

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ADEMIR GOELZER

**Multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.
Berg (Myrtaceae)**

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ADEMIR GOELZER

**Multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.
Berg (Myrtaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação da Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani.

**Dourados
Mato Grosso do Sul
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G595m Goelzer, Ademir.
Multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium*(Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). / Ademir Goelzer.– Dourados, MS: UFGD, 2016.
26f.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Roberta Damiani.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. *Campomanesia adamantium*. 2. ANA. 3. TDZ. 4. 2iP. 5. BAP. I. Título.

CDD –581.634

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

ADEMIR GOELZER

**Multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg
(Myrtaceae)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formadora:

Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

Profa. Dra. Liliam Silvia Candido

Msc. Fernanda Pinto

**Dourados
Mato Grosso do Sul
2016**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani, pela orientação, pela disposição em esclarecer as dúvidas, pelo apoio, pela confiança ao longo do período de pesquisa, pelo exemplo de dedicação como profissional e pelos conselhos pessoais durante esses longos quatro anos.

À todos os excelentes professores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por todo o exemplo, conhecimento passado e auxílio necessário durante o período de graduação.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por serem solícitos a ajudar no dia a dia do laboratório.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização do curso de graduação em Biotecnologia.

À todos os colegas de laboratório do grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal, em especial a acadêmica Thamiris Gatti Déo e aos mestrandos Leandro Darc e Nathaskia Nunes, pela disposição em ajudar e pelo convívio durante este período.

À toda a minha família, ao meu pai Nilson e minha mãe Cristina, meus irmãos Ademar e Jéssica, por todo incentivo, suporte, apoio e amor.

Aos grandes amigos da época de Itamarati, aos amigos da biotec e aos demais amigos que são tantos.

Ao Centro Acadêmico Pantaneiro de Biotecnologia, onde tive a oportunidade de fazer parte da gestão e consegui desenvolver muitas habilidades necessárias no mercado de trabalho.

Agradeço a todos aqueles que aqui não foram nomeados, mas que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes ao meu desenvolvimento pessoal.

À Deus pela existência de tudo e de todos.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÕES	22
5. REFERÊNCIAS	23

**Multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg
(Myrtaceae)**

RESUMO

Campomanesia adamantium, popularmente conhecida como guavira, é uma frutífera nativa do Cerrado. A espécie é encontrada em grande maioria no estado silvestre e apresenta limitações na propagação relacionada à recalcitrância das sementes. Considerando a ausência de manejo e tratos culturais, o estabelecimento da cultura *in vitro* a partir de material vegetativo está sujeito a altos índices de contaminação fúngica e bacteriana. Visando a propagação, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de guavira, utilizando como fonte de explantes, segmentos caulinares retirados de plântulas obtidas da germinação *in vitro*. Para atingir o objetivo proposto foram realizados três experimentos distintos, sendo avaliados o efeito de 5,0 µM de TDZ (thiadizuram), 1,0 µM de ANA (ácido naftaleno acético) e a combinação dos mesmos, bem como, o efeito isolado de BAP (6-benzilaminopurina) e isolado de 2iP (2-isopentenil adenina), nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹. Os resultados obtidos demonstraram que o uso de 5,0 µM de TDZ aumentou o comprimento das brotações, o número de gemas e a taxa de multiplicação, enquanto a combinação de TDZ e ANA exerceu um efeito negativo sobre o crescimento das brotações, o número de folhas e a taxa de multiplicação. O cultivo dos explantes em meio contendo BAP aumentou o número de brotações, proporcionalmente ao aumento da concentração do regulador de crescimento, entretanto, reduziu o comprimento das brotações. Explantes cultivados em meio contendo 2iP foram estatisticamente iguais para as variáveis analisadas entre as concentrações testadas.

Palavras-chave: *Campomanesia adamantium*, ANA, TDZ, 2iP, BAP

***In vitro* multiplication of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg
(Myrtaceae)**

ABSTRACT

Campomanesia adamantium, popularly known as 'guavira' is a native fruit species of the 'Cerrado'. The species is found mostly in wild state and their propagation has limited due to recalcitrant seeds. Considering the management lack and cultural traits, the *in vitro* establishment of culture from vegetative material is subject to high rates of fungal and bacterial contamination. Aiming the propagation, this work was development to evaluate the *in vitro* multiplication capacity of 'guavira', using as explants source, stem segments taken from *in vitro* germinated seedlings. To achieve this purpose were conducted three separate experiments, and evaluated the effect of 5.0 mM of TDZ (thiadizuram), 1.0 mM of NAA (naphthalene acetic acid) and combinations thereof, as well as the isolated effect of BAP (6-benzylaminopurine) and isolated 2iP (2-isopentenyl adenine) in concentrations of 2.5 ; 5.0; 7,5 and 10 mg L⁻¹ and the control (0). The results showed that the use of 5.0 mM of TDZ increased the shoot length, number of buds and the multiplication rate, while the combination of TDZ and ANA has a negative effect on the growth of the shoots, the number of leaves and the multiplication rate. The explants cultivation in medium containing BAP increases the number of shoots in proportion to the increased concentration of growth regulator, however, reduces the length of the shoots. Explants cultured in medium containing 2iP were statistically equal for the variables analyzed between the concentrations tested.

Key-words: *Campomanesia adamantium*, NAA, TDZ, 2iP, BAP.

