



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E  
AMBIENTAIS



**Germinação, organogênese e multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**

**LEANDRO DARC DA SILVA**

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2015**



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



**Germinação, organogênese e multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**

**LEANDRO DARC DA SILVA**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. CLÁUDIA ROBERTA DAMIANI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral – Bioprospecção, para a obtenção do título de Mestre.

**Dourados**  
**Mato Grosso do Sul**  
**2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E  
AMBIENTAIS



**Germinação, organogênese e multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**

**LEANDRO DARC DA SILVA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de  
MESTRE EM BIOLOGIA GERAL

Aprovado em:31/08/2015

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Roberta Damiani  
(Orientadora – UFGD)

---

Prof. Dr. Etenaldo Felipe Santiago  
(UEMS)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liliam Silvia Cândido  
(UFGD)

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S586g Silva, Leandro Darc da.  
Germinação, organogênese e multiplicação *in vitro* da  
*Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). / Leandro Darc da  
Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2015.  
73f.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Roberta Damiani.  
Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal  
da Grande Dourados.

1. Guavira. 2. Propagação in vitro. 3. Reguladores de  
crescimento. 4. Explantes. I. Título.

CDD – 581.981

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

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

"GERMINAÇÃO, ORGANOGÊNESE E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE)"

POR

**LEANDRO DARC DA SILVA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CLAUDIA ROBERTA DAMIANI  
ORIENTADORA – UFGD

PROF. DR. ETENALDO FELIPE SANTIAGO  
MEMBRO TITULAR – UEMS / CÂMPUS DOURADOS

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LILIAM SILVIA CÂNDIDO  
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovado em 31 de agosto de 2015.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado a todo o momento.

A minha família, pelo apoio incondicional em todas as etapas pelo qual passei, acreditando que eu fosse capaz de atingir meus objetivos, por todo amor, carinho, atenção durante toda a minha vida e por sempre me ensinar que posso contar com eles em tudo que eu precisar.

À Profª Drª Cláudia Roberta Damiani, pela orientação, ensinamentos, compreensão, amizade, confiança em mim depositada e por toda a contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional, será uma pessoa pela qual terei eterna gratidão.

À Universidade Federal da Grande Dourados, à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais e aos professores do Curso de Pós-graduação em Biologia Geral – Bioprospecção pela oportunidade de aprendizado e formação.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e a FUNDECT pelo fornecimento da bolsa de estudo que garantiu o sustento financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Aos acadêmicos do curso de Bacharelado em Biotecnologia Ademir Goelzer e Thamiris Gatti Déo pela disponibilidade, auxílio e contribuição na elaboração desta dissertação.

Aos colegas de curso pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos dos Laboratórios de Botânica e Multiuso - FCBA (Juliana, Fabiana, Marquinhos e Lívia) e ao secretário do programa de pós-graduação Paulo Henrique pelo auxílio e colaboração.

Aos professores membros da Banca Examinadora, por aceitarem fazer parte desse trabalho e contribuir com seus conhecimentos.

Às mestres, Cristiane e Thalita, pelos ensinamentos e esclarecimentos de dúvidas no início do meu trabalho e auxílio sempre que necessitei.

Ao doutorando Fernando Santos, por ser esse ótimo amigo em todas as ocasiões e por sempre estar me incentivando e não medindo esforços em ajudar-me em toda a minha carreira acadêmica e pessoal.

A minha namorada Mary Janne, pelo apoio, incentivo e confiança nas minhas decisões e por sempre ser compreensiva em todos os momentos da minha vida acadêmica.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a efetivação deste trabalho.

## SUMÁRIO

Germinação, organogênese e multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia adamantium</i> (Myrtaceae).....	6
RESUMO.....	6
<i>In vitro</i> Germination, organogenesis and multiplication of <i>Campomanesia adamantium</i> (Myrtaceae).....	7
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Características gerais da <i>Campomanesia adamantium</i> (Camb.) O. Berg.....	10
2.2. Propagação da espécie.....	12
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> .....	14
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO I: Effects of seed origin, storage conditions, and gibberellic acid on <i>in vitro</i> germination of guaviras seeds.....	22
ABSTRACT.....	22
INTRODUCTION.....	23
MATERIAL AND METHODS.....	24
RESULTS AND DISCUSSION.....	26
CONCLUSION.....	33
ACKNOWLEDGEMENTS.....	34
REFERENCES.....	34
CAPÍTULO II: Efeito do TDZ e ANA na organogênese <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia adamantium</i> a partir de explantes foliares, internodais e radiculares.....	39
RESUMO.....	39
CHAPTER II: Effect of TDZ and NAA on <i>in vitro</i> organogenesis of <i>Campomanesia adamantium</i> from leaf, root and intermodal explants.....	40
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO III: Efeito de diferentes citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia adamantium</i> .....	55
RESUMO.....	55
CHAPTER III: Effect of different cytokinins on <i>in vitro</i> multiplication of <i>Campomanesia adamantium</i> .....	56
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60

CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO.....	73



## Germinação, organogênese e multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)

### RESUMO

O desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação assexuada da guavira (*Campomanesia adamantium*) é de fundamental importância para a conservação da espécie, considerando as limitações encontradas na propagação seminífera, impostas pela recalcitrância e perda de poder germinativo das sementes. Neste sentido, técnicas de cultivo *in vitro*, poderão contribuir para a produção de mudas. Com o intuito de desenvolver protocolos para o cultivo *in vitro* da espécie, este trabalho foi realizado em três etapas. Inicialmente avaliou-se a germinação *in vitro*, de sementes provenientes de diferentes locais de coleta dos frutos, condições de armazenamento das sementes e temperatura, bem como, a inoculação em meio de cultivo MS, acrescido de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Na segunda etapa avaliou-se a capacidade organogênica *in vitro*, a partir de explantes foliares, radiculares e internodais e o efeito dos reguladores de crescimento, TDZ e ANA. Na terceira etapa avaliou-se a capacidade de multiplicação *in vitro*, utilizando como fonte de explantes plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* e submetida a diferentes tratamentos com TDZ, ANA, BAP e 2iP. De acordo com os dados obtidos nos diferentes experimentos, concluiu-se que em sementes de guavira inoculadas em meio de cultivo logo após a colheita dos frutos, o uso de GA<sub>3</sub> promove um aumento de 10% do percentual de germinação, sendo o uso de 1,0 mg L<sup>-1</sup> suficiente para promover 100% de germinação. O comprimento da parte aérea aumenta linearmente com o aumento da concentração de GA<sub>3</sub>, porém não exerce efeito sobre o desenvolvimento da raiz principal e folhas. Sementes adquiridas de frutos oriundos de feira livre apresentam um percentual de germinação inferior ao das sementes inoculadas logo após a colheita dos frutos e não diferem quanto ao percentual de germinação sob os diferentes tratamentos com GA<sub>3</sub>. A germinação é inviável em sementes de guavira armazenadas em diferentes temperaturas (4°C e -20°C) e em diferentes locais (refrigerador e freezer) por 60 dias, não sendo possível a conservação das sementes nestas condições. Por sua vez, o armazenamento em temperatura ambiente (±25°C), causa a germinação precoce. Quanto à capacidade organogênica, concluiu-se que explantes internodais são mais responsivos para a formação de calos (84%), quando comparados aos explantes foliares (69%) e radiculares (42,7%). Explantes internodais não apresentam oxidação, sendo esta variável observada em maior intensidade em explantes foliares (41%), seguido de 14,7% em explantes radiculares. Para a multiplicação *in vitro*, os resultados obtidos demonstraram que o uso de 5,0 µM de TDZ aumenta o comprimento das brotações, o número de gemas e a taxa de multiplicação, enquanto a combinação de TDZ e ANA exerce 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 aumenta o número de brotações, proporcionalmente ao aumento da concentração do regulador de crescimento, porém, no sentido inverso reduz o comprimento das brotações. Explantes cultivados em meio contendo 2iP, para as variáveis analisadas, não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações testadas.

**Palavras-chave:** guavira, propagação *in vitro*, reguladores de crescimento, explantes.

***In vitro* Germination, organogenesis and multiplication of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**

**ABSTRACT**

The development of efficient asexual propagation techniques of 'guavira' (*Campomanesia adamantium*) has fundamental importance for the species conservation, considering the limitations found in the seminiferous propagation, imposed by the recalcitrance and loss of seeds germination power. In this sense, *in vitro* culture techniques may contribute to the production of seedlings. In order to develop protocols for *in vitro* culture of this species, this work was carried out in three stages. Initially, the *in vitro* germination was analyzed basing on seeds from different fruits collection sites, storage conditions of seeds and temperature, as well as inoculation in MS medium, supplemented with different concentrations of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). In the second stage, it was evaluated the *in vitro* organogenic capacity, from leaf, root and internodal explants and the effect of growth regulators, TDZ and NAA. In the third stage, *in vitro* multiplication of capacity was evaluated using as a source of explants seedlings obtained from seeds germinated *in vitro* and subjected to different treatments with TDZ, NAA, BAP and 2iP. According to the data obtained in different experiments, it was concluded that in guavira seed inoculated in culture medium immediately after harvest, the use of GA<sub>3</sub> promotes an increase of 10% of the germination percentage, with the use of 1,0 mg L<sup>-1</sup> enough to promote 100% germination. The aerial part length increases linearly with increasing concentration of GA<sub>3</sub>, but has no effect on the development of the primary root and leaves. Seeds acquired from free fair fruits have a germination percentage lower than the inoculated seeds after harvesting the fruit and do not differ as to the percentage of germination under different treatments with GA<sub>3</sub>. Germination is not feasible in 'guavira' seeds stored at different temperatures (4°C and -20°C) and in different places (refrigerator and freezer) for 60 days, being not possible the conservation of seeds in these conditions. In turn, the storage at room temperature (±25°C) causes premature germination. As the organogenic capacity, it was concluded that are more responsive internodal explants for callus formation (84%), when compared to leaf explants (69%) and root explants (42.7%). Internodal explants do not show corrosion, this variable being observed at greater intensity of leaf explants (41%), followed by 14.7% of root explants. For *in vitro* multiplication, the results demonstrated that the use of 5.0 µM TDZ increases the length of shoots, the number of buds and the multiplication rate, while the combination of TDZ and NAA has a negative effect on growth of shoots, number of leaves and the multiplication rate. The explant culture in medium containing BAP increases the number of shoots in proportion to the increased concentration of growth regulator, however, the other way reduces the length of the shoots. Explants cultured in medium containing 2iP, to the variables analyzed, did not show significant differences between the tested concentrations.

**Keywords:** guavira, *in vitro* propagation, growth regulators, explants.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Cerrado apresenta uma grande variedade de espécies frutíferas nativas, das quais algumas são comercializadas, fazendo parte do consumo da população brasileira. As espécies nativas, na sua maioria, são de difícil propagação seminífera, pois, a maioria apresenta dormência e/ou recalcitrância das sementes, o que dificulta a germinação e reduz a longevidade e viabilidade das sementes, limitando a propagação e a formação de mudas em escala comercial (PINHAL et al., 2011).

Outro agravante com relação às espécies nativas do Cerrado está relacionado à exploração do bioma para fins agropecuários, resultando em uma extensa conversão e fragmentação dos espaços naturais (PREVEDELLO e CARVALHO, 2006; DOMINGOS, 2008). A substituição do bioma e de acordo com Pinhal et al., (2011) o extrativismo predatório, tem acarretado em produções menores e perdas de genótipos com características desejáveis, colocando em risco a sobrevivência das espécies nativas. Com a fragmentação ou redução do tamanho das populações, a estrutura genética das populações fica comprometida, visto que a conservação da diversidade genética depende da proteção dos ecossistemas (MOURA, 2007).

Dentre as inúmeras espécies nativas do Cerrado que a cada ano vem se tornando menos abundante em seu habitat encontra-se a guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg), pertencente à família Myrtaceae. A guavira é uma espécie com potencial para cultivo comercial devido as suas características agronômicas desejáveis, como alto rendimento de frutos por planta (MELCHIOR et al., 2006) e elevada qualidade nutricional, pois, os frutos são ricos em ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos, podendo ser utilizados *in natura* ou em indústrias (VALLILO et al., 2006).

A guavira é muito apreciada pelos habitantes das comunidades locais, possuindo grande potencial de exploração sustentável para essas famílias (VIEIRA et al., 2006). A comercialização dos frutos de guavira acontece em feiras livres ou às margens de rodovias, sendo estes colhidos e comercializados sem tratamentos tecnológicos (OSHIRO et al., 2013) e segundo Azambuja (2013), os frutos são colhidos de forma extrativista e sem um manejo adequado das plantas. Além disso, os frutos, as plantas de guavira são intensamente colhidas pela população local devido às propriedades medicinais, encontradas nas folhas e casca, o que contribui para a diminuição da espécie no seu hábitat natural (CARNEVALI et al., 2012). Neste sentido, por ser uma espécie encontrada apenas como nativa, não sendo cultivada (SCALON et al., 2009), incentivar o cultivo agrícola é uma maneira de preservar a espécie por meio da exploração sustentável e uma alternativa para melhorar a qualidade de vida de comunidades locais, por exemplo, comunidades que vivem às margens de rodovias no Estado do Mato Grosso do Sul, onde o comércio dos frutos de guavira representa uma importante fonte de renda (AZAMBUJA, 2013).

O desenvolvimento de pomares comerciais de guavira e a preservação da espécie serão possíveis se houver conhecimento das formas de propagação, aspectos fisiológicos, nutricionais e outros (MELCHIOR et al., 2006). Com o objetivo de atingir estes propósitos, nos últimos anos, diversos pesquisadores têm investido em estudos relacionados à qualidade nutricional dos frutos e principalmente, com relação à propagação seminífera da espécie, como exemplo, podemos citar os trabalhos de Vallilo et al. (2006) onde os autores avaliaram a composição química dos frutos da espécie. Entre os principais problemas encontrados com relação à espécie, destaca-se à pequena extensão da safra, pouca tolerância a pragas e doenças e baixa resistência ao transporte e armazenamento dos frutos depois da coleta (VIEIRA et al., 2010), e, a limitação na propagação sexuada imposta pela recalcitrância e perda do poder

germinativo das sementes (CARMONA et al., 1994; MELCHIOR et al., 2006; SCALON et al., 2012; DRESCH et al., 2012).

