3</sub> e BAP testadas para o desenvolvimento *in vitro* de microestacas de grumixameira, em meio MS, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Tratamentos	AG <sub>3</sub>	BAP
	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
1	2,5	1,0
2	1,5	1,0
3	0,5	1,0
4	0,0	1,0
5	0,0	0,0

Foram utilizadas microestacas com uma gema, da região intermediária de plântulas obtidas por germinação *in vitro* de sementes. Para isso, as sementes foram extraídas do fruto e imersas por 24 horas na própria polpa, posteriormente foram enxaguadas com água deionizada e secas ao ar, em ambiente de laboratório. Para semeadura *in vitro*, as sementes foram mergulhadas por dez minutos em solução de NaOCl (2 %) acrescida de tensoativo polisorbato 20 e sob condições de assepsia, enxaguadas com água deionizada estéril e semeadas, deixando três sementes por frasco com 20 mL de meio. O meio utilizado foi o MS básico (50 %) acrescentado com sacarose (25g L<sup>-1</sup>), ANA (0,5 mg L<sup>-1</sup>) esterilizado em autoclave por calor úmido e pressão por 15 minutos a 1,3 ATM e 120°C.

Após o período de incubação, foi medido o percentual de sobrevivência das microestacas. O experimento foi estabelecido num delineamento em blocos completos ao acaso de acordo com a disposição na prateleira, com quatro repetições, sendo a unidade experimental composta por dez tubos de ensaio de 50 mL, com 10 mL de meio e um explante.

### 3.4 Calogênese em araçazeiro

Foram utilizadas folhas jovens expandidas e com coloração completamente verde e padronização da textura, coletadas de plantas matrizes adultas de *P. cattleianum* mantidas em casa de vegetação. Os testes foram realizados em junho de 2012.

Na tentativa de evitar a oxidação dos explantes após a desinfestação sem afetar a qualidade da introdução *in vitro*, foram realizados dois experimentos:

Em um primeiro experimento, foram utilizados explantes de folhas da região média da planta completamente desenvolvida de textura padrão e um mesmo estado de desenvolvimento, sendo que estas diferem no aspecto e cor durante o seu desenvolvimento (Figura 9a). As folhas foram conduzidas ao laboratório dentro de um becker com água destilada protegidas da luz e da desidratação.

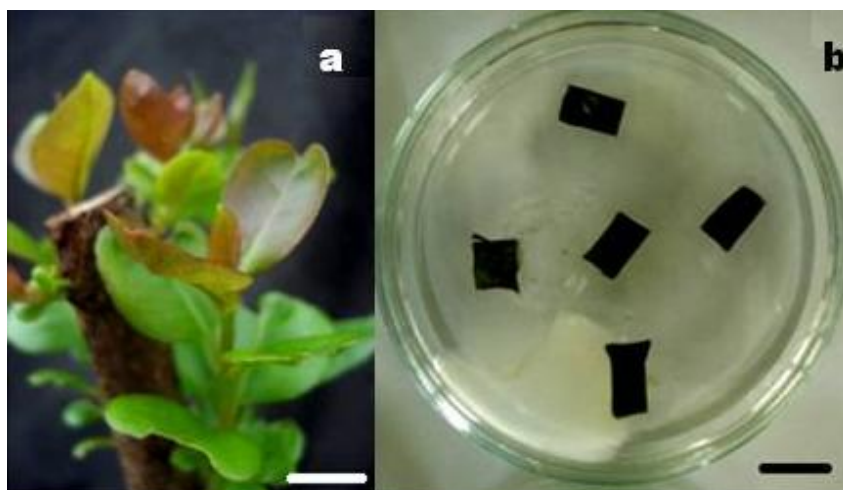


FIGURA 9. Explantes foliares de araçazeiro inoculados em meio de indução: a. ramos em desenvolvimento para obtenção de folhas após poda de matrizes. b. Segmentos de folha prontos para serem inoculados (barra= 1 cm). UFRGS, Porto Alegre 2013.

No laboratório, as folhas foram lavadas com detergente (Extran®, 2 % v/v) e enxaguadas com ADE, posteriormente mergulhadas por 90 minutos em solução fungicida tiofanato-metilico ( $49 \text{ mg L}^{-1}$  i.a) e bactericida ampicilina ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Na câmara de fluxo laminar foram tratadas com solução de NaOCl (1,3 %) por dez minutos e, após, enxaguadas três vezes com ADE, finalizando com uma última lavagem com solução esterilizada de ácido ascórbico ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Os tratamentos de desinfestação testados encontram-se descritos no item 3.4.1.

Como explante, retirou-se aproximadamente um  $\text{cm}^2$  da região laminar descartando-se a parte da borda e nervura central (Figura 9b). Foram dispostos três explantes por frasco mantendo sua face adaxial em contato com a superfície do meio, mantendo-se distâncias regulares entre os explantes. Em todos os tratamentos de calogênese os frascos foram vedados com filme de PVC e mantidos em incubação no escuro na sala climatizada nas condições previamente descritas.

Em relação aos meios de cultura utilizados nas diferentes fases, em todos eles o pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , utilizando-se hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M, autoclavados por 15 minutos, a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1,3 ATM de pressão. A preparação do agente gelificante Phytigel® foi feita mediante sua prévia diluição com água deionizada a temperatura do ambiente prévio aquecimento até  $90^\circ \text{C}$  e posteriormente misturado com os sais, evitando assim, reaquecer a solução dos demais componentes do meio.

#### **3.4.1 Desinfestação de explantes foliares para indução de calogênese**

Para todos os experimentos descritos a seguir, utilizou-se meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido pela metade da concentração original de macro e micronutrientes, acrescidos com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), vitaminas utilizadas

no 3.3.1, gelificado com  $2,4 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel® e mantido no escuro até o dia de avaliação.

As variáveis avaliadas nos tratamentos de desinfestação foram: percentual de contaminação, percentual de oxidação, segundo o grau de oxidação de acordo com a escala proposta na Figura 10.

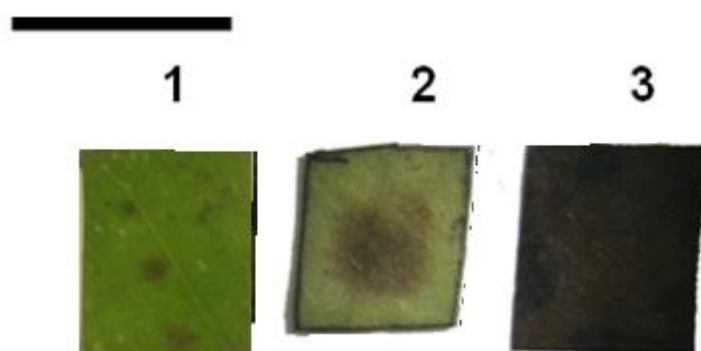


FIGURA 10. Grau de intensidade da oxidação dos explantes de folha de araçazeiro para indução de calogênese. 1) Explante sem oxidação; 2) Explante medianamente oxidado; e, 3) Explante totalmente oxidado (barra = 1 cm), UFRGS, Porto Alegre, 2013.

#### 3.4.1.1 Pré-tratamento com solução de fungicida-antibiótico

De acordo com os testes prévios realizados para introdução de explantes foliares que mostraram frequente contaminação, principalmente por fungos e bactérias, comparou-se o percentual de contaminação e oxidação quando feito ou não o pré-tratamento das folhas na solução de fungicida-antibiótico.

Para isso, as folhas extraídas foram lavadas em água destilada com solução de detergente Extran® (2 % v/v), finalizando com enxágüe com ADE. Posteriormente foram aplicados os tratamentos: o primeiro por imersão durante 90 minutos, em solução de fungicida tiofanato-metilico ( $49 \text{ mg L}^{-1}$  i.a) + bactericida ampicilina ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ); e, no segundo, tratamento as folhas receberam somente desinfestação em câmara de fluxo. Ambos tratamentos foram aplicados em

câmara de fluxo laminar estéril, as folhas foram mergulhadas em solução de NaOCl (1,5 % i.a) e realizados três enxágües com ADE.

Como explantes, foram seccionadas porções de um cm<sup>2</sup> aproximadamente, da região da lâmina foliar, descartando-se os extremos e a nervura central. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta por quatro frascos com cinco explantes cada um, e quatro repetições por tratamento.

#### **3.4.1.2 Efeito do pH da solução NaOCl na desinfestação e qualidade de explantes foliares**

Anteriormente ao estabelecimento dos tratamentos, foi mensurado por triplicata o pH da solução de NaOCl em cinco concentrações (0,05; 1,0; 2,5; 5,0; 10 i.a). A partir dos resultados observados, e considerando a diferença evidenciada nos resultados, que poderia incidir no efeito desejado realizou-se o teste de modificação do pH.

Como tratamentos foram testadas duas soluções de NaOCl (2 % i.a), uma de pH 13 e outra sendo corrigido para pH 7 com o uso de HCl 98 %. Não foi analisado o teor de cloro ativo da solução após o ajuste de pH. As folhas foram mantidas na solução por 10 minutos e depois lavadas com ADE por três vezes.

Os explantes foram incubados em meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido pela metade da concentração original, acrescido com sacarose (2,5 % m/v), vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) gelificado com 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e incubados na ausência de luz sob condições da sala climatizada. O delineamento foi inteiramente ao acaso com cinco repetições sendo a unidade experimental composta por quatro frascos com 15 mL de meio e três explantes.



As variáveis avaliadas foram o percentual de explantes contaminados e o percentual de oxidação após quinze dias do estabelecimento.

#### **3.4.1.3 Efeito do tempo de imersão em solução de NaOCl**

O experimento foi estabelecido em setembro de 2012 a partir de plantas matrizes de araçazeiro mantidas em casa de vegetação. Utilizou-se como explantes seções de lâmina foliar, segundo o descrito anteriormente.

Na câmara de fluxo laminar foram aplicados os tratamentos de desinfestação com solução de NaOCl (1,5 % i.a) acrescida de tensoativo polisorbato 20, sem pré-lavagem em álcool, testando quatro tempos de imersão (5, 10, 15 e 25 minutos). Após o tratamento, foram feitos quatro enxágües, três com água destilada estéril e o último em solução de ácido ascórbico ( $5 \text{ gL}^{-1}$ ). Como testemunha deixou-se um tratamento sem desinfestação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, a unidade experimental constituída de quatro frascos e cinco repetições por tratamento com 15 mL de meio de cultura MS e três explantes foliares.

Da mesma forma que o teste anterior, após quinze dias as variáveis avaliadas foram: percentual de explantes contaminados e o percentual de oxidação, sendo este último classificado em três graus dependendo da intensidade de dano no tecido, conforme descrito anteriormente.

#### **3.4.2 Efeito da concentração de cinetina e 2,4 D na indução de calogênese em araçazeiro**

Foram testadas concentrações de citocinina e 2,4-D utilizando como explantes, porções de lamina foliar e foram testadas concentrações de cinetina em porções de hipocótilo.

### 3.4.2.1 Explante foliar

Os explantes de folha, preparados segundo o descrito no item 3.4 foram estabelecidos em frascos de vidro transparente de 100 mL com tampa plástica contendo 15 mL de meio de cultura mantendo a face adaxial em contato com a superfície do meio de cultura. Foram feitas duas incisões internas paralelas para aumentar o contato com o meio.

Como meio de indução adotou-se a composição proposta por Sondahl & Sharp (1977), constituído por sais MS, sacarose (4 % m/v) acrescentado com tiamina-HCl (10 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (10 mg L<sup>-1</sup>), glicina (10 mg L<sup>-1</sup>) e a adição do regulador de crescimento conforme apresentado na Tabela 7.

TABELA 7. Tratamentos para indução de calo a partir de lâmina foliar de araçazeiro, UFRGS, Porto Alegre 2013.

Tratamento	Regulador de crescimento (mg L <sup>-1</sup> )	
	2,4 D	Cinetina
1	1,0	0,0
2	1,0	0,5
3	1,0	2,0
4	1,0	3,5
5	1,0	5,0
6	1,0	6,5

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo que a unidade experimental foi composta por cinco frascos com três explantes cada um.

As variáveis avaliadas, após 60 dias do estabelecimento, foram o percentual de explantes com formação de calo, explantes vivos não responsivos e explantes oxidados. Foi feita também a análise histológica seguindo a

metodologia descrita no item 3.5 para conhecer o tipo de formação e a ontogenia da formação dos calos.

### 3.4.2.2 Explantes em camada fina de secções de hipocótilo

Porções de hipocótilo de aproximadamente dois mm de comprimento foram obtidas a partir de mudas desenvolvidas em condições *in vitro*. Os explantes dispostos longitudinalmente em contato com o meio de cultura foram estabelecidos em frascos de vidro transparente de 100 mL, com tampa plástica, contendo 15 mL do meio de cultura de Sondahl & Sharp (1977), descrito anteriormente.

Testaram-se seis concentrações de cinetina (Tabela 8) e seis concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (Tabela 9). O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, com dez repetições, tendo como unidade experimental um frasco com cinco explantes distribuídos uniformemente na superfície do meio.

As variáveis avaliadas, após 60 dias do estabelecimento, foram o percentual de explantes com formação de calo, explantes verdes e explantes oxidados.

TABELA 8. Tratamentos para a indução de calo a partir de porções de hipocótilo de mudas de araçazeiro obtidas por germinação *in vitro* de sementes, UFRGS, Porto Alegre 2013.

Tratamentos	Regulador de crescimento (mg L <sup>-1</sup> )	
	2,4D	cinetina
1	1,0	0,0
2	1,0	0,5
3	1,0	2,0
4	1,0	3,5
5	1,0	5,0
6	1,0	6,5

TABELA 9. Tratamentos para a indução de calo a partir de porções de hipocótilo de mudas de araçazeiro germinadas *in vitro*, Porto Alegre, 2013.

Tratamentos	Regulador de crescimento (mg L <sup>-1</sup> )	
	2,4D	Cinetina
1	0,0	1,0
2	0,5	1,0
3	2,0	1,0
4	3,5	1,0
5	5,0	1,0
6	6,5	1,0

### 3.5 Estudo anatômico da desdiferenciação celular durante a calogênese

A partir dos resultados obtidos na indução da desdiferenciação no experimento descrito no 3.4.2.1, foram repetidos os tratamentos na dose de 2,0 e 3,5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (

TABELA 8. Tratamentos para a indução de calo a partir de porções de hipocótilo de mudas de araçazeiro obtidas por germinação *in vitro* de sementes, UFRGS, Porto Alegre 2013.

). Foram tomadas amostras a cada três dias, aproximadamente, de frascos diferentes, incubados nas condições descritas anteriormente. As amostras foram fixadas em solução glutaraldeído (1 %) e formaldeído (4 %) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8 (McDowell & Trump, 1976).

As amostras foram submetidas a vácuo e, em seguida, desidratadas, através da serie de etanol, para posterior infiltração com a resina de hidroxietilmetacrilato (Reichert - Jung) de acordo com o protocolo do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Gerrits & Smid, 1983).

Foram montadas lâminas a partir de cortes histológicos de cinco µm em micrótomo de deslize marca Leitz 1400. Os cortes foram corados com azul de

toluidina ácida 0,05 % (Feder & O'Brien, 1968) ou submetidos a teste do ácido periódico de Schiff - PAS, (Lillie, 1965) segundo o propósito de observação.

Para a observação da distribuição das nervuras, folhas adultas de araçazeiro completamente desenvolvidas foram submetidas ao procedimento de diafanização, segundo o protocolo descrito por Strittmatter (1973), para o reconhecimento do padrão de venação da espécie, segundo o seguinte procedimento:

- As folhas foram submersas em álcool (96 %) e aquecidas em placa aquecedora até ferver durante 10 minutos;
- Posteriormente foram transferidas para solução 1:1 (v:v) de etanol (96 %) e NaOH 5 % e fervidas por 10 minutos;
- Retiradas da solução anterior, foram dispostas em placa de Petri para evitar manuseio, e enxaguadas várias vezes para retirar os compostos solubilizados; depois foram submersas em solução de NaOCl (1,5 %) por 30 minutos até o tecido se tornar esbranquiçado, e posteriormente, enxaguadas quatro vezes com água deionizada por cinco minutos cada vez;
- O material foi transferido para cloral hidratado (5 %) por duas horas e posteriormente transferido para etanol (70 %) por dez minutos. Seguidamente foram coradas com safranina (5 %) em etanol 80 %;

Para preparação das lâminas permanentes, as folhas foram submetidas à desidratação em série alcoólica e posteriormente transferidas para xileno (duas vezes por cinco minutos) até o material se tornar translúcido.

As folhas foram dispostas em lâminas de vidro e montadas em balsamo de Canadá.

### 3.6 Análise estatística

Os grupos de dados foram previamente submetidos a teste de normalidade e análise de variância (ANOVA).

Para o experimento de germinação, os dados que não apresentaram normalidade foram transformados pela fórmula  $\sqrt{x+1}$  e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Dados de calogênese com explantes de hipocótilo com cinetina e percentual de calos não friáveis foram transformados pela fórmula  $(x+0,5)$ .

Quando o valor de P foi significativo, foi feita a comparação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade de erro. No caso dos experimentos com tratamentos de doses crescentes ou variáveis avaliadas no tempo, foi realizado análise de regressão polinomial. Foram utilizados os software Sigmaplot® e Assistat®.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Germinação *in vitro* de araçazeiro

#### 4.1.1 Efeito do AG<sub>3</sub> na germinação *in vitro* de sementes de araçazeiro

O percentual máximo de germinação (68 %) atingiu-se no testemunha, mas não houve diferença significativa entre as concentrações de ácido giberélico testadas, sendo a média de 64 % (Figura 11).

A imersão das sementes em ácido giberélico provocou um atraso na germinação (Figura 12). As sementes sem tratamento começaram emergir 33 dias após a sementeira, atingido 50 % de germinação após 48 dias, sendo superior aos demais tratamentos.

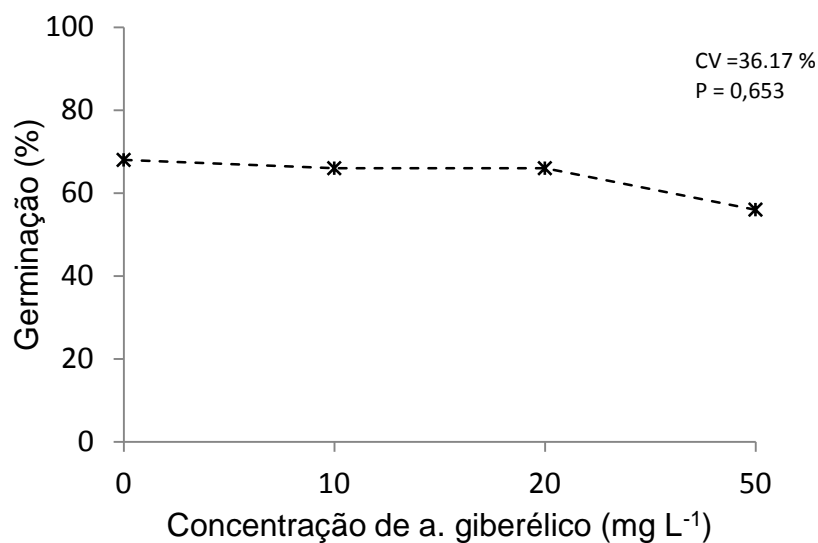


FIGURA 11. Percentual de germinação (% G) *in vitro* de sementes de araçazeiro submetidas a diferentes concentrações de ácido giberélico após 60 dias de semeadura. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Concentrações a partir de 10 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico foram prejudiciais havendo diferença significativa entre os tratamentos (Figura 12). Neste sentido embora se tenha mostrado emergência acumulada em um período de tempo mais curto, o uso do regulador de crescimento mostrou-se inibitório nas condições testadas.



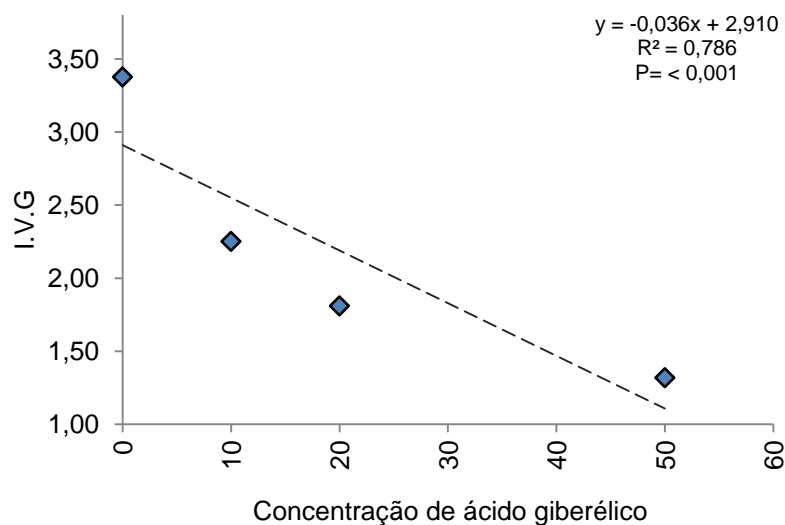


FIGURA 12. Índice de velocidade de germinação (IVG) *in vitro* de sementes de araçazeiro após 60 dias de semeadura, submetidas a diferentes concentrações de ácido giberélico. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Os resultados obtidos na germinação de sementes de araçazeiro não dependem de fatores isolados, senão da interação deles, particularmente em relação à interação entre os fitormônios (Marcos Filho *et al.*, 2005). Portanto, uma primeira abordagem da discussão do resultado é que a aplicação exógena do AG<sub>3</sub> pode ter inibido a germinação por um desbalanço interno ou por seu uso isolado.

Altas doses de fitorreguladores geralmente são relatadas como inibidoras da germinação, fato pelo qual é preciso pesquisar a concentração ideal em função do método de aplicação e o produto empregado. Conforme o observado por Oliveira (2010) em testes de germinação de sementes de *Anona cherimola* M, a embebição por 36 horas em solução contendo 778 mgL<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> provocou o maior percentual de germinação, enquanto que as concentrações superiores foram prejudiciais. Contrapondo com o presente estudo onde observou-se efeito inibitório do ácido giberélico em concentrações a partir de 10 mg L<sup>-1</sup>, sustentando que cada espécie reage de uma forma diferente.

Marcos Filho *et al.*, (2005) propõem que as giberelinas em geral auxiliam a saída do estado de quiescência ou dormência causada pela falta de frio, desidratação ou luz. Neste contexto, o baixo percentual de emergência além da dose utilizada, pode ter sido influenciado tanto pelo tempo de imersão, quanto pelo teor endógeno do hormônio próprio da semente, ou outra causa ainda não estudada.

Além da relação existente entre o balanço hormonal com a espécie, outro fator que pode estar associado é à fotoblastia positiva das sementes de araçazeiro (Santos *et al.*,2004). A necessidade de luz para germinar deste grupo de sementes associada ao fitocromo, incide pelo estímulo luminoso sobre a citocinina, estimulando a síntese de giberelinas endógenas (Taylorson & Hendricks, 1997).

Esta ação dos fitocromos é apoiada por Hall & Rao (1999), que afirmaram que estas proteínas intracelulares sensíveis à luz são essenciais na regulação de vários estádios do crescimento, e no desenvolvimento das plantas, entre elas: germinação, desenvolvimento de cloroplastos, alongação do caule e outros; todos eles necessários para a formação da plântula.

O seguinte ponto de análise relaciona-se com as condições da semente no momento da semeadura. O percentual de umidade das sementes, que embora não foi avaliado antes da aplicação dos tratamentos, pode estar fortemente associado aos efeitos obtidos. Marcos Filho *et al.*, (2005) observaram que nas sementes secas onde há alta força de retenção de água, embora exista uma tendência proporcional entre o conteúdo de água e a velocidade e intensidade de deterioração, inúmeras respostas ocorrem mais rápida e eficiente quando os tecidos estão mais secos do que nos úmidos pela relação do estado energético da água e as reações bioquímicas.

Da mesma forma, sendo que nem sempre há correlação entre o ponto de maturação fisiológica do fruto e o da semente, e que para o caso da espécie em estudo, é importante definir estes parâmetros, pois a sensibilidade aos reguladores depende diretamente do estágio de desenvolvimento das sementes; assim, por exemplo, a resposta ao ABA ocorre principalmente na fase prévia ao final de maturação, e posterior a ela cresce a resposta às giberelinas (Marcos Filho *et al.*, 2005).

Outros aspectos como o potencial hídrico, a concentração de sais e a presença de sacarose no meio de cultura para germinação, devem ser levados em consideração, sendo que eles podem afetar a saída do estado de dormência das sementes. A presença de açúcares contribui para manter as membranas na fase cristalina, e por esse motivo é benéfica, tanto que o percentual de umidade da semente incide na resposta ao tratamento (Marcos Filho *et al.*, 2005).