1. INTRODUÇÃO

A guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg), pertencente à família Myrtaceae, é uma espécie nativa do Cerrado que a cada ano vem se tornando menos abundante em seu habitat. A substituição do bioma por culturas de maior impacto econômico ou para fins agropecuários, como citado por Domingos (2008), têm resultado em uma extensa conversão e fragmentação dos espaços naturais, as quais, de acordo com Pinhal et al. (2011) tem acarretado em produções menores e perdas de genótipos com características desejáveis, colocando em risco a sobrevivência das espécies nativas

Do ponto de vista econômico, a espécie é utilizada pela população para diferentes fins. Folhas e casca são usadas na preparação de chás devido às suas propriedades medicinais, as quais, de acordo com Piva (2002) apresentam ação anti-inflamatória, antidiarreica e antisséptica das vias urinárias. Por sua vez, os frutos, encontrados entre os meses de novembro e janeiro e em grande quantidade por plantas (VALLILO et al., 2006), apresentam grande potencial econômico sendo utilizados como alimento *in natura*, no preparo de doces, sorvetes, licores caseiros (SANGALLI et al., 2002), geléia (PAVAN et al., 2009) e sucos (BAVIATI et al., 2004). Os frutos podem também ser utilizados como flavorizantes na indústria de bebidas, devido à elevada acidez, alto teor de ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos (α -pineno, limoneno e β -(z) ocimeno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem o aroma cítrico (VALLILO et al., 2006).

Visando o cultivo da guavira, alguns estudos vêm sendo conduzidos, com o intuito de avaliar e aprimorar a propagação seminífera. No entanto, apesar da guavira ter aparente facilidade de propagação natural, um fator limitante encontrado na propagação

da espécie encontra-se na perda do poder germinativo das sementes, necessitando ser semeadas logo após a sua extração dos frutos (MELCHIOR et al., 2006; SCALON et al., 2009). O comportamento das sementes de guavira indica que a espécie pode ser classificada como recalcitrante, por não suportar armazenamento à baixa temperatura e ser intolerante à dessecação (MELCHIOR et al., 2006).

Diante das dificuldades encontradas na propagação sexuada da guavira, uma alternativa para a obtenção de mudas da espécie encontra-se na clonagem *in vitro* ou micropropagação. A micropropagação é um método assexuado, comumente utilizado na multiplicação das mais variadas espécies de plantas, com segregação genética reduzida (MORAES et al., 2010), que permite a produção de mudas em larga escala e em períodos de tempo pequenos (ARRIGONI-BLANK et al., 2011). As técnicas de cultivo *in vitro*, além da propagação da espécie, são importante ferramenta para a manutenção e o intercâmbio de germoplasma com genótipos de melhor qualidade (BRAUN et al., 2010).

O uso de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* atua como estimuladores para a regeneração das plantas. Dentre os principais reguladores, temos a classe das citocininas, que são utilizadas para promover o crescimento pela expansão e desenvolvimento de plantas estimulando a divisão celular, regulam a síntese de proteínas que estão relacionadas diretamente com a formação das fibras do fuso mitótico, além de inibirem o crescimento da parte aérea e do sistema radicular, exemplos de reguladores dessa classe, BAP (6-Benzilaminopurina), 2iP (N6-D2-isopentenil adenina), TDZ (thiadizuram (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)), entre outros. (CASTRO et al., 2007). Já as auxinas, outra classe, promovem a divisão, diferenciação e alongamento celular e são responsáveis pela dominância apical. Em baixas concentrações, as auxinas auxiliam no crescimento normal de embriões e da raiz,

enquanto que em concentrações mais elevadas, pode apresentar efeito inibitório ou favorecer na formação de calos (PILET e SAUGY, 1987) auxiliando no cultivo *in vitro*, alguns exemplos de auxinas, ANA (ácido naftaleno acético), AIB (ácido indo butírico), AIA (ácido indol acético).

Azambuja (2013) desenvolveu trabalhos com o objetivo de realizar propagação assexuada e *in vitro* de guavira. A autora realizou diversos experimentos com o objetivo de estabelecer a espécie *in vitro* a partir de segmentos nodais retirados de ramos vegetativos de plantas matrizes adultas e cultivadas no campo. Os fatores avaliados, na sua grande maioria, foram agentes desinfetantes, tais como, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, rifampicina, tetraciclina, carbendazim e cloreto de mercúrio, em diferentes concentrações e tempos de exposição dos explantes aos mesmos, com o intuito de reduzir a contaminação por microrganismos e agentes antioxidantes, objetivando reduzir a oxidação dos explantes, fato comum em espécies lenhosas.

Os resultados obtidos por Azambuja (2013) demonstraram que nas matrizes estudadas apresentam uma elevada incidência de bactérias e fungos, indicando uma possível contaminação endógena do material vegetativo utilizado, e uma elevada taxa de oxidação, o que por sua vez, resultou num baixo percentual de estabelecimento e sobrevivência dos explantes *in vitro*.

Para superar os entraves causados pelo elevado índice de contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de material vegetativo adulto, uma alternativa viável pode ser o cultivo a partir de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*. De acordo com Gratapaglia e Machado (1998) a micropropagação de espécies lenhosas a partir de explantes oriundos de plantas germinadas *in vitro* é mais viável sob o ponto de vista fisiológico e experimental, devido ao estágio juvenil e capacidade de maior resposta *in vitro*.

Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de guavira, submetida a diferentes tratamentos com TDZ, ANA e a combinação dos mesmos, bem como, o efeito de diferentes concentrações de BAP e 2iP, utilizando como fonte de explantes plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado consistiu em segmentos nodais contendo duas gemas laterais, sem a presença de folhas e com aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Os explantes foram retirados de plântulas de guavira (*Campomanesia adamantium* Cambes. O. Berg), com idade de 3 meses, que foram obtidas de sementes germinadas *in vitro*. As sementes foram obtidas de frutos coletados de plantas cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em novembro de 2013. Os experimentos foram conduzidos no período de dezembro (2013) a fevereiro de 2014, nos Laboratórios de Botânica e Multiuso, da Faculdade de Ciências Biológicas (FCBA) e Ambientais, da UFGD – MS.

Para avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de guavira foram realizados três experimentos, em delineamentos inteiramente casualizado, e tendo como principal fator de estudo, o tipo de regulador de crescimento e a concentração do mesmo.

Inicialmente avaliou-se o efeito dos reguladores de crescimento, TDZ e ANA, em concentrações definidas, 5,0 µM de TDZ e 1,0 µM de ANA e a combinação dos mesmos, nas referidas concentrações, totalizando três tratamentos. Posteriormente estudou-se em experimentos distintos, o efeito dos reguladores de crescimento, BAP e 2iP, nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹ e tratamento controle (0 – sem

adição de regulador), totalizando 5 tratamentos em cada experimento. Nos três experimentos, cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo cinco explantes.

Em todos os experimentos utilizou-se o meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol, 6 g L⁻¹ de ágar, pH 5,8 e regulador de crescimento de acordo com cada tratamento. O meio de cultura foi distribuído em frascos de cultivo e esterilizado em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a preparação dos explantes e inoculação em meio de cultivo, os frascos foram mantidos no escuro, por um período de sete dias, em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C e após este período, mantidos sob luminosidade de 45 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 14 horas.

Aos 56 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis: número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de folhas por brotação e a taxa de multiplicação, obtida por meio da razão entre o número e o número de gemas inicial.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan e/ou por regressão polinomial a 5% de probabilidade de erro, com o uso do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999). Os dados obtidos em unidade foram transformados em raiz quadrada de (x+0,5).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância houve efeito estatístico significativo entre os reguladores de crescimento TDZ, ANA e a combinação dos mesmos, evidenciando que o uso destes reguladores exerce uma influência para o número médio de folhas e a taxa de multiplicação (Tabela 1), evidenciando assim que o uso destes reguladores

isolados ou combinados exerce uma influência sobre o número médio de folhas e a taxa de multiplicação.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para o efeito dos reguladores de crescimento TDZ, ANA e TDZ+ANA, na multiplicação *in vitro* de guavira, para as variáveis: número médio de brotações; comprimento médio das brotações (cm); número médio de folhas por brotação e taxa de multiplicação. Dourados-MS, UFGD, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		Nº de Brotações	Comprimento brotações	Nº de folhas	Taxa de multiplicação
Regulador de crescimento	2	0,014 ^{ns}	0,287 ^{ns}	0,764 [*]	3,088 [*]
Resíduo	6	0,008	0,064	0,154	0,623
CV (%)		6,8	45,7	18,9	31,5
Média geral		1,35	0,56	4,0	2,5

** , * e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Quanto ao número de brotações por explante, os resultados obtidos demonstraram que as concentrações testadas de TDZ (5,0 µM), ANA (1,0 µM) e a combinação de ambos, não exerceram influência sobre esta variável, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Tabela 2). Por outro lado, foi constatado sobre o comprimento das brotações. Explantes cultivados em meio suplementado com TDZ apresentaram brotações com maior comprimento (0,73 cm), sendo a média superior e significativamente diferente à média obtida em explantes cultivados em meio contendo a combinação de TDZ e ANA (0,24 cm).

Tabela 2. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando como explantes segmentos nodais aos 45 dias de cultivo, Dourados-MS, 2015.

Regulador de crescimento (μM)	Número de brotações	Comprimento das brotações (cm)	Número de folhas por brotação	Taxa de multiplicação
TDZ (5,0)	1,52 a*	0,73 a	5,32 a	3,16 a
ANA (1,0)	1,25 a	0,63 ab	4,28 ab	2,64 ab
TDZ (5,0) + ANA (1,0)	1,26 a	0,24 b	2,03 b	1,51 b

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

Semelhante aos resultados observados com relação ao comprimento das brotações, o tratamento com TDZ promoveu um aumento significativo do número de folhas e da taxa de multiplicação (Tabela 2) quando comparado à combinação de TDZ e ANA, sendo o efeito de ANA intermediário, pois não diferiu do uso isolado de TDZ ou da combinação dos reguladores. Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que o uso de ANA em associação ao TDZ exerceu um efeito negativo sobre a multiplicação *in vitro* de guavira, reduziu o crescimento em altura das brotações, inibiu o desenvolvimento das folhas e reduziu a taxa de multiplicação. Por sua vez, o uso de TDZ, mesmo não diferindo dos valores obtidos nos explantes tratados com ANA, destacou-se com valores superiores em todas as variáveis analisadas. A influência dos reguladores de crescimento estudados pode ser visualizada no aspecto geral das brotações (Figura 1).