Considerando as diversas formas de utilização da guavira, a qualidade nutricional dos frutos e as boas perspectivas da produção comercial, é importante e necessário o desenvolvimento de trabalhos que envolvam a coleta de germoplasma visando à conservação da espécie, a seleção de populações mais resistentes a pragas e doenças, ao transporte e armazenamento, e principalmente, o desenvolvimento de técnicas mais eficientes de propagação assexuada (VIEIRA et al., 2010).

Assim com a finalidade de encontrar uma alternativa viável e promissora para a conservação da espécie, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter protocolos para a propagação *in vitro* da guavira, avaliando a habilidade de germinação, organogênese e multiplicação *in vitro*. O desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* poderá ser utilizado tanto na manutenção de bancos de germoplasma, bem como, na produção de mudas para fins comerciais e/ou repovoamento de ambientes naturais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Características gerais da *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg**

A espécie *Campomanesia adamantium* é nativa, não endêmica, de ampla distribuição, Cerrado e Mata Atlântica, podendo ser encontrada nas regiões de Campos e do Cerrado do Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina (LORENZI et al., 2006) e em regiões do Uruguai, Argentina e Paraguai (ARANTES e MONTEIRO, 2002; LORENZI, 2008).

As plantas de guavira apresentam ramos delgados com inúmeras ramificações. Podem atingir até 2,0 metros de altura, sendo consideradas arbustivas. As folhas são subcoriáceas, glabras na fase adulta, possuindo de 3,0 a 10 centímetros de comprimento. As flores são

brancas, solitárias, melíferas e começam a se formar a partir do mês de setembro a outubro (LORENZI et al., 2006). A polinização ocorre em sua maioria por abelhas (NICLUGHADHA e PROENÇA, 1996) e por ser uma espécie melífera, é importante para o pasto apícola (VIEIRA et al., 2010).

A espécie é pouco exigente quanto ao tipo de solo e cresce naturalmente em solos pobres em nutrientes (VALLILO et al., 2006). De acordo com Lorenzi (2008), os solos do tipo podzólico vermelho-amarelo, em clima tropical quente e com baixo índice pluviométrico são os que promovem melhores produções nas plantas do gênero *Campomanesia*.

Do ponto de vista ecológico, as plantas de guavira são tolerantes a inundação e se estabelecem no ambiente ao final do período de sucessão, quando o ambiente atinge seu equilíbrio, sendo assim, considerada uma espécie clímax ou secundária tardia, desempenhando uma importante função na reposição de matas ciliares (DURIGAN et al., 2004).

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 ( $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\beta$ -(z) ocimeno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem o aroma cítrico (VALLILO et al., 2006).

A presença dos compostos fenólicos nos frutos da espécie tem despertado interesses crescentes nas pesquisas nos últimos anos por serem considerados potentes agentes antioxidantes, protegendo o organismo dos efeitos danosos causados pelos radicais livres, os quais são responsáveis pelo envelhecimento e surgimento de doenças degenerativas como o câncer, cataratas, artrite e diabetes (GIADA e MANCINI FILHO, 2006).

## **2.2. Propagação da espécie**

Com relação à propagação da guavira, naturalmente é propagada por sementes (PORTO e GULIAS, 2006), porém, a propagação sexuada apresenta algumas limitações, devido principalmente às suas sementes apresentarem recalcitrância, não suportando armazenamento à baixa temperatura e sendo intolerante à dessecação (MELCHIOR et al., 2006). Devido a curta viabilidade das sementes, a germinação deve ser feita imediatamente após a colheita dos frutos (AVIDOS e FERREIRA, 2003).

Dentre os primeiros trabalhos realizados para avaliar a propagação da espécie, destaca-se o de Carmona et al. (1994), onde os autores estudaram o efeito da extração química das sementes e verificaram que a fermentação em hidróxido de amônio, com pH próximo ao neutro (6,0) gerou 100% de sementes viáveis, enquanto que, as sementes não fermentadas apresentaram baixo percentual de germinação, desenvolvimento de plântulas anormais e alta contaminação por microrganismos. Os mesmos autores atribuíram o baixo percentual de germinação das sementes e o crescimento anormal das plântulas à presença de substâncias inibidoras do processo germinativo na mucilagem em torno das sementes e a esta favorecer o desenvolvimento de microrganismos.

Posteriores estudos conduzidos por Melchior et al. (2006) demonstraram que o baixo percentual de germinação das sementes de guavira não estava relacionado à presença de inibidores na mucilagem que as envolve, mas sim, ao grau de maturação dos frutos durante a

colheita, verificando a existência de uma relação linear crescente entre a maturidade dos frutos (polpa com maior concentração de açúcar) e a germinação, sendo necessária a colheita dos frutos com um mínimo de 15,65° Brix. Em acréscimo a baixa germinação devido ao grau de maturação dos frutos, os autores destacaram ainda como fator limitante da germinação à recalcitrância das sementes, não suportando armazenamento à baixas temperaturas (8°C) e nem a dessecação.

Scalon et al. (2009) verificaram que a germinação das sementes de *C. adamantium* aos três dias após a retirada do fruto é elevada e não varia em função do processamento e temperatura de incubação, no entanto, quando mantidas no fruto, as sementes perdiam a qualidade fisiológica, confirmando a perda da viabilidade e vigor das sementes.

Dresch et al. (2012) avaliaram a influência da temperatura e da umidade do substrato na germinação das sementes de guavira recém-processadas com 57% de grau de umidade e sementes secas com 27% de grau de umidade, armazenadas durante 18 dias em frasco de vidro hermeticamente fechado. Os resultados obtidos demonstraram que as sementes recém-processadas apresentaram maior germinação e vigor em relação às sementes secas e armazenadas. A redução do grau de umidade para 27% e o armazenamento prejudicaram a qualidade fisiológica das sementes e concordando com os trabalhos de Carmona et al., 1994; Melchior et al., 2006; Scalon et al., 2009, os autores concluíram que devido a curta viabilidade das sementes, a semeadura deve ser feita imediatamente após a sua extração dos frutos. Ainda de acordo com Dresch et al. (2012) é necessário desenvolver programas de conservação de germoplasma da espécie, bem como, a realização de estudos básicos sobre as condições necessárias para o armazenamento, germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas, visando à produção de mudas e a recomposição de vegetação.

A criação de bancos de germoplasma, de acordo com Vieira et al. (2010) é de fundamental importância para a preservação da espécie, bem como, para a seleção de



populações mais resistentes, considerando que a espécie apresenta uma grande variabilidade genética, pouca resistência a pragas e doenças e devido às características dos frutos, película delgada e apresentarem por 90% de suco, os frutos são pouco resistentes ao transporte e ao armazenamento. Segundo os mesmos autores, é também, de fundamental importância, o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação assexuada para a espécie.

Um dos métodos de propagação assexuada utilizado com sucesso no sentido de preservação de inúmeras espécies, produção de mudas e seleção de plantas mais resistentes tem sido encontrado nas técnicas de cultura de tecidos *in vitro*. A propagação *in vitro* ou micropropagação apresenta inúmeros benefícios, podendo citar a produção em larga escala e em curtos períodos de tempo (MORAES et al., 2010; ARRIGONI-BLANK et al., 2011), a produção de plantas uniformes não precisando se preocupar com a época do ano, a obtenção de plantas mais resistentes à estressores bióticos e abióticos e livres de problemas fitossanitários (MORAES et al., 2010; DIAS et al., 2011), e, como ferramenta importante para a manutenção e o intercâmbio de germoplasma (BRAUN et al., 2010).

### **2.3. Cultivo *in vitro***

As técnicas de cultivo *in vitro* têm contribuído para a propagação de diferentes espécies, sendo o método mais utilizado a micropropagação *in vitro*. Espécies vegetais que não produzem sementes (plantas estéreis) ou as que produzem sementes recalcitrantes, as quais não podem ser armazenadas por longos períodos de tempo, podem com sucesso ser preservadas por meio de técnicas de cultivo *in vitro* (HUSSAIN et al., 2012).

O cultivo *in vitro* é iniciado a partir da inoculação, em condições assépticas, de pequenos propágulos ou de fragmentos de tecidos e órgãos vegetais, denominados explantes, em meio nutritivo sólido ou líquido, constituído, principalmente, de sais minerais, vitaminas e fitorreguladores (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Os explantes podem regenerar órgãos vegetais (organogênese direta) ou plantas completas idênticas à planta matriz, ou ainda dar origem a massas celulares denominadas calos (organogênese indireta), que também podem regenerar plantas completas. A capacidade de regeneração fundamenta-se na característica de totipotência da célula vegetal, a qual permite manifestar a capacidade de iniciar a formação de novo indivíduo (TORRES et al., 2000). A capacidade de regeneração de plantas *in vitro* é considerada complexa, pois, diferentes fatores externos e internos estão envolvidos no controle do processo de diferenciação, como exemplo, podemos citar o genótipo, a fonte e as condições fisiológicas em que se encontram os explantes, a associação de reguladores vegetais exógenos, em particular auxinas e citocininas, as características do meio de cultura empregado e as condições do ambiente de cultivo (LIMA et al., 2012; HUSSEIN e AQLAN, 2011).

As citocininas 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 (CASTRO et al., 2007). Já as auxinas, 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*. Um dos métodos mais utilizados de cultivo *in vitro* é a micropropagação. Esta técnica é uma forma de propagação assexuada com segregação genética reduzida (MORAES et al., 2010), que permite a obtenção de plantas livres de patógenos, a produção em larga escala e em períodos de tempo pequenos (ARRIGONI-BLANK et al., 2011) e a produção de plantas em ambiente controlado e espaço reduzido, independente da influência de fatores ambientais,

sazonais e geográficos, ampliando as perspectivas de exploração econômica das espécies (SATO e YAMADA, 2008).

Geralmente, a micropropagação é iniciada a partir de explantes nodais caulinares retirados de ramos vegetativos adultos. *In vitro* é dividida em três fases distintas, o estabelecimento da cultura em condições assépticas, a multiplicação (repicagem das brotações produzindo inúmeros clones) e o enraizamento das brotações, produzindo ao final plantas completas. O sucesso da técnica depende principalmente da fase de estabelecimento *in vitro*.

Em espécies lenhosas, como a maioria das frutíferas, de acordo com Schuch e Erig (2005), o estabelecimento *in vitro* apresenta dois problemas principais: a contaminação e a oxidação. Em acréscimo a estes problemas, outro fator agravante está na origem do material utilizado como matriz para o estabelecimento *in vitro*. Na ausência de um jardim clonal ou plantas matrizes cultivadas em condições controladas, os ramos vegetativos para o estabelecimento *in vitro* da cultura devem ser obtidos diretamente de plantas oriundas do campo, o que pode resultar em maior grau de contaminação e um baixo percentual de sobrevivência.

Entre os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de realizar a propagação assexuada e *in vitro* de guavira encontra-se o de Azambuja (2013). A autora realizou diversos experimentos com o objetivo de estabelecer *in vitro* a espécie a partir de segmentos nodais de plantas matrizes adultas obtidas diretamente do campo. Os fatores avaliados na sua grande maioria foram agentes antimicrobianos, tais como, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, rifampicina, tetraciclina, carbendazim e cloreto de mercúrio, e diferentes concentrações e tempos de exposição dos explantes aos mesmos, bem como, agentes antioxidantes, com o objetivo de reduzir a oxidação dos explantes, fato comum em espécies lenhosas. Os resultados obtidos por Azambuja (2013) demonstraram que a espécie apresenta 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*.

Na inexistência de um jardim clonal com qualidade fitossanitária, uma alternativa para a obtenção de explantes sadios encontra-se na propagação de material vegetativo proveniente de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*. De acordo com Gricoletto (1997) o uso de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*, reduz a contaminação e a baixa resposta morfo genética dos tecidos arbóreos adultos, o que será abordado nos próximos capítulos.

## REFERÊNCIAS

ARANTES, A.A.; MONTEIRO, R.A. Família Myrtaceae na estação ecológica do Panga. **Lundiana**, Uberlândia, v.3, n. 2, p. 111-127, 2002.

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.

AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos Cerrados - Preservação gera muitos frutos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.15, p.36-41, 2003. (Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/frutos.pdf>).

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.

CARMONA, R.; REZENDE, L.P.; PARENTE, T.V. Extração química de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.16, n.1, p.31-33, 1994.

CARNEVALI, T.O.; VIEIRA, M.C.; SOUZA, N.H.; RAMOS, D.D.; HEREDIA ZÁRATE, N.A.; CARDOSO, C.A.L. Espaçamento entre plantas e adição de cama-de-frango na produção de biomassa das plantas e na composição química dos frutos da *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p. 680-685, 2012.

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.

DIAS, M.M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.; SANTOS, A. dos; OLIVEIRA, A.C. de; RODRIGUES, V.A. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 513-520, 2011.

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. (Disponível em: <http://www3.mg.senac.br/Revistasenac/edicoes/edicao4.htm>).

DRESCH, D.M.; SCALON, S. de P.Q.; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M. do C. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 94, p. 223-229, 2012.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J.B.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F. **Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada**. São Paulo: Páginas & Letras, 2004. 475p.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p.

GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.4, n.12, p. 7-15, 2006.

GRIGOLETTO, E.R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gómez (mangabeira)**. 1997. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

HUSSAIN, A.; AHMED, I.; NAZIR, H.; ULLAH, I.; QARSHI, I.A. Plant tissue culture: Current status and opportunities. In: LEVA, A.; RINALDI, L.M.R. **Recent advances in plant *in vitro* culture**. Rijeka, INTECH Open Access Publisher, 2012, p.1-28.

HUSSEIN, E.A.; AQLAN, E.M. Regeneration of *Solanum villosum* Mill., via direct organogenesis *in vitro*: A novel study. **International Journal of Botany**, Faisalabad, v.7, ed.2, p. 177-182, 2011.