Finalmente é importante salientar que observou-se antes da protrusão da radícula, a oxidação de compostos fenólicos liberados no meio de cultura (Figura 13). Segundo Marcos Filho *et al.* (2005) dita liberação de exsudados, junto com açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e íons geralmente acompanha o início da embebição. A intensidade de liberação pode também ter relação com o tratamento prévio de hipoclorito de sódio, sendo que sementes com tegumentos escarificados normalmente liberam maiores quantidades de exsudados pela desestruturação de membranas (Marcos Filho *et al.*, 2005).

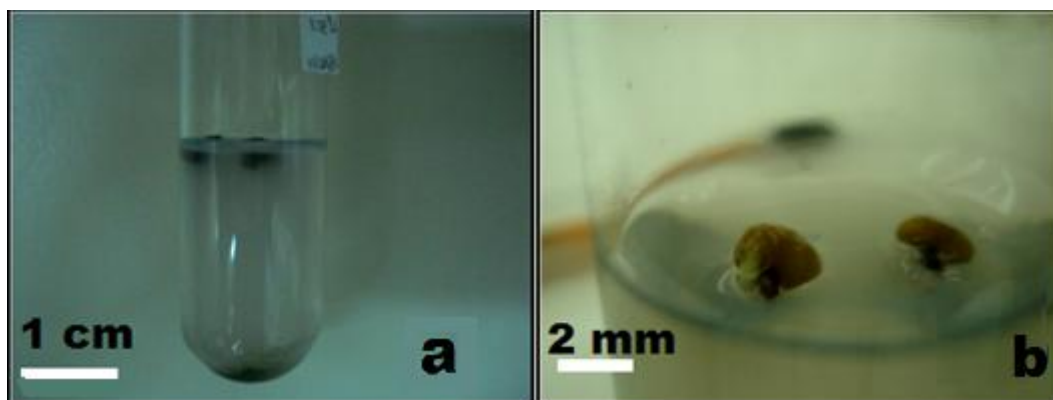


FIGURA 13. Aspecto inicial da protrusão da radícula de sementes de araçazeiro em meio de cultura MS 50 %: a. Oxidação fenólica antes da germinação. b. Protrusão da radícula. UFRGS, Porto Alegre 2013.

#### 4.1.2 Efeito do tempo de imersão em solução NaOCl (2 %) na germinação *in vitro* de sementes de araçazeiro

O uso de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes, como parte do protocolo de germinação *in vitro* de sementes, geralmente é baseado em resultados similares obtidos com outro tipo de explantes. A concentração do hipoclorito utilizada para desinfestação de sementes de varias espécies lenhosas varia entre 0,5-10 % (Martinez *et al.*, 2007) sendo que concentrações maiores podem causar efeitos negativos na germinação (Lima, 2010). Em alguns casos é utilizado como pré-tratamento a imersão em álcool 70 % (Martinotto *et al.*, 2007).

Para o caso do araçazeiro, quando as sementes foram tratadas com tempos diferentes de imersão em solução de hipoclorito não houve diferença significativa no percentual de emergência, sendo em média 59 %. Em relação à formação da muda, houve diferença significativa no percentual de sementes com alongamento do hipocótilo maior a dois cm, sendo o maior percentual (71 %) do tratamento de imersão em NaOCl por 20 minutos (Figura 14).

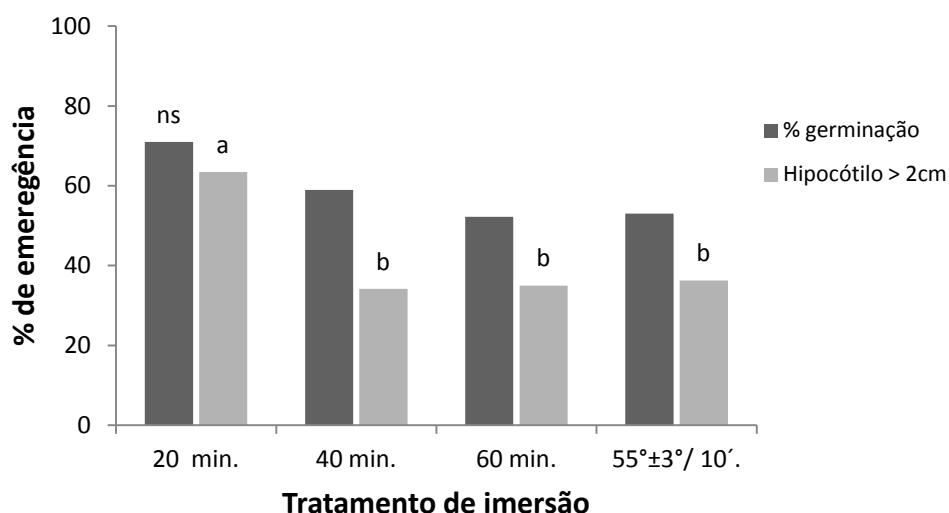


FIGURA 14. Percentual de emergência e alongação do hipocótilo de sementes de araçazeiro após 45 dias submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação: Tempos de imersão em NaOCl (2 % i.a) (20, 40, 60 min.) e 55°±3°/ 10'. UFRGS, Porto Alegre, 2013. \* Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. \*\*ns = não significativo.

Baseado no modo de ação do referido desinfestante, que atua mediante um processo de cloraminação e saponificação dos tecidos tratados e pelas suas condições químicas, este não depende tanto da sua concentração, mas também do tempo de atuação em contato com as superfícies que se deseja para não afetá-las negativamente. Assim também, outras soluções como hipoclorito de cálcio, produtos mercuriais ou formol incidem na qualidade fisiológica na estrutura seminal, de acordo com a concentração e o tempo de exposição a estas substâncias (Malaggi *et al.*, 2011).

A redução no percentual de formação de mudas observado nos tratamentos com hipoclorito, segundo Borges *et al.*, (2005) pode estar sustentado nos efeitos citotóxicos nas células tratadas como quebra cromossômica, falhas no fuso celular, que repercutem na divisão mitótica. Corroborando os resultados obtidos, Malaggi *et al.*, (2011) e Ferreira & Ranal (1999) observaram redução nos

parâmetros avaliados na germinação de sementes de couve-flor quando tratadas com NaOCl (0,14 % cloro ativo).

No estabelecimento *in vitro* de sementes de jabuticabeira (*Myrciaria* spp.), somente foi testado o efeito da imersão por 20 minutos de duas concentrações de solução de NaOCl (2,5 e 5 % i.a) sobre o percentual de contaminação, observando-se que a mais alta foi mais eficiente (2 %) (Picolotto *et al.*, 2007).

Outros tratamentos para desinfestação de sementes empregadas para obtenção de mudas por germinação *in vitro* poderiam ser testados como a luz UV, formol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **4.2 Macropropagação por estaquia**

### **4.2.1 Macropropagação de grumixameira por estaquia**

Não houve efeito significativo da aplicação de AIB sobre a indução de enraizamento nem no comprimento médio de raízes de estacas de grumixameira (Tabela 10). Em geral, o enraizamento de estacas, de acordo com o exposto por Harttman *et al.*, (2002) é favorecido pelo aumento no tempo de exposição dos tecidos quando estes são expostos a baixas concentrações de auxinas. Por outro lado, tratamentos com altas concentrações em grumixameira não foram eficientes (Lopes, 2009).

TABELA 10. Efeito da concentração de AIB e do tipo de explante na indução de enraizamento de estacas de grumixameira. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Tratamento	Enraizamento (%)	Comp. raiz(mm)
0	23,33 *ns	24,26 *ns
100	33,33	51,05
250	46,67	31,09
500	23,33	30,37
Estaca herbácea	26,67	33,78
Média	31%	34,11
CV	33%	46,50
P	0,50	0,95

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. Ns = não significativo.

Observando-se o desenvolvimento radicular da grumixameira, notaram-se diferenças em relação ao padrão observado no enraizamento de araçazeiro, sendo que na primeira a formação de raízes ocorreu na região do corte, enquanto que na segunda, formou-se em pontos diferentes da zona de contato com o regulador de crescimento. Cortes a mão livre da zona de rizogênese, mostraram a formação de uma massa celular protuberante circundando o tecido exposto, porém as raízes se desenvolveram formando uma continuação da região do procâmbio atravessando gradativamente o calo formado (Figura 15).

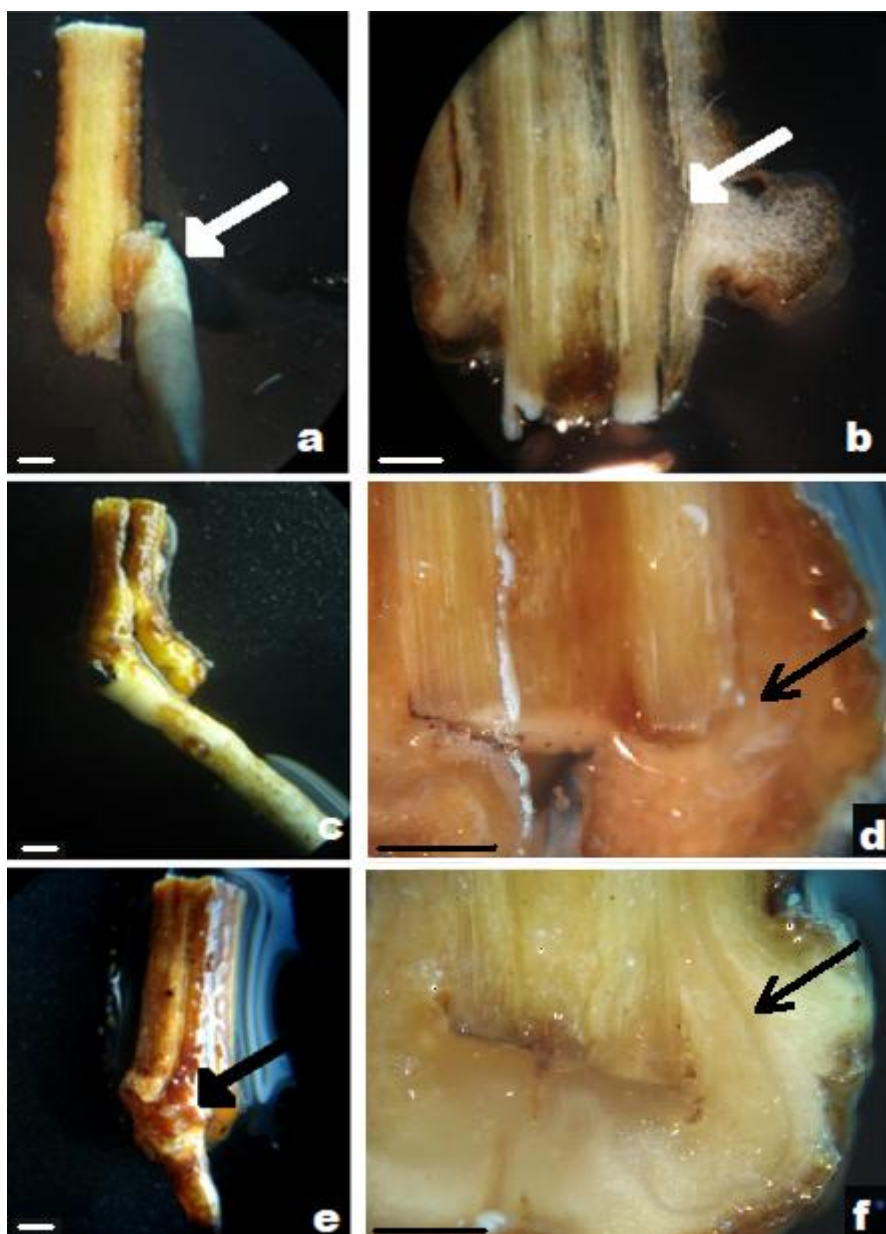


FIGURA 15. Cortes a mão livre da região dos tipos de raiz observados no enraizamento de estacas de grumixameira: a,c,e, Raiz desenvolvida na região lateral, b,d,f, Corte a mão livre mostrando o desenvolvimento da região do procâmbio (barra = 1 mm). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

O calo é a primeira resposta visível na propagação por estaquia de algumas espécies. Sua formação tem sido relacionada com a indução ou inibição da rizogênese adventícia. Na estaquia de grumixameira, independente do prévio desenvolvimento ou não de calo, a raiz formou-se pela reestruturação da região



ativa de crescimento, fato pelo qual formaram-se entre uma e duas raízes por estaca, de comprimento máximo em média 51 mm, no tratamento dois.

Quanto ao percentual de enraizamento entre estacas, herbáceas ou semilenhosas sem tratamento com AIB, não houve diferença significativa, tendo, em média, 25 % de enraizamento (Tabela 10). Segundo Olmos *et al.*, (2002), a condição histológica do tipo de tecido dos si estar relacionada com o potencial de organogênese, a juvenilidade e os componentes histológicos dos explantes utilizados.

#### **4.2.2 Macropropagação por estaquia de araçazeiro**

O sucesso da propagação por estaquia está ligado, entre outros aspectos, à juvenilidade do tecido, sendo que os tecidos novos são mais responsivos a estímulos para o rearranjo celular e respostas organogênicas (Olmos *et al.*, 2002). Por isso, as plantas matrizes adultas foram podadas para induzir desenvolvimento de brotações basais que serviram como fonte de estacas herbáceas.

Neste caso, com araçazeiro testou-se duas vias de propagação assexuada para o desenvolvimento de clones, necessários entre outros, para posteriores trabalhos de micropropagação.

##### **4.2.2.1 Estaquia de folha**

Os tratamentos com solução de AIB ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ácido fosfórico ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) mostraram baixo percentual de indução ao enraizamento (18 %). Com o uso do regulador de crescimento comercial em talco (AIB  $10 \text{ g kg}^{-1}$ ) houve alto percentual de estacas vivas formando apenas calo na base. A melhor resposta das estacas ao desenvolvimento radicular e formação de calo, foi obtida com a solução de AIB ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o AIB em base de talco, respectivamente. Embora não tenha havido diferença no percentual de enraizamento entre a solução de AIB

e o  $H_2PO_4$ , a segunda foi significativamente mais favorável no acúmulo de massa radicular (Tabela 11).

TABELA 11. Efeito do tratamento no enraizamento de estacas de folha após 120 dias de estabelecimento. Formação de calo (C), enraizamento (R), morte (M) e massa seca por estaca de raiz (R) e calo (C), UFRGS, Porto Alegre, 2013

Tratamento	Percentual (%)			Massa seca (gr)	
	C.	R.	M	C.	R.
1- Solução de AIB (100 mg L <sup>-1</sup> )	45 <sup>b</sup>	18 <sup>a</sup>	35 <sup>b</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>
2- Solução de H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 g.L <sup>-1</sup> ) e ácido ascórbico 5 g.L <sup>-1</sup>	18 <sup>c</sup>	18 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	0,11	0,05
3- Talco comercial (AIB 10 g.kg <sup>-1</sup> )	75 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	0,04	0,0
Média (%)	46	13	41	0,07	0,05
C.V %	18,9	46	22,7		

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. ns = não significativo.

Até o momento da avaliação do experimento, nas estacas tratadas com AIB (10 g kg<sup>-1</sup>) que tinham formado calo, não observou-se diferenciação de raízes. Entretanto, não se pode descartar o posterior aparecimento destas, tal como foi constatado na propagação por estaquia de *Olea europaea* L. por Peixe *et al.*, (2007), que observaram que a formação do calo esta intimamente ligada à formação de raízes adventícias, sendo que estas últimas apareceram posteriormente a partir das células parenquimatosas do primeiro.

O maior percentual de estacas vivas foi obtido no tratamento de AIB (10 g kg<sup>-1</sup>) que por sua vez foi o que mostrou o maior percentual de formação de calo (Tabela 12). De forma similar, Quadros (2009), na propagação por estaquia herbácea de *Ilex paraguariensis*, observou uma correlação positiva entre o percentual de formação de calo e de sobrevivência de estacas. Porém, Huetteman & Preece, (1993), em contraposição, reconheceram que a formação do calo é um passo prévio na regeneração de órgãos adventícios, mas acreditaram que este se torna inibitório em espécies lenhosas.

Estaquia de folha tem sido utilizada com sucesso na propagação de espécies hortícolas como mandioca e batata (CIAT, 1983) e com moderado nível de enraizamento em espécies como abacateiro, sem desenvolvimento da parte aérea, no qual só tem se conseguido a produção de mudas utilizando estacas semi-lenhosas (Ferreira, 2008), similar aos resultados obtidos em *Cedrela fissilis* (Xavier *et al.*, 2003).

A disposição das folhas no leito de enraizamento pode ser preponderante, pois a importância da presença delas na propagação assexuada relaciona-se com a síntese de fotoassimilados e outros compostos necessários para o enraizamento favorecido pela maior ou menor incidência da luz, tal como propuseram Hall & Rao (1999), que as reações fotoquímicas na fotossíntese dependem mais do número de fótons incidentes na superfície foliar do que a energia contida nesses fótons.

Até o momento de avaliação do experimento, nenhuma mostrou desenvolvimento de estrutura aérea (Figura 16) similar aos resultados com abacateiro (Ferreira, 2008) e cedro-rosa (Xavier *et al.*, 2003), causados possivelmente pela priorização fisiológica de estruturas para absorção de nutrientes.



FIGURA 16. Detalhe dos cortes das estacas de folha de araçazeiro após trinta dias de estabelecimento sob condições de sala de nebulização: a. formação de calo; b, formação de raiz; UFRGS, Porto Alegre 2013.

#### 4.2.2.2 Miniestaqueia de ramos herbáceos

Para o presente estudo, na ausência de BAP obteve-se em todos os tratamentos de AIB enraizamento superior a 95 % e no testemunha de 98 %. O uso de BAP ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) mostrou efeito inibitório para todas as variáveis avaliadas sem diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 12).

Porém, em nenhuma das variáveis avaliadas o efeito dos níveis de BAP dependem da concentração de AIB aplicado.

TABELA 12. Percentual de enraizamento, volume radicular por estaca e número de raízes por estaca na propagação do araçazeiro por estaquia herbácea, massa seca de raiz, com a utilização de diferentes doses de BAP e AIB, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Concentração de BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Enraizamento (%)	Volume de raiz por estaca (mL)	Número de raiz por estaca	Massa seca (mg)
0	0	98 ns	2,23 ns	7,4 ns	21,59 ns
	1500	100	3,13	9,45	21,89
	3000	95	2,63	10,88	26,96
	6000	98	3,25	9,53	22,24
Média		97,75 a	2,81a	9,315 a	23,17a
500	0	83	1,50	5,73	8,63
	1500	85	1,25	5,05	9,67
	3000	68	0,95	3,81	6,76
	6000	75	0,98	4,99	7,73
média		77,75 b	1,17 b	4,895 b	8,1975 b
Transf. Dados		arcsen x	raiz (x+1)		
Valor P (BAP)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Valor P (AIB)		0,284	0,615	0,922	0,942
Valor P (BAPxAIB)			0,908	0,179	0,314
Média geral		88	1,98	7,1	15,68
CV %		27,2	35,1	16,96	35,5

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. Ns = não significativo.

Para as variáveis massa e volume radicular houve diferença significativa entre presença e ausência de BAP, mas não houve diferença significativa entre as doses de AIB. O BAP, do grupo das citocininas, pertence a um grupo de fitohormônios relacionados, principalmente, ao estímulo da citocinese auxiliado pela presença de auxinas (Skoog & Miller, 1957), e com estímulo do crescimento de meristemas axilares e senescência foliar (Motyka *et al.*, 1996).

Em relação aos aspectos físico-químicos da casca de arroz utilizada como substrato, à alta capacidade de troca gasosa, baixa retenção de água, pH, condutividade elétrica estável e baixo conteúdo de nutrientes (Kämpf, 2000) pode

ter favorecido a rizogênese. Ao contrário, Altoé *et al.*, (2011) na propagação de araçazeiro empregou o substrato Plantmax®, além de ter feito adubações periódicas durante o enraizamento, o que pode ter causado os menores resultados em comparação com o presente estudo. Sob as mesmas condições ambientais para enraizamento, Souza *et al.*, (2006) na propagação por estaquia de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) relataram o efeito do substrato no percentual de enraizamento e desenvolvimento das mudas na fase inicial. Avaliando os substratos, casca de arroz carbonizada (CAC) e vermiculita (V) em proporções diferentes, encontrou-se que misturas de 50 %: 50 % e 25 %: 75 % de vermiculita e CAC foram as mais adequadas.

Cortes a mão livre em diferentes estádios na região de enraizamento das estacas mostraram que a formação de calo não foi precursora do enraizamento (Figura 17d), sendo que o calo formado mostra-se como uma massa celular que recobre a região do corte (Figura 17c). Por sua vez, as raízes formadas diferenciaram-se a partir do procâmbio na região da base onde não foi feito o corte (Figura 17a) e (Figura 17b). Autores relatam que a formação de primórdios radiculares adventícios começa pela divisão de células do parênquima de forma similar às divisões que dão origem às raízes laterais no periciclo de raízes primárias (Baltierra *et al.*, 2004). Outros autores afirmam que o calo origina-se quando há exposição dos tecidos do xilema e do floema (Fachinello *et al.*, 1995), podendo ser evitado pelo aparecimento precoce de raízes (Komissarov, 1968).

Ainda assim, Hartmann *et al.*, (2002) indicaram que a formação de calo nos propágulos é um indicativo do fornecimento de condições ambientais adequadas para o enraizamento. Entretanto, quando há ausência de calo em propágulos juvenis e presença de calo em propágulos adultos, a formação do mesmo é um indicativo de baixa juvenilidade.



FIGURA 17. Cortes a mão livre da região de enraizamento de estacas ramos herbáceos de araçazeiro mostrando a formação de raiz adventícia e calo: a. raiz primaria; b. Detalhe da formação de raízes laterais; c. desenvolvimento de calo na base da estaca; d. formação do calo na base da estaca, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

A preparação da estaca constitui também um elemento importante para o sucesso da técnica, assim, quando utilizadas estacas herbáceas, a presença de folhas jovens pode favorecer a síntese de auxinas e por sua vez a formação de raízes adventícias devido à presença de células menos especializadas (Hoppe *et al.*, 2004), característica importante para a mudança de funções e reorganização do sistema aéreo e o sistema radicular necessário para o desenvolvimento de mudas por via assexuada.

Na região onde ocorreu a formação das raízes observou-se que esta teve lugar no tecido sem se expor pelo corte em bisel duplo, como pode ser observado na Figura 18, onde na região do corte houve principalmente formação de calo

cicatricial, o que mostra que a prática do corte não aumenta a área de formação radicular.

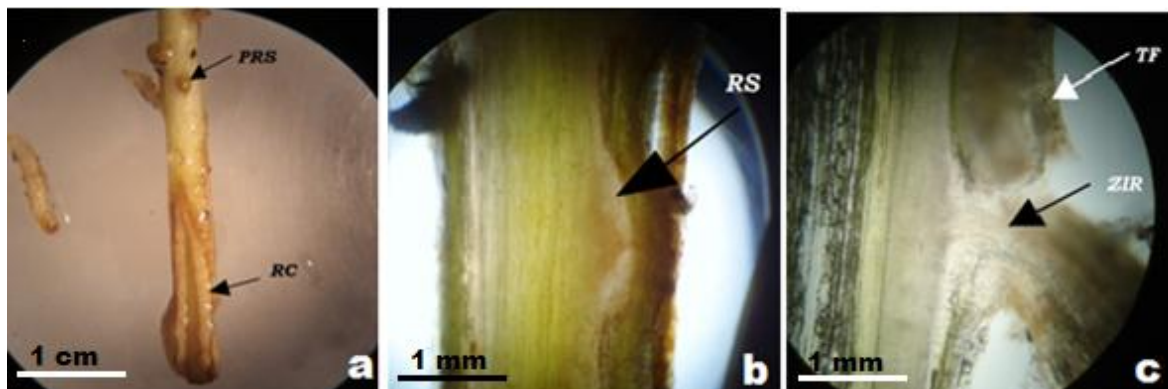


FIGURA 18. Desenvolvimento de raiz adventícia na propagação por estaquia de ramos herbáceos de araçazeiro. a: Formação dos primórdios radiculares (PRS) e calo fora da região do corte (RC); b: Corte transversal do caule, raiz secundária (RS); c: Desenvolvimento de raiz secundária na região do câmbio (ZIR) atravessando o tecido do floema (TF). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Os resultados do local de formação do sistema radicular foram confirmados mediante teste dos tipos de corte na base da estaca sem tratamento hormonal. O número de raízes por estaca foi significativamente superior nas estacas apenas com corte reto na base em comparação com aquelas que foram cortadas em bisel. O volume médio por estaca foi de 0,89 mL por estaca, sem diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 13).



TABELA 13. Efeito do tipo de corte na propagação por estaquia de ramos herbáceos de araçazeiro quanto a: a. número de raízes por estaca; b. Massa seca por estaca; c. volume de raízes por estaca, UFRGS. Porto Alegre, 2013.