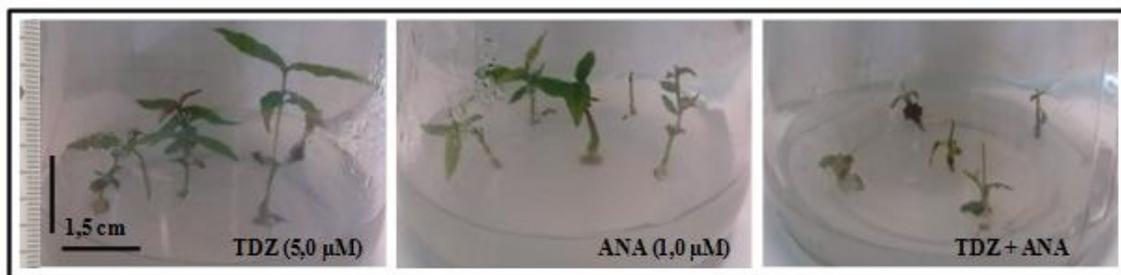


Figura 1. Aspecto geral das brotações de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento, Dourados-MS, 2015.

Resultados semelhantes aos obtidos neste experimento foram observados por Candido (2013) em *Peltophorum dubium* (canafístula). O autor estudou o efeito de diferentes citocininas, BAP, TDZ, KIN e 2iP (isopenteniladenina), isoladas, combinadas entre si e em combinação com o ácido naftaleno acético (ANA) e observou que quando se utiliza o TDZ no meio de cultura durante a multiplicação, o uso de ANA é dispensável. Por outro lado, o autor observou que o uso de ANA é dependente do tipo de citocinina utilizada, pois, no caso de 2iP, a combinação com ANA contribuiu para a redução do número de folhas senescentes.

Quanto aos tratamentos com diferentes concentrações de BAP (6 - benzilaminopurina), por meio da análise de variância (Tabela 3) foram verificadas diferenças estatísticas significativas somente sobre o número de brotações, enquanto o uso de diferentes concentrações de 2iP (2 - isopentenil adenina) não diferiu estatisticamente para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para o efeito do regulador de crescimento BAP, na multiplicação *in vitro* de guavira, para as variáveis: número médio de brotações; comprimento médio das brotações (cm); número médio de folhas por brotação e taxa de multiplicação. Dourados-MS, UFGD, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		Nº de Brotações	Comprimento brotações	Nº de folhas	Taxa de multiplicação
Concentrações de BAP	4	0,068*	0,840 ^{ns}	0,445 ^{ns}	2,703 ^{ns}
Resíduo	11	0,019	0,273	0,159	0,906
CV (%)		9,3	77,8	16,3	28,3
Média geral		1,7	0,67	5,7	3,4

**, * e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para o efeito do regulador de crescimento 2iP, na multiplicação *in vitro* de guavira, para as variáveis: número médio de brotações; comprimento médio das brotações (cm); número médio de folhas por brotação e taxa de multiplicação. Dourados-MS, UFGD, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		Nº de Brotações	Comprimento brotações	Nº de folhas	Taxa de multiplicação
Concentrações de 2iP	4	0,003 ^{ns}	0,060 ^{ns}	0,372 ^{ns}	2,466 ^{ns}
Resíduo	6	0,016	0,035	0,287	2,015
CV (%)		9,1	37,7	19,2	33,2
Média geral		1,5	0,5	7,6	4,3

**, * e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

Explantes cultivados em meio contendo BAP, apresentaram um aumento significativo do número de brotações, sendo verificado uma tendência linear, proporcional ao aumento da concentração do regulador de crescimento, obtendo-se uma média de 2,2 brotos por explante na concentração de 10 mg L⁻¹ (Figura 2). Diferentemente do BAP e semelhante ao cultivo com TDZ, o tratamento com 2iP, não interferiu no número médio das brotações, não sendo observadas diferenças significativas entre as concentrações testadas, sendo a média geral de 1,5 brotos por

explante (Figura 2). O aspecto geral das brotações obtidas nos diferentes tratamentos com BAP e 2iP pode ser observado na figura 3.