LIMA, C.O. de C.; MARCHI, M.N.G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C.E.; BELLINTANI, M.C.; SANTANA, J.R.F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p. 249-254, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v.1, 5ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 384 p.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

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.

MOURA, T. M. **Estrutura genética populacional em lobeira (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., Solanaceae), em ambientes naturais e antropizados no estado de Goiás**. 2007. 97p.

Dissertação (Dissertação Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2007.

NIC-LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C. A. Survey of the reproductive biology of the Mystoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Washington, v.83, n.1, p. 480-503, 1996.

OSHIRO, A.M.; DRESH, D.M.; SCALON, S. de P.Q. Atmosfera modificada e temperaturas de armazenamento na conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.29, n.5, p.1421-1430, 2013.

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.

PORTO, A.C.; GULIAS, A.P.S.M. Gabiroba. In: VIEIRA, R.F.; COSTA, T. da S.A.; SILVA, D.B. da; FERREIRA, F.R.; SANO, S.M. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, 322p.

PREVEDELLO, J.A.; CARVALHO, C.J.B. de. Conservação do Cerrado Brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v.4, n.1, p.39-57, 2006.

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.

SATO, F.; YAMADA, Y. Engineering Formation of Medicinal Compounds in Cell Cultures. In: BOHNERT, H.J.; NGUYEN, H.; LEWIS, N.G. (Eds.) **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, San Diego, v. 1, p. 311-345, 2008.

SCALON, S. de P.; OSHIRO, A. M.; DRESCH, D. M. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia adamantium* Camb.) sob diferentes revestimentos e temperaturas de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n.4, p. 1022-1029, 2012.

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.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.T.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Ed. Embrapa, 2000, 128p.

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.

VIEIRA, R. F. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. In: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI, T. da S. C.; SILVA, D. B. da; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2006. 320 p.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. 1ª Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, 322 p.



## **CAPÍTULO I:**

### **Effects of seed origin, storage conditions, and gibberellic acid on *in vitro* germination of guavira seeds**

**Cláudia Roberta Damiani<sup>1\*</sup>, Leandro Darc da Silva<sup>1</sup>, Ademir Goelzer<sup>1</sup> and Thamiris Gatti Déo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) - Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, CEP: 79804-970, Dourados – MS, e-mail: [claudiadamiani@ufgd.edu.br](mailto:claudiadamiani@ufgd.edu.br)

#### **ABSTRACT**

Guavira seeds (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) are recalcitrant and rapidly lose viability upon removal from the fruit, making difficult the long-term storage. *In vitro* germination could be used as an important tool to overcome the issues related to this short viability. It might help seed conservation and species propagation. The purpose of this study was to evaluate *in vitro* germination of guavira seeds collected from different sites and stored under different storage conditions. Also, the inoculation of these seeds in MS medium supplemented with different concentrations of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) was evaluated. We evaluated germination rate, the average length of the shoot and main root, and the number of leaves. Inoculated guavira seeds immediately after harvest and treated with GA<sub>3</sub>, regardless concentration, increased germination rate by at least 10%, whereas 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> resulted in 100% germination. The shoot length increased linearly with increasing concentration of the growth regulator. Different concentrations of GA<sub>3</sub> had no effect on the development of the main root and leaves. Seeds acquired from a local farmer's market showed lower germination rate than those inoculated immediately after harvesting, and did not differ in the rate of germination under different treatments with GA<sub>3</sub>. Furthermore, around 25% of those seedlings had abnormal leaf morphology. Guavira seeds stored at 4°C and -20°C for 60

days did not germinate successfully, suggesting that seeds under cold storage conditions cannot be used for germplasm purposes.

**Key words:** *Campomanesia adamantium*, Cerrado, Myrtaceae, Temperature.

## INTRODUCTION

Guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) is a native species to Cerrado belonging to the myrtle family Myrtaceae. Fruit is rich in phenolics compounds, with great antioxidant activity (Giada & Mancini Filho, 2006) and due its sweetness and aromatic flavor it offers good market acceptance (Vieira et al., 2010). In addition to the unique flavor and nutraceutical properties of its fruit, this species presents desirable agronomic traits such as a high fruit per plant ratio (Melchior et al., 2006) and high genetic variability, which are useful for cultivar development and genetic selection (Oliveira et al., 2011).

Given these traits, guavira is a good prospect for commercial production (Vieira et al., 2010). However, guavira is not presently cultivated in commercial orchards, so fruits are directly harvested from natural populations. Several factors have limited the expansion of commercial orchards, such as the limited natural range of this species, susceptibility to insects and diseases, and poor post-harvest preservation during transport and storage (Vieira et al., 2010). However, the greatest limitation is the plant (seedling) propagation due to the recalcitrance characteristics and low seed germination efficacy (Melchior et al., 2006; Scalon et al., 2012; Dresch et al., 2012). Therefore, basic researches on seed storage, germination, establishment conditions (Dresch et al., 2012), as well as the development of new and efficient asexual propagation techniques (Vieira et al., 2010) becomes critically important in order to producing seedlings,

establishing a germplasm collection for preservation, and developing commercial production.

*In vitro* tissue culture has been successfully used for species preservation, seedling production, and selection of disease-resistant plants. *In vitro* propagation or micropropagation presents countless benefits, including rapid mass production (Moraes et al., 2007; Arrigoni-Blank et al., 2011), year-round production of uniform plants, increased biotic and abiotic stress resistance, elimination of phytosanitary problems (Moraes et al., 2007; Dias et al., 2011), and facilitation of germplasm maintenance and exchange (Braun et al., 2010). Field-grown or wild plants may not provide a suitable source for *in vitro* culture due to endogenous contamination, according to Soares et al. (2009). Whereas healthy explants can be developed from vegetative material grown from seeds germinated *in vitro*. However, Oliveira et al. (2013) highlights that an embryo is the result of genetic recombination with a different genotype limiting the cloning process of superior individuals established in the field. For all these reasons, our research objective was to evaluate the efficiency of *in vitro* germination of guavira seeds under different gibberellic acid treatments.

*In vitro* germination and high quality seedling establishment (great vigor and phytosanitary conditions) may be used to initiate *in vitro* micropropagation. These techniques will assist in guavira conservation and seedling production, avoiding the limitations imposed by propagation via seed.

## **MATERIAL AND METHODS**

Guavira fruits, *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg were harvested in November 2013 from plants grown at the Garden of Medicinal Plants at the Faculdade

de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil. In November 2014, fruits were obtained from a farmer's market in Dourados city (MS).

The fruits were pulped and the seeds were separated under running water. In a laminar flow cabinet, seeds were rinsed with 70% ethanol, immersed in 2.5% sodium hypochlorite for 5 minutes, washed three times in sterilized water, and superficially dried with sterilized filter paper. After this procedure and in order to sterilize external surfaces seeds were used in one of five experiments designed under a completely randomized design. In the first two experiments, the initial germination capacity of the seeds was immediately evaluated. For the other experiments, the seeds were stored in brown paper bags for 60 days at one of the following temperatures:  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  (ambient conditions maintained by air conditioning),  $4^{\circ}\text{C}$ , or  $-20^{\circ}\text{C}$ . After storage, seed surfaces were sterilized a second time as previously described. All experiments tested the effects of different concentrations of gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ) on germination efficacy.

In the first experiment, seeds from the local garden were treated with different  $\text{GA}_3$  concentrations: 0 (control), 1.0, 2.0, 3.0, or  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Each of the five treatments included four replicates of three culture flasks with seven seeds each. In the other experiments seeds from a local farmer's market were treated with different  $\text{GA}_3$  concentrations: 0 (control), 2.5, 5.0, 7.5, or  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Each of the five  $\text{GA}_3$  treatments included five replicates of one culture flask with five seeds each. In every experiment seeds were inoculated in 260 mL glass culture flasks containing 30 mL of MS culture medium (Murashige & Skoog, 1962), with  $30 \text{ g L}^{-1}$  of sucrose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of myo-inositol,  $6 \text{ g L}^{-1}$  of agar, and the specified concentration of gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ), with the final pH adjusted to 5.8. The medium was sterilized in an autoclave for 20 minutes

at 121°C, under 1.5 atm of pressure.

After inoculation, the flasks were transferred to a growth chamber set at 25°C ± 2°C. Seeds from the garden were subjected to an initial 15-day period of darkness, while seeds from the market were kept in darkness for 7 days; after this period, all seeds were grown under lights with a photosynthetic photon flux density of 45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a photoperiod of 14 hours.

After day 45, seeds from the local garden fruit were scored for percent of germination, average length of shoot (cm), average length of the main root (cm), and average number of leaves. After day 30, seeds from farmer's market fruit were scored for germination rates (total = seeds that developed roots; normal = seedlings with root and leaf; abnormal = seedlings with stem axis but no leaves), average length of shoot (cm), average length of the main root (cm), and average number of leaves.

Percentage data were transformed to arcsine values, while count and continuous data were transformed to square root prior ANOVA analysis. Means were compared by polynomial regression using the statistics software package Winstat (Machado et al., 1999).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

According to the ANOVA different concentrations of gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ) showed a significant effect ( $p=0.05$ ) on *in vitro* germination of seeds collected from the garden and immediately inoculated after harvest (Table 1). Farmer's market fruit seeds did not show a significant response to difference concentrations of  $\text{GA}_3$  (Table 2).

**Table 1.** Analysis of variance (ANOVA) summary for the *in vitro* germination of guavira seeds (*Campomanesia adamantium*) extracted from fruit collected in the local garden. Germination – G (%); Average length of shoots – ALS (cm); Average length of main root – ALMR (cm) and Average number of leaves – ALL.

SV	DF	MS			
		G	ALS	ALMR	ALL
GA <sub>3</sub> concentration	4	0.13 <sup>*</sup>	0.65 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>
Residue	12	0.03	0.29	0.10	0.02
VC (%)		11.6	12.3	17.3	7.9
OA		96.3	4.4	1.8	2.4

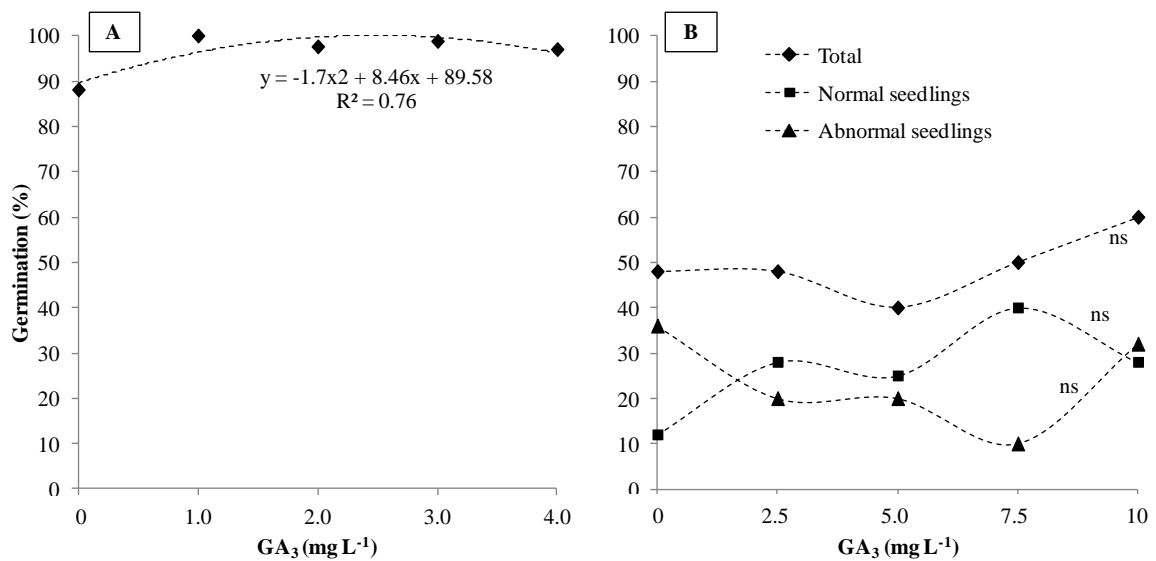
<sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup> and <sup>ns</sup>, significant at 1% e 5% and non-significance, respectively, by the test F. SV- Source of Variation; DF- Degrees of Freedom; SM- Mean Square; VC - Variation Coefficient; OA - Overall average.

**Table 2.** Analysis of variance (ANOVA) summary for the *in vitro* germination of guavira seeds (*Campomanesia adamantium*) extracted from fruit exposed at the local farmer's market. Germination – G (%); Germination of normal plants – GNP and abnormal - GAP; Average length of shoots – ALS (cm); Average length of main root – ALMR (cm) and Average number of leaves – ALL.

SV	DF	SM					
		G	GNP	GAP	ALS	ALMR	ALL
GA <sub>3</sub> concentration	4	0.04 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	0.48 <sup>ns</sup>
Residue	16	0.05	0.10	0.12	0.07	0.13	0.17
VC (%)		30.5	69.5	79.5	20.9	28.2	29.3
OA		49.6	26.1	24.3	1.2	1.2	1.8

<sup>\*\*</sup>, <sup>\*</sup> and <sup>ns</sup>, significant at 1% e 5% and non-significance, respectively, by the test F. SV- Source of Variation; DF- Degrees of Freedom; SM- Mean Square; VC - Variation Coefficient; OA - Overall average.

Garden seeds that were inoculated right after harvest presented significant differences in percent germination when treated with different concentrations of GA<sub>3</sub>. The addition of GA<sub>3</sub> to the culture medium, regardless of concentration, increased the percent of germination by approximately 10% over the control. Maximum germination (100%, Figure 1A) was observed at 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. For the seeds from market fruits, percent of germination did not differ at different concentrations of GA<sub>3</sub>, except at 10 mg L<sup>-1</sup>. At this concentration (10 mg L<sup>-1</sup>), an approximately 10% increase in germination was observed compared to the control (GA<sub>3</sub> free), respectively, 48 and 60% (Figure 1B).



**Figure 1.** The effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) in the MS medium on *in vitro* germination of guavira (*Campomanesia adamantium*). **A)** Seeds extracted from fruit collected at the local garden. **B)** Seed extracted from fruit exposed at the local farmer's market.