Tipo de corte	Número de raízes	Massa (g)	Volume (mL)
Reto	7,41 a	30,16 a	0,75 ns
Bisel simples	5,13 b	20,39 b	1,02
Bisel duplo	5,67 ab	26,47 ab	0,92
média	6,07	25,67	0,89
CV	49,00	0,30	9,90
P	0,012	0,004	0,34

\* valores com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. \*\*ns = não significativo.

### 4.3 Propagação *in vitro* por microestaquia

A aparição de variação somaclonal na propagação *in vitro* é menor quando realizada a partir de gemas axilares em comparação com a regeneração adventícia de calo (Preece & Trigiano, 2001). Baseados na premissa anterior, foram executados os seguintes experimentos de multiplicação de *P. cattleianum* e *E. brasiliensis* por esta via.

#### 4.3.1 Efeito do meio de cultura no desenvolvimento de microestacas de araçazeiro

Ao analisar as variáveis de formação da muda nos três meios de cultura testados, não se observou diferença significativa no percentual de mortalidade, que, em média, foi de 27 % (Figura 19a), no entanto, o crescimento, após trinta dias de incubação, foi maior quando utilizados os meios WPM e DSD1 (Figura 19b), sendo que o maior comprimento do entre nó ocorreu no meio DSD1, o maior número de raízes, nem sempre favorável nesta fase, foi obtido no meio WPM (Figura 19).

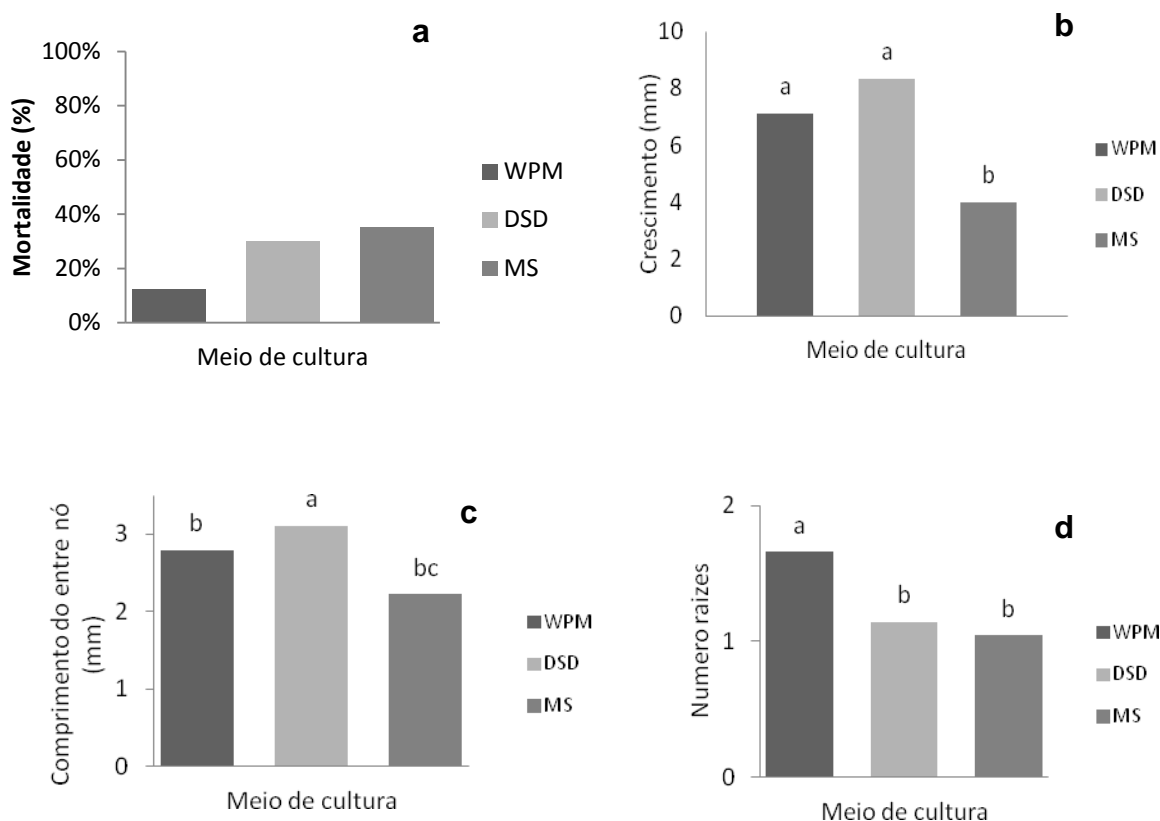


FIGURA 19. Efeito do meio de cultura WPM, DSD1 e MS no desenvolvimento de microestacas de araçazeiro após 30 dias de estabelecimento *in vitro*: a. Mortalidade relativa (%); b. altura (mm); c. comprimento de entrenó (mm); d. número de raízes. UFRGS, Porto Alegre, 2013. \*\* barras com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. \*\*ns = não significativo.

São diversos os fatores que interagem no estabelecimento de tecidos em cultura por microestaquia; utilizando a mesma composição do meio de cultura, as condições do meio ambiente, disponibilidade de meio por explante, consistência do meio, tipo de explante, concentração de reguladores de crescimento, entre outras (Newmann *et al.*, 2009). Os eventos de divisão e crescimento celular, fundamentais nesta fase, são influenciados de maneira diferente pelos nutrientes.

Rezende *et al.* (2008) no desenvolvimento de plântulas de *Coffea arabica* por embriogênese somática mostraram, por exemplo, que quando utilizado o meio

WPM líquido houve, em média, formação de 8,4 folhas por explante e esta foi decrescente na medida em que se aumentou a concentração do ágar.

Associado ao anteriormente exposto, a luz das lâmpadas fluorescentes nas condições dos experimentos com *P. cattleianum* pode também ter limitado o potencial de expressão dos explantes e do meio de cultura, sendo que a luz proporcionada por elas atinge principalmente a faixa do vermelho distante, conforme observado por Olsen (2010) que, avaliando o desenvolvimento de mudas de *Picea abies*, evidenciou que a luz na faixa do vermelho distante (FR) foi mais eficiente para manter o crescimento em comparação com o vermelho (R), mas que uma mistura de R e FR foi mais eficiente. Da mesma forma Erig (2005), na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.), também verificaram o efeito do tipo de luz, encontrando que a luz na faixa do verde favoreceu mais o número médio de folhas e taxa de multiplicação, enquanto que a vermelha favoreceu a média de brotos, salientando que em todos os casos, embora seja a mais utilizada em salas de crescimento, a luz branca foi a menos eficiente, isto causado possivelmente porque as folhas sob este tipo de luz absorvem mais na faixa do azul e vermelho (Salisbury & Ross, 1992). Deve ser considerada que a mencionada distribuição espectral pode variar consideravelmente em função da sua vida útil, em média de 8.000 e 19.000 horas (Seabrook, 1987; Wassink & Stolwijk, 1956).

Em relação ao meio de cultura, para esta primeira fase de estabelecimento é necessária a readaptação celular para o transporte através de membranas, fato pelo qual os processos químicos de baixo consumo energético podem ser mais favoráveis. O meio MS, que foi ajustado inicialmente para cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* (Murashige & Skoog, 1962) caracteriza-se, principalmente, pelo alto conteúdo de sais com um balanço de nitrogênio entre a forma nítrica e

amoniacoal. Por outro lado, o meio WPM comparado ao MS contém menor concentração de nitrogênio em forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sendo o primeiro desprovido da forma  $\text{KNO}_3$  e acrescentado na forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Em estudos com *Acacia meamsii*, Corrêia & Cortezzi (1995) observaram que a redução da concentração de sais gerou o maior crescimento dos explantes num curto período, inferindo assim que esta espécie pode-se estabelecer em meios com baixa concentração total de íons como meio WPM.

Desde uma abordagem fisiológica, o alto conteúdo relativo de nitrogênio característico do MS pode ser uma limitação nesta fase, pois de acordo com Bloom *et al.*, (1992) o processo de aproveitamento do nitrato envolve uma série de reações bioquímicas que consomem em torno de 12 ATP por mol de N inorgânico incorporado à forma orgânica, considerando-se este um alto consumo em termos energéticos. Schjoerring (2002), por sua vez, mostrou que o íon amônio pode ser transportado pelo xilema das plantas para ser assimilado nas folhas, embora, o custo energético citado anteriormente seja maior, salientando que o nitrogênio é o elemento mais relacionado como crescimento celular, baixas concentrações dele podem favorecer a estabilidade do pH e metabolismo dos outros nutrientes.

Quanto à provisão de nitrogênio na forma amoniacoal ( $\text{NH}_4^+$ ), Marengo & Lopez (2011) agregaram que, independentemente da fonte, este íon deve ser metabolizado prontamente pelas células ou assimilado logo após sua absorção, sendo que este pode interferir na produção de ATP e gerar toxicidade mesmo em baixos níveis.

Neumann *et al.*, (2009) sugeriram que a diferença no crescimento em função deste elemento pode também se sustentar na variação do pH, que ocorre

pela troca de cátions durante a absorção na forma amoniacal, e na diferença da metabolização desta e da forma nítrica.

Por outro lado, há variações também na fonte de cálcio, do  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  do MS para  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  do WPM, reduzindo à metade a concentração de cloro em comparação com o MS. O íon cloreto, fisiologicamente atua na fotólise da água, mas também participa na divisão celular tanto de folhas quanto de raízes (Taiz & Zeiger, 2004).

Em relação aos micronutrientes do WPM, sua composição difere do MS, em que o primeiro é desprovido de iodo, cobre e cobalto, sendo que no meio MS é utilizado cobalto na forma de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Esta característica, segundo Neumann (2009) pode ser uma limitante na resposta morfogênica, pela clara influência que existe entre a divisão e crescimento celulares com o balanço de micronutrientes. Assim, por exemplo, em explantes de cenoura, observou-se que o ferro promove a divisão celular enquanto que o Mn e o Mo promovem o crescimento.

Ao observar os resultados dos parâmetros avaliados como um todo, percebe-se que houve um melhor desenvolvimento das microestacas no WPM seguido do DSD1, ao contrário do meio básico MS amplamente utilizado para outras culturas, em concordância com Olmos *et al.*, (2002) quem citam o WPM como um dos meios basais mais empregados na propagação de lenhosas.

#### **4.3.2 Avaliação da concentração auxina/citocinina no desenvolvimento *in vitro* de microestacas de araçazeiro**

O meio MS com as concentrações testadas de ANA e BAP foi prejudicial para o desenvolvimento, ocorrendo alta mortalidade entre os tratamentos avaliados (70 %), sem diferença significativa, enquanto observou-se um

comportamento quadrático no incremento do percentual de microestacas mal formadas (caules curvos) alcançando 85 % com a concentração de BAP (0,9 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,3 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 20). Nos caules que apresentaram malformações observou-se posterior desorganização das estruturas e formação de massas celulares (Figura 21d).

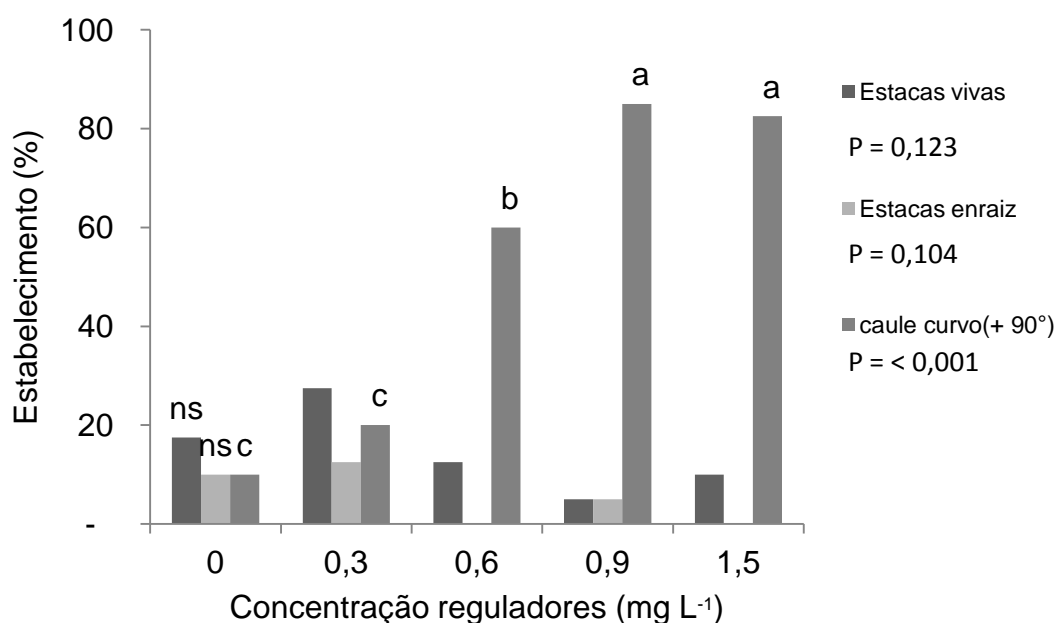


FIGURA 20. Efeito da concentração de BAP e ANA (3:1) no meio de cultura MS sobre o percentual de estabelecimento de microestacas obtidas por germinação *in vitro* de sementes de araçazeiro: Estacas vivas, enraizadas e caules deformados após 45 dias de incubação, barras seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. Ns = não significativo. UFRGS. Porto Alegre, 2013.

A deformação das microestacas observada em gemas laterais (Figura 21a) e na região da base (Figura 21c), após uma semana, logo depois da incubação por dois dias no escuro, inicialmente mostrou-se como um encurvamento na região da base (Figura 21b) que posteriormente ocasionaram a desdiferenciação do tecido e em alguns casos formação de calo. Estes movimentos na região do caule podem ser atribuídos principalmente a fatores hormonais pela sua relação com a concentração de auxinas. Segundo define Went & Thimann (1937), esses

movimentos laterais são induzidos pela translocação assimétrica das auxinas, sendo observados e descritos inicialmente como a teoria de tropismos ou hipótese *Cholodny-Went*.

O enovelamento pode também ter sido influenciado pela presença do meristema apical, local de síntese auxínica, que como resposta da planta à falta de raiz e luz favoreceu o acúmulo de hormônios na base em gradientes similares aos do fitoregulador no meio de cultura.



FIGURA 21. Alterações teratogênicas ocorridas nos tratamentos com ANA:BAP em microestacas de *Psidium cattleianum*; a. Microestacas após uma semana do estabelecimento; b. Malformações na região meristemática; c. Malformações no hipocótilo observadas posteriormente; d. Calo gerado após 90 dias de se manter em meio de cultura (barra= 0,5 cm). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Um aspecto que permite inferir sobre a diferença metabólica dos explantes em resposta ao tratamento é a variação do pH do meio de cultura, avaliada no final do período de incubação das estacas. O meio que teve o maior percentual de

enovelamento apresentou o pH mais básico (4,75) e aquele com a menor concentração dos reguladores, o pH mais ácido (Tabela 14). Neumann (2009) atribui a variação de pH do meio de cultura, entre outros fatores, à troca de cátions que ocorre entre o  $\text{NH}_4$  e o interior da célula quando este é translocado para os tecidos.

TABELA 14. Efeito da concentração de BAP/ ANA no meio de cultura após 45 dias de incubação de microestacas de araçazeiro na variação do pH. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

BAP	ANA	pH
mg L <sup>-1</sup>		
0,0	0,0	4,56 abc
0,3	0,1	4,33 c
0,6	0,2	4,67 ab
0,9	0,3	4,75 a
1,5	0,5	4,49 bc
Média		4,56
CV		1,95
P		0,003

\*Mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey.

\*\*ns = não significativo.

Comportamento similar em resposta à alta concentração de citocinina foi observado por Reidiboym-Talleux (1999) na indução de embriogênese somática de *Prunus avium*, sendo que a suplementação em altas concentrações (0,46  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,44  $\mu\text{M}$  de BA) causou hiper-hidratação e respostas teratogênicas dos tecidos inoculados, que segundo o autor, a expressão de dita resposta é característica das citocininas.

Finalmente, de acordo com Olmos (2002), há necessidade de aperfeiçoar para cada espécie e etapa de multiplicação, o tipo de regulador, suas combinações e níveis de concentração. Particularmente, pelos resultados deste experimento, a propagação *in vitro* na fase de estabelecimento é afetada pela



presença de fitoreguladores no meio de cultura MS; porém é interessante analisar o processo posterior de desdiferenciação do caule observado.

#### 4.3.3 Concentração de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) na propagação *in vitro* por microestaquia de grumixameira

Não houve diferença significativa no percentual de brotação, entre o tratamento do meio de cultura sem fitoreguladores e o tratamento sem ácido giberélico na presença de BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,5 mg L<sup>-1</sup>). Por sua vez, entre os tratamentos de ácido giberélico o que se mostrou mais eficiente foi a dose de 1,5 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 15).

TABELA 15. Percentual de brotação de microestacas de grumixameira propagadas *in vitro* em meio de cultura MS sob concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de ácido giberélico. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Concentração de AG <sub>3</sub> mg.L <sup>-1</sup>	Rebrote (%)
0	5% a
0,5	3% a
1,5	25% b
2,5	3% a
Média	10%
C.V	28,4%
P	10%
Transformação	$\sqrt{x+0,01}$
Presença de fitoregulador	Rebrote (%)
Sem fitoreguladores	40% a
BAP 1,0 mg L; ANA 0,5 mg L; GA <sub>3</sub> 0	5% a
Média	21,25%
C.V.	27,8%
P	0,017

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. \*\*ns = não significativo

As microestacas utilizadas como explantes para o presente experimento obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* são estruturas subdesenvolvidas, em comparação com as que são germinadas sob condições naturais; portanto, não só os estímulos hormonais, mas também o tempo adequado, é necessário para a formação de estruturas que permitam superar esta primeira fase. A

indução através de reguladores, sem adequado desenvolvimento dos tecidos e estruturas, no caso das gemas laterais, pode desencadear a formação de variações somáticas. Portanto nesta primeira fase, como não houve diferença no percentual de brotação entre o meio com giberelina ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o meio sem fitoreguladores, pode ser mais interessante empregar este último.

Entre os reguladores, as giberelinas são aparentemente as mais relacionadas com a superação da ecodormência, sendo que sem elas não ocorre a produção de enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilase, fundamental neste processo (George, 2008); porém além de ser afetada por fatores hormonais, a presença de estruturas de proteção incidem fisicamente (Neumann, 2009; Arora *et al*, 2009).

Além do tratamento sem uso de reguladores, outras práticas podem ser utilizadas para a superação da dormência de microestacas de grumixameira que apresentam forte dominância apical tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*, para isso, algumas práticas preliminares na germinação *in vitro* das sementes e no estabelecimento das microestacas mostraram-se favoráveis, por exemplo, ao dispô-las deitadas em contato com a superfície do meio de cultura WPM sem hormônios, mantendo a região apical e duas ou três gemas, observou-se a alongação desta região enquanto que aquelas sem o meristema apical induziram rebrotos laterais (Figura 22).



FIGURA 22. Propagação *in vitro* de grumixameira por microestaquia; a. Indução de microestacas intermediárias em posição horizontal; b. Desenvolvimento de microestacas apicais em condições *in vitro* após 45 dias em meio de cultura, (barra= 1 cm). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Em relação à formação das mudas *in vitro* a partir de semente, conseguiu-se alterar o padrão de crescimento destas quando foram transferidas para um meio acrescentado com BAP ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), sendo que algumas sementes desenvolveram até cinco caules basais e quando foram feitas podas para obtenção de mini-estacas também foi visto o potencial de rebrote na base do caule sempre que mantida pelo menos uma gema (Figura 23).

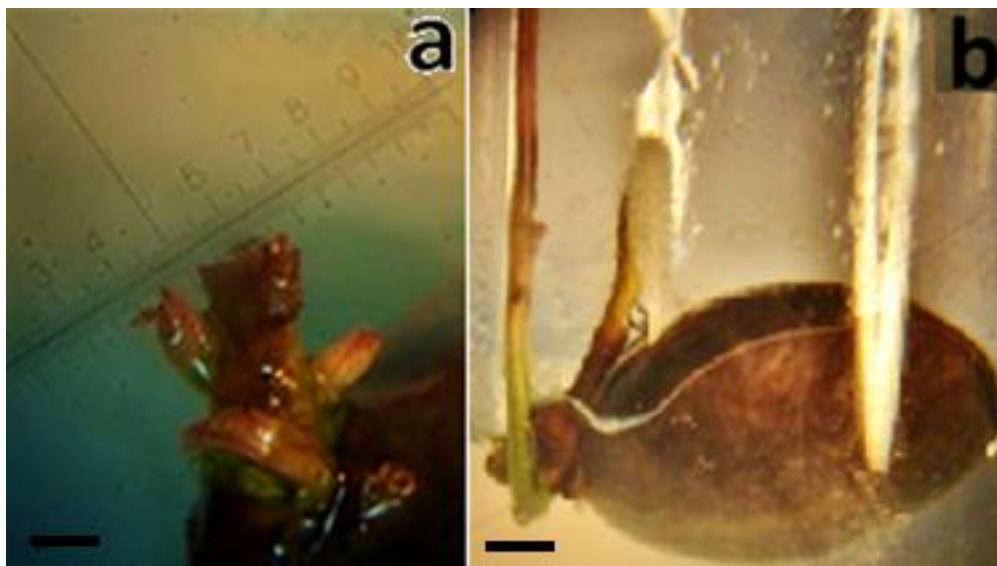


FIGURA 23. Indução ao aumento no número de brotações na germinação *in vitro* de sementes de grumixameira mediante incubação em meio com BAP ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ); a. Início da brotação; b. desenvolvimento das brotações após duas semanas, (barra= 1 mm). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Observou-se também que explantes com a região apical são mais responsivos e desenvolvem estrutura caulinar muito mais rápido, possivelmente por ser local de síntese de auxinas em comparação com o resto do caule. Neste sentido, na propagação *in vitro* por estaquia é preciso desenvolver meios de cultivo diferentes dependendo da posição do explante.

#### 4.4 Calogênese em araçazeiro

##### 4.4.1 Desinfestação de explantes foliares para indução de calogênese

Testes preliminares mostraram que os explantes obtidos a partir das folhas novas oxidaram rapidamente após o tratamento com NaOCl (2 %) por mais de dez minutos.

##### 4.4.1.1 Pré-tratamento com solução de fungicida-antibiótico

O uso de solução de fungicida-antibiótico como pré-tratamento de desinfestação não teve efeito significativo no percentual de explantes estabelecidos sem contaminação e oxidação, salientando que em nenhum dos

tratamentos, até o momento de avaliação, houve presença de colônias bacterianas (Figura 24). Salienta-se que os resultados foram obtidos sem o uso de álcool 70 % empregado em outros protocolos, o que pode ajudar reduzir o dano celular nesta primeira fase.

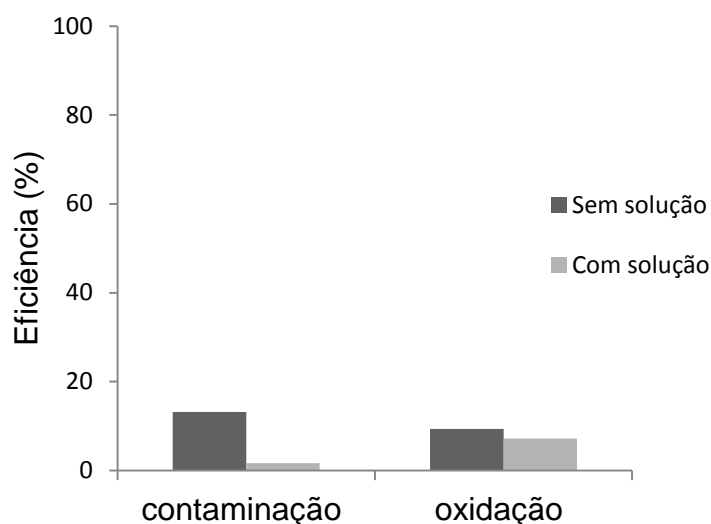


FIGURA 24. Efeito do pré-tratamento de desinfestação em solução de fungicida + bactericida sobre o percentual de contaminação em explantes foliares de araçazeiro. ns = não significativo. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

O problema da presença de bactérias em explantes foliares e caules desta espécie foi verificado em testes prévios, o que determinou a necessidade de realização de pré-tratamento das plantas matrizes, sendo utilizada ampicilina (250 mg L<sup>-1</sup>), que segundo Ribeiro (2007) é altamente hidrossolúvel, estável em pH ácido e de amplo espectro na atividade antimicrobiana. A concentração de uso adotada para a solução foi baseada na concentração mínima inibitória relatada para o uso da ampicilina no controle de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batatas micropropagadas (Pereira *et al.*, 2003).

O uso de antibiótico a partir de diferentes fontes, concentrações e formas de aplicação na experimentação e produção agrícola é bastante discutido entre outros aspectos pela sua aptidão por se translocar através dos órgãos e estruturas vegetais. Segundo Romero (2001), o maior problema reside na ausência de sua absorção pelos órgãos vegetais, dada, entre outras características, pela alta solubilidade em água da maioria deles.