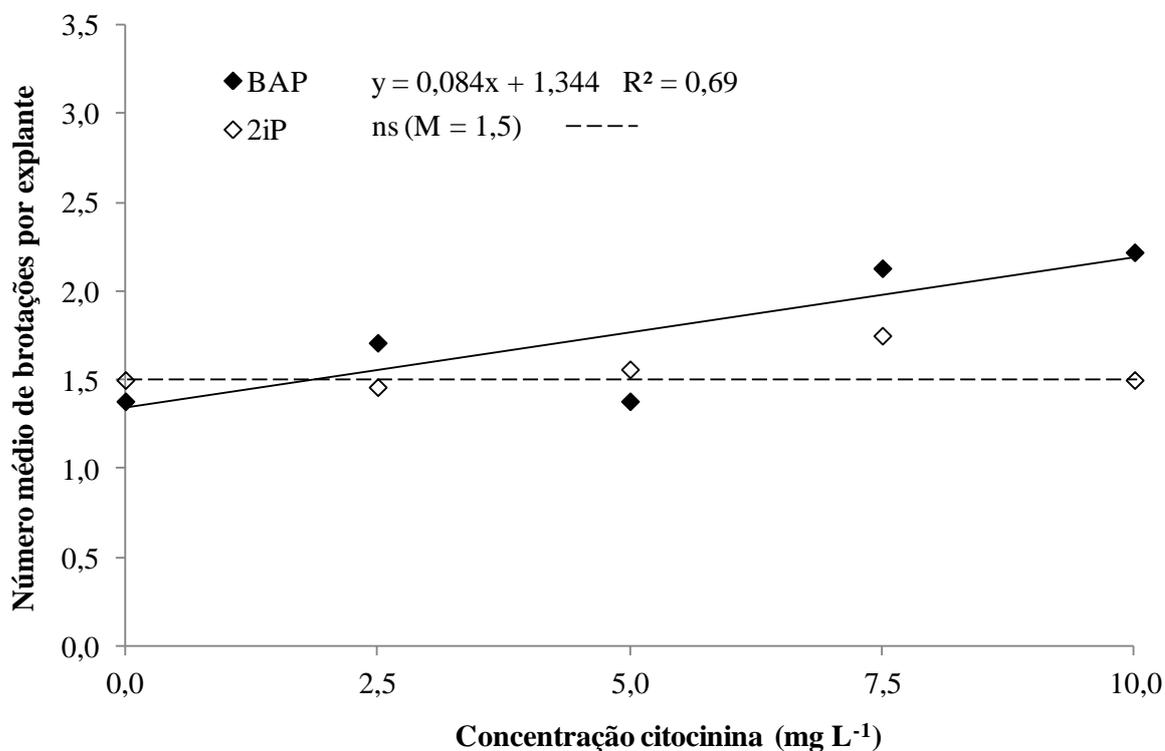


Figura 2. Número médio de brotações por explantes de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS. M – representa a média geral obtida entre os tratamentos, Dourados-MS, 2015.

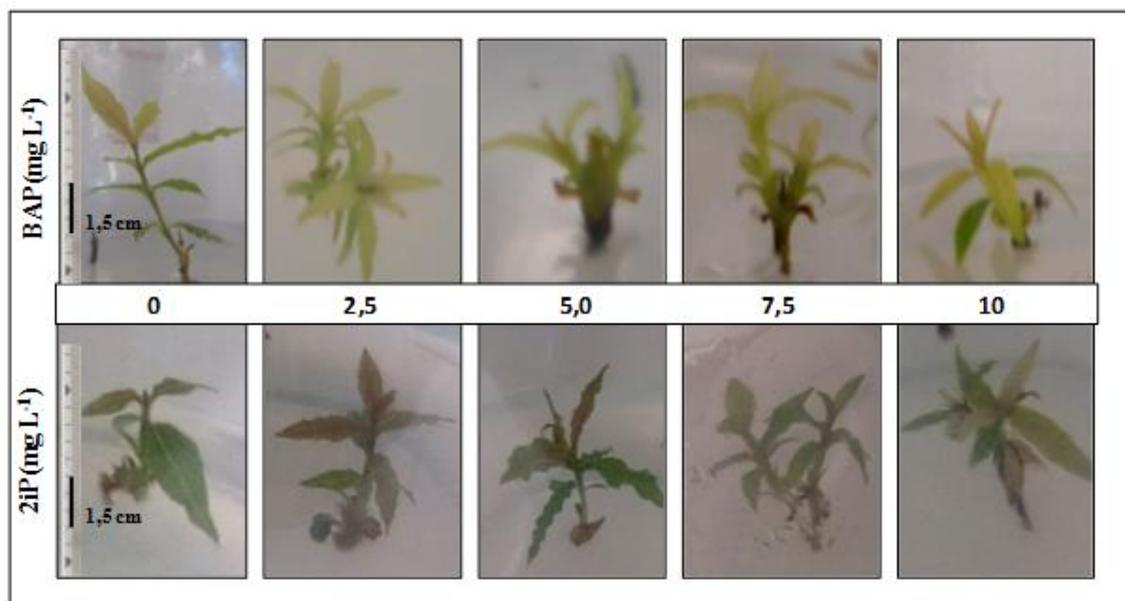


Figura 3. Aspecto geral das brotações por explantes de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS, Dourados-MS, 2015.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Almeida et al. (2009), onde os autores testaram os efeitos das citocininas BAP, CIN (cinetina) e 2iP durante a multiplicação de *Crossandra infundibuliformis* Nees cv. Mona Wallhead (crossandra-laranja). Os mesmos autores verificaram maiores percentuais de brotações em explantes cultivados em meio de cultivo acrescido de BAP quando comparados aos explantes cultivados com as citocininas do tipo 2iP e cinetina. O efeito positivo linear no número de brotos concomitante ao aumento das concentrações de BAP no meio de cultivo também foi observado por Moraes et al. (2010) durante a multiplicação *in vitro* de *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), no entanto, os autores trabalharam com concentrações de BAP associadas a GA₃ e verificaram que o uso de 4 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de GA₃ promoveram a formação de até 6,08 brotos por explantes.

Quanto ao comprimento das brotações, em explantes cultivados com BAP (Figura 4), os valores obtidos foram inversamente proporcionais às diferentes concentrações de BAP estudadas, sendo observando um decréscimo no comprimento à medida que se aumentou a concentração do regulador no meio de cultura. Por outro lado, explantes multiplicados em meio contendo 2iP (Figura 4) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as concentrações estudadas, verificando-se uma média geral de 0,5 cm de comprimento por brotação.

Os resultados observados para a variável número de brotações, principalmente com o uso de BAP no meio de cultivo apresentaram influência efetiva sobre os dados obtidos em relação ao comprimento das brotações, pois, neste sentido, o desenvolvimento de novos brotos, por ser um dreno forte, requer muita energia e por consequência reduz o crescimento em altura.