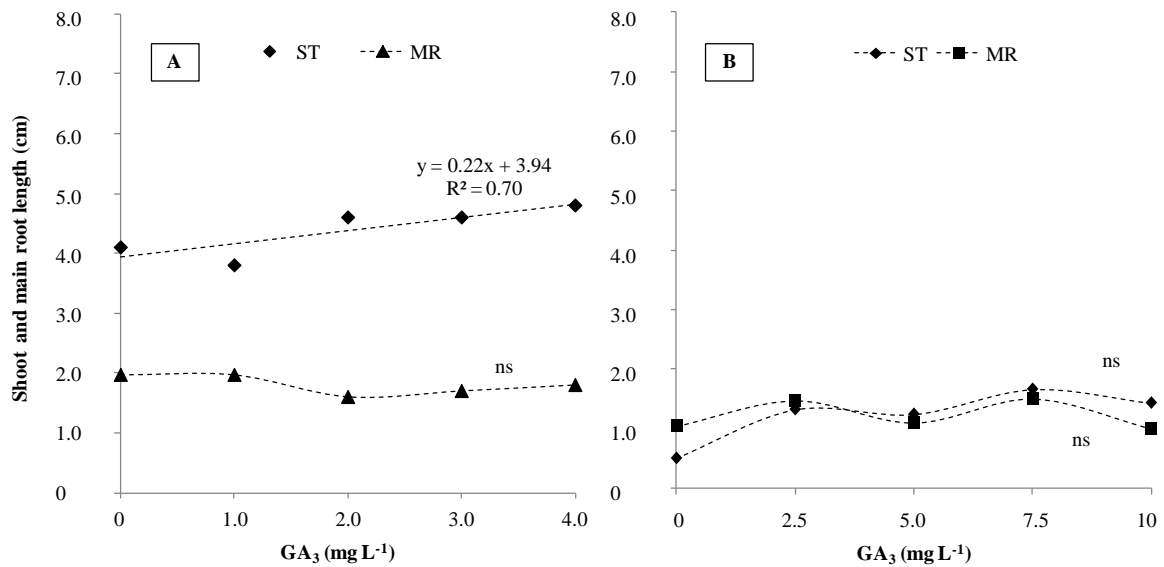
In the first and second experiments, the seeds were inoculated immediately after surface sterilization, but garden and market seeds had different germination rates. These differences might be related to the amount of time between harvest and seed extraction. Guavira seeds are known to lose their viability when kept in the fruit, and they germinate most successfully right after harvest (Melchior et al., 2006). We could not establish a harvest date for the market fruits, but the seeds had already lost viability compared to those from the freshly harvested garden fruits. More research will be needed to identify the factors that lead to the reduction of viability.

Market seeds that were treated with 10 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> showed abnormal morphology in approximately 25% of the seedlings (Figure 1B), with the primary leaves atrophied or undeveloped. The development of incomplete or abnormal seedlings may be attributed to fruit harvest time and storage conditions. The harvest date and storage conditions prior to selling might affect factors that are essential for proper seedling

development. According to Dresch et al. (2012), seedlings from seeds exposed to high temperatures (35 °C) had both poor growth and development, curved and bulky hypocotyl compared to seeds exposed to lower temperatures (25 °C), evidencing the effect of temperature on seedling development.

In the polynomial regression using garden seeds, shoot length demonstrated a linear response to the concentration of GA<sub>3</sub> (Figure 2A). The longest shoots (4.8 cm) grew in the culture medium with 4.0 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>. In market seeds, different concentrations of GA<sub>3</sub> did not affect shoot length over the control; average seedling length was 1.2 cm (Figure 2B). Main root development was not influenced by gibberellic acid at any concentration in any of the experiments (Figure 2A and B). Soares et al. (2012) reported a positive influence of GA<sub>3</sub> on the shoot length in the orchid *Dendrobium nobile* Lindl. They also observed that plant height increased linearly with the increase of GA<sub>3</sub> concentration, suggesting a correlation between the two. According to Santos et al. (2013), gibberellin use may inhibit or minimize the impact of adverse factors in the quality and performance of seeds, and gibberellins increase the speed at which seeds emerge and aid in seedling development. During *in vitro* propagation, species that are sensitized by gibberellic acid elongate more rapidly and can be transferred from culture more quickly, allowing efficient production of large numbers of robust individual plants (Alcantara et al., 2014).



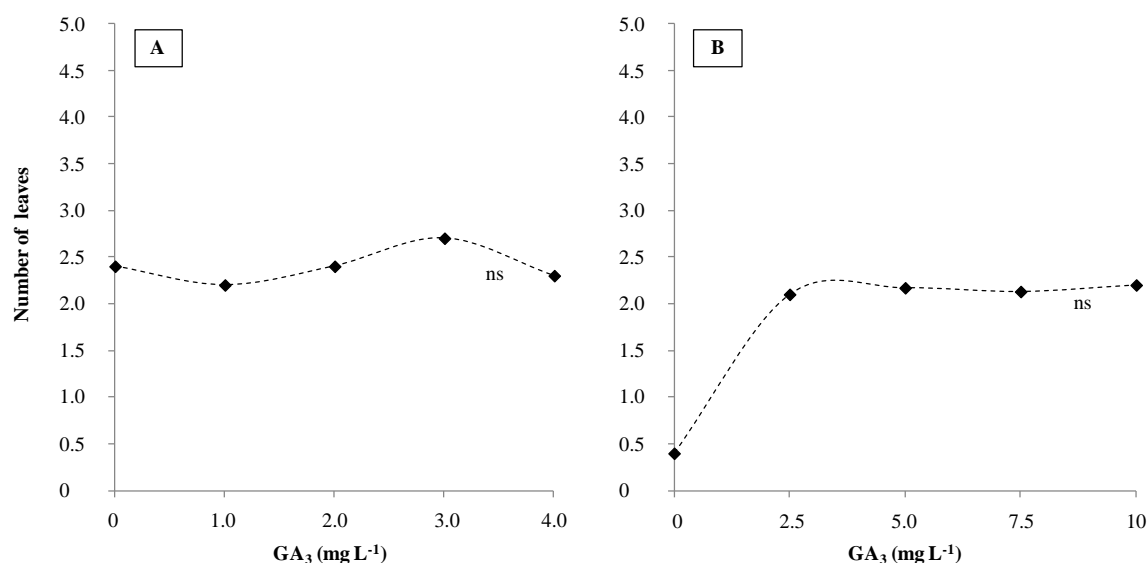


**Figure 2.** Average length of shoots (ST) and main root (MR) of guavira seedlings (*Campomanesia adamantium*) germinated and *in vitro* cultivated in MS medium with different gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) concentrations. **A)** Seeds extracted from fruit collected at the local garden. **B)** Seed extracted from fruit exposed at the local farmer's market.

Simões et al. (2012) studied the effect of gibberellins, at the same concentrations we tested with the garden seeds, during *in vitro* germination of long pepper (*Piper hispidinervum* C. DC.), and contrary to our results, the authors found that shoot length responded negatively, with the longest shoots observed at the lowest concentration, 1.0 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>. It is important to emphasize that growth regulators can affect cultivated species in different ways, and the classes, concentrations (Bastos et al., 2007), and presence of endogenous phytohormones can induce different responses in plants (Dias et al., 2008). Although *Eucalyptus dunnii* Maiden belongs to the same family (Myrtaceae) as guavira, Navroski et al. (2013) did not find that GA<sub>3</sub> had a positive effect on the *in vitro* shoot elongation of this species. Treatment with GA<sub>3</sub> reduced germination and shoot length while increasing callus formation.

Species respond differently to gibberellins depending on tissue type, developmental stage, hormone concentration, and interactions with endogenous factors. Different concentrations of GA<sub>3</sub> did not influence root growth, regardless of seed origin or storage treatment. Torres and Borges (2013) found similar results with *Capsicum frutescens* L. (chili pepper), with no significant difference in seedling root growth between the control and treatments with gibberellin. In contrast, Simões et al. (2012) found that the same concentrations of GA<sub>3</sub> that we used with the garden seeds reduced root length in long pepper (*Piper hispidinervum*) seedlings. However, according to Lima et al. (2009), in many species, including passion fruit, tangerine, soursop, and lemon trees, gibberellins promote cellular stretching and stimulate the primary root to break the tissues that restrict its growth.

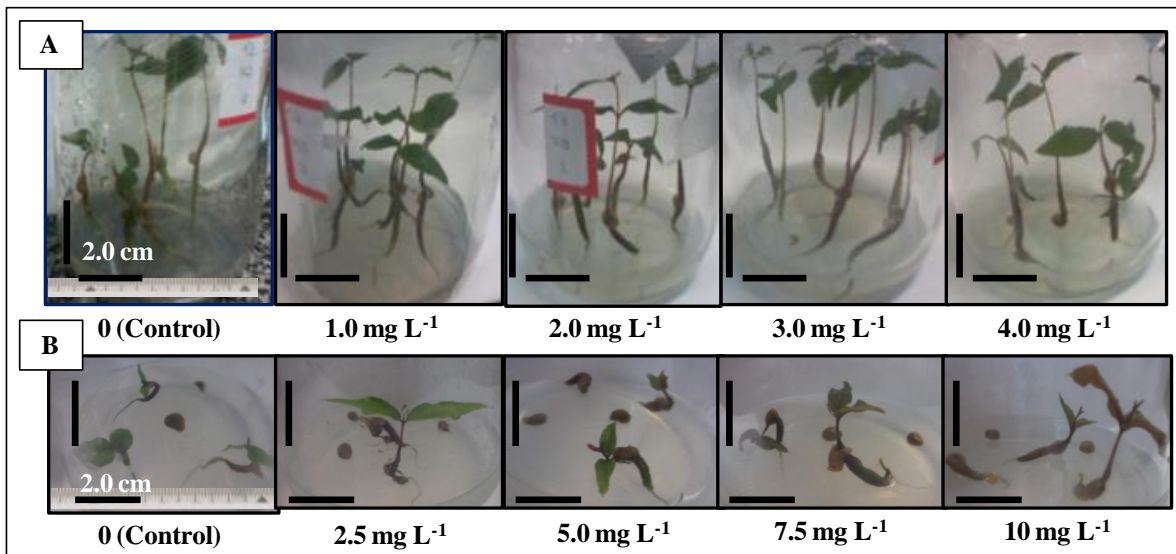
We did not find a significant difference in the average number of leaves between seed types or among treatments (Figure 3A and B). However, seedlings from market seeds had a greater average number of leaves when germinated in the presence of GA<sub>3</sub> (Figure 3B). Machado et al. (2005) studied the effects of different concentrations of gibberellins during the acclimatization process in micropropagated rootstock of the apple cultivar Marubakaido and observed that the number of leaves was positively affected. They found that gibberellic acid induced the plants to produce a larger number of leaves by overcoming apical bud dormancy.



**Figure 3.** Average number of leaves of guavira seedlings (*Campomanesia adamantium*), germinated and *in vitro* cultivated in MS medium with different gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) concentrations. **A)** Seeds extracted from fruit collected at the local garden. **B)** Seed extracted from fruit exposed at the local farmer's market.

Garden seeds germinated right after harvest (Figure 4A) showed an increase in shoot length and leaf number in the presence of GA<sub>3</sub> compared to the control, although shoot length and number of leaves were not influenced by different concentrations of the regulator. Seedlings from market seeds (Figure 4B) that were germinated in a medium containing GA<sub>3</sub> showed better leaf blade developed, longer internodes, and a thicker main root when compared to the control. Seeds stored at ambient temperature (approximately 25°C) germinated prematurely and became contaminated with fungi during storage, probably due to the combination of relatively high humidity and temperature, precluding their use in further experiments. The seeds stored at 4°C and -20°C for the period of 60 days lost their germinative power, with no germination observed 30 days after *in vitro* inoculation. Our results corroborated those of Melchior et al. (2006) and Scalon et al. (2009), where the authors showed that guavira seeds

presented recalcitrance, lost germinative power during storage, and only germinated successfully when obtained from fruits right after their harvest and pulping.



**Figure 4.** General appearance of guavira seedlings (*Campomanesia adamantium*), germinated and *in vitro* cultivated in MS medium with different gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) concentrations. **A)** Seeds extracted from fruit collected at the local garden. **B)** Seed extracted from fruit exposed at the local farmer's market.

## CONCLUSION

The use of gibberellic acid, regardless concentration, promoted an increase of 10% in germination of seeds inoculated in a culture medium right after fruit harvest, however the use of 1.0 mg L<sup>-1</sup> lead to 100% germination. Shoot length increased linearly as the growth regulator concentration increased. At the studied concentrations, GA<sub>3</sub> did not affect main root and leaf development. Seeds extracted from fruits at the farmer's market had lower a germination rate and did not respond to the different treatments with gibberellic acid. The seeds had an elevated percentage (±25%) of seedlings with abnormal leaf morphology. Seeds stored at 4°C and -20°C for 60 days did not germinate, whereas seeds stored at ambient temperature (±25°C) germinated prematurely. These storage conditions are not suitable for seed conservation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the scholarships provided and financial support by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-MS).

## REFERENCES

- ALCANTARA, G. B. de; MACHADO, M. P.; RIBEIRO, D. de S.; WIPPEL, H. H.; BESPALHOK FILHO, J. C.; OLIVEIRA, R. A. de; DAROS, E. Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.5, n. 1, p. 20-25, 2014.
- ARRIGONI-BLANK, M.F.; SANTOS A. V.; BLANK A. F. Organogênese direta e aclimatização de plantas de patchouli. *Horticultura Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000200002>
- BASTOS, L.P.; MOREIRA, M.J.S.; COSTA, M.A.P. de C.; ROCHA, M.C. da; HANSEN, D. de S.; SILVA, S.A.; DANTAS, A.C.V.L.; SOUSA, C. da S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, supl. 2, p.1122-1124, 2007.
- 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*, v.31, n.3, p.539-546, 2010.