Na propagação *in vitro*, antibióticos têm sido utilizados principalmente como componente do meio de cultura ou mediante aspersão nas plantas matrizes (Pollock *et al.*, 1983; Souza *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2010). Entre os mais empregados encontram-se: agrimicina, cloramfenicol, estreptomicina, ampicilina, entre outros (Pollock *et al.*, 1983).

Porém, uso de antibióticos na agricultura e nas pesquisas com propagação *in vitro*, merece cuidados para seu efeito nas plantas, no estabelecimento *in vitro*, além da repercussão da sua inclusão em protocolos de propagação de espécies vegetais. Resistência a medicamentos antimicrobianos podem desencadear a aparição de novas mutações no genoma bacteriano ou através da aquisição de genes que codificam para resistência (Davies *et al.*, 2006).

Trabalhos com outras espécies nativas mostraram respostas variadas na eficiência de pré-tratamentos com soluções desinfestantes. Por exemplo, para estabelecimento *in vitro* de explantes de *Eugenia involucrata*, foram feitas quatro aplicações quinzenais nas matrizes com solução cercobim ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e sulfato de estreptomicina ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) prévias à extração dos explantes; posteriormente em condições de laboratório, os segmentos nodais foram submersos por trinta minutos em solução de benomil ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e sulfato de estreptomicina ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) seguidos por 30 segundos em etanol (70 % v:v) e, finalmente, em solução de  $\text{HgCl}_2$  (0,05 % p:v) por dez minutos antes de se levar para a câmara de fluxo.

Nesta última, os explantes foram tratados com hipoclorito de sódio (1,5 % v:v) por 15 minutos e feito um quarto enxágüe em ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>) antes da inoculação (Golle *et al.*, 2012). O percentual de contaminação alcançado nesse estudo foi inferior a 10 % e a oxidação variou entre 16 e 39 % dependendo do explante. Para o caso do araçazeiro, onde empregou-se um protocolo de limpeza mais simples os resultados foram similares.

Por outro lado, Lattuada (2010), testou como parte do protocolo de desinfestação para introdução de segmentos nodais de pitangueira, a imersão dos explantes sob agitação em solução hidroalcoólica de 60 mg L<sup>-1</sup> de tetraciclina. Como resultado encontrou-se que não houve contaminação enquanto que usando somente fungicida, a contaminação foi superior a 65 %, o que justificou o pré-tratamento.

Também na introdução *in vitro* de *Zingiber officinale* R., atingiu-se níveis similares de descontaminação (20 %) aos obtidos no presente experimento, mediante explantes provenientes de rizomas, pré-lavados para extração das gemas, seguido da imersão em solução de tetraciclina (0,2 %) e metalaxil (0,2 %) por 90 minutos, prévia desinfestação com hipoclorito de sódio (0,5 % i.a), com o tensoativo polisorbato 20 por dez minutos (Pandey *et al.*, 1997).

Souza *et al.*, (2007) na fase de estabelecimento *in vitro* por segmentos nodais de pitangueira, conseguiram baixos níveis de contaminação por bactérias (3,48 %) e fungos (5,03 %) quando realizadas previa extração dos explantes, duas pulverizações semanais com o antibiótico agrimicina (sulfato de estreptomicina) e o fungicida Benlate (benomil) nas doses de 2,4 g L<sup>-1</sup> e 0,6 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Santos & Wedling (2010) na introdução *in vitro* de explantes oriundos de brotações de enxertos de *Ilex paraguariensis*, a combinação entre álcool 70 % por

dois minutos seguida de hipoclorito de sódio a 1,5 % por 30 minutos somente mostrou-se adequada para a desinfestação sendo que após alguns sucessivos subcultivos apareceu contaminação por bactérias endógenas.

A oxidação causada pelo tratamento de desinfestação, tanto com hipoclorito de sódio quanto com outras soluções químicas pode influenciar a capacidade de resposta celular dos explantes ou induzir sua morte, porém não houve diferença significativa para esta variável entre os tratamentos testados como se observa na Figura 24.

Nas condições do presente estudo, verificou-se que o uso da solução testada não interferiu no pré-tratamento na limpeza dos explantes.

#### **4.4.1.2 Efeito do pH da solução NaOCl na desinfestação e qualidade de explantes foliares**

O pH das soluções de NaOCl apresentou uma resposta quadrática positiva com o incremento das concentrações (Figura 25). De qualquer maneira o pH foi alcalino em todas as concentrações avaliadas.

Trabalhos publicados correlacionam não só a concentração de NaOCl na solução mas também o pH, com a eficiência dos tratamentos.



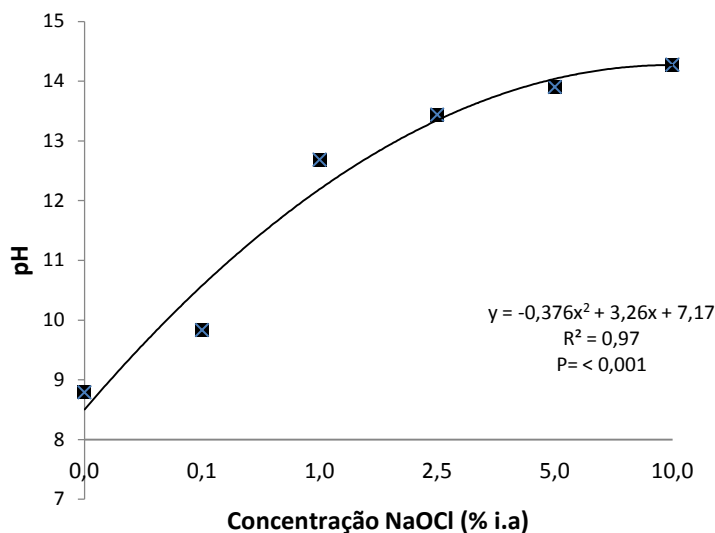


FIGURA 25. Variação do pH da solução do hipoclorito de sódio (NaOCl) em função da concentração. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

O percentual de contaminação foi menor quando empregada a solução de NaOCl com o pH corrigido (2 %) em comparação com o observado quando utilizada a solução sem corrigir (10 %) (Figura 26). Segundo Liu *et al.*, (2006), isto pode ser interessante em termos de eficiência do processo, considerando que o cloro que se volatiliza ao reagir com soluções ácidas, oxida mais fortemente os tecidos tratados em pH mais baixo pelo incremento que ocorre na polaridade de solutos, enquanto que um pH mais elevado pode aumentar a repulsão eletrostática entre membrana e solutos.

Segundo Liu *et al.* (2006) a maior eficiência na desinfestação com solução de NaOCl, não se deve apenas à concentração, mas também ao tempo de ação, à temperatura e às condições hidro-dinâmicas do procedimento. No mesmo trabalho verificou-se que a combinação de NaOH (0,1 N) e NaOCl (400 ppm) provocou um incremento no fluxo de membranas em 150 % em comparação com obtido usando as soluções usadas isoladamente. Isso pode explicar não só o

menor percentual de contaminação dos explantes, mas também a maior oxidação em explantes foliares de araçazeiro (Figura 26).

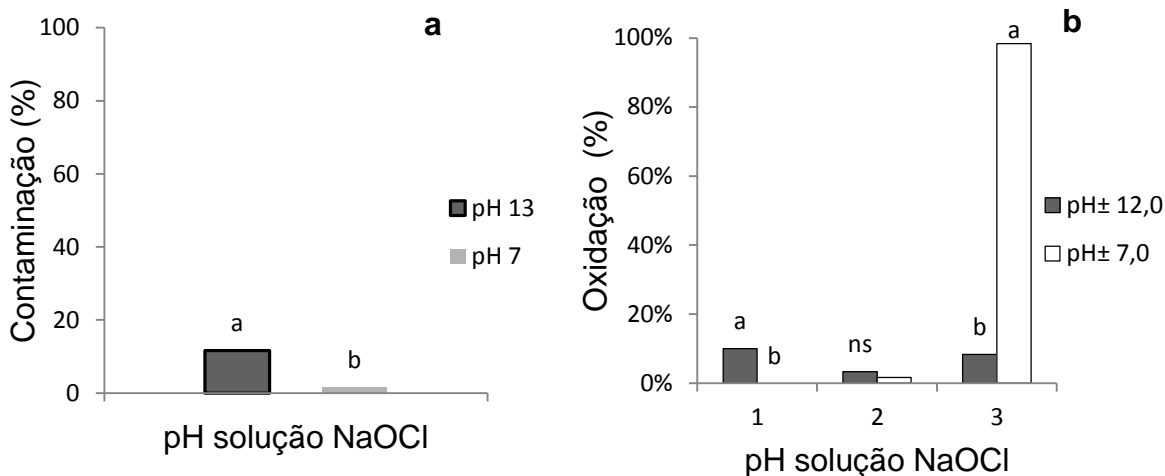


FIGURA 26. Efeito do pH da solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2 % m/v) no percentual de oxidação e contaminação de explantes foliares de araçazeiro; a. Percentual de contaminação; b. Percentual de oxidação. barras com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade de erro, pelo teste de Tuckey. \*\*ns = não significativo. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Quanto ao percentual de oxidação, houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo maior (98 %) quando utilizada a solução com pH corrigido em comparação com a solução tradicional com níveis abaixo de 10 % (Figura 26b).

As causas da alta oxidação podem ser explicadas pela alta concentração de compostos fenólicos (5,29 mg EAG 100g<sup>-1</sup>) presentes nas folhas novas (Affonso *et al.*, 2008) que, ao reagir com o oxigênio e os íons metálicos (+) de outros compostos presentes no meio de cultivo, causam o típico halo marrom (Santos, 2001). O tratamento com soluções antioxidantes, como é o caso do ácido ascórbico empregado nos outros tratamentos, pode ser uma alternativa para superar este fator limitante.

Porém, estes compostos fenólicos, do amplo grupo de metabólitos secundários em vegetais sintetizados a partir da rota do ácido chi-químico,

malônico, ou de aminoácidos aromáticos, participam em diversas funções de defesa, sinalização, competência, entre outras (Taiz & Zeiger, 2004). Por tanto sua presença pode ser importante em determinadas etapas do processo de desdiferenciação e formação de estruturas sempre que não haja acúmulo ou oxidação generalizada dos tecidos.

Visando a solução deste problema, diversos tratamentos têm sido utilizados, entre eles incubação dos explantes no escuro, uso de carvão ativado, de cisteína, de polivinilpirrolidona (PVP), de ácido ascórbico, redução de fontes de nitrogênio, entre outros (Concepcion *et al.*, 2005).

O ácido ascórbico, que foi utilizado nos outros experimentos, como solução de enxágue, não foi empregado neste experimento para evitar a interferência com o tratamento. Segundo Guerra, (2007) quando acrescentado ao meio de cultura em concentrações entre 10 e 140 mgL<sup>-1</sup>, possui a propriedade de estimular a atividade metabólica dos tecidos reduzindo assim a oxidação em até 50 %.

Outros tratamentos paralelos como a redução da irradiância no local das plantas doadoras podem auxiliar na redução das perdas por oxidação, sendo que o excesso de radiação pode gerar saturação luminosa induzindo, entre outras respostas, a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007) e aumento da biossíntese de substâncias fenólicas no cloroplasto que, por sua vez, é acumulado em algumas estruturas como o vacúolo (Kefeli *et al.*, 2003) corroborado também por Casagrande Junior *et al.*, (1999) para o caso do araçazeiro.

Ainda, o papel da produção e oxidação de fenóis, quanto à produção de ERO é discutida pelo fato de se apresentar em varias situações, durante hidrólise e ciclo de água na fase fotoquímica da fotossíntese, como mecanismo de

sinalização frente a danos celulares, durante a programação da morte celular, entre outras (Greenberg, 1996).

Produto da reação do oxigênio molecular na presença de outros radicais livres ou por colisão com moléculas altamente redutoras quimicamente, o  $O_2^-$  (superóxido), atua como um forte oxidante citotóxico, dentro deste processo de redução, sendo liberados radicais  $OH^-$  que podem gerar desdobramentos de cadeias (DNA), danos na base de DNA, e oxidação de moléculas orgânicas (Fehér *et al.*, 2008). O desencadeamento das respostas antes mencionadas durante o estabelecimento dos explantes pode ser afetado pelo uso de soluções antioxidantes, mas também mantendo os explantes mergulhados em água e sob baixa incidência de luz.

#### **4.4.1.3 Efeito do tempo de imersão em solução de NaOCl**

Para a desinfestação utilizando o hipoclorito de sódio (NaOCl), não só a concentração da solução é importante, mas sim ajustar o tempo de contato que permita a adequada eliminação dos micro-organismos. Para o caso do presente estudo obteve-se percentual de contaminação inferior a 8 % no tempo de imersão acima de cinco minutos sem diferença estatística em comparação com os tempos superiores (Figura 27a) enquanto não houve diferença significativa no percentual de oxidação de explantes entre os tratamentos quando utilizada a mesma concentração sendo esta inferior a 10 % (Figura 27b).

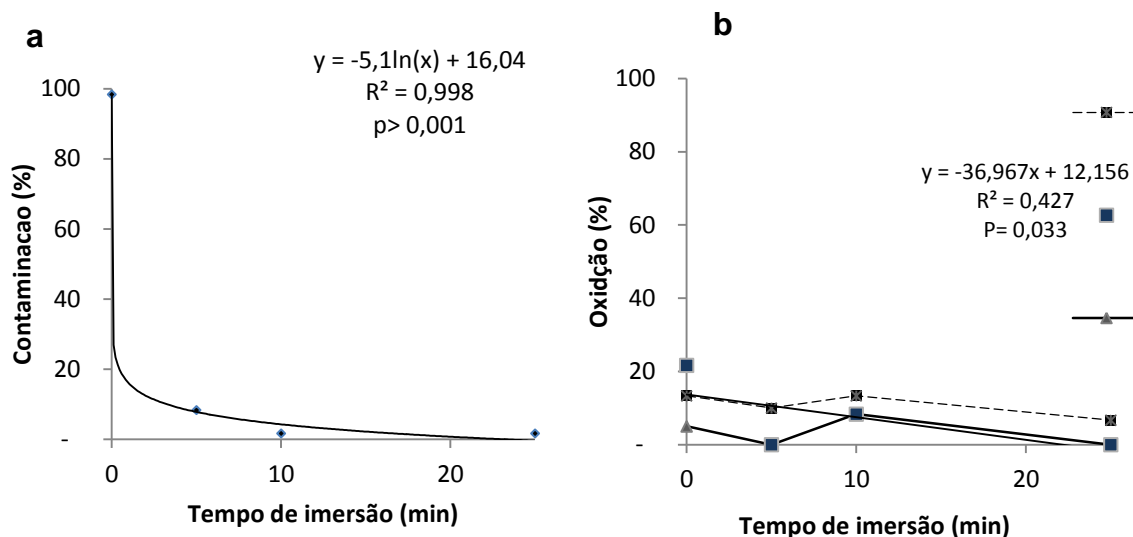


FIGURA 27. Efeito do tempo de imersão no percentual de contaminação (a) e na intensidade da oxidação dos explantes de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sab) (b) em solução de NaOCl (1,5 % i.a). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Houve efeito do tempo de imersão no NaOCl no decréscimo do percentual de contaminação, o que mostra que mantendo uma mesma concentração do ingrediente ativo, o efeito de limpeza varia em função do tempo de contato, mas como pode-se constatar neste experimento este tempo é muito pequeno. A diminuição da contaminação, segundo Estrela *et al.*, (2003), é devido a que o hipoclorito de sódio em concentração bio-compatível (0,5 - 1 %) na presença de micro-organismos e tecido vegetal inicialmente atua gerando uma reação de saponificação, neutralização de aminoácidos e finalmente cloraminação como etapas do processo antimicrobiano e diluição dos tecidos. Concentrações menores que variam entre 0,5 % e 2 % em função do tamanho dos explantes são propostas por autores como Vargas *et al.*, (2004); Silva *et al.*, (2003); Donini *et al.*, (2005) e Pereira *et al.*, (2011).

Portanto, em função das características do explante deve se ajustar o tempo adequado entre os níveis de desinfestação e oxidação, que neste experimento ficou entre cinco e dez minutos.

#### **4.4.2 Efeito da concentração de cinetina e 2, 4 D na indução de calogênese em araçazeiro**

##### **4.4.2.1 Explante foliar**

No araçazeiro, a perda de explantes foliares por oxidação esteve diretamente relacionada com a concentração de cinetina no meio de cultura, pois a obtenção de calos foi possível nas doses menores (Figura 28). Explantes nas menores concentrações mostraram degradação total da clorofila sem se oxidar nem se desdiferenciar. Segundo Sharp *et al.*, (1980), esta resposta pode ser causada pela relação dependente de 2,4 D com o nitrogênio disponível no meio, sendo que quanto maior é a concentração de fitoregulador maior o requerimento do íon.

Embora o percentual de oxidação tenha sido baixo nas doses menores o maior percentual de formação de calo a partir de folha atingido foi 50 % sendo que outros fatores podem ter incidido na resposta do tecido, entre elas a fonte de regulador (Golle, 2010), o tamanho e região do explante (Pedroso & Pais, 1993), fonte do gelificante (Welandar & Maheswaran, 1992; Carvalho, 2003) entre outros.

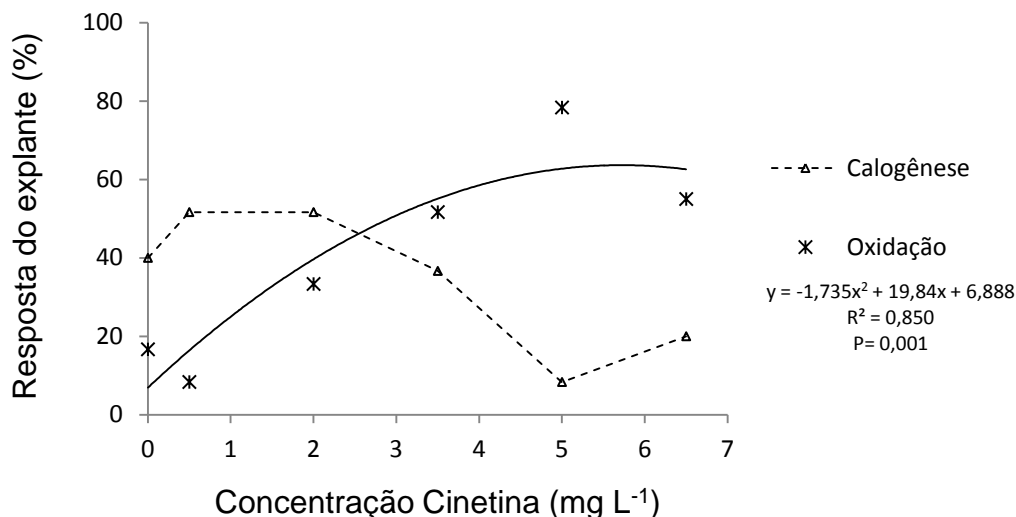


FIGURA 28. Efeito da concentração de cinetina sobre o percentual de calogênese e oxidação em explantes de lâmina foliar de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Relacionado com o tamanho e região do explante de araçazeiro, o fato de utilizar a região central da lâmina foliar, descartando as bordas, ápice e base e nervura central pretendeu homogeneizar o tipo de tecido empregado para formação de calo. Porém, mesmo na região laminar, a densidade de feixes vasculares relacionados como precursores de calos, é maior quanto mais perto da região apical (Figura 29a).

A folha de araçazeiro apresenta padrão de venação tipo broquidódromo, tal como o referido por Cardoso & Sajo (2006) e Arruda & Fontenelle (1994), caracterizada pela ocorrência de ângulos de fechamento no ponto de anastomose das nervuras secundárias, que são maioritariamente retos ou próximos disso, formando arcos evidentes. Por outro lado, a região entre a borda e o local de anastomose das nervuras secundárias varia entre dois e três milímetros sendo maior na região do ápice (Figura 29b).

Na região da base da folha as nervuras secundárias estão mais espaçadas e são de maior diâmetro, reduzindo gradualmente o espaçamento na medida que

aproximam-se do ápice (Figura 29a). As nervuras secundárias correspondem à região da folha de maior atividade meristemática durante o processo de calogênese e dita variação poderia incidir na resposta aos tratamentos.

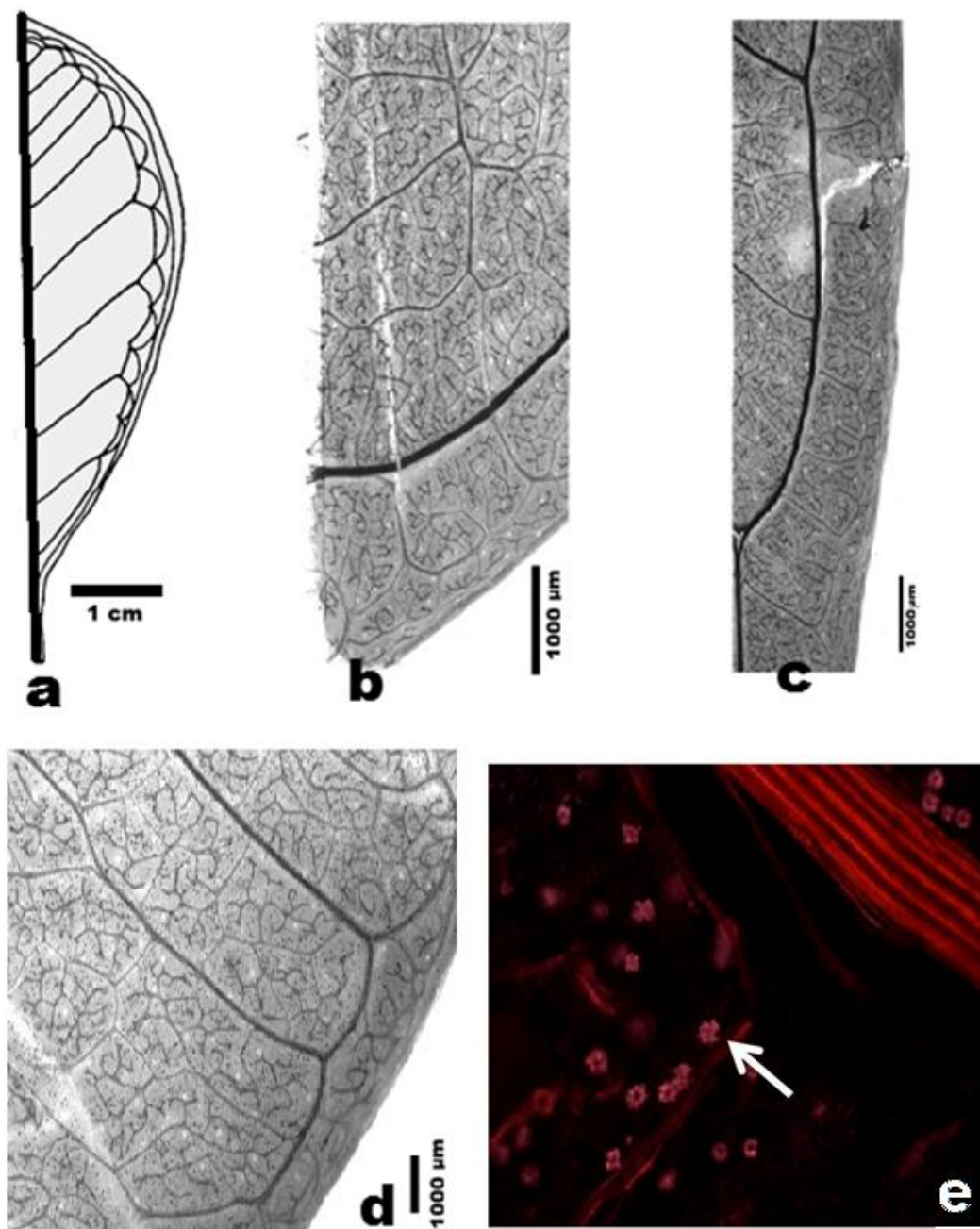


FIGURA 29. Aspecto geral da folha de araçazeiro diafanizada e corada com safranina (5 %); a. Desenho Arruda & Fontenelle (1994); b. fotografia região apical; c. fotografia região central; d. fotografia região basal; e. Drusas presentes na lamina foliar. UFRGS, Porto Alegre, 2013.



Outra diferença observada na imagem da folha diafanizada é a presença generalizada de drusas em maior concentração na região dos feixes vasculares (Figura 29e). As drusas são grupos de cristais de oxalato de cálcio, silicatos ou carbonatos presentes nas plantas, atuando no sistema de defesa junto a compostos fenólicos, na regulação do cálcio e detoxificação por metais pesados (Franceschi & Nakata, 2005).