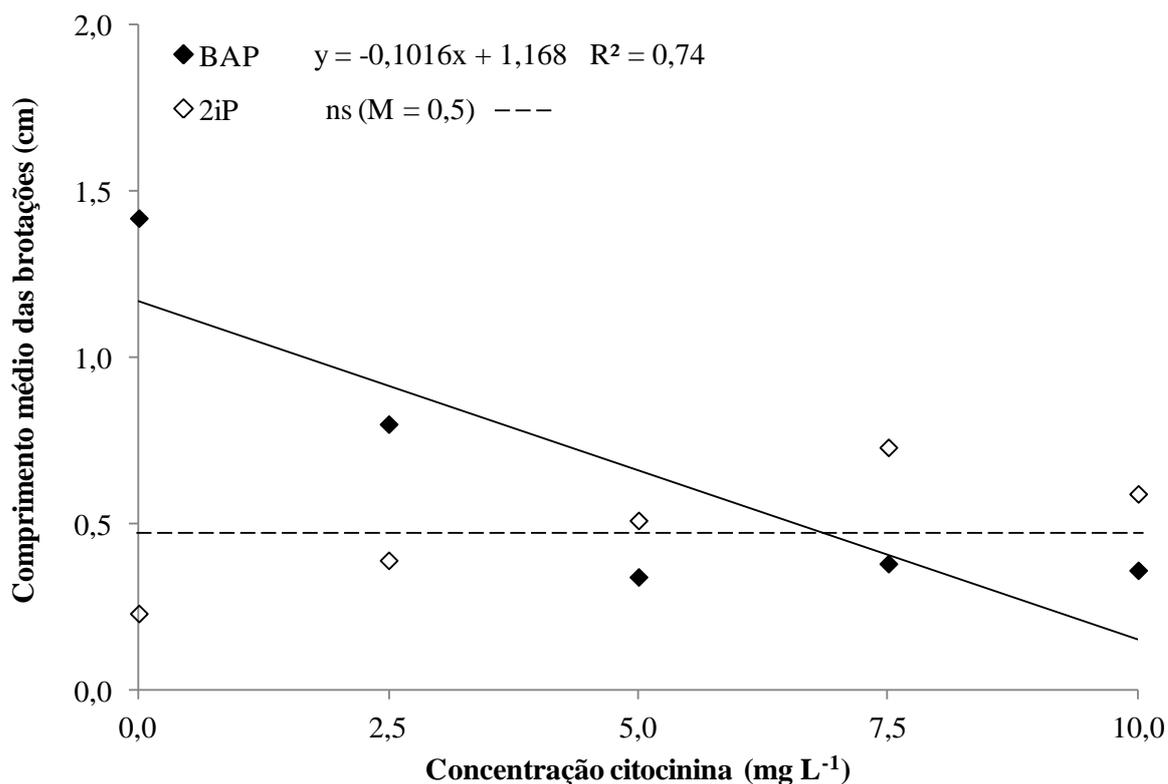


Figura 4. Comprimento médio das brotações de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS. M – representa a média geral obtida entre os tratamentos, Dourados-MS, 2015.

A redução do comprimento das brotações com o aumento das concentrações de BAP no meio de cultivo também foi observada por Garlet et al. (2011) durante a multiplicação de *Mentha gracilis* (hortelã). De acordo com Asmar et al. (2011), concentrações mais acentuadas de citocininas como por exemplo o BAP possuem grande eficiência na indução de novas brotações, mas, em relação ao alongamento, em concentrações mais baixas ou na ausência do regulador de crescimento, ocorre uma maior promoção do alongamento do explante. A redução do comprimento das brotações com o aumento da concentração de citocinina foi também verificado por Leitzke et al. (2010), na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante. Os mesmos autores estudaram o efeito de 2iP, BAP e zeatina nas concentrações 7,5; 15 e 22,5 µM e observaram que com a adição de 2iP em meio MS, o comportamento foi linear

descendente, indicando que o uso de concentrações mais elevadas de 2iP promoveu uma queda no comprimento das brotações.

Para o número médio de folhas por brotação (Figura 5), em ambos os experimentos, com diferentes concentrações de BAP e 2iP os dados obtidos não diferiram estatisticamente, observando-se uma média geral de 5,7 folhas por brotação em explantes crescidos em meio contendo BAP e 7,6 em explantes crescidos em meio contendo 2iP. No entanto, observou-se que explantes cultivados em meio contendo 7,5 ou 10 mg L⁻¹ de 2iP apresentam maior número de folhas se comparado as demais concentrações estudadas deste regulador e até mesmo ao uso de BAP independentemente da concentração testada.