DIAS, G. de M.G.; CARVALHO, A.C.P.P. de; PINHEIRO, M.V.M.; MORAIS, J.P.S. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v.4, n.1, p.1-7, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362009000100021>

DIAS, M.M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.; SANTOS, A. dos; OLIVEIRA, A.C. de; RODRIGUES, V.A. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 2, p. 513-520, 2011.

DRESCH, D.M., SCALON, S. de P.Q.; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M.C. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. *Scientia Forestalis*, v.40, n.94, p. 223-229, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000100030>

GIADA, M.L.R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.4, n.12, p.7-15. 2006.

LIMA, C.S.M.; BETEMPS, D.L.; TOMAZ, Z.F.P.; GALARÇA, S.P.; RUFATO, A. de R. Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 15, n. 1-4, p. 43-48, 2009.

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

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; COSTACURTA, M. A. Aplicação de ácido giberélico em mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira marubakaido. *Scientia Agrária*, v.6, n1, p. 55-58, 2005.

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*, v.28, n.3, p.141-150, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222006000300021>

MORAES, A.M.; ALMEIDA, F. de A.C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.1, n.2, p.39-44, 2007.

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

NAVROSKI, M.C.; REINIGER, L.R.S.; PEREIRA, M. de O.; CURTI, A.R.; PAIM, A.F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Cerne*, v.19, n.4, p.545-550, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000400003>

OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v.33, n.76, p.439-453, 2013. <http://dx.doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>

OLIVEIRA, M. C de.; SANTANA, D. G de.; SANTOS, C. M dos. Biometria de frutos e sementes e emergência de plântulas de duas espécies frutíferas do gênero *Campomanesia*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 2, p. 446-455, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000069>

SANTOS, C.A.C. dos; VIEIRA, E.L.; PEIXOTO, C.P.; LEDO, C.A. da S. Germinação de sementes e vigor de plântulas de maracujazeiro amarelo submetidos à ação do ácido giberélico. *Biocience Journal*, v. 29, n.2, p. 400-407, 2013.

SCALON, S. de P.; OSHIRO, A. M.; DRESCH, D. M. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia adamantium* Camb.) sob diferentes revestimentos e temperaturas de armazenamento. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 34, n.4, p. 1022-1029, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000400008>

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, vol.31, n.2, p.096-103, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000200011>

SIMÕES, M.A.; VASCONCELOS, J.M.; OLIVEIRA, J.P. DE; BELTRÃO, R.T.; MANFIO, C.E.; FERMINO JUNIOR, P.C.P.; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) no alongamento *in vitro* de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) durante a micropropagação. Amazônia: Ciência & Desenvolvimento, v.7, n.14, 2012.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; NERY, F.C.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Ciência e Agrotecnologia, v.33, edição especial, p.1847-1852, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000700025>

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; SUZUKI, R.M.; SCALON, S.P.Q.; ROSA JUNIOR, E.J. Germinação assimiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.14, n.4, p.617-623, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400007>



TORRES, R.C.; BORGES, K.C.A.S. Ação da giberelina no crescimento de pimenta (*Capsicum frutescens*). Cadernos UniFOA. Edição Especial Ciências da Saúde e Biológicas / Centro Universitário de Volta Redonda. Ano VIII, Volta Redonda: FOA, maio de 2013, 189p.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil. 1ª Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, 322 p.

## **CAPÍTULO II: Efeito do TDZ e ANA na organogênese *in vitro* de *Campomanesia adamantium* a partir de explantes foliares, internodais e radiculares**

### **RESUMO**

O desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação assexuada da guavira, *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg., é de fundamental importância para a conservação da espécie, considerando as limitações encontradas na propagação seminífera, impostas pela recalcitrância e perda de poder germinativo das sementes. Neste sentido, técnicas de propagação assexuada via cultivo *in vitro*, poderão contribuir para a produção de mudas, bem como, para a conservação de bancos de germoplasma da espécie. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade organogênica *in vitro* de guavira. Utilizou-se explantes radiculares e internodais e avaliou-se o efeito dos reguladores de crescimento, TDZ e ANA, nas concentrações de 5,0  $\mu\text{M}$  e 1,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente e a combinação destes, nas respectivas concentrações, bem como, explantes foliares e o efeito de diferentes concentrações de TDZ (5,0; 10; 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) suplementados com 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA e tratamento controle, sem adição de regulador de crescimento. Aos 56 dias de cultivo concluiu-se que explantes internodais são mais responsivos para a formação de calos (84%), quando comparados aos explantes foliares (69%) e radiculares (42,7%), porém, em nenhuma das concentrações testadas de TDZ, ANA e TDZ+ANA houve emissão de brotações. Explantes internodais não apresentaram oxidação, sendo esta observada em maior intensidade em explantes foliares (41%), seguido de 14,7% em explantes radiculares. Desta forma, a combinação de 5,0  $\mu\text{M}$  de TDZ e 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA é mais adequada para o processo de calogênese, pois mantém a produção de calos em 100% em explantes internodais, e, eleva a formação de calos em explantes radiculares, de 20 para 64%. Em explantes foliares, o uso de 5,0, 10; 15 e 20  $\mu\text{M}$  de TDZ suplementado com 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA, não exerceram influência sobre a formação de calos.

**Palavras-chave:** Reguladores, Guavira, Calo, Oxidação.

## **CAPÍTULO II: Effect of TDZ and NAA on *in vitro* organogenesis of *Campomanesia adamantium* from leaf, root and internodal explants**

### **ABSTRACT**

The development of efficient asexual propagation techniques of 'guavira', *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg., has fundamental importance for the conservation of the species, considering the limitations found in the seminiferous spread, imposed by the recalcitrance and loss of germination of seeds. In this sense, asexual propagation techniques via *in vitro* culture can contribute to the production of seedlings, as well as for the conservation of germplasm banks of the species. This work was carried out to evaluate *in vitro* organogenic capacity of 'guavira'. Internodal and radicular explants were used to evaluate the effect of growth regulators, TDZ and NAA at concentrations of 5.0  $\mu\text{M}$  and 1.0  $\mu\text{M}$ , respectively, and a combination of these at the respective concentrations, as well as leaf explants and the effect of different TDZ concentrations (5.0, 10, 15 and 20  $\mu\text{M}$ ) supplemented with 1.0  $\mu\text{M}$  NAA and control treatment, without added growth regulators. After 56 days of cultivation it was concluded that internodal explants are more responsive for callus formation (84%), when compared to leaf explants (69%) and root explants (42.7%), but in none of the tested concentrations TDZ, NAA and NAA+TDZ had shoots emission. Internodal explants showed no oxidation, this one being observed with greater intensity in leaf explants (41%), followed by 14.7% of root explants. Thus, the combination of 5.0  $\mu\text{M}$  of TDZ and 1.0  $\mu\text{M}$  of NAA is more appropriate for callus induction process, because it keeps the production of callus on 100% by internodal explants, and increases the formation of callus in root explants from 20 to 64%. In foliar explants, the use of 5,0 and 10; 15:20  $\mu\text{M}$  of TDZ supplemented with 1.0  $\mu\text{M}$  of NAA, did not exercise influence over the formation of calluses.

**Keywords:** Regulators, Guavira, Callus, Oxidation.

## INTRODUÇÃO

A *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg, conhecida popularmente como guavira, é uma espécie frutífera nativa do bioma Cerrado, pertencente à família Myrtaceae (LORENZI et al., 2006). A espécie apresenta potencial para cultivo comercial e exploração sustentável em curto prazo (VIEIRA et al., 2010) devido as suas características agronômicas desejáveis, como alto rendimento de frutos por planta (MELCHIOR et al., 2006) e qualidade nutricional dos frutos. Apresenta teores elevados de ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos permitindo sua utilização *in natura*, ou em indústrias, como exemplo em fábrica de alimentos e de bebidas (VALLILO et al., 2006).

Entre os principais problemas encontrados com relação à espécie, destaca-se à pequena extensão da safra, pouca tolerância a pragas e doenças e baixa resistência ao transporte e armazenamento dos frutos depois da coleta (VIEIRA et al., 2010), além da limitação na propagação sexuada imposta pela recalcitrância e perda do poder germinativo das sementes (CARMONA et al., 1994; MELCHIOR et al., 2006; SCALON et al., 2009; DRESCH et al., 2012).

O desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação assexuada da guavira, de acordo com Vieira et al. (2010) é fundamental para a conservação da espécie e seleção de populações mais resistentes à pragas e doenças. Neste sentido, as técnicas de cultura de tecidos vegetais têm contribuído significativamente na propagação e conservação das mais variadas espécies, além de serem utilizadas na formação de bancos de germoplasma. Adicionalmente, de acordo com Singh et al. (2011), as técnicas de cultivo *in vitro* podem também ser úteis como ferramentas para o melhoramento genético de culturas e para investigar a produção de importantes metabólitos secundários.

Dentre os métodos de cultivo *in vitro* mais utilizados encontra-se a micropropagação, uma forma de propagação assexuada com segregação genética reduzida a qual permite a

obtenção de plantas livres de patógenos. Outros benefícios são a produção em larga escala e em períodos de tempo pequenos, a produção de plantas uniformes independentemente da época do ano (ARRIGONI-BLANK et al., 2011; MORAES et al., 2010), bem como, por ser um processo de clonagem, a manutenção de características genéticas importantes a partir de matrizes selecionadas.

A técnica de micropropagação pode ser realizada por meio de organogênese ou embriogênese somática. A organogênese pode ser direta quando ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações destes, acarretando na formação de brotos e pode ser indireta, em que o explante necessariamente passa pela fase de calogênese e a partir de calos são gerados os brotos (REZENDE et al., 2008).

Tanto a indução de calos, como a regeneração de plantas *in vitro* é considerada complexa, pois diversos fatores estão envolvidos, externos e internos, como por exemplo, o genótipo, a fonte e as condições fisiológicas em que se encontra o explante, a associação de reguladores vegetais exógenos, em particular, auxinas e citocininas, as características do meio de cultura empregado e as condições do ambiente (HUSSEIN e AQLAN, 2011; LIMA et al., 2012; SHERKAR e CHAVAN, 2014). Dentre as citocininas utilizadas no processo de organogênese *in vitro*, o thidiazuron (TDZ) é reconhecidamente um dos reguladores de crescimento mais efetivo no controle e indução da morfogênese *in vitro* (ACHARJEE et al., 2012). As auxinas pertencem a uma classe de reguladores vegetais que participam de muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, como pode ser citado o seu efeito sobre aumento da resposta rizogênica, induzindo os primórdios radiciais visando o enraizamento (CAMARGO e VIEIRA, 2001).

No intuito de contribuir para o desenvolvimento de técnicas de propagação assexuada da espécie, tanto para obtenção de mudas, bem como visando à conservação do germoplasma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade organogênica *in vitro*

de guavira a partir de diferentes explantes, foliares, radiculares e internodais e submetidos a tratamentos com diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento, TDZ e ANA.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material vegetal foi obtido de plantas matrizes de guavira, *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Botânica e Multiuso, da Faculdade de Ciências Biológicas (FCBA) e Ambientais, da UFGD, Dourados – MS, no período de agosto de 2013 a junho de 2014.

Para atingir os objetivos propostos realizaram-se dois experimentos, em delineamento inteiramente casualizado. No primeiro experimento avaliou-se a capacidade organogênica de explantes radiculares e internodais, retirados de plântulas obtidas de sementes previamente germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm, e o efeito dos reguladores de crescimento, TDZ ((thiadizuram (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)) e ANA (ácido naftalenoacético), utilizando 5,0  $\mu\text{M}$  e 1,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente e a combinação destes, nas mesmas concentrações, obtendo-se um fatorial 2x3, totalizando seis tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo cinco explantes.

No segundo experimento avaliou-se a capacidade organogênica de explantes foliares retirados de brotações advindas do estabelecidos *in vitro* de ramos vegetativos e o efeito de diferentes concentrações de TDZ (5,0; 10; 15 e 20  $\mu\text{M}$ ) combinadas com 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA, comparados ao tratamento controle (0), sem adição de regulador de crescimento. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco

tubos de ensaio contendo uma folha com aproximadamente 1,0 x 0,7cm. As folhas foram incisadas na altura da nervura central e inoculadas com a face abaxial em contato com o meio.

Em ambos os experimentos, os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), previamente preparado e esterilizado, acrescido dos reguladores de crescimento (conforme tratamento), juntamente com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH 5,8 (ajustado após a adição do ágar). Após a distribuição nos frascos de cultivo, a esterilização foi realizada em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos com os explantes foram vedados com papel alumínio e mantidos no escuro por um período de 7 dias em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2°C, seguido da transferência para luminosidade de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 14 horas.

Aos 56 dias de cultivo foram avaliadas: a porcentagem de explantes oxidados, porcentagem de explantes que formaram calo e número de brotações emitidas por explante.

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

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No processo de organogênese *in vitro* de *Campomanesia adamantium* a partir de explantes internodais e radiculares, de acordo com a análise de variância (Tabela 1), o desenvolvimento de calos é dependente do tipo de explante, do regulador de crescimento e da

interação entre estes fatores. Por sua vez, a oxidação dos explantes é dependente somente do tipo de explante utilizado.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para características médias de: explantes oxidados (%) e explantes que formaram calos (%) durante a organogênese *in vitro* de explantes internodais e radiculares de guavira (*Campomanesia adamantium*). Dourados-MS, UFGD, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes oxidados	Calos
Tipo de explante	1	0,709 **	2,935 **
Regulador de crescimento	2	0,028 <sup>ns</sup>	0,667 **
Explante x Regulador	2	0,028 <sup>ns</sup>	0,786 **
Resíduo	20	0,039	0,062
Coeficiente de Variação (%)		129	25
Média geral		7,3	63,3

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

Na organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares, de acordo com a análise de variância (Tabela 2), não foram observadas diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações de TDZ para as variáveis, formação de calos e oxidação.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para características médias de: explantes oxidados (%) e explantes que formaram calos (%) durante a organogênese *in vitro* de explantes foliares de guavira (*Campomanesia adamantium*). Dourados-MS, UFGD, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Explantes oxidados	Calos
Concentrações de TDZ	4	0,089 <sup>ns</sup>	0,152 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,172	0,138
Coeficiente de Variação (%)		39,6	54,9
Média geral		41	69

ns - não significativos a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F.