O maior percentual de explantes oxidados obteve-se quando utilizada concentração de citocinina acima de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  que por sua vez geraram a menor taxa de indução de calo. O grau de desdiferenciação celular, além da presença de reguladores de crescimento é afetado por diversos mecanismos paralelos que influenciam as respostas fisiológicas e a eficiência dos tratamentos tais como a relação de sais no meio, a fonte de nitrogênio, potássio e outros íons (Sharp *et al.*, 1980), portanto não pode se atribuir o efeito exclusivamente à variável avaliada.

Em termos de meios de cultura, Sondhal & Sharp (1977) na embriogênese somática em cafeeiro, propõem que ela deve ser manejada nas seguintes fases: indução, acondicionamento, resgate do embrião, e germinação, salientando que, por exemplo, para a primeira, além da composição básica do meio por sais MS, vitaminas, adicionam-se os reguladores cinetina ( $20 \mu\text{m}$ ) e 2,4 D ( $5 \mu\text{m}$ ). O meio básico MS modificado por Sondahl & Sharp (1977) é utilizado também na indução de embriogênese em outras espécies como eucalipto (Pinto *et al.*, 2007), cafeeiro (Sondahl *et al.*, 1991; Rezende *et al.*, 2008) e goiabeira serrana (Caprestano, 2012), espécies de características similares ao araçazeiro.

Pelas necessidades descritas por outros autores, nesta fase a alta concentração de sacarose e a alta concentração da citocinina na presença de 2,4 D são chave no estímulo necessário. Por sua vez, os meios propostos pelo autor para as seguintes fases, diferenciam-se no balanço hormonal e concentração de

sacarose, segundo Sondhal *et al.*, (1991), o mencionado balanço tem dupla função na calogênese, no reingresso das células ao ciclo mitótico em alguns pontos específicos do ciclo ou da citocinese.

Em outros processos como a embriogênese somática de cenoura, Feher *et al.*, (2003), durante a fase de indução, determinou ao nível celular, que a aplicação exógena de 2,4-D estimula o acúmulo de grande quantidade de AIA endógeno.

Outros mecanismos podem substituir total ou parcialmente o 2,4 D por um fator não hormonal ou inclusive estresse abiótico para induzir a competência necessária (Potters *et al.*, 2007), como no caso da indução de embriões somáticos a partir de protoplastos obtidos de células de *Medicago sativa* foram induzidos pela substituição parcial por estresse com ferro aplicado em concentração subletal (Pasternak *et al.*, 2002).

A aparência morfológica do calo, a resposta inicial nos explantes é a degradação da clorofila na região dos cortes, tornando o explante de cor amarelada e encurvado em algumas regiões. Porém, só aproximadamente quinze dias após inoculação nos meios de cultura observaram-se as primeiras formações de pequenos agrupamentos celulares.

O maior percentual de explantes foliares com formação de calo obteve-se na concentração de 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina na presença de 2,4 D (1,0 mg L<sup>-1</sup>). Concentrações mais elevadas reduziram o percentual de explantes viáveis para formação das massas celulares (Figura 35).

O aspecto, tamanho e outras características dos calos desenvolvidos, mesmo dentro do mesmo explante e tratamento, são diferentes quando utilizadas porções de lâmina foliar como explante. Este tipo de tecido constitui-se, segundo Sondhal, *et al.*, (1991), de populações fenotípicas múltiplas que projetam a

formação das linhagens celulares em diferentes sentidos, com diferente fase de desenvolvimento e morfologia, entre outras.

O desenvolvimento das massas celulares entre os tratamentos apresentaram diferença, principalmente no aspecto e na cor (Figura 30). Dita diferença pode estar relacionada com a origem múltipla que ocorre dentro do explante, assim massas formadas na borda do explante aparentaram ser mais compactas e amarelados enquanto que na superfície da lâmina foliar observaram-se formação de calos mais translúcidos e esbranquiçados.

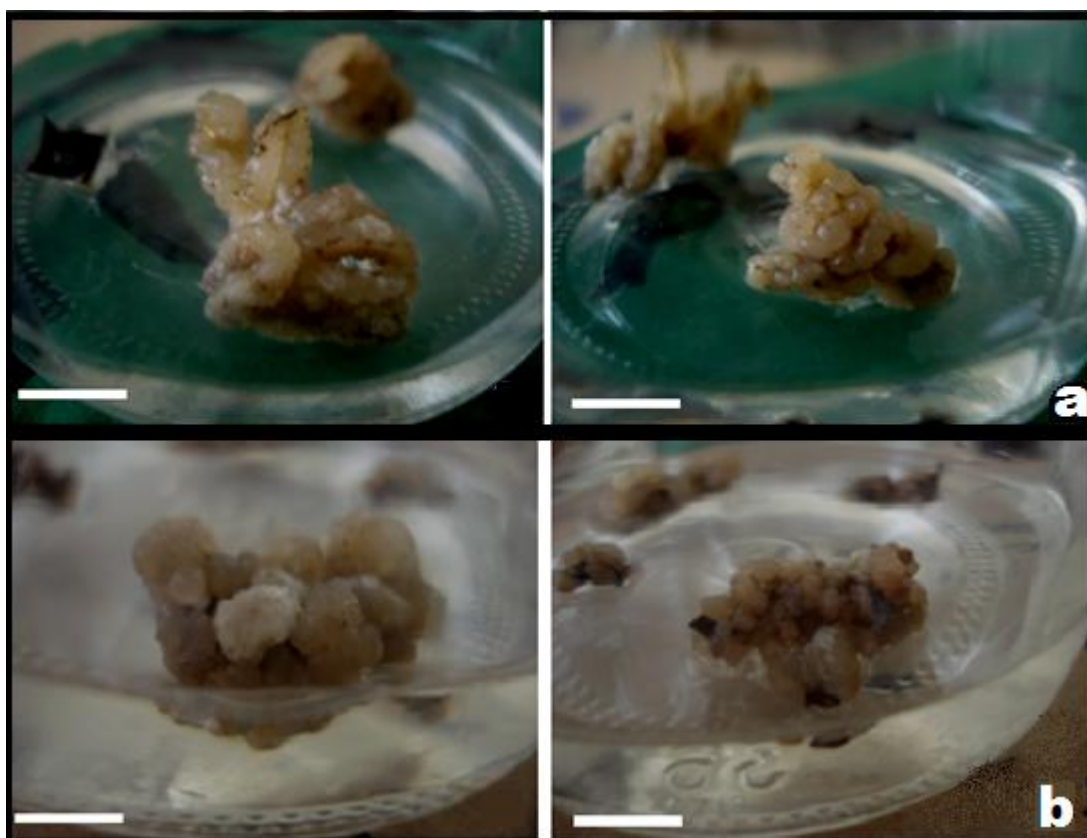


FIGURA 30. Aspecto físico dos calos após 60 dias de incubação no meio de cultura com citocinina para indução de calogênese; a. Calos formados com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ; b. Calos formados com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  (barra= 1 cm). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

O aspecto físico do calo no processo de desdiferenciação de órgãos ou estruturas somáticas para o desenvolvimento de organogênese ou embriogênese pode constituir uma ferramenta básica de noção do processo ontogênico posterior. Segundo Guerra (2007), calos obtidos a partir de células somáticas

apresentam consistência variável, assim, por exemplo, considera-se principalmente dois tipos, calo friável e calo granular, existindo termos intermediários, como calos nodulares.

A cor do calo predominantemente amarelada neste experimento, pode variar em função da idade, do meio de cultura, da fonte do explantes, entre outras e mesmo dentro de um explante, como se observou nos experimentos com araquá, que desenvolveram massas celulares de aspecto diferente (Figura 31). Calos amarelados ou cor creme apresentam proplastídeos e amiloplastídeos e calos verdes além dos anteriores, apresentam cloroplastos (Makowczyńska *et al.*, 2005). A intensidade da cor amarelada tem sido atribuída possivelmente ao teor de amido acumulado nas células, em tanto cores roxas atribuem-se à oxidação de complexos fenólicos (Miyawaky, 2006).

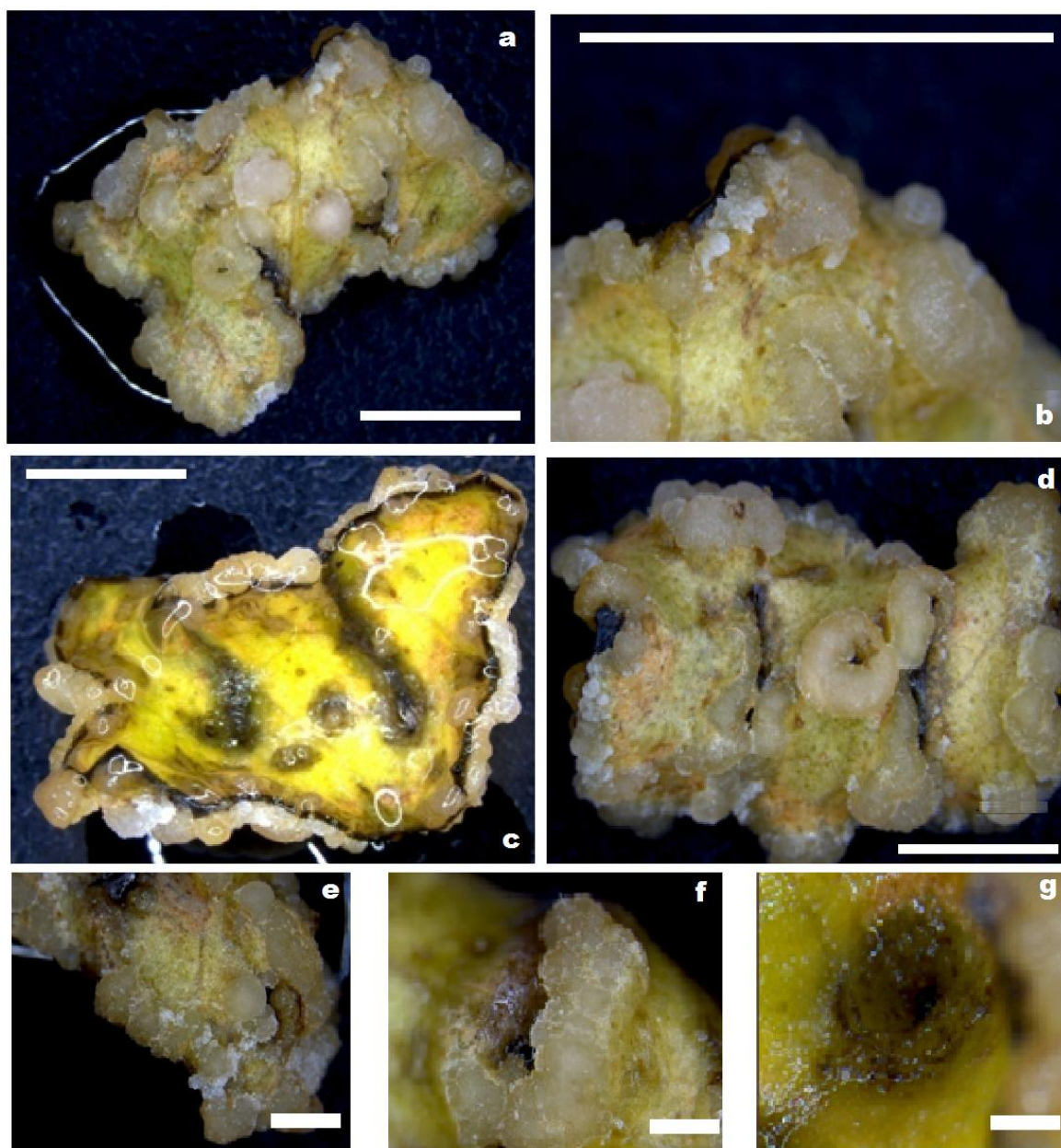


FIGURA 31. Aspectos gerais da formação de calos de araçazeiro a partir da lâmina foliar após 60 dias inoculados no meio de indução; a.  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina; b.  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina; c. face adaxial do explante em contato com o meio; d. face abaxial com formação do calo; e. formação de calo secundário a partir de calo primário; f. detalhe de formação do calo inicialmente na região do corte; g. formação de calo em ferimentos da lâmina foliar. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

O papel dos fenóis e sua oxidação durante as diferentes fases do processo têm sido discutidos pela relação com o processo de desdiferenciação celular e os

primeiros estádios na diferenciação do embrião somático (Reis *et al.*, 2008; Alemanno, 2003).

Auxinas tem sido amplamente reportadas como indutores de embriogênese somática (Sharp, *et al.*, 1980; Almeida, *et al.*, 2012), porém outros trabalhos apresentam as citocininas como BA e TDZ induzindo este evento (Chhabra *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2002).

Sucessivas divisões celulares começam a partir de uma protuberância contendo uma ou duas células meristemáticas progredindo a uma formação multicelular numerosa que envolve a formação de um calo compacto de aspecto nodular. O processo de indução de embriogênese somática, que inclui a formação de calo, caracteriza uma rota regenerativa indireta (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012).

Em testes prévios de desinfestação no presente trabalho, na ausência de fitoreguladores, observou-se na superfície do explante, aparição de pequenas formações celulares que não desenvolviam e oxidavam rapidamente o que pressupõe condições endógenas favoráveis do explante para formar calos sob outras condições de estresse.

Segundo o dissertado anteriormente, são diversos os fatores envolvidos nas respostas do explante; porém, de acordo com as observações da indução de calo a partir de explantes foliares, pelo fato de ser altamente histodiferenciados ou dissimilares, esta pode aumentar a variabilidade na resposta do explante. Assim o uso da técnica de cultura de células em camada fina (TCL-Thin Cell Layering) pode reduzir a variação fenotípica pelo fato de usar populações celulares fenotipicamente mais homogêneas.

#### 4.4.2.2 Explantes em camada fina de secções de hipocótilo

##### Doses de cinetina

O maior percentual de formação de calo por esta via (93 %) foi atingida com a menor concentração de cinetina, enquanto doses superiores foram prejudiciais observando-se um decréscimo quadrático entre a dose e o percentual de formação do calo (Figura 32). Por sua vez, o percentual de explantes oxidados entre os tratamentos não teve diferença estatística (Figura 32).

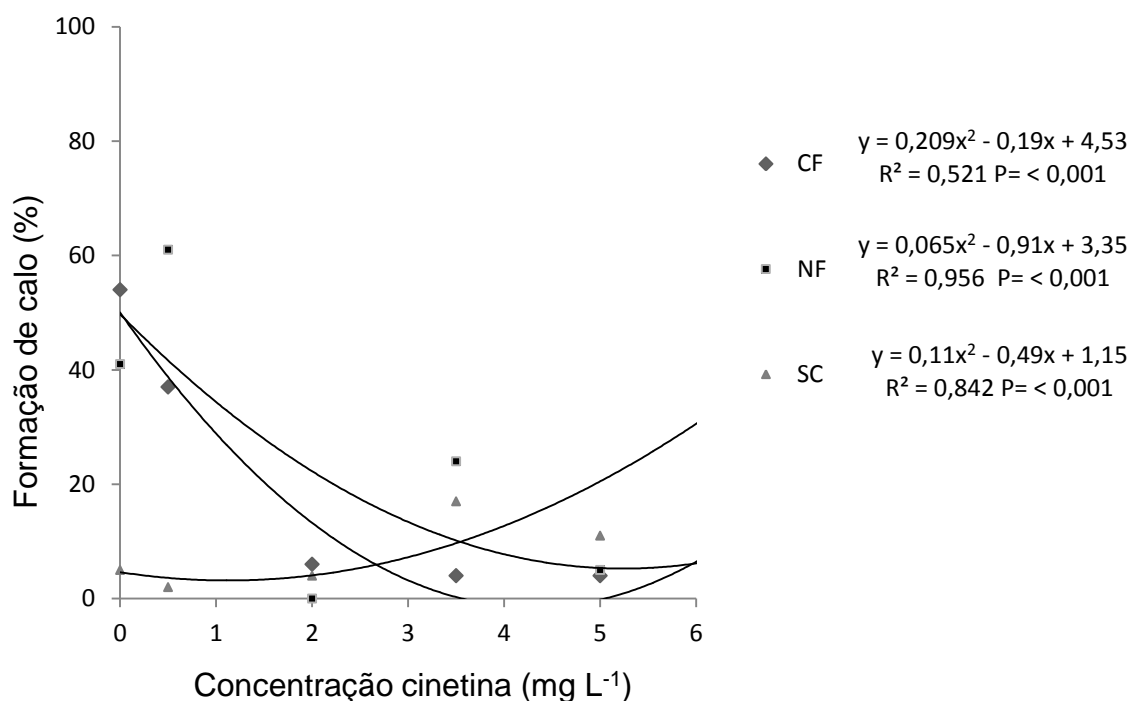


FIGURA 32. Efeito da concentração de cinetina no meio de cultura sobre o percentual de formação de calo friável (CF), não friável (NF) e sem desdiferenciação (SC) a partir de explantes de hipocotilo de araçazeiro. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Os resultados por sua vez mostraram que, em comparação com os calos obtidos usando explantes foliares, o uso de hipocótilo em camada fina induz a formação de massas de aparência mais homogênea (Figura 33). Quando utilizada a menor concentração o percentual de formação de calo alcançou 54 % e

concentrações maiores não foram favoráveis havendo um decréscimo quadrático no percentual de indução (Figura 34).

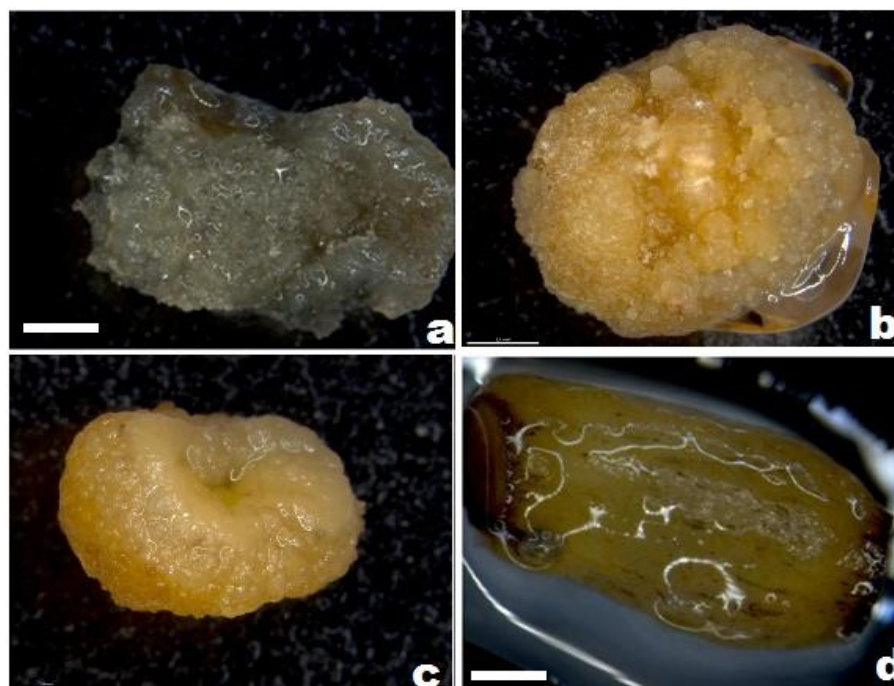


FIGURA 33. Explantes em camada fina de seções de hipocótilo após 45 dias de incubação; a. calo friável translúcido; b. calo compacto vista superior; c. calo compacto em contato com o meio; d. explante sem desenvolvimento de calo, (barra = 0,5 mm), UFRGS, Porto Alegre, 2013.

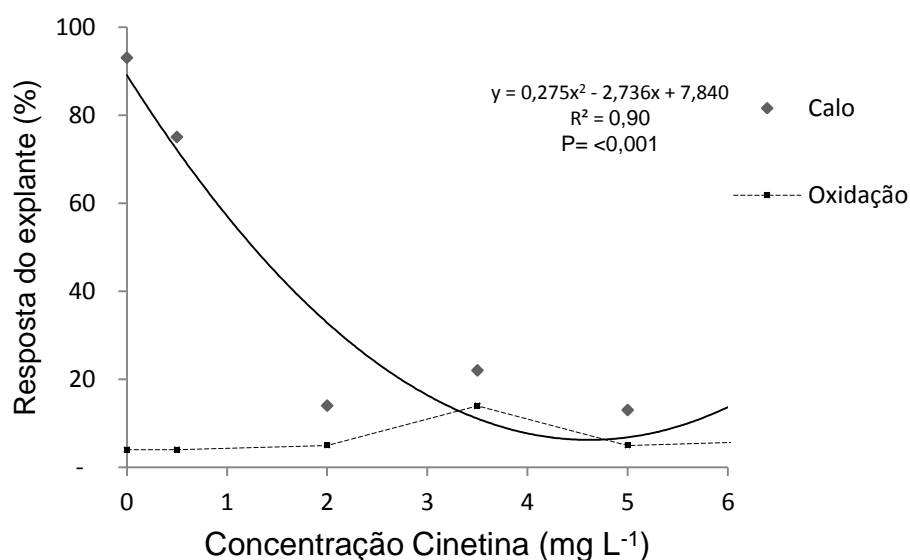


FIGURA 34. Efeito da concentração de cinetina no meio de cultura MS modificado no percentual de formação de calo e oxidação em explantes de hipocótilo obtidos de mudas de araçazeiro germinadas *in vitro*. UFRGS, Porto Alegre, 2013.



### Doses de 2,4 D

O percentual de indução de calo, utilizando como regulador de crescimento o 2,4 D, mostrou um comportamento similar em comparação com o uso de cinetina. O maior percentual de calo atingiu-se com concentrações entre 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> em quanto que houve um decréscimo quadrático nas concentrações maiores. Comparativamente, houve aumento quadrático no percentual de explantes não diferenciados enquanto que os níveis de oxidação foram inferiores a 5 % na presença do fitorregulador (Figura 35).

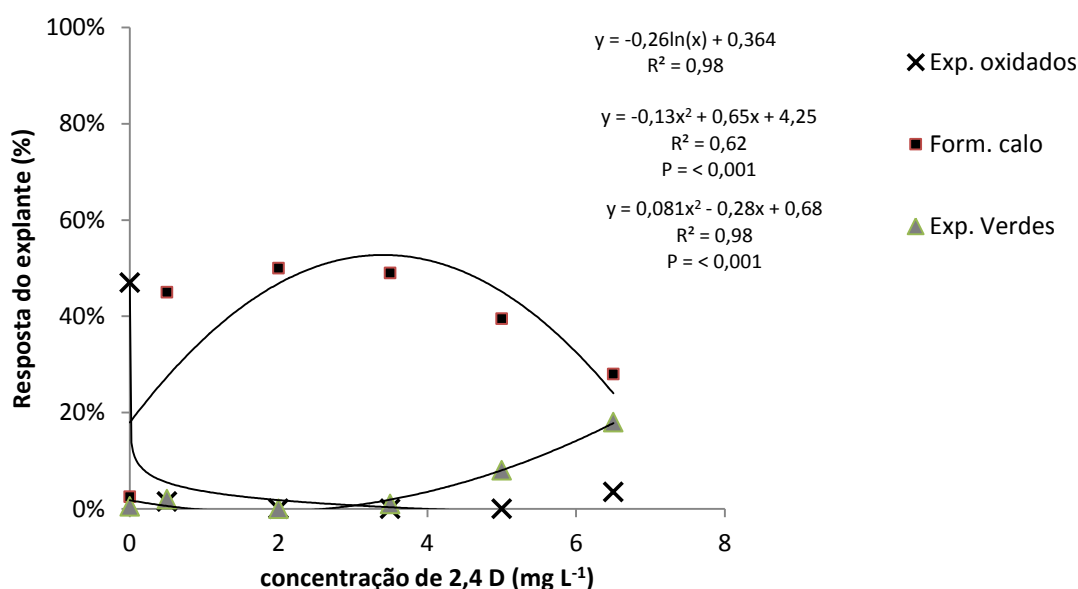


FIGURA 35. Percentual de formação de calo e oxidação em explantes de hipocótilo de mudas de araçazeiro desenvolvidas *in vitro* em função da concentração de 2,4 D, Porto Alegre, 2013.

A análise do decrescente percentual de formação em função do aumento da concentração do regulador de crescimento no meio de cultura pode ser discutida desde diferentes abordagens: em função de níveis citotóxicos do

regulador, da limitação causada por outros componentes do meio de cultura, pelo tipo de explante, entre outros (Sharp, 1980).

A resposta decrescente da calogênese paralelo ao aumento no percentual de explantes sem se diferenciar nem se oxidar, em função da concentração do regulador, segundo Sharp *et al.*, (1980) pode ser atribuída à relação dependente entre a concentração do regulador e os componentes do meio. Para o caso do 2,4-D e o nitrogênio, sabe-se que quanto maior é a concentração do primeiro, maior é o requerimento do íon. Esta relação possibilita a hipótese de uma resposta inibitória pela ausência de outros componentes.