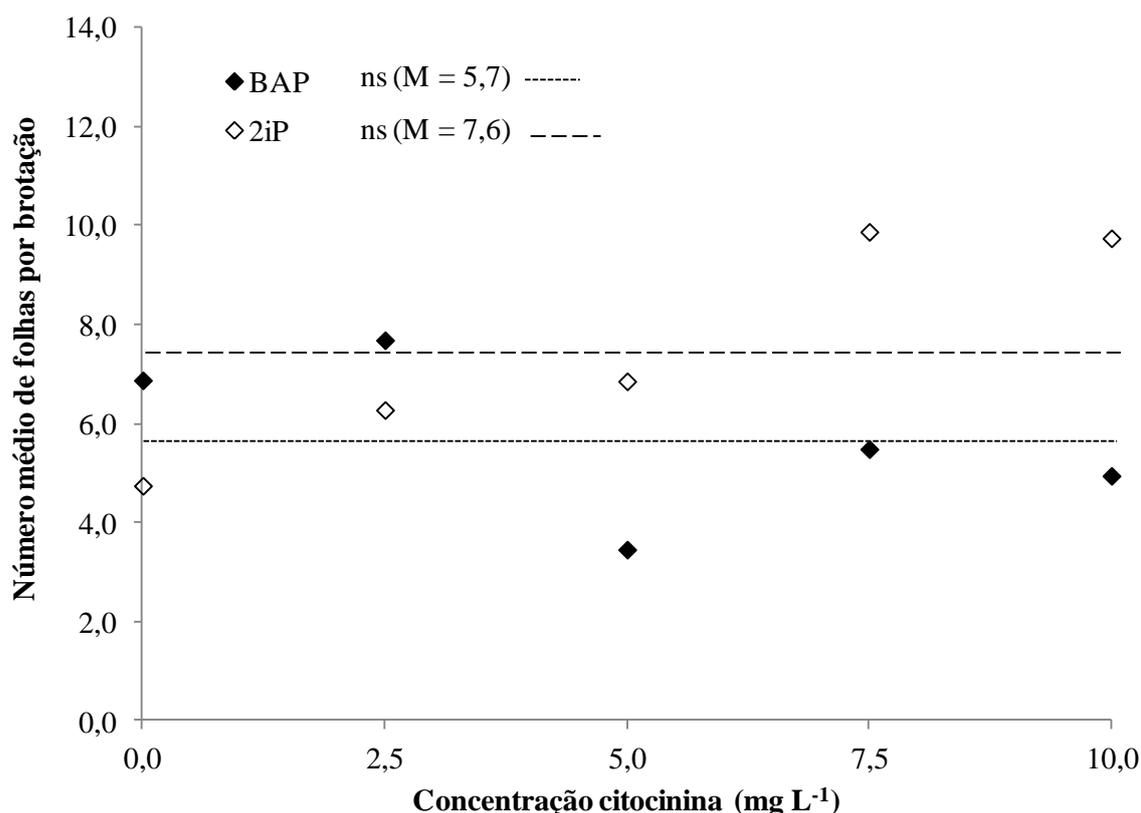


Figura 5. Número médio de folhas por brotação de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS. M – representa a média geral obtida entre os tratamentos, Dourados-MS, 2015.

Vidal et al. (2013) compararam o efeito de diferentes citocininas, BAP, 2iP e CIN e diferentes concentrações, 2,5; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ durante a multiplicação de

explantes de mamoeiro (*Carica papaya* L.), e verificaram que o número médio de folhas foi maior com a utilização de 2iP apresentando uma pequena redução na concentração de 10,0 mg L⁻¹.

Semelhante aos resultados obtidos com relação ao número de folhas, a taxa de multiplicação em ambos os experimentos não apresentou diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de BAP e/ou 2iP testadas (Figura 6). Foi observado uma média de 3,4 em explantes cultivados em meio suplementado com BAP e 4,3 em explantes cultivados com 2iP. De modo geral, explantes cultivados em meio contendo 7,5 ou 10 mg L⁻¹ de 2iP apresentam maior taxa de multiplicação, resultado similar ao obtido quanto ao número de folhas.