Explantos internodais são superiores na habilidade de formação de calos se comparados aos radiculares (Tabela 3), sendo verificada uma média geral de 84 e 42,7%, respectivamente, demonstrando que esta variável é dependente do tipo de explante. Por sua vez, a formação de calos também é dependente do regulador de crescimento utilizado. Em explantes internodais, o uso de TDZ isolado ou combinado com ANA promove a formação de calos em 100% dos explantes. Adicionalmente, constatou-se uma interação significativa entre estes fatores. Explantes radiculares aumentam a formação de calos na presença de ANA, enquanto explantes internodais reduzem em aproximadamente 50% os calos quando tratados somente com ANA, sendo dependentes da presença de TDZ. Desta forma, é possível obter resultados superiores em ambos os tipos de explantes com a combinação de 5,0  $\mu\text{M}$  de TDZ e 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA.

**Tabela 3.** Porcentagem de calos formados durante a organogênese *in vitro* de explantes internodais e radiculares de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando diferentes reguladores de crescimento, aos 56 dias de cultivo. Dourados-MS, 2015.

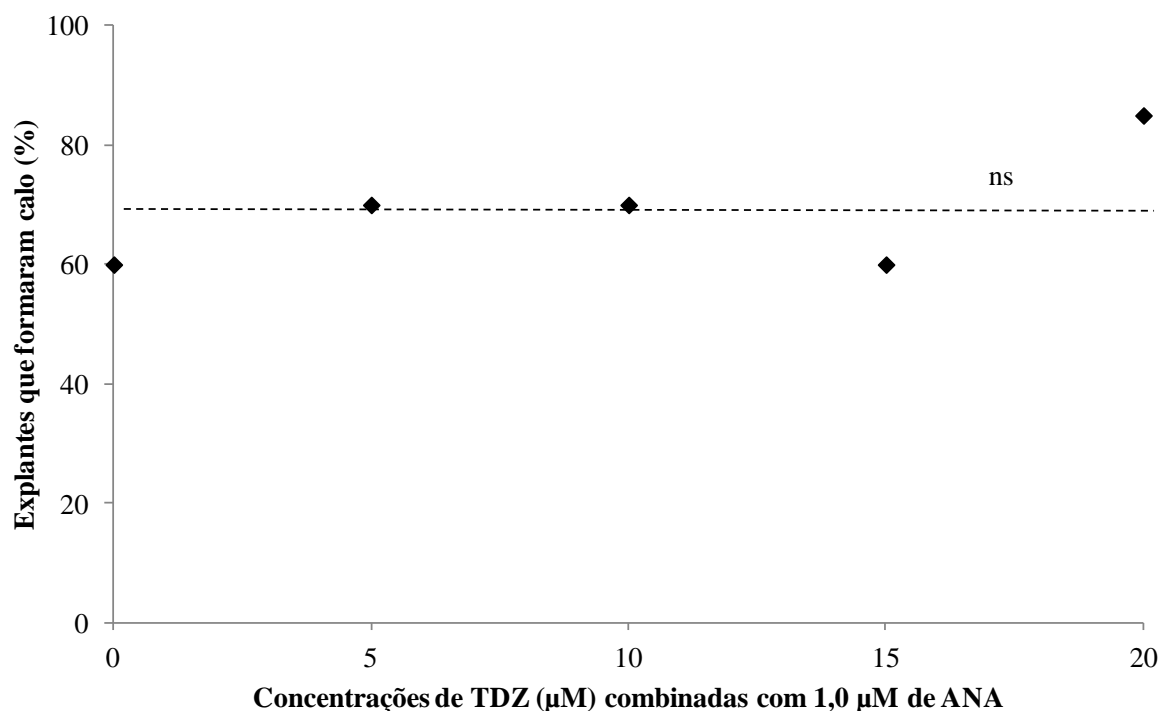
Tipo de explante	Explantos que formaram calo (%)		
	TDZ (5,0 $\mu\text{M}$ )	ANA (1,0 $\mu\text{M}$ )	TDZ+ANA (5,0+1,0 $\mu\text{M}$ )
Entre-nó	100 a A*	52 a B	100 a A
Raiz	20 b B	44 a A	64 b A

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

Também foi observado por Gobara (2011), baixo desempenho na formação de calos em explantes radiculares de mogno (*Swietenia macrophylla* King). O autor obteve uma taxa de calogênese de 15% e semelhante ao resultado obtido neste experimento, o meio mais adequado envolveu a combinação de TDZ e ANA, nas concentrações respectivas de 0,5 e 0,1  $\mu\text{M}$ .

Em explantes foliares, a formação de calos não diferiu entre os tratamentos com diferentes concentrações de TDZ combinadas com 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA (Figura 1), sendo observada uma média geral de 69%. Explantes cultivados com 20  $\mu\text{M}$  de TDZ + 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA em comparação aos cultivados em meio livre de regulador de crescimento (tratamento

controle), apresentaram um leve incremento de 25%, respectivamente, 85 e 60%. Em explantes foliares de *Eucalyptus saligna* (Eucalipto), valor próximo a média obtida neste experimento, foram registrados por Dibax et al. (2010). Os autores obtiveram 73% de formação de calos utilizando 1,0  $\mu\text{M}$  de TDZ combinado com 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA.



**Figura 1.** Porcentagem de calos formados durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) a partir de folhas e utilizando diferentes concentrações de TDZ, combinadas com 1,0  $\mu\text{M}$  de ANA, aos 56 dias de cultivo. Dourados-MS, 2015.

De acordo com Oliveira-Cauduro et al. (2014), a formação de calos além de ser influenciada pela concentração de TDZ, também é influenciada pelo meio de cultura utilizado. Em híbridos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* os mesmos autores verificaram que em meio de cultura JADS adicionado de 0,5  $\mu\text{M}$  de TDZ ocorreu à formação de calos em 83,3% dos explantes, enquanto em meio MS, com a mesma concentração de TDZ, os autores verificaram a formação de calos em somente 55% dos explantes.

Quanto à oxidação dos explantes internodais e radiculares, observou-se que este fator é dependente somente do tipo de explante utilizado, não sendo observado efeito significativo entre os tratamentos com os reguladores de crescimento TDZ, ANA e a combinação destes,

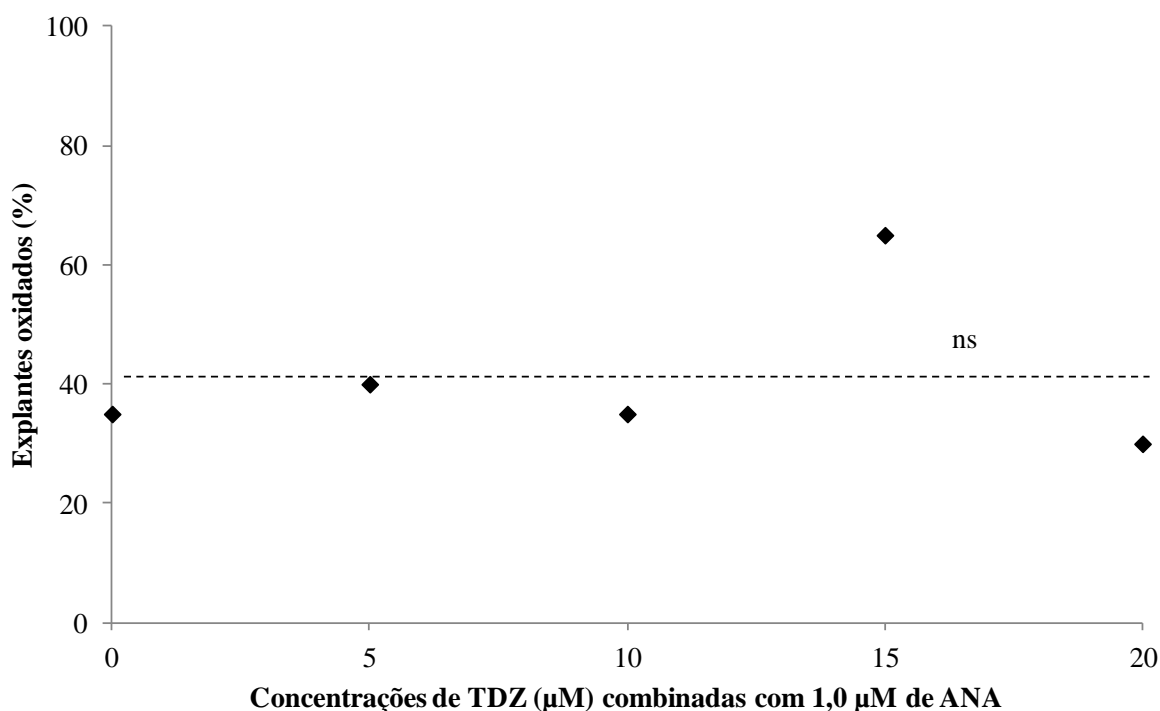
nas concentrações testadas (Tabela 4). Explantes internodais, não apresentaram oxidação, enquanto que, explantes radiculares apresentaram oxidação em todos os tratamentos, verificando-se uma média de 14,7%. Os valores observados foram relativamente baixos, porém a presença de oxidação neste tipo de explante pode estar associada a maior sensibilidade e suscetibilidade das células da raiz à luz, resultando em maior atividade das enzimas oxidativas.

**Tabela 4.** Porcentagem de explantes oxidados durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*), utilizando explantes internodais e radiculares e diferentes reguladores de crescimento aos 56 dias de cultivo. Dourados-MS, 2015.

Tipo de explante	Explantes oxidados (%)		
	TDZ (5 µM)	ANA (1 µM)	TDZ+ANA (5+1 µM)
Entre-nó	0 a A*	0 b A	0 b A
Raiz	8 a A	16 a A	20 a A

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

Em explantes foliares, para a variável oxidação, semelhante aos resultados relativos à formação de calos, não foi verificada diferenças significativas entre os tratamentos com TDZ combinados com 1,0 µM de ANA, sendo obtida uma média geral de 41% (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentagem de explantes oxidados durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) a partir de folhas e utilizando diferentes concentrações de TDZ, combinadas com 1,0 µM de ANA, aos 56 dias de cultivo. Dourados-MS, 2015.

Explantes foliares, por não apresentar lignificação como em caules e raízes, apresentam menor produção de compostos fenólicos. Desta forma, a oxidação verificada neste experimento pode ser consequência da manipulação dos explantes *in vitro*. De acordo com Cid e Teixeira (2010), no cultivo *in vitro* o processo de oxidação pode ser desencadeado por injúrias causadas aos tecidos vegetais, como o corte dos explantes com bisturi. O tecido lesionado libera compostos fenólicos que em contato com as enzimas polifenoloxidasas oxidam os polifenóis formando as quinonas. As quinonas são substâncias altamente ativas e, posteriormente à sua produção, polimerizam e ou oxidam proteínas para formar compostos melânicos, os quais são responsáveis pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultura (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). O acúmulo de polifenóis e de produtos da oxidação modificam a composição do meio e a absorção de metabólitos

(ANDRADE et al., 2000), inibindo o crescimento e podendo causar a morte dos explantes (SATO et al., 2001).

Comparando os resultados obtidos em ambos os experimentos pode-se dizer que na organogênese *in vitro* de guavira, explantes internodais são mais responsivos para a formação de calos (84%), quando comparados aos explantes foliares (69%) e radiculares (42,7%). Estes resultados corroboram com os obtidos por Carvalho et al. (2011) em videiras (*Vitis vinifera*), onde os autores verificaram que a formação de calos foi influenciada de maneira significativa pelo tipo de explante utilizado, sendo os internódios mais responsivos (47,4%) que segmentos foliares (7,2%).

Neste trabalho, em ambos os experimentos, apesar da desdiferenciação dos explantes formando calos, não houve emissão de brotações. Considerando que o TDZ é um dos reguladores mais efetivos na indução da regeneração *in vitro* e segundo Silva et al. (2011), utilizado para induzir a formação de brotações e calos em várias espécies vegetais, especialmente nas lenhosas, provavelmente as concentrações testadas de TDZ, ANA a combinação destes reguladores não foram adequadas. Neste sentido, Carvalho et al. (2011) verificaram que o TDZ em concentrações elevadas, respectivamente, 5,0 e 10  $\mu\text{M}$ , propiciaram substanciais taxas de formação calosa em videiras, porém a regeneração de brotos somente ocorreu em explantes cultivados em meio contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de TDZ, uma concentração significativamente menor.

## **CONCLUSÕES**

Concluiu-se que na organogênese *in vitro* de guavira, explantes internodais são mais responsivos para a formação de calos, quando comparados aos explantes foliares e radiculares, porém, em nenhuma das concentrações testadas de TDZ, ANA e TDZ+ANA houve emissão de brotações.

Explantos internodais não apresentaram oxidação, sendo esta observada em maior intensidade em explantes foliares, seguido de explantes radiculares.

A combinação de 5,0 µM de TDZ e 1,0 µM de ANA é mais adequada para o processo de calogênese, pois mantém a produção de calos em 100% em explantes internodais, e, eleva a formação de calos em explantes radiculares, de 20 para 64%.

O uso de diferentes concentrações de TDZ (5,0, 10; 15 e 20 µM) combinadas com 1,0 µM de ANA, não exerceram influência sobre a formação de calos em explantes foliares.

## REFERÊNCIAS

ACHARJEE, S.; HANDIQUE, P.J.; SARMAH, B.K. Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* regeneration of blackgram (*Vigna Mungo* L.) embryonic axes. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Korea, v.15, n.4, p.311-318, 2012.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

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.

CAMARGO, P. R. D.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001.

CARMONA, R.; REZENDE, L.P.; PARENTE, T.V. Extração química de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.16, n.1, p.31-33, 1994.

CARVALHO, D.C. de; SILVA, A.L.L. da; TANNO, G.N.; PURCINO, M.; BIASI, L.A. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 108-114, 2011.

CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L.P.B. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303p.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H.B.C.; CAMPOS, M.K.F. de; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010.

DRESCH, D.M.; SCALON, S. de P.Q.; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M. do C. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 94, p. 223-229, 2012.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p.

GOBARA, B.N.K. **Calogênese a partir de segmentos de epicótilos e raízes de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Monografia (TCC) - Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 40 f, 2011.

HUSSEIN, E.A.; AQLAN, E.M. Regeneration of *Solanum villosum* Mill., via direct organogenesis *in vitro*: A novel study. **International Journal of Botany**, Faisalabad, v. 7, ed. 2, p. 177-182, 2011.

LIMA, C.O. de C.; MARCHI, M.N.G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C.E.; BELLINTANI, M.C.; SANTANA, J.R.F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 249-254, 2012.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

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 bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y. de; ADAMUCHIO, L.G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. BESPALHOK FILHO, J.C.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 347-355, 2014.

REZENDE, R.K.S.; PAIVA, L.V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P.P.; CASTRO, E.M. de. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, 2008.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A de.; SOUZA, V.C de. Micropropagação de *Celtis sp*: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

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**, Brasília, vol.31, n.2, p.096-103, 2009.

SHERKAR, H.D; CHAVAN, A.M. Effect of 2,4-D; BAP and TDZ on callus induction and shoot regeneration in potato. **Science Research Reporter**, Jalna, vol.4, n.1, p101-105, 2014.

SILVA, I. M. de C. da; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Resposta diferencial ao uso do thidiazuron na regeneração *in vitro* de marmeleiros, CVS. Adams e MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3-4, p. 375-382, 2011.

SINGH, N.; MEENA, M.K.; PATNI, V. Effect of plant growth regulators, explants type and efficient plantlet regeneration protocol through callus induction in *Naringi crenulata* (Roxb.)



Nicolson and its biochemical investigation. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v.10, n.77, p.17769-17777, 2011.

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.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. 1ª Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, 322 p.

### **CAPÍTULO III: Efeito de diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium***

#### **RESUMO**

Considerando os entraves causados pelo elevado índice de contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de material vegetativo adulto, uma alternativa viável é iniciar o cultivo a partir de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*). Utilizou-se como fonte de explantes plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* e submetida a diferentes tratamentos com 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 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L<sup>-1</sup> e tratamento controle (0). Os resultados obtidos demonstraram que o uso de 5,0 µM de TDZ aumenta o comprimento das brotações, o número de gemas e a taxa de multiplicação, enquanto a combinação de TDZ e ANA exerce 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 aumenta o número de brotações, proporcionalmente ao aumento da concentração do regulador de crescimento, porém, no sentido inverso reduz o comprimento das brotações. Explantes cultivados em meio contendo 2iP, para as variáveis analisadas, não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações testadas.

**Palavras-chave:** guavira, ANA, TDZ, 2iP; BAP

### **CAPÍTULO III: Effect of different cytokines on *in vitro* multiplication of *Campomanesia adamantium***

#### **ABSTRACT**

Considering the barriers caused by high contamination and oxidation index in establishing adult plant material *in vitro*, a viable alternative is to start the culture from seedlings obtained from seeds germinated *in vitro*. Thus, this work was made to evaluate *in vitro* multiplication capacity of 'guavira' (*Campomanesia adamantium*). It was used as a source of explants seedling obtained from seeds germinated *in vitro* and subjected to different treatments with 5.0  $\mu\text{M}$  TDZ (thiadizuram), 1.0  $\mu\text{M}$  of NAA (naphthalene acetic acid) and combinations of the same, as well as the isolated effect of BAP (6-benzylaminopurine) and 2iP isolated (2-isopentenyl adenine) at concentrations of 2.5; 5.0; 7,5 and 10  $\text{mg L}^{-1}$  and control treatment (0). The results obtained showed that the use of 5.0  $\mu\text{M}$  of TDZ increases the shoot length, the number of buds and the multiplication rate, while the combination of TDZ and NAA has a negative effect on the growth of the shoots, the number of leaves and the multiplication rate. The explant culture in medium containing BAP increases the number of shoots in proportion to the increased concentration of growth regulator, however, the other way reduces the length of the shoots. Explants cultured in medium containing 2iP had no significant differences between the tested concentrations for the variables analyzed.

**Keywords:** guavira, NAA, TDZ, 2iP; BAP

## INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado apresenta uma ampla variedade de espécies frutíferas nativas, das quais algumas são comercializadas, fazendo parte do consumo da população brasileira (PINHAL et al., 2011). No entanto, a sobrevivência das espécies nativas está em risco, em razão da exploração do bioma para fins agropecuários (PREVEDELLO e CARVALHO, 2006; DOMINGOS, 2008) e devido ao extrativismo predatório, fatores estes associados ao risco da perda de genótipos (PINHAL et al., 2011). Outro agravante com relação às espécies nativas está relacionado à propagação, sendo a grande maioria, em razão da dormência e/ou recalcitrância das sementes, de difícil propagação seminífera (PINHAL et al., 2011).

Dentre as inúmeras espécies nativas do Cerrado que a cada ano vem se tornando menos abundante em seu habitat destaca-se a guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg), pertencente à família Myrtaceae. A guavira é uma espécie com potencial para cultivo comercial devido as suas características agrônômicas desejáveis, como alto rendimento de frutos e elevados teores de sólidos solúveis (brix) (MELCHIOR 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 (CARMONA et al., 1994; 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).

Entre os primeiros trabalhos desenvolvidos com o objetivo de realizar a propagação assexuada e *in vitro* de guavira encontra-se o de Azambuja (2013). 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 antimicrobianos, tais como, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, rifampicina, tetraciclina, carbendazim e cloreto de mercúrio, e 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 a espécie apresenta 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 é iniciar 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 teve como objetivo avaliar a capacidade de multiplicação *in vitro* de guavira, submetida a diferentes tratamentos com TDZ (thiadizuram), ANA (ácido naftaleno acético) e a combinação dos mesmos, bem como, o efeito de diferentes concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina) e 2iP (N<sup>6</sup>-D<sup>2</sup>-isopentenil adenina), utilizando como fonte de explantes plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*.

## 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) 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 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 (thiadizuram (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)) e ANA (ácido naftaleno acético), 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 (6-benzilaminopurina) e 2iP (N<sup>6</sup>-D<sup>2</sup>-isopentenil adenina), nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 6 g L<sup>-1</sup> 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<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 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 do número de gemas final dividido pelo número de gemas inicial.

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

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com a análise de variância houve um efeito significativo entre os reguladores de crescimento TDZ (thiadizuram), ANA (ácido naftaleno acético) e a combinação dos mesmos, para o número médio de folhas e a taxa de multiplicação (Tabela 1).

**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 <sup>ns</sup>	0,287 <sup>ns</sup>	0,764 <sup>*</sup>	3,088 <sup>*</sup>
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 (Tabela 2), não exerceram influência sobre esta variável, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, sendo observada uma média geral de 1,35. 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 observada superior e significativamente diferente à média obtida em explantes cultivados em meio contendo a combinação de TDZ e ANA (0,24 cm).

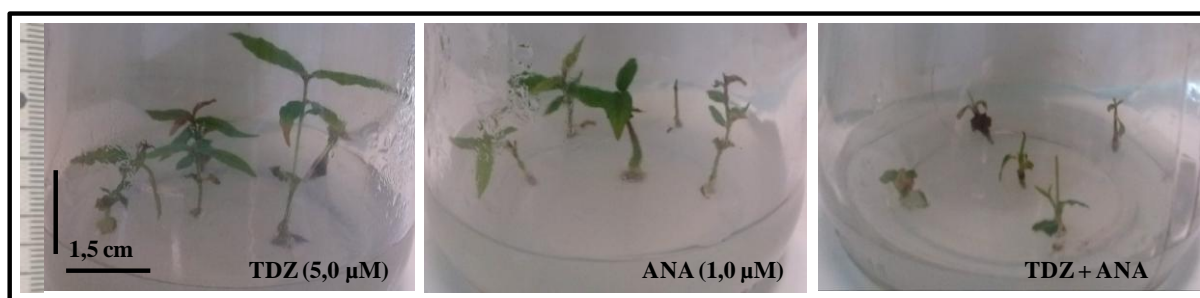
**Tabela 2.** Efeito de diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando como explantes segmentos nodais aos 45 dias de cultivo, Dourados-MS, 2015.

Regulador de crescimento (µM)	Número de brotações	Comprimento das brotações (cm)	Número de folhas por brotação	Taxa de multiplicação
<b>TDZ (5,0)</b>	1,52 a*	0,73 a	5,32 a	3,16 a
<b>ANA (1,0)</b>	1,25 a	0,63 ab	4,28 ab	2,64 ab
<b>TDZ (5,0) + ANA (1,0)</b>	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 difere 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 exerce um efeito negativo sobre a multiplicação *in vitro* de guavira, causando a redução do crescimento em altura das brotações, inibindo o desenvolvimento das folhas e reduzindo a taxa de multiplicação. Por sua vez, o uso de TDZ, mesmo não diferindo dos valores obtidos nos explantes tratados com ANA, destaca-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 significativas somente sobre o número de brotações, enquanto o uso de 2iP (2 - isopentenil adenina) não diferiu entre as concentrações testadas 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 <sup>ns</sup>	0,445 <sup>ns</sup>	2,703 <sup>ns</sup>
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.

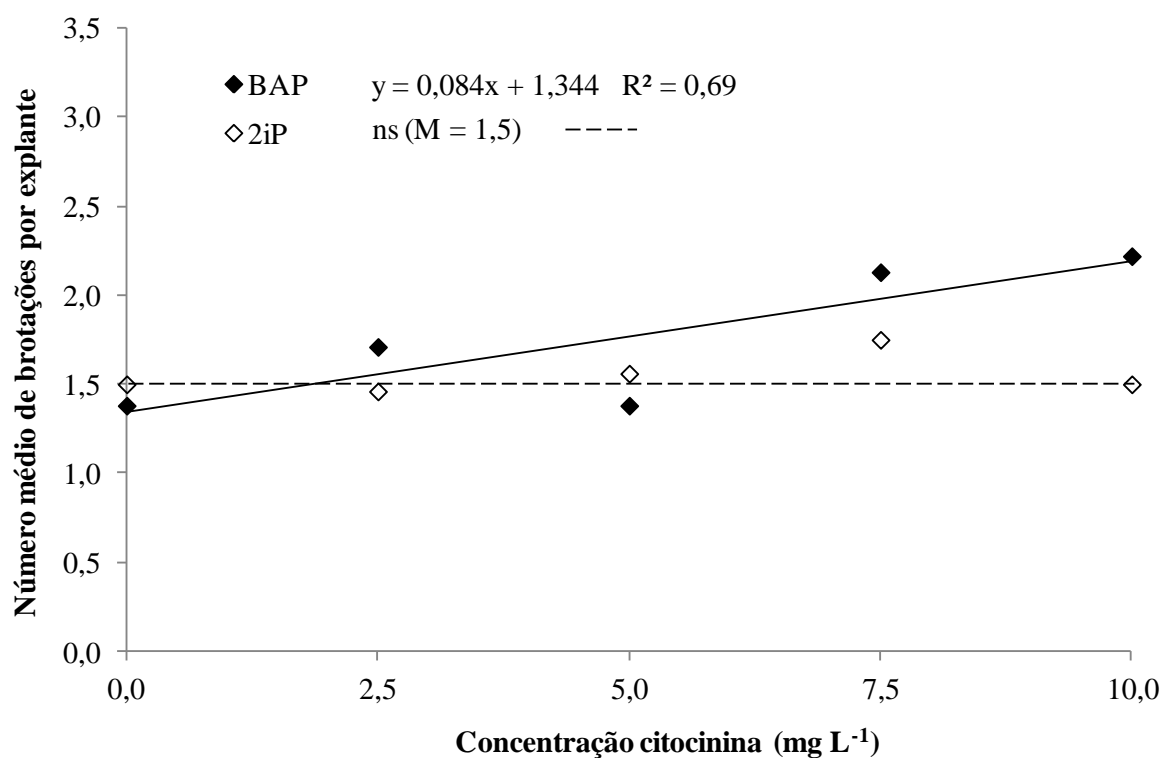
**Tabela 4.** Resumo da análise de variância para o efeito do regulador de crescimento 2iP, na multiplicação *in vitro* de guavira, para as variáveis: número médio de brotações; comprimento médio das brotações (cm); número médio de folhas por brotação e taxa de multiplicação. Dourados-MS, UFGD, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		Nº de Brotações	Comprimento brotações	Nº de folhas	Taxa de multiplicação
Concentrações de 2iP	4	0,003 <sup>ns</sup>	0,060 <sup>ns</sup>	0,372 <sup>ns</sup>	2,466 <sup>ns</sup>
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

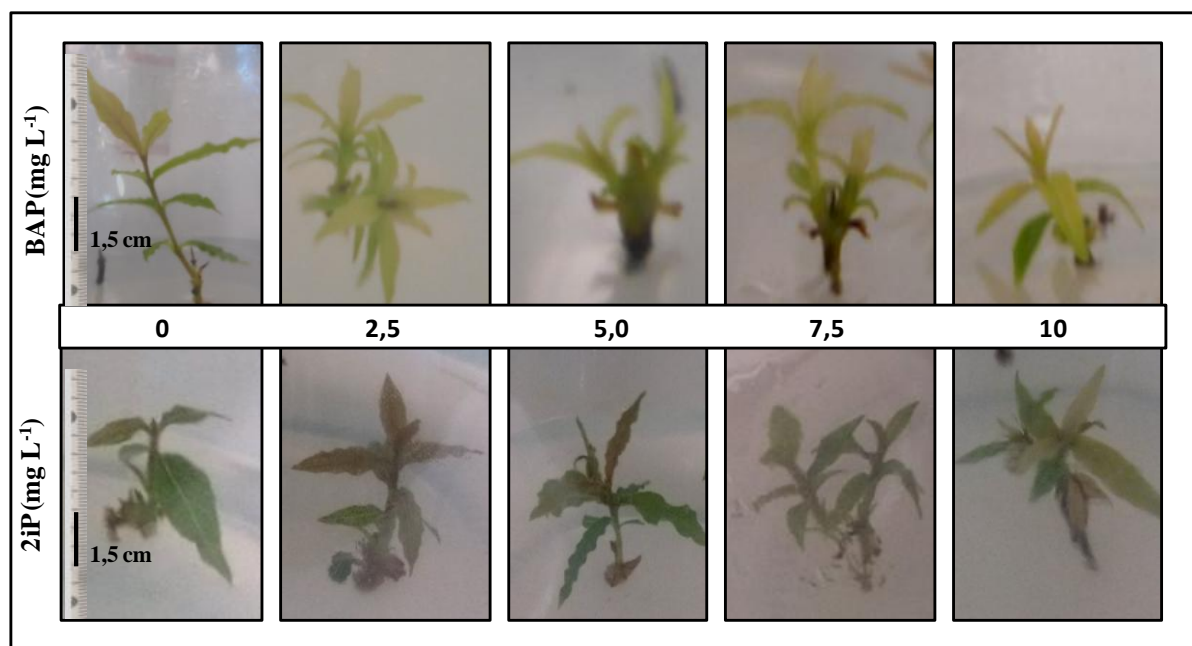
\*\*, \* e ns, significativos a 1% e 5% de probabilidade de erro e não significativo, respectivamente, pelo teste F.