Na indução de embriogênese somática de *Coffea arabica*, Sharp *et al.*, (1980) reportaram que explantes cultivados em meio de cultura contendo  $\text{NH}_4^+$  mostraram alta frequência de embriogênese em comparação com aqueles que se desenvolveram em meio contendo  $\text{NO}_3^-$  na mesma concentração, enquanto que há um requerimento de amônio na formação e obtenção de embriões somáticos quando utilizado 2,4-D acima de determinadas concentrações (Sharp *et al.*, 1980).

De acordo com Komamine *et al.*, (1992) as auxinas são fundamentais ao longo processo de desdiferenciação, principalmente na transição da fase zero onde encontram-se células embriogênicas desagregadas, para a fase um onde ocorre a formação de *cluster* celulares. Por sua vez, durante o desenvolvimento de calos de *Phyllanthus* SP encontrou-se que há interação positiva entre o 2, 4 D e a cinetina no aumento do peso fresco (Duangporn & Siripong, 2009).

A rota de desdiferenciação expressada no aspecto físico do calo foi também influenciada pelo balanço de reguladores do meio; assim, nas concentrações mais baixas de cinetina o percentual de calos com aparência friável foi maior e decresceu a medida que esta aumentou. Segundo Akaneme & Eneobong, (2008) calo compactos e friáveis de *Pinus* sp., mostraram diferença na

distribuição das células meristemáticas. No calo friável, a disposição das células poderia ser vista muito solta e os grupos localizados de células ou meristemóides, estavam distribuídos por todo o calo enquanto que células do calo compacto eram mais estreitas, empacotadas e homogêneas. Ditas características relacionam-se com a rota de diferenciação da massa celular.

Em relação aos níveis fitotóxicos dos reguladores empregados, não se observou diferença significativa entre o número de explantes necrosados e as concentrações testadas. A toxicidade entende-se como a expressão de efeitos adversos causados pela interferência de agentes específicos na estrutura e/ou processos essenciais para a sobrevivência e/ou proliferação de um organismo ou parte dele (Hayes, 2001).

Porém, sendo que é amplamente conhecido que o uso de altas concentrações de 2,4-D induz o aparecimento de anormalidades, repressão da expressão gênica, entre outros efeitos, há necessidade de avaliar o processo de produção de mudas por esta via até o estabelecimento e desenvolvimento em campo.

O tipo de explante determina a população fenotípica das células empregadas na desdiferenciação e por sua vez os fatores relacionados como estabilidade genética, grau de desdiferenciação, potencial de expressão gênica, entre outros. Neste contexto, a técnica de cultura de células em camada fina, considerada como um modelo oposto às técnicas de cultura de tecidos convencionais pelo uso de explantes de tamanho reduzido facilita as respostas dependentes do meio reduzindo a dependência de outros fatores.

Para o caso do estudo em araçazeiro, quando utilizadas porções de hipocótilo nota-se que quando utilizadas baixas concentrações, tanto com 2,4-D

quanto de cinetina, há percentuais acima de 90 % de explantes com formação de calo, enquanto quando utilizados explantes foliares, estes foram inferiores a 50 %.

Baseados no mesmo princípio, Nhut *et al.*, (2007) na propagação *in vitro* por organogênese de *Passiflora edulis*, conseguiu percentuais de 100 % de formação de calo e sua posterior diferenciação para formação de mudas. Por sua vez, Silva *et al.*, (2007) citaram o sucesso da aplicação do sistema na micropropagação de *Citrus sp*, *Poncirus trifoliata*, *Manihot sculenta*, *Garcinia mangostana*, entre outras.

De maneira global, os resultados da aplicação desta técnica, possibilitam o desenvolvimento das fases subseqüentes, não só para diferenciação de estruturas senão para estudo de outras aplicações como culturas celulares, estudos fisiológicos, entre outros.

#### **4.5 Estudo anatômico da desdiferenciação celular durante a calogênese**

Os explantes empregados no estabelecimento de cultura de tecidos primária consistem em pequenas populações fenotípicas de células que podem variar na morfologia básica, respostas bioquímicas, atividade e fase do ciclo mitótico, entre outras (Sondhal *et al.*,1991).

Em um órgão, existem grupos celulares cumprindo funções específicas que na indução de calogênese reagem em tempo e forma diferentes de acordo com sua determinação e competência. Assim, por exemplo, Webster & Davidson, 1968 observaram que os meristemas apicais de *Vicia faba* mostraram diferença nos tempos do ciclo mitótico dentro mesmo explante, sendo que alguns grupos celulares apresentam ciclo mais longo do que outros enquanto algumas células não se dividem.

No caso do araçazeiro, observa-se nos cortes histológicos provenientes da lâmina foliar que estes apresentavam uma estrutura típica bifacial, sendo que o parênquima paliçádico (PP) está localizado na face adaxial (AD) e o parênquima lacunoso (PL) na face abaxial (Figura 36). No corte transversal das diferentes regiões observa-se que cada face apresenta uma epiderme uniestratificada com células retangulares alongadas. A região subepidérmica da face adaxial apresenta células maiores em comparação com as células da face abaxial (AB). Observa-se uma camada dupla de células do parênquima paliçádico nem sempre coberta por uma camada de células epidérmicas de maior tamanho em comparação aquelas da face abaxial.

Na Figura 36 também é possível observar, nas faces abaxial e adaxial, a ocorrência de cavidades proeminentes que correspondem a vesículas secretoras (VS). Dita característica é comum em varias espécies das Myrtaceae (Gomez *et al.*, 2009). Estas cavidades têm origem a partir de uma única célula protodérmica que inicialmente destaca-se pelo seu conteúdo denso e que após divisões periclinais dão origem aos estratos celulares, que recobrirão a cavidade ou darão origem às células secretoras (Arruda & Fontenelle, 1994)

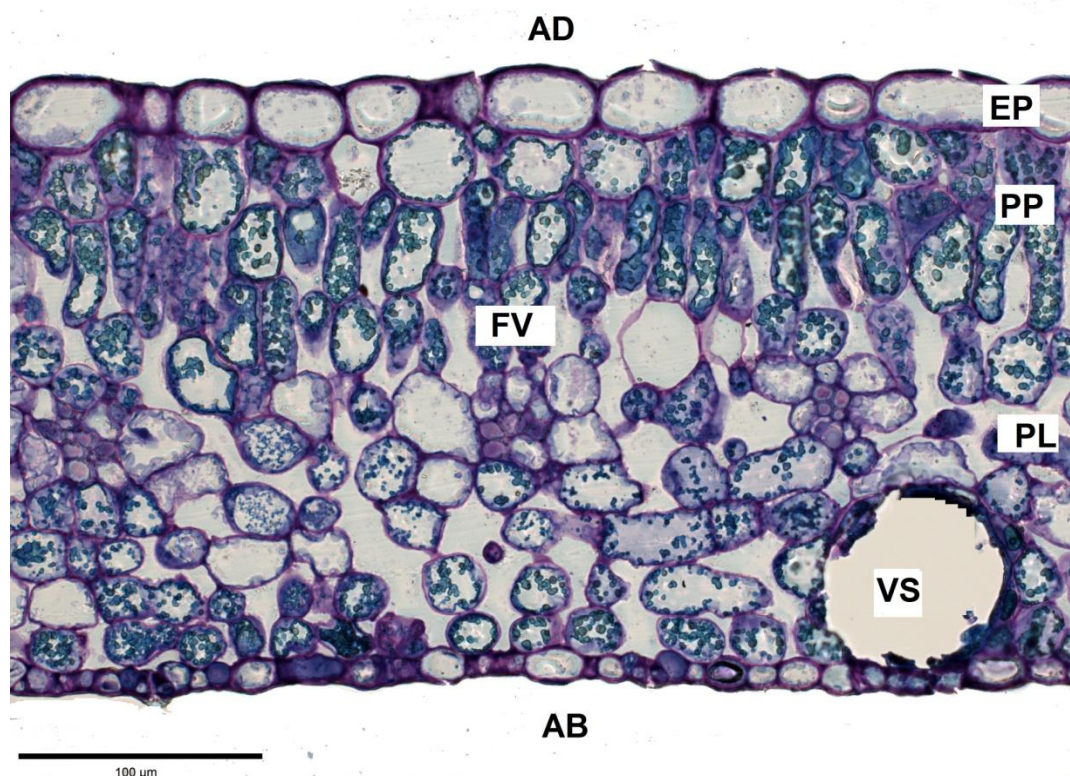


FIGURA 36. Corte transversal da região média de folha de araçazeiro. AB= Face abaxial. AD= face adaxial. EP= Epiderme. PP= parênquima paliádico. PL= parênquima lacunoso. FV= Feixe vascular. VS= Vesícula secretora (barra = 100  $\mu$ m). UFRGS, Porto Alegre 2013.

O corte da região da borda da lâmina foliar mostra que esta é constituída por células de maior tamanho, que acumulam compostos que reagem fortemente ao azul de toluidina e tornam-se mais homogêneas conforme aproximam-se da região central (CE), sendo também estas células das margens e do ápice da folha mais estreitas e de parede visivelmente mais espessa (Figura 37). Esta região é constituída majoritariamente por células parenquimáticas sem a presença de feixes vasculares. A eliminação, da região da borda foliar (AP) na obtenção dos explantes a ser inoculados é necessária para aumentar a eficiência na desdiferenciação do tecido (Bartos, 2012) (Figura 37).

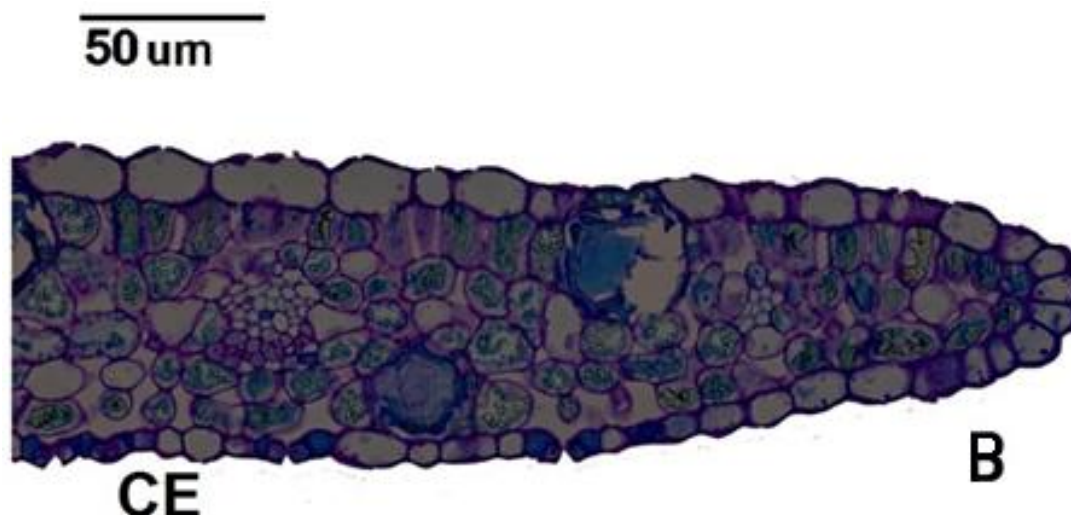


FIGURA 37. Corte transversal da região da borda da lâmina foliar de araçazeiro. CE= Região central da folha. B= borda da folha. UFRGS, Porto Alegre 2013.

Na Figura 38 observa-se corte da região central, utilizada para extração dos explantes. Verifica-se uma camada dupla de células no parênquima paliçádico interrompido nas duas faces pela presença das cavidades secretoras além da presença contínua de feixes vasculares de tamanho reduzido, que são os de maior atividade na calogênese (Figura 39). Os elementos de condução estão constituídos por diferentes células como as células meristemáticas, caracterizadas por seu tamanho reduzido em comparação com àquelas.

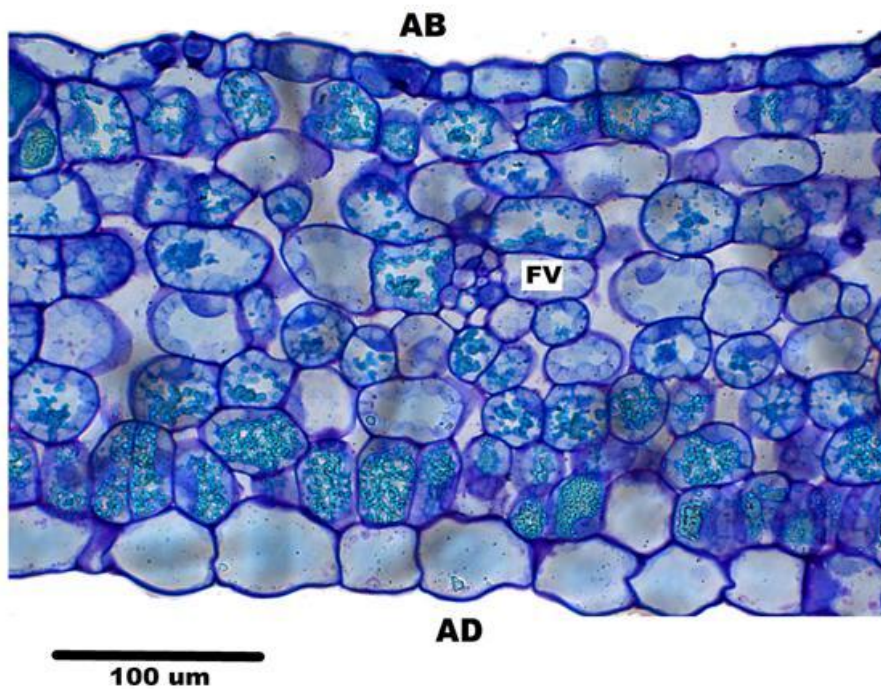


FIGURA 38. Corte transversal da região central de folha de araçazeiro. AB= Face abaxial. FV= Feixe vascular. AD= Fase adaxial. UFRGS, Porto Alegre 2013.

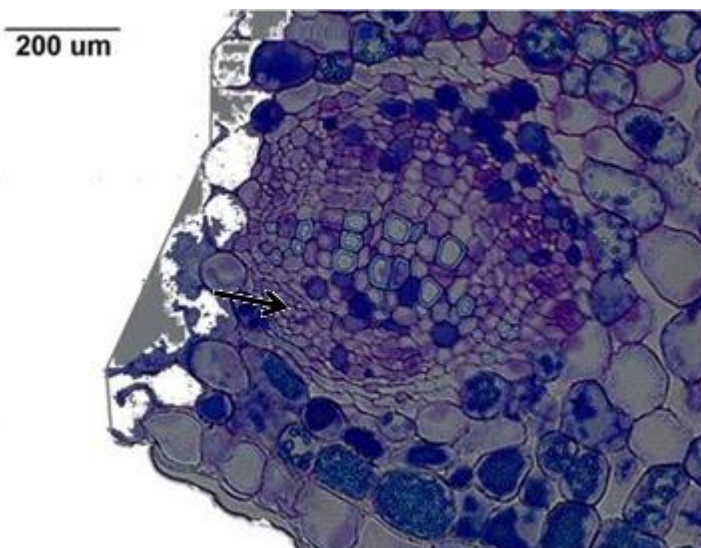


FIGURA 39. Detalhe do feixe vascular em corte transversal da região central de lâmina foliar de araçazeiro nos primeiros dias após incubação em meio de cultura. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Corroborando o exposto por O'brien *et al.*, (1964 ), o azul de toluidina definiu as secções dos tecidos pela coloração de diferentes composições da



parede diferindo fortemente na cor como observa-se na região dos feixes vasculares onde o mesmo tecido é constituído por fibras de diferente grau de lignificação; assim por exemplo, uma secção de fibras jovens reage com azul de toluidina tornando as paredes primárias na coloração azul esverdeada.

A coloração azul mais intensa observada nas glândulas e em algumas células, como as que se encontram na periferia dos feixes, corresponde possivelmente a compostos fenólicos liberados como resposta às trocas que ocorrem nesta região (Mariath, 2012).

### **Análise da sequência no desenvolvimento do calo**

Os explantes foliares de araçazeiro inoculados em meio de cultura de indução de calos previamente foram avaliados quanto à transição da sua morfologia interna. No tempo zero (controle) verifica-se a diversidade da constituição celular dos tecidos foliares e a necrose das células nas regiões dos cortes (Figura 40). No primeiro mês após a inoculação, a análise ontogênica mostra principalmente a maior atividade mitótica a partir de grupos celulares associados aos feixes vasculares (Figura 40a). Estas primeiras respostas, segundo Cutler (2011), são devidas a que a região perivascular, caracterizada como uma endoderme é a primeira camada do cilindro central e de maior atividade meristemática.

Observa-se também nesta região dos feixes, mudança da estrutura no parênquima que os circunda ao mesmo tempo em que esses vão se reorganizando também, especialmente onde há pressão mecânica exercida pelas células em divisão e expansão. Observa-se aumento no tamanho das células e a espessura da lâmina foliar (Figura 40 d). Corroborando os resultados anteriores, Menéndez-Yuffa & Garcia, (1997) na indução de embriões somáticos com

cafeeiro, relatam também a ruptura da epiderme causada pela pressão mecânica exercida pela proliferação da massa celular.

Na região do periciclo perivascular e células do parênquima observa-se a ocorrência atividade de divisão, que levaram à formação de linhagens celulares de tipo meristemática. Trabalhos de calogênese a partir de lâmina foliar com cafeeiro relatam a ontogenia do calo a partir de células do mesófilo, ao nível do parênquima esponjoso sendo algumas vezes originado no parênquima paliçádico (Menéndez-Yuffa & García, 1997). Por sua vez, Scherwinski-Pereira *et al.*, (2012) na indução de embriogênese somática a partir de tecido cotiledonar de açai (*Euterpe oleracea*) observaram que as primeiras divisões celulares ocorreram na região da epiderme e subepiderme do explante. As células observadas, de competência embriogênica, caracterizaram-se por ter núcleo proeminente, citoplasma denso e linhagens finas dividindo-se em forma irradiada.

A origem múltipla na formação do calo é referida por vários autores. Em *Coffea canephora* relatou-se que células perivascularares do feixe e muitas células do mesófilo próximas ao bordo do explante foram as primeiras a se dividir em (Menéndez-Yuffá & García, 1997; Berthouly & Ferriere,1996). Outros estudos histológicos das estruturas globulares, durante a formação de calo na superfície cotiledonar, em *Glicine max* observaram que estas originaram-se a partir da divisão das células subepidérmicas no mesófilo cotiledonar (Fernando *et al.*, 2002).

Durante esta etapa, paralelo à perda da estrutura do parênquima paliçádico pela pressão mecânica exercida na formação das massas celulares, observou-se que não há participação desta região na formação do calo (Figura 40d) até a protrusão da massa celular.

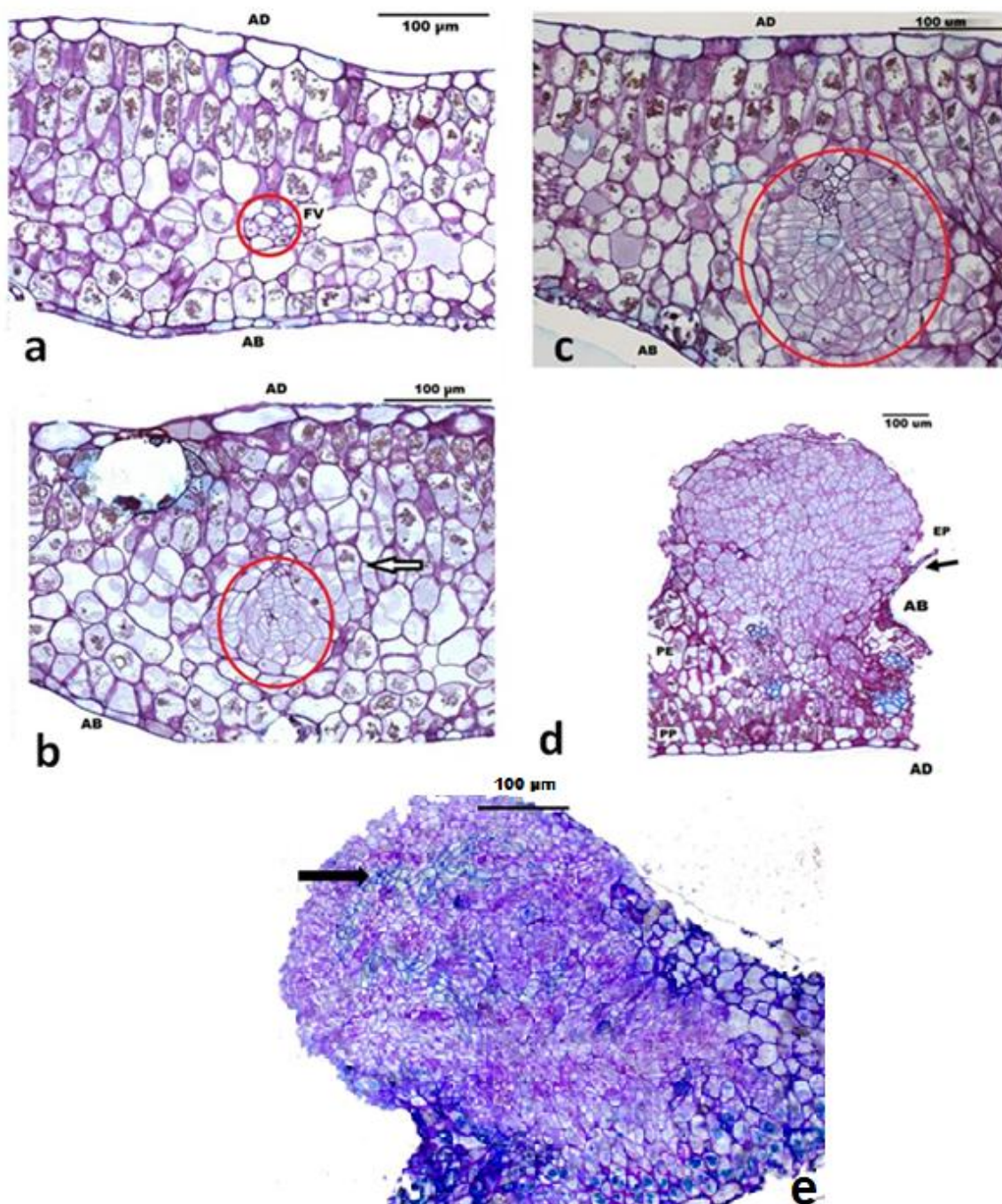


FIGURA 40. Sequência do desenvolvimento do calo a partir de células associadas ao feixe vascular em folha de araçazeiro; a. Aspecto de feixe vascular no estabelecimento; b. Formação de linhagens celulares na região perivascular; c. Projeção das linhagens celulares da formação do calo para a face abaxial; d. Calo formado após 45 dias; e. Região de calo após 40 dias corado com azul de toluidina evidenciando formação de elementos de condução. UFRGS, Porto Alegre 2013.

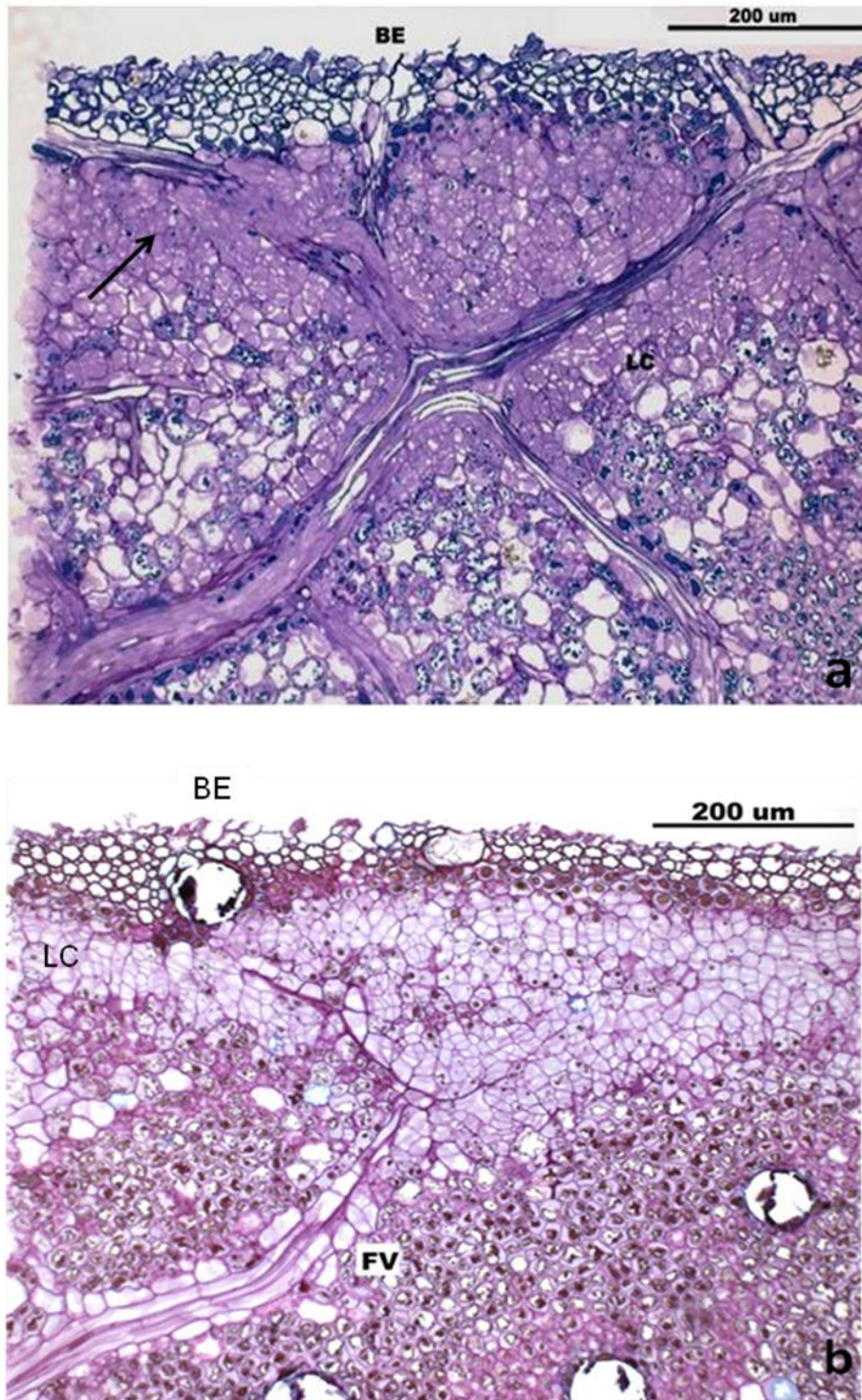


FIGURA 41. Detalhe do feixe vascular em corte paradérmico da região central de lâmina foliar de araçazeiro; a. corte corado com azul de toluidina mostrando maior atividade mitótica na região da borda e periferia dos feixes. b. corte com teste PAS evidenciando acúmulo de polissacarídeos nas células periféricas ao tecido condutor. BE= borda do explante. LC= Linhagens celulares. FV= Feixe vascular. BE= Borda do explante. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Após os eventos descritos anteriormente, este processo resulta na formação dos primeiros agrupamentos celulares denominados por alguns autores como nódulos (Te-chato & Lim, 1996; Werner *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2005) que darão origem as massas celulares de maior tamanho sendo sua taxa de desenvolvimento sujeita aos gradientes nutricionais e de fitormônios.