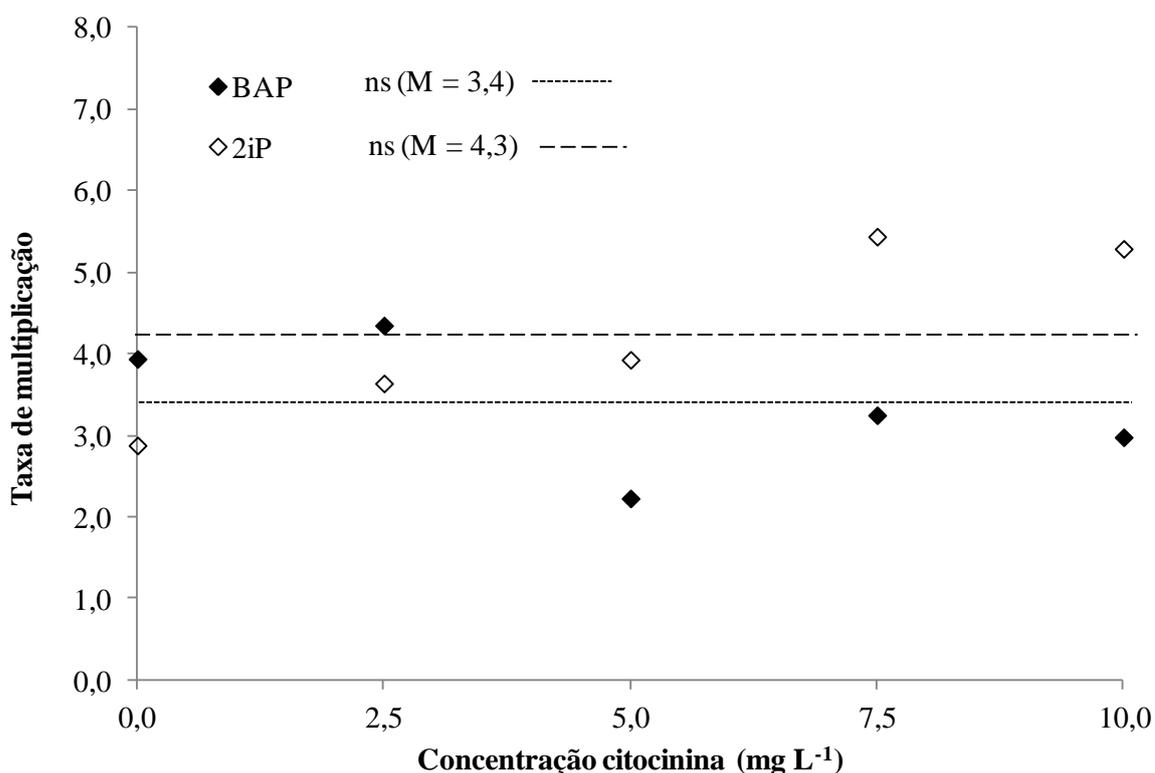


Figura 6. Taxa de multiplicação de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS. M – representa a média geral obtida entre os tratamentos, Dourados-MS, 2015.

Os resultados verificados neste experimento para a taxa de multiplicação diferem do encontrado por Asmar et al. (2011), que obtiveram maiores taxas de

multiplicação de *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta) com a adição de BAP ao meio de cultura. Apesar de o BAP ser um dos reguladores de crescimento mais comumente utilizado na fase de multiplicação, de acordo com Vidal et al. (2013) esta citocinina nem sempre apresenta um efeito positivo para todas as espécies.

A multiplicação *in vitro* de plântulas de sementes germinadas *in vitro* de guavira, pode ser uma alternativa para a obtenção deste material, com maior vigor de crescimento e qualidade fitossanitária em larga escala. De acordo com os experimentos realizados, provavelmente a guavira apresenta uma alta concentração endógena de auxina, portanto, o balanço citocinina e auxina são essenciais no desenvolvimento de novas brotações, conseqüentemente uma maior taxa de multiplicação.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados concluiu-se que em guavira, o uso de 5,0 μM de TDZ aumenta o comprimento das brotações, o número de folhas e a taxa de multiplicação.

A combinação de TDZ e ANA no meio de cultivo reduz o crescimento das brotações, o número de folhas e a taxa de multiplicação.

O cultivo dos explantes em meio contendo BAP aumenta o número de brotações, proporcionalmente ao aumento da concentração do regulador de crescimento, entretanto, reduz o comprimento das brotações.

Explantes cultivados em meio contendo 2iP, para as variáveis analisadas, não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações testadas.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F. Micropropagação de *Crossandra infundibuliformis* Ness cultivar 'Mona Wallhead'. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 115-122, 2009.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, A. V.; BLANK, A. F. Organogênese direta e aclimatização de plantas de patchouli. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v.29, n.2, p.145-150, 2011.
- ASMAR, A. S.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.esp., p. 533-38, 2011.
- AZAMBUJA, T. M. S. **Estabelecimento *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg.** 2013. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.
- BAVIATI, M.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L.M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S.N.; PRADO, S.R.T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Maryland, v. 93, p. 385-389, 2004.
- BRAUN, H.; LOPES, J. C.; SOUZA, L. T. de; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.539-546, 2010.

CANDIDO, D. F. Cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) taubert: multiplicação, senescência foliar e calogênese. 2013. 120 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2013.

CASTRO, P. R. de C.; PITELLI A. M. de C. M.; PERES L. E. P.; ARAMAKI, P. H. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Ciências Exatas Terra, Ciências Agronômicas e Engenharia**, Ponta Grossa, v. 13, n. 3, p. 25-29, 2007.

DOMINGOS, D. C. C. Alternativas de uso sustentável do bioma Cerrado através de práticas extrativistas e agro-extrativistas. Revista Acadêmica Senac Minas, n.4, p.5-14, 2008. Capturado em: 04 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://www3.mg.senac.br/Revistasenac/edicoes/edicao4.htm>.

GARLET, T. M. B.; FLORES, R.; MESSCHMIDT, A. A. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha gracilis* Sole. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p.30-4, 2011.

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

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n 2, p. 352-360, 2010.

MACHADO, A. A.; SILVA, J. G. C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A. R. **Winstat - Sistema de análise estatística para Windows**, 1999.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; MACHADO NETO, N.B. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium*

Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.28, n.3, p.141-150, 2006.

MORAES, C. F.; SUZIN, M.; NIENOW, A. A.; GRANDO, M. F.; MANTO-VANI, N. CALVETE, E. O. DONIDA, B. T. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 1, p. 64-89, 2010.

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

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; CARDOSO, C. de L.; VILLEGAS, V.; LEITE, S. R. de A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.5, p. 1222-1226, 2009.

PILET, P. E.; SAUGY, M. Effect on root of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 83, 33-38, 1987.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J. da; MORAIS, T. P. de; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PIVA, M. G. **O caminho das plantas medicinais**: estudo etnobotânico. Rio de Janeiro: Mondrian, 2002. 320 p.

SANGALLI, A.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA ZÁRATE, N. A. Levantamento e caracterização de plantas nativas com propriedades medicinais em fragmentos florestais e de cerrado de Dourados-MS, numa visão etnobotânica. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.19, p. 173-184, 2002.

SCALON, S. de P. Q.; LIMA, A. A. de; SCALON FILHO, H.; VIEIRA, M. do C. Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb.: efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol.31, n.2, p.096-103, 2009.

VALLILO, M. I.; BUSTILLOS, O. V.; AGUIAR, O. T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg-Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.18, p.15-22, 2006.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. da. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 64-70, 2013.