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<sup>-1</sup> (Figura 2). Diferentemente do BAP e semelhante ao cultivo

com TDZ, o tratamento com 2iP, não interferiu no desenvolvimento 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.

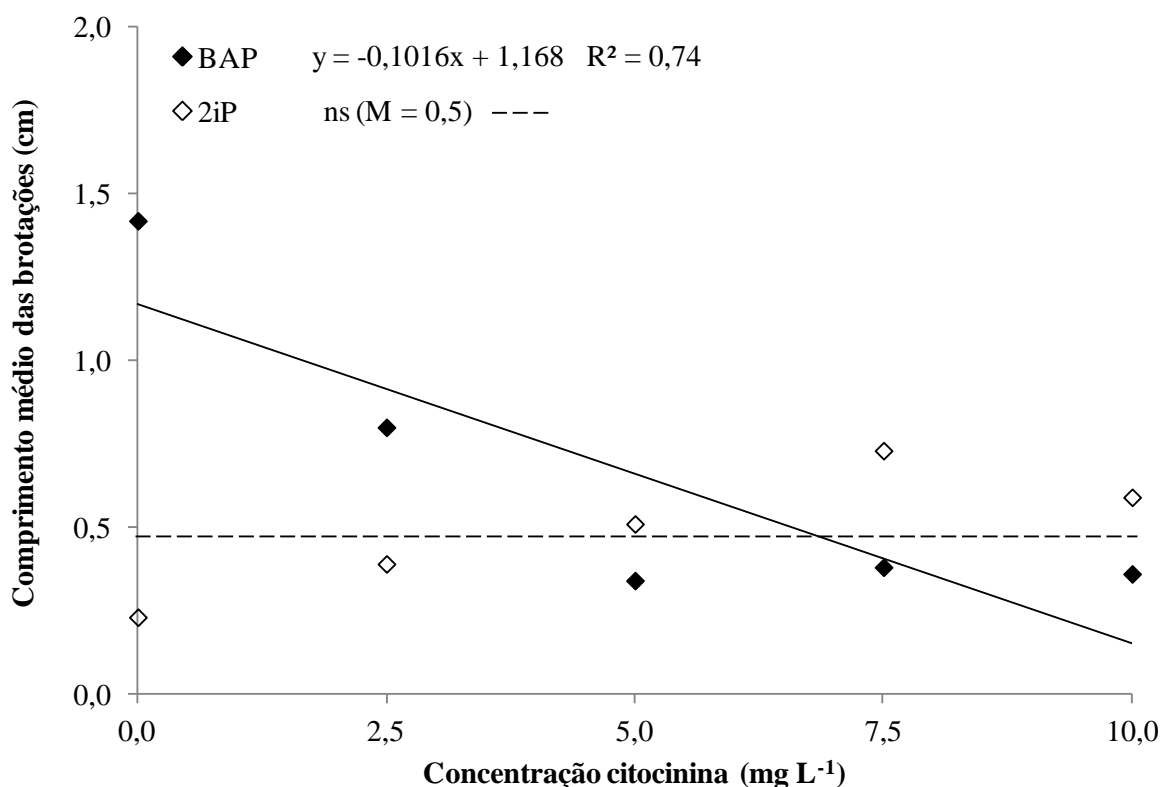


**Figura 3.** Aspecto geral das brotações por explantes de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS, Dourados-MS, 2015.

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 GA<sub>3</sub> e verificaram que o uso de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> 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 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 significativas entre as concentrações estudadas, verificando-se uma média geral de 0,5 cm de comprimento por brotação. Os resultados observados para a variável comprimento das brotações, principalmente com o uso de BAP no meio de cultivo, apresentaram uma influência efetiva sobre os dados obtidos em relação ao número de 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.

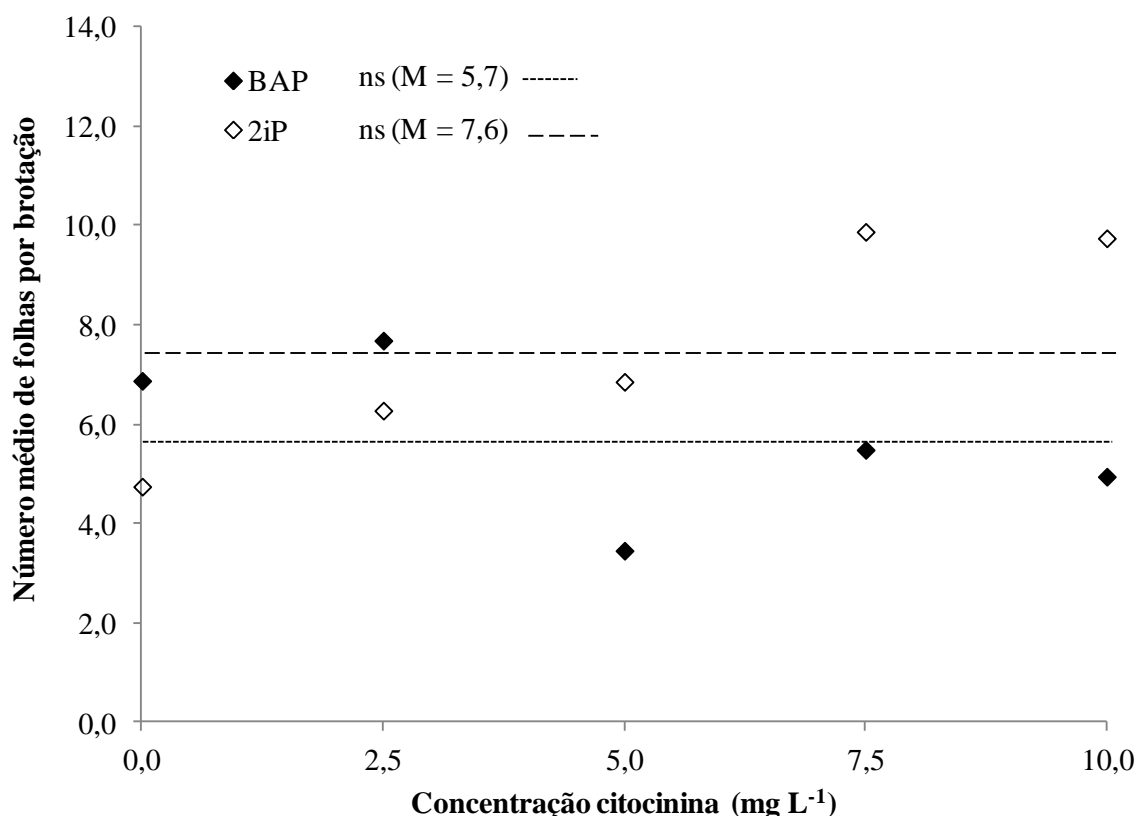


**Figura 4.** Comprimento médio das brotações de guavira (*Campomanesia adamantium*) durante a multiplicação *in vitro* aos 56 dias após inoculação em meio MS. M – representa a média geral obtida entre os tratamentos, Dourados-MS, 2015.

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. O decréscimo do alongamento 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  $\mu\text{M}$  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.

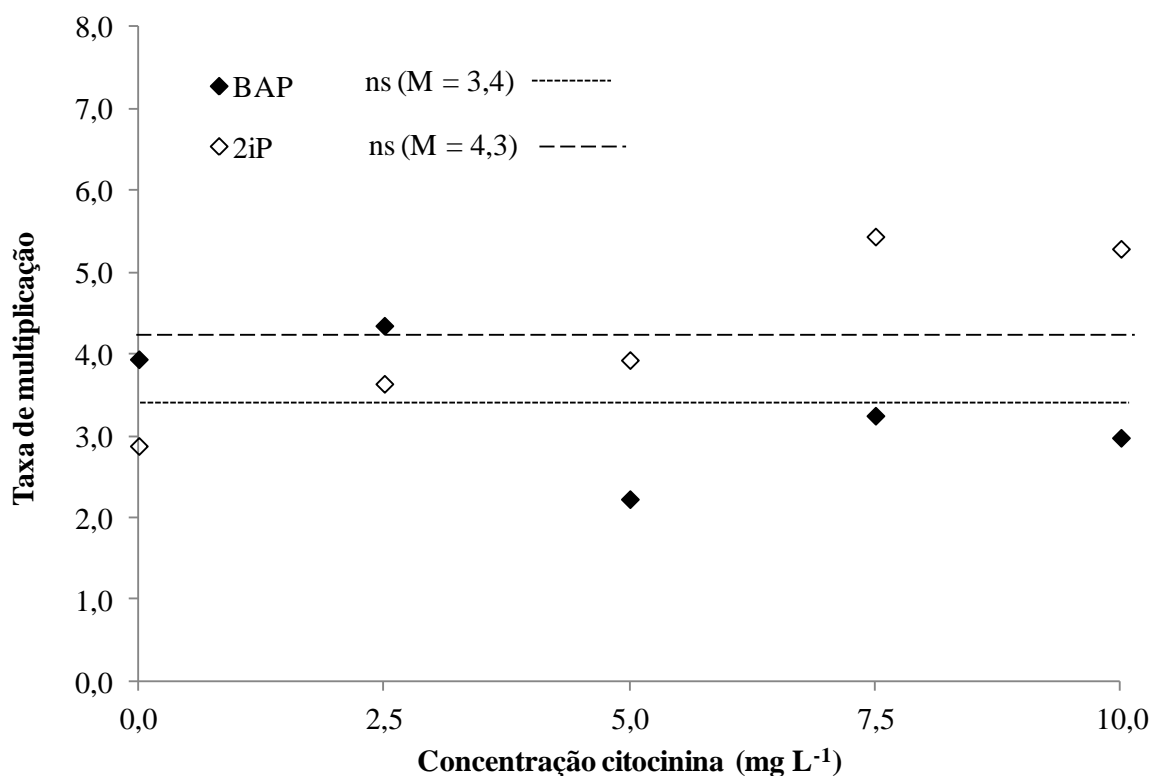
Para o número médio de folhas por brotação (Figura 5), em ambos os experimentos, com diferentes concentrações de BAP ou 2iP os dados obtidos não diferiram estatisticamente, observando-se uma média geral de 5,7 folhas por brotação em explantes crescidos em meio contendo BAP e 7,6 em explantes crescidos em meio contendo 2iP. No entanto, observou-se que explantes cultivados em meio contendo 7,5 ou 10  $\text{mg L}^{-1}$  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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>.

Semelhante aos resultados obtidos com relação ao número de folhas, a taxa de multiplicação em ambos os experimentos não apresentou diferenças significativas entre as diferentes concentrações de BAP e/ou 2iP testadas (Figura 6), obtendo-se uma média geral 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<sup>-1</sup> 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.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados concluiu-se que em guavira, o uso de 5,0  $\mu$ M 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, porém, no sentido inverso, reduz o comprimento das brotações.

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

## 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.

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.

CARMONA, R.; REZENDE, L.P.; PARENTE, T.V. Extração química de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.16, n.1, p.31-33, 1994.

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.

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 Agrotecnica**, 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 gabiroba (*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 bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

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.

PREVEDELLO, J.A.; CARVALHO, C.J.B. de. Conservação do Cerrado Brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v.4, n.1, p.39-57, 2006.

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.

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.

## ANEXO

Comprovante de submissão do CAPÍTULO I da dissertação, “**Effects of seed origin, storage conditions, and gibberellic acid on *in vitro* germination of guavira seeds**”, o qual foi enviado para a revista African Journal of Biotechnology e aguarda aprovação.

### Manuscript AJB/14.02.16/15277 Details

---

#### Manuscript Info

---

Journal  
African Journal of Biotechnology

---

Authors  
[DAMIANI CLÁUDIA ROBERTA](#) [SILVA LEANDRO DARC](#) [GOELZER ADEMIR](#) ...  
[DÉO THAMIRIS GATTI](#)

---

Manuscript number  
AJB/14.02.16/15277

---

Title  
Effects of seed origin, storage conditions, and gibberellic acid on *in vitro* germination of guavira seeds


---

Last Updated  
February 14th, 2016

---

Current Status  
**SUBMITTED**  
Your manuscript has been forwarded to our Editorial Office. An acknowledgement letter will be sent to you shortly. Please track your manuscripts on [ms.academicjournals.me](http://ms.academicjournals.me)

---



**View Archive**

---

#### Contact Us

Editorial Office: [ajb@academicjournals.org](mailto:ajb@academicjournals.org)

Accounts Unit: [accounts@academicjournals.org](mailto:accounts@academicjournals.org)

Help Desk: [helpdesk@academicjournals.org](mailto:helpdesk@academicjournals.org)

Submit Manuscript: <http://www.ms.academicjournals.org>

Website: <http://www.academicjournals.org>

---

**Thank you for submitting your manuscript to the African Journal of Biotechnology**