De maneira geral, pode-se dizer que os eventos descritos anteriormente, observados durante a formação do calo a partir de folha de araçazeiro seguem os padrões de calogênese descritos por Termignoni, (2005), que são: a) indução, caracterizada pela coloração avermelhada de algumas massas celulares que diferenciam regiões de paredes celulares e formação de tecido condutor na nova região em desenvolvimento possivelmente associado a elementos de condução. Resultados similares foram relatados em *G. max* em que massas celulares globulares mostravam formação de elementos de condução entre as células meristemáticas e seguiram processos morfogênicos distintos dependendo da sua localização ao longo do explante (Fernando *et al.* 2002).

As massas celulares de linhagens celulares concêntricas e presença de células condutoras, obtidas nesta fase apresentam características histológicas similares às descritas por outros autores; Hartweck *et al.*, (1988) testando doses de auxinas e analisando as regiões dentro do explante para induzir formação de embriões somáticos em *G. max*, descreveu ditas estruturas referindo-se a zonas meristemáticas não pró-embriogênicas que deram origem a raízes, enquanto que Fernando *et al.*, (2002) descreveu morfo-anatomicamente os mesmos tipos de protrusão, as quais poderiam se desenvolver em embriões somáticos.

Calos obtidos a partir das folhas de araçazeiro após dois meses de incubação apresentavam característica similar às descritas na fase inicial de outras espécies como cafeeiro. Menéndez-Yuffa & Garcia (1997) mencionaram

que o calo embriogênico a partir de explantes foliares de cafeeiro caracterizou-se pela coloração marrom escura nos estádios prévios à formação do embrião de consistência suave, mas não friável, com uma superfície lisa, algumas vezes com brilho e estruturas globulares de superfície lisa.

Dita mudança de cor referida anteriormente, até o momento da avaliação, foi visível nos calos de araçazeiro, o que denota mudanças fisiológicas internas durante o seu desenvolvimento. Similar ao anterior, Almeida & Silvarolla (2009) na embriogênese somática de cafeeiro relataram a mudança para uma cor marrom do calo friável obtido a partir de explantes foliares como fase prévia à formação dos embriões. Segundo Menéndez-Yuffa & Garcia (1997) este processo leva em torno de oito meses.

### **Teste de polissacarídeos**

Os explantes de lâmina foliar de araçazeiro, desde o momento do estabelecimento no meio de cultura, apresentam acúmulo de polissacarídeos distribuídos principalmente na região do parênquima esponjoso da lâmina foliar e algumas células circundantes dos feixes vasculares como se pode observar na Figura 42. Porém, na visualização com luz polarizada destas regiões não observou-se presença de grãos amido, os quais, segundo Beninca (2008), pela organização molecular, sob luz polarizada apareceriam brancos. Segundo Bartos (2012), isto se deve a que as folhas desenvolvidas, como as utilizadas para a indução do calo neste trabalho, são órgãos denominados fonte e, portanto não realizam estocagem de grandes quantidades de carboidratos.

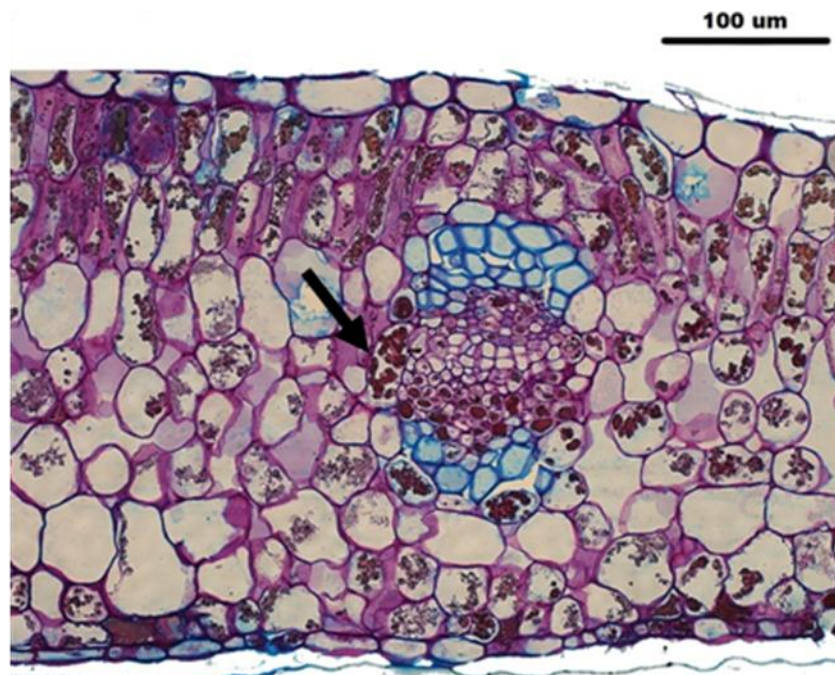


FIGURA 42. Detalhe da região do feixe vascular de explante foliar de araçazeiro, em meio de cultura com citocinina na primeira semana de desenvolvimento de calo, submetido a teste PAS, evidenciando o acúmulo de sacarídeos nesta região. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Durante o processo de desenvolvimento do calo, observa-se perda gradativa dos sacarídeos acumulados nas células em divisão, entanto que nestas últimas não há presença; dita degradação dos sacarídeos acumulados nas regiões de alta mitose atribui-se à grande quantidade de carboidratos que são utilizados na promoção desse desenvolvimento (Bartos, 2012).

Na sequência do desenvolvimento do calo, em corte paradérmico da região da nervura central onde ocorrem as primeiras divisões, observou-se maior acúmulo de polissacarídeos translocados, principalmente na região das células que apresentam maior atividade mitótica (Figura 43). Esta translocação de moléculas de reserva de energia em algumas regiões do explante pode estar relacionada com a preparação de certas regiões para sua ativa divisão celular. Por sua vez, Sharp (1980) salienta que acúmulo de amido também foi observado

em fases posteriores da diferenciação de embriões somáticos. Outros autores como Scherwinski-Pereira *et al.*, (2012) na embriogênese somática de *Eutерpe oleracea*, observaram que em regiões de alta frequência de divisão celular, estas continham grãos de amido, mas tinham baixa densidade citoplasmática. Em geral os grãos de amido se acumularam em células que não exibiam características embriogênicas e estavam localizadas perto das regiões onde esta ocorria.

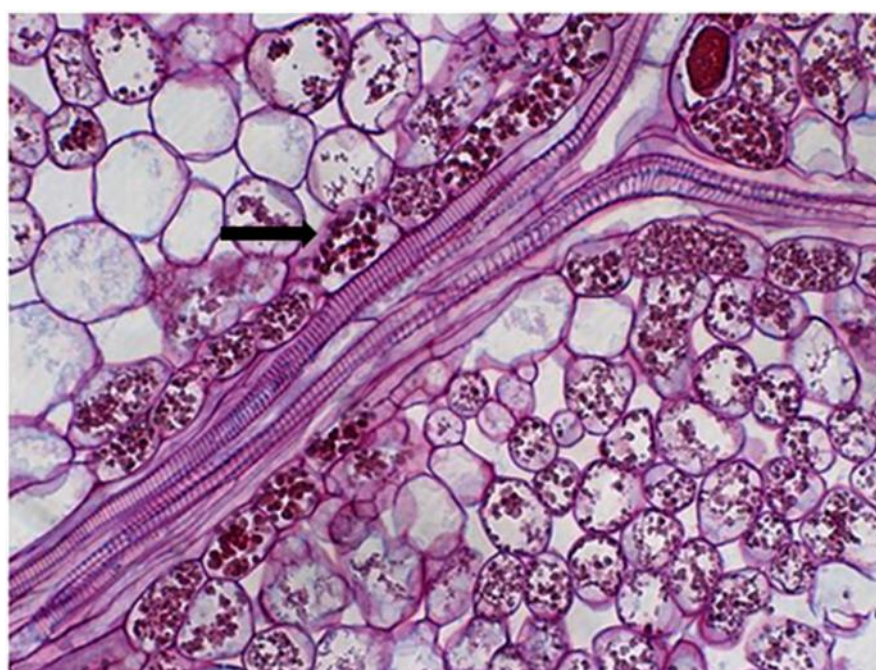


FIGURA 43. Detalhe do feixe vascular em corte paradérmico da região central de lâmina foliar de araçazeiro em meio de cultivo para indução de calogênese com citocinina, evidenciando pelo teste de Schiff (PAS), maior atividade mitótica nas células periféricas do tecido condutor. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

### **Explantes em camada fina de secções de hipocótilo**

De maneira geral, observações da morfologia em corte transversal do hipocótilo, mostram uma constituição ainda não desenvolvida de estrutura típica de caule, sendo pelo contrário caracterizada como uma população de células mais o menos homogêneas de maior tamanho às que compõem a epiderme. Durante o processo de formação do calo observa-se a resposta inicial pela região



do periciclo que começa o desenvolvimento de linhagens celulares se projetando no sentido da epiderme (Figura 44b) e posterior aumento do tamanho das células do tecido em geral.

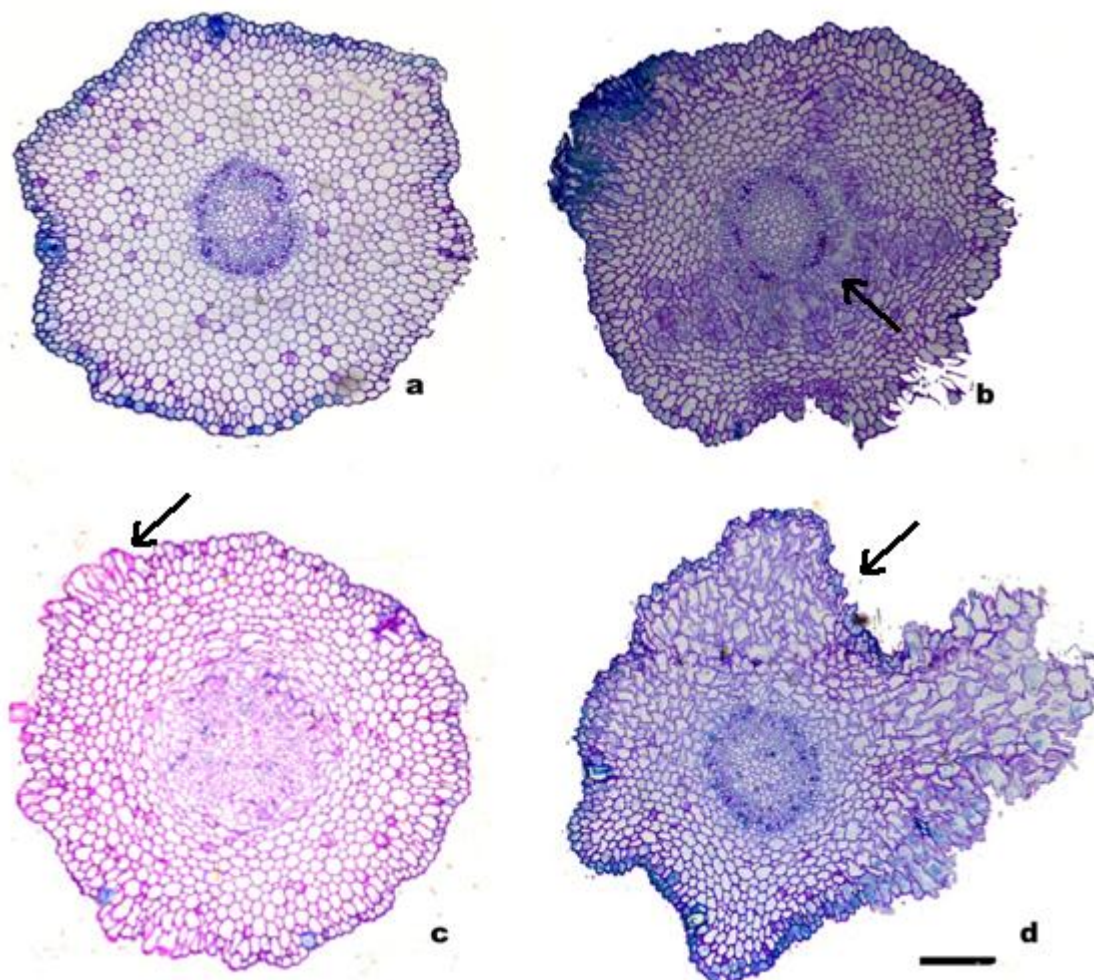


FIGURA 44. Corte transversal de porções de hipocótilo de mudas obtidas por germinação *in vitro* de sementes de araçazeiro nas fases iniciais de desenvolvimento do calo; a. aspecto inicial do tecido no estabelecimento; b. tecido após uma semana mostrando atividade mitótica na zona cambial; c. região da epiderme mostrando atividade mitótica na segunda semana; d. calo após três semanas. (barra = 50  $\mu$ m). UFRGS, Porto Alegre, 2013.

Os calos obtidos após sessenta dias foram analisados sob microscopia óptica em campo escuro onde foi possível evidenciar o aspecto arredondado e desagregado das células que o compõem (Figura 45).

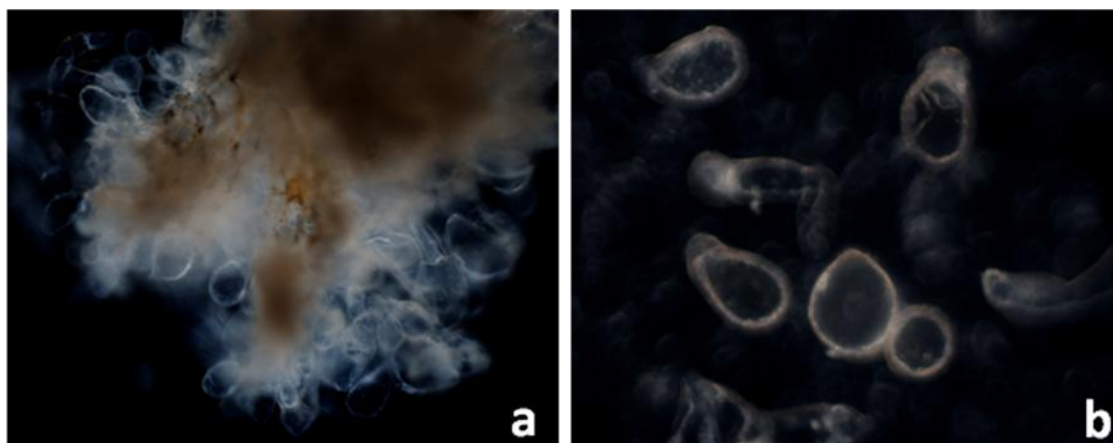


FIGURA 45. Calos obtidos a partir de secções de hipocótilos de mudas de araçazeiro, preparados mediante esmagamento entre lamina e lamínula, observados sob microscopia óptica em campo escuro; a. aspecto geral do calo; b. formas e aspecto desagregante das células do calo. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

## 5 CONCLUSÕES

As principais conclusões do presente trabalho, sob as condições de desenvolvimento dos experimentos e para as espécies em estudo, são:

### **Araçazeiro**

- A emergência de sementes de araçá é inibida pela embebição em soluções de giberelina nas soluções testadas variando entre 10 mg L<sup>-1</sup> e 50 mg L<sup>-1</sup> por 18 horas.
- A submersão das sementes de araçazeiro em solução de NaOCL (2 %) acima de 20 minutos foi prejudicial para o desenvolvimento das plântulas na fase inicial em condições *in vitro*.
- O desenvolvimento de microestacas após 45 dias de incubação foi mais eficiente em meio WPM.
- A propagação por estaquia de folha mostrou baixo potencial para desenvolvimento radicular quando tratadas com AIB e H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- A propagação por estaquia herbácea conseguiu-se a formação de raiz sem o tratamento com AIB.
- O corte reto na preparação das estacas herbáceas de araçazeiro mostrou ser o mais adequado para o desenvolvimento radicular, sendo superior no número e massa seca de raízes por estaca.

- A desinfestação eficiente dos explantes foliares para indução de calo pode ser obtida sem imersão em álcool 70 %, mediante imersão em solução NaOCl (1,5 %) por 10 minutos.
- O uso de porções de hipocótilo, em comparação com explantes foliares mostrou-se mais responsivo na calogênese.
- Menores concentrações testadas de cinetina foram mais eficientes na indução da desdiferenciação quando utilizado como explante secções de hipocótilo de mudas obtidas de sementes germinadas *in vitro*.
- A concentração de 2,4D no meio de cultura foi determinante sobre o tipo de calo dos explantes em camada fina de hipocotilo.

### **Grumixameira**

- É possível a propagação por estaquia de ramos herbáceos ou semilenhosos de grumixameira mediante o tratamento com solução entre 0 e 500 mg L<sup>-1</sup> sem diferença significativa entre elas.
- Para a fase de multiplicação *in vitro* por microestaquia na fase de estabelecimento, o meio desprovido de fitoreguladores ou na presença de AG<sub>3</sub> (1,5 mg L<sup>-1</sup>), mostraram-se os mais adequados.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### **Araçazeiro**

Para posteriores estudos de germinação com araçazeiro é necessário aprofundar nos fatores que afetam o processo nesta espécie a respeito da umidade, época de colheita, massa e tamanho das sementes, entre outras.

Deve-se aprofundar no efeito do pré-tratamento das matrizes para extração das estacas e outros explantes, sendo que, não só a variação da composição dos meios de cultura, mas também o preparo do explante e adequação das condições de crescimento podem incidir no sucesso do estudo.

Em relação à propagação por microestaquia, baseado nos resultados obtidos na avaliação de meios de cultura, é necessário testar outras fontes de explante como rebrotes, meristemas, gemas dormentes, entre outras.

Posteriormente, a partir de estacas *in vitro*, pode-se testar no meio de cultura, concentrações de ácido giberélico na presença em baixa concentração de uma fonte de auxina para estimular a alongação e o desenvolvimento delas, requerido para a fase de multiplicação.

A obtenção de calos é a primeira fase para o desenvolvimento de pesquisas posteriores em algumas técnicas da propagação *in vitro*. A formação de calo obtida, que dependendo dos experimentos, mostrou aspectos diferentes, pode ser continuada para avaliar o seu uso na indução de organogênese ou

embriogênese, sendo que os dois processos precisam de tempos e condições distintas.

### **Grumixameira**

Na propagação por estaquia herbácea ou semilenhosa sugere-se testar o uso de estacas semilenhosas induzidas a partir de matrizes mantidas na posição horizontal, em casa de vegetação, com o intuito de diminuir a dominância apical.

Para propagação *in vitro*, na fase de introdução, testes preliminares mostraram que o estabelecimento em posição horizontal da estaca favorece a superação da dormência e o desenvolvimento da gema, tanto em estacas intermediárias quanto em estacas apicais. De acordo com anterior e baseado nos resultados dos experimentos, sugere-se testar para a fase de multiplicação variação na fonte de reguladores dispondo os explantes na posição mencionada.

De acordo com observações preliminares durante a germinação *in vitro* de sementes, a citocinina quando adicionada ao meio de cultura, induz a formação de multibrotos na região basal do hipocótilo; baseado no anterior, sugere-se testar concentrações deste fitoregulador para aumentar o número de microestacas por esta via.

Contudo, espera-se que o presente trabalho sirva de base para continuar a pesquisa nestas espécies.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOUR, A.; MUÑOZ, A. Micropropagación de *T. grandis* (*Tectona grandis* L.f). **Revista Forestal**, Costa Rica, v. 2, n. 5, p. 1-11, 2005.
- AFELE, J. C.; LANGHE, E. Increasing *in vitro* germination of *Musa balbisiana* seed. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 27-1, p 33-36, 1991.
- AKANEME, F. I.; ENEOBONG, E. E. Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. *Hondurensis* barr. and golf. II: effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 6, p. 757-765, 2008.
- ALCANTARA, G. B. D; *et al.*, Effect of seedling age and season on rooting of *Pinus taeda* L. minicuttings. **Revista Árvore**, v. 31-3, p. 399-404, 2007.
- ALEMMANO, L. *et al.*, Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 92, n. 4, p. 613-623, 2003.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ALVES, E. S; TRESMONDI, F; LONGUI, E. L. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p.241-248, 2008.
- ALMEIDA, J. A. S.; SILVAROLLA, M. B. Induction of somatic embryos of *Coffea arabica* genotypes by 6-benzyladenine. **International Journal of Plant Developmental Biology**, Takamatsu, v. 3, p. 5-9, 2009.
- ALMEIDA, M. *et al.* Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for a organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 1495-1515, 2012.
- ALTOÉ, J. A. *et al.* Propagação de araçazeiro e goiabeira via miniestaquia de material juvenil, **Bragantia**, v. 70-2, p. 312-318, 2011.
- ANDRADE, R. A; MARTINS A. B. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 134-136, 2003.

ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 4, p. 897-903, 2009.

ARORA R.; ROWLAND L. J.; TANINO K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. **HortScience**, Alexandria, v. 38, p. 911–921, 2003.

ARRUDA, R. C. O.; FONTENELLE, G. B. Contribuição ao estudo da anatomia foliar de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 17, p. 25-35, 1994.

BAKRY F. *et al.* Genetic improvement of banana. In: JAIN S. M.; PRIYADARSHAN, P. M. (Ed.). **Breeding plantation tree crops: tropical species**. Berlin: Springer, 2009. p. 3–51.

BARCISZEWSKI, J.; MASSIANO, F.; CLARK, B. F. C. Review: kinetin - a multiactive molecule. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 40, n. 3, p. 182–192, 2007.

BARTEL, B. S.; LECLERE, M. M.; ZOLMAN, B.K. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, p. 198–216. 2001.

BARTOS, P. M. C. **Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo**. 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012

BECWAR, M. R.; STANWOOD, P. C.; LEONHARTDT, K.W. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 4, p. 613-618, 1983.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44-2, p.169-176, 1996.

BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 99, p. 1294-1301, 1992.

BORGES, C. S. *et al.* Avaliação citotóxica de formol e hipoclorito de sódio utilizados na desinfestação de sementes em cultura de tecidos de plantas. In: **XIV Congresso de Iniciação Científica**, Universidade Federal de Pelotas, 2005,



BRAUN, H. *et al.* Produção de mudas de tomateiro por estaquia: efeito do substrato e comprimento de estacas. **Idesia**, Arica, v. 28, n. 1, p. 9-15, 2010.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defining hormesis. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 21, p. 91-97, 2002.

CAÑAL, M. J. *et al.* Fisiología del cultivo *in vitro*. **Biotecnología Vegetal**, Santa Clara, v. 1, p. 3-9, 2001.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 657-669, 2006.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 11, p. 47-54, 2004.

CARVALHO, D. C. de; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Organogênese do caqui 'fuyu' a partir de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 303-307, 2004.

CARVALHO, I. S; POLIVANOV, H.; FERNANDES, A. C. S. A utilização do Ácido Periódico de Schiff (PAS.) na definição de estruturas sedimentares biogênicas do Terciário brasileiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 2, p. 203-204, 1988.

CASAGRANDE JUNIOR, J. G. Influência do sombreamento sobre os teores de carboidratos e fenóis em estacas semilenhosas de araçazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 2219-2223, 1999.

CHEYHIYAN, N. Stigma receptivity, flower seedling. Flower abnormality and pollination studies in *Psidium* sp. **Madras Agricultural Journal**, Coimbatore, v. 75, p. 29-32, 1988.

CHHABRA G. *et al.* TDZ-induced direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis on cotyledonary node explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 14-4, p. 347-353, 2008.

COLLADO, R. *et al.* Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King. **Biotecnología Vegetal**, Santa Clara, v. 4, n. 3, p. 143-146, 2004.

CONCEPCION, O.; NAPOLES, L.; PEREZ, A. T. The effect of three antioxidants on the *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.) shoot tips. Relationship between explant origin and phenolic compound content. **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 26, p. 33-9, 2005.

COELHO, M. D. F. B; MAIA, S. S. S; OLIVEIRA, A. K; DIÓGENES, F. É. P; SOARES, S. R. F. Vegetative propagation of liamba, a medicinal plant. **Horticultura Brasileira**, Mossoró, v. 29-3, p.418-420, 2011.

CORDEIRO N. L. *et al.* Stock indexing and *Potato virus Y* elimination from potato plants cultivated *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 525–530, 2003.

CORREIA, D; CORTEZZI G. M. E. *In vitro* propagation of black wattle (*Acacia meamsii* de wild), research paper. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, v. 48/49, p. 117-125, 1995.

CUTLER D.F; BOTHA T; STEVENSON D. W. **ANATOMIA VEGETAL - UMA ABORDAGEM APLICADA**, Ed. ARTMED, 2011, 304 p.

DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 445-453, 2006.

DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation, technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991.

DUANGPORN, P. SIRIPONG, P. Effect of auxin and cytokinin on phyllanthusol A production by callus cultures of *Phyllanthus acidus* Skeels. **American Eurasian Journal Agricultural and Environtal Science**, 5, 258-263, 2009.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 2002. 288 p.

DONATO A. M.; MORRETES B. L. de. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 230 p.

DUTRA, L.F. *et al.* Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59-2, p. 327-333, 2002.

EMMANUEL, E. *et al.* Toxicological effects of disinfestations using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Oxford, v. 30, p. 891-900, 2004.

ERIG A. C.; SCHUCH M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

FACHINELLO, J. C. *et al.* **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: Universitária, 1995. 178 p.

FEDER N.; O'BRIEN T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FEHER, A. *et al.* The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 3, p. 823-826, 2008.

FEHÉR, A.; TARAS, P. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, p. 201-228, 2003.

FELZENER, L. *et al.* Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas caulinares de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa*, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 29, p. 399-402, 2007.

FERNANDO, J. A. *et al.* Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 3, p. 277-286, 2002.

FERNANDEZ F. F. *et al.* Avaliação da atividade de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Burseraceae como agentes tripanossomicidas. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3., 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1997.

FERREIRA, I. T. **Propagação in vitro de crisântemo 'Funny Pynk'**. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

FERREIRA, M. Melhoramento e silvicultura intensiva clonal. **IPEF / Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 45, p. 22-30, 1992.

FERREIRA, W. R.; RANAL M. A. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. var. *parachinensis* (Bailey) sinskaja (couve-damalásia). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34-3, p.353-361, 1999.

FLORIANO, E. P. **Produção de mudas clonais por via assexuada**. Santa Rosa: [S.n.], 2004. 37 p. (Série cadernos didáticos, 3).

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 41-71, 2005.

FRANZON, R. C. *et al.* **Araças do gênero Psidium**: principais espécies, ocorrências, descrição e usos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009. 48 p.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 64, p. 162-164, 1979.

GABRIEL, B. L. **Biological electron microscopy**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982.

GARCIA, C. L. *et al.* Cinética enzimática de la Polifenol oxidasa del banano *Gros michel* em diferentes estados de maduración **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, Medellín, v. 13, n. 2, p. 13-19, 2006.

GARCIA, E.; MARTINEZ, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from stem nodal sections. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145. p. 526-530, 1995.

GEORGE, E. G.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial operations**. Basingstoke: Exegetics, 1984. 709 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1993. 2 v.

GEORGE E. F.; HALL M. A.; DE KLERK G. J. Effect of the physical environment. In: GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 423–464.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial section. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 132, n. 1, p. 81–85, 1983.

GOLLE, D. P. *et al.* Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GOMES S. M. *et al.* Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

GREENBERG, J. T. Programmed cell death: a way of life for plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 12094–12097, 1996.

GROUT, B. W. W. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. methods in molecular biology. In: HALL, R. D. **Plant cell culture protocols**. Dordrecht: Springer, 1999. v. 3, p. 115-125.

GUERRA M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia vegetal**. 2007. Apostila de aula. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/ldgv/Apostila.html>>. Acesso em: 14 maio 2012.

GUPTA P.K.; DURZAN D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **Biotechnology**, Davis, v. 5, p. 147-151, 1987.

GUPTA, P. K.; HOLMSTROM, D. Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. In: JAIN, S. M. **Protocol for somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 573–575.

HALL, D. O; RAO, K. K. **Photosynthesis (studies in biology)**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 214 p.

HARTWECK, L. M. *et al.* Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons, *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 24, n. 8, p. 821-828, 1988.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant propagation**. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1983. 727 p.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation**: principles and practices. 7th ed. New York: Englewood Clippings/Prentice Hall, 2002. 880 p.

HASSANEIN, A. M.; AZOOS, M. M. Propagation of citrus *reticulata* via *in vitro* seed germination and shoot cuttings. **Biologia Plantarum**, Sohag, v. 47, n. 2, p. 173-177, 2003.

HAVEL, L.; DURZAN, D. J. Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of *Norway spruce*. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 157, p. 8-16, 1996.

HAYES, L. A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001, 1886 p.

HOPPE, J. S. *et al.* **Produção de sementes e mudas florestais**. 2. ed. Santa Maria: UFSM. PPGEF, 2004. 388 p. (Caderno didático, 1).

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, p. 105-119, 1993.

JIMENEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p.196–223, 2001.

JONNY, S. P. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agrolivros, 2005. 256p.

KEFELI, V; KALEVITCH, M; BORSARI, B. Phenolic cycle in plants and environment. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Cary, v. 2, p. 13-18, 2003.

KOHAMA, S. *et al.* Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, p. 72-78, 2006.

KOMAMINE, A; *et al.* Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.28-1, p. 11-14, 1992.

KOMISSAROV, D. A. **Biological basics for the propagation of wood plants by cuttings**. Jerusalem: IPST Press, 1968. 250 p.

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.

LATTUADA, D. S. **Micropropagação e miniestaquia de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEE, M.; PHILLIPS, R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 413-437, 1988.

LILLIE, R. D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. Blakiston: Editora Guanabara, 1965. 270 p.

LIMA JUNIOR, M. J. V. **Manual de procedimentos para análise de sementes, florestais**. Manaus: UFAM, 2010. 146 p.

LIU, C. *et al.* **Membrane chemical cleaning: from art to science**. 2006. Disponível em: <<http://www.pall.sg/pdfs/Water-Treatment/mtcpaper.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

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

LOPES Z. P. **Propagação vegetativa e interação com endomicorrizas arbusculares em mirtáceas nativas do sul de Brasil**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LORENZI H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. 352 p.

LUDWIG, J. M. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulators**, New York, v. 32, p. 219-230, 2000.

LUDWIG-MÜLLER, J.; COHEN, J. D. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, p. 320–329, 2002.

LUNA, T. Vegetative propagation of coastal redwood (*Sequoia sempervirens* (Lamb. ex D. Don) Endl.). **Native Plants Journal**, Madison, v. 9, n. 1, p. 25-28, 2008.

LUQUE, R.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roese (1972) – modificado – e Kropop (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcito 8 GS ou 8 GX. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 199-212, 1996.

MA, G.; XU, Q. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, p. 281–288, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 176-177, 1962.

MAKOWCZYŃSKA, J.; ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E.; MAREK, K. Cream-coloured and green-coloured lines of the nonmorphogenic callus of *plantago asiatica* L. ultrastructure analysis. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warszawa, v. 74, n. 3, p. 187-192, 2005.

MALAGGI J; Viecelli C.A; Silva C T. Tratamentos pré-germinativos em couve-flor, cascavel **Cascavel**, v.4-4, p.81-91, 2011.

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

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: Editora UFV, 2005. 451 p.

MARTINOTTO, C. *et al.* Efeito da escarificação e luminosidade na germinação in vitro de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 1668–1671, 2007.

MARTINS, M.; SARMENTO, D.; OLIVEIRA, M. M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 492–496, 2004.

MATHEUS M. T. *et al.* Efeitos de tratamentos térmicos na germinação de sementes de grumixama (*Eugenia brasiliensis*). In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5., 2005, José dos Campos. **Anais...** José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

McDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 100, n. 8, p. 405-414, 1976.

MEINS JUNIOR, F. Heritable variation in plant cell culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 34, p. 327-346, 1983.

MENÉNDEZ-YUFFÁ; GARCÍA, G. E. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". **Protoplasma**, New York, v. 199, p. 208-214, 1997.

MIYAWAKI, M. **Control of polyphenol oxidase and pectin methylesterase activities by ultra high pressure**. 2006.105 f. Tese (doutorado)- Department of Food Science and Human Nutrition, faculty of Washington State University, 2006.

MOREL, G.; WETMORE R.H, Fern callus tissues culture. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 38, p. 141-143, 1951.

MOTOIKE, S. Y. *et al.* Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOTYKA, V. *et al.* Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, p. 1035-1043, 1996.

MROGINSKI, E. *et al.* Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via organogenesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, p. 129-134, 2004.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135– 66, 1974.

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

NAMASIVAYAM P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, p. 1-8, 2007.

NAVARRETE-LUNA, M.; VARGAS-HERNÁNDEZ, J. Propagación asexual de clones de *Eucalyptus camaldulensis* utilizando radix en diferentes concentraciones. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 11, n. 2, p. 111-166, 2005.

NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology: basics and application**. Berlin: Springer, 2009. 333 p.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLESEN, P. O. On cyclophysis and topophysis. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 27, p. 173-178, 1978.

OLIVEIRA, A. F. *et al.* Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 117-125, 2003.



OLIVEIRA, M. C. D; *et al.* Germinação de sementes de atemoia (*Annona Cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv 'Gefner' submetidas a tratamentos com ácido Giberélico (GA3) e ethephon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Brasília, v.32-2, p. 124-130, 2010 .

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. Micropropagación. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária), 2002. v. 1, p. 163-172.

OLMOS, S.; LUCIANE, G.; GALDEANO, E. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. In: LEVISTOS, G. *et al.* (Ed.). **Biotecnología y mejoramiento vegetal II**. [Buenos Aires]: INTA, 2010. p. 351-376.

PAN, M. J.; STADEN J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review, **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 155–163, 1998.

PANDEY, Y. R. *et al.* *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **The Kasetsart Journal**, Bangkok, v. 31, n. 1, p. 81-86, 1997.

PASTERNAK, T. *et al.* The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 129, p. 1807-1819, 2002.

PEDROSO M. C.; PAIS M. S. Direct embryo formation in leaves of *Camillia japonica* L. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n.11, p. 639-643, 1993.

PEREIRA, A. R. *et al.* Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 4, n. 1, 77-80 2003.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande Naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, n. 1, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, J. E. S; MATTOS, M. L. T; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PESCADOR, R. *et al.* Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

PICOLOTTO L. *et al.* Efeito do hipoclorito de sódio, foto período e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2007.

PIMENTEL, N. W. *et al.* Efeito das concentrações de vitaminas e reguladores de crescimento no superbrotamento da cultivar BRS-verde. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 152-157, 2008.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 49-50.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 2, p. 36-39, 1983.

PORTAL G. N. *et al.* Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento *in vitro* del Guayabo. **Biotecnología Vegetal**, Santa Clara, v. 3, n. 2, p. 169 - 172, 2003.

POTTERS, G. *et al.* Stress induced morphogenic responses: growing out or trouble? **Trends in Plant Science**, Groenenborgerlaan, v.12, p. 98-105, 2007.

PREECE J. E; TRIGIANO, R. N. **Tissue culture of woody plants**. In: JONES, R. K.; BENSON, D. M. (Ed.). Diseases of woody ornamentals and trees in nurseries. St. Paul: APS Press, 2001. p. 451–456.

PROPONOE, W. **Manual of tropical and subtropical fruits**. New York: Mcmillan, 1920. 474 p.

QUADROS, K. M. **Propagação vegetativa de erva mate (Ilex paraguariensis Saint Hilaire- Aquifoliaceae)**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

QUORIN M; LEPOIVRE P. Etudes de mileux adaptes aux cultures *in vitro* de prunes. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977

MANOJ, K. R. Biotechnological advances in guava ( *Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. **Trees, Structure and Function**, Berlin, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2010.

REIS, E.; BATISTA, M. T.; CANHOTO, M. T. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in Feijoa Sellowiana Berg. **Protoplasma**, New York, v. 232, n. 3/4, p. 193-202, 2008.

REZENDE, J. C. *et al.* Influência do meio de cultura e concentração de Agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas das embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

REIDIBOYM-TALLEUX, L. *et al.* Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p. 199-209, 1999.

RIBEIRO, M. P. A. **Operação ótima de reator para síntese enzimática de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos**. 2007. 199 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de

Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ROCA, W. M; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. 970 p.

RODRÍGUEZ, R. *et al.* Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahagani* (*Caoba híbrida*) y *Cedrela odorata* (cedro). **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 24, p. 23-27, 2003.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

SALISBURY F. B.; ROSS C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de myrtaceas nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 13-20, 2004.

SANTOS, D. C.; WENDLING, I. Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate. **Revista de Biologia e Farmácia (Biofar)**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 34-42, 2010.

SANTOS, R. B. *et al.* Problemas no cultivo *in vitro*. In: PAIVA R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras, MG: UFLA, 2001. p. 73-79.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, p. 501–508, 2012.

SCHJOERRING K. *et al.* The regulation of ammonium translocation in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 883-890, 2002.

SCIANNA, J. D. *et al.* **Asexual plant propagation: special techniques and considerations for successful high altitude revegetation**. Bridger: United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Bridger Plant Materials Center, 1998. 12 p.

SEABROOK, J. E. A. Changing the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* by varying the illumination source. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 212, p. 401-410, 1987.

SHARP, W. R. *et al.* The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. In : JULES, J. **Horticultural Reviews**, New York, v. 2, p. 268–310, 1980.

SILVA, A. L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiationaux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **The Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Villenave d'Ornon, v. 29, p. 1-9, 1995.

SILVA, J. A. T. *et al.* Thin cell layers: developmental building blocks in ornamental biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, Takamatsu, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

SILVA, T. S. *et al.* The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, p. 397-410, 2003.

SILVA L. B.; MEDEIROS J. D. Anatomia foliar comparativa de *Psidium cattleianum* Sab. (Myrtaceae). **Insula**, Florianópolis, v. 34, p. 15-38, 2005.

SINGH S. K. *et al.* Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajaba* L cv. Allahabad Safeda, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 213–221, 2002.

SINGH M, JAISWAL U, JAISWAL VS. *In vitro* regeneration and improvement in tropical fruit trees: an assessment. In: SRIVASTAVA PS, NARULA A, SRIVASTAVA S (eds) Plant biotechnology and molecular markers. **Anamanya Publishers**, New Delhi, p. 228–243, 2004.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118–131, 1957.

SKOOG, P.; TSUI, C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured “*in vitro*”. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, p. 782-787, 1948.

SMETANSKA, I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, Berlin, v. 111, p. 187–228, 2008.

SONDHAL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. Propagacion *in vitro* de café In: **CULTIVO de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. Cap. 11, p. 271-294.

SOUZA, P. V. D.; CARNIEL, E.; FOCESATO, M. L. Efeito da composição do substrato no enraizamento de estacas de maracujazeiro azedo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 276-279, 2006.

STEFANELLO, S. *et al.* Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 117–126, 2005.

SMETANSKA, I. Production of secondary metabolites using plant cell culture. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, Berlin, v. 111, p. 187-228, 2008.

STRITTMATTER, C. G. D. Nueva técnica de diafanización. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, La Plata, v. 15, p. 126-129, 1973.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4th ed. Sunderland: Sinauer, 2004.

TAVARES, M. S. W., KERSTEN, E., & SIEWERDT, F. Efeitos do ácido indolbutírico e da época de coleta no enraizamento de estacas de goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52-2, p.310-317, 1995.

TAYLOR, N. J. *et al.* Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 25-34, 2001.

TAYLORSON, R. B.; HENDRICKS, S. B. Dormancy in seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 331-353, 1997.

TEALE, W. D.; PAPANOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 7, p. 847-859, 2006.

TE-CHATO, S.; LIM, M. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 59, n. 2, p. 89-93, 1999.

TEAOTIA, S. S.; PHOGOT, K. P. S.; SRISVATAVA, V. S. Blossom biology studies in *Psidium* species. **Progressive Horticulture**, Chaubattia, v. 2, n. 3, p. 101-112, 1970.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre, UFRGS, 2005, 182p.

TOONEN, M. A. J. *et al.* Description of somatic-embryo- forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. **Planta**, Berlin, v. 194, p. 565–572, 1994.

VARGAS, T. E. *et al.* Plant regeneration of *anthurium andreanum* cv rubrun. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 7, n. 3, p. 1-5, 2004.

VASCONCELLOS, R. C. C.; ALMEIDA, J. A. S.; SILVAROLLA, M. B. Indução de embriões somáticos em exemplares foliares de genótipos de *Coffea arabica* em presença da citocinina 2-*ip*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória, ES. **Anais...** [Brasília: Embrapa Café], 2009.

VIEIRA, R. F. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 320 p.

VILLALOBOS, A. V. M. **Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libre de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos**. 1979. 94 f. Tesis (Maestría en Ciencias) – Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 1979.

VILORIA V., Z. J. **Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.)**. Maracaibo: La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía, 1993. 35 p. Fase I. Trabajo de ascenso.

WAKSMAN, S. A.; SCHATZ A. Strain specificity and production of antibiotic substances: VI. strain variation and production of streptothricin by actinomyces lavendulae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 31, n. 7, p. 208–214, 1945.

WASSINK, E. C.; STOLWIJK J. A. J. Effects of light quality on plant growth. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 7, p. 373-400, 1956.

WEBSTER, P. L.; DAVIDSON, D. Evidence from Thymidine-H-Labeled meristems of *Vicia faba* of two cell populations. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 39, n. 2, p. 332-338, 1968.

WELANDER M; MAHESWARAN G. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. **Journal of Plant Physiology**, v.140,p. 223–228, 1992.

WENDING I; XAVIER A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de eucalyptus. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.38-4, p. 475-480, 2003.

WENT, F. W.; THIMANN, K. V. **Phytohormones**. New York: MacMillan, 1937.

WILLIAMS, J. *et al.* **Biodiversity**. Canberra: Australia State of the Environment Report, 2001.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

ZVALETA-MANCERA, H. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 12, p. 1572-1582, 2007.

## 8 APÊNDICES

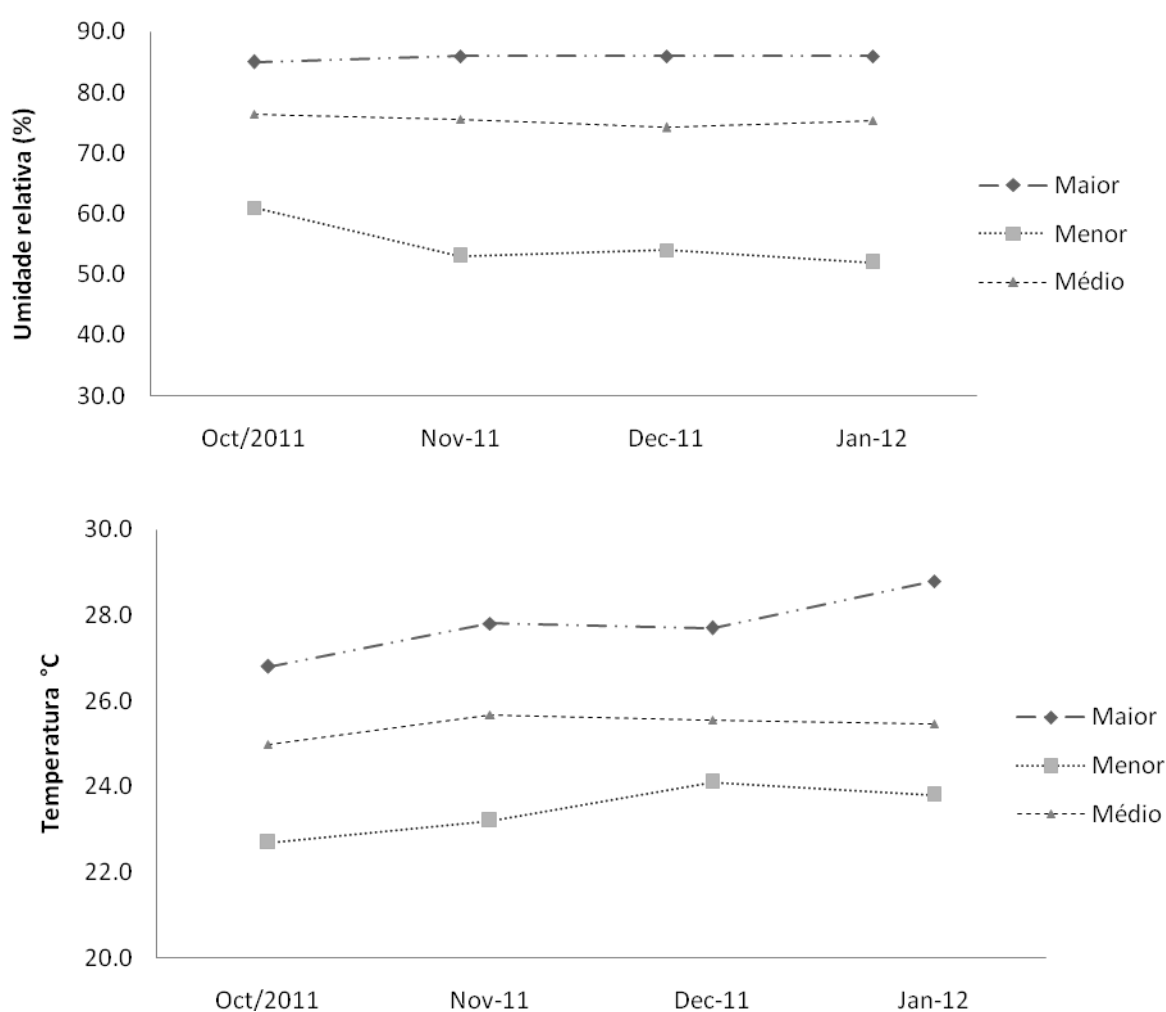
Apêndice 1. Composição de meios de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962), WPM (Lloy e McCown, 1980), LPm (Von Arnold & Eriksson, 1981) e DSD1 (Von Arnold & Eriksson, 1981). Porto Alegre, 2013.

SAIS	MS	WPM	LPm	DSD1
(mg L <sup>-1</sup> )				
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1.650	400	1.200	100
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1.900		1.900	1000
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440	96	180	
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>		556		500
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170	170	340	100
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>		990		
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370	370	370	180
<b>Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O</b>	37,3	37,3	19	27,5
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27,8	27,8	14	37,5
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	22,3	22,3	1,69	1,2
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8,6	8,6	2,88	1
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,2	6,2	0,63	1
<b>KI</b>	0,83		0,75	-
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0,025		0,0025	0,025
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,25	0,25	0,025	-
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0,025		0,0025	0,025

De acordo com a finalidade do meio, a composição do meio foi acrescentada com sacarose, reguladores de crescimento, vitaminas e gelificado com Phytigel ®(Sigma)

Apêndice 2. Condições da sala de incubação: Temperatura ( $T^{\circ}$ ), umidade relativa (U.R) e Irradiância ( $\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Porto Alegre 2013.

	Sala de incubação								
	Out/2011		Nov/11		Dez/11		Jan/12		Mai/12
	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	U.R (%)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	U.R (%)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	U.R (%)	( $^{\circ}\text{C}$ )	U.R(%)	I $\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Maior	26,8	85,0	27,8	86,0	27,7	86,0	28,8	86,0	37,5
Menor	22,7	61,0	23,2	53,0	24,1	54,0	23,8	52,0	12,7
Médio	25,0	76,4	25,7	75,6	25,6	74,2	25,5	75,4	21,9





Apêndice 3. Condições da sala de nebulização: Temperatura ( $T^{\circ}$ ) e umidade relativa (U.R). Porto Alegre, 2012.

