

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Symplocos
uniflora* (POHL.) BENTH. (SYMPLOCACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Simone Ribeiro Lucho

Santa Maria, RS, Brasil

2014

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Symplocos uniflora* (POHL.) BENTH. (SYMPLOCACEAE)

Simone Ribeiro Lucho

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

Orientador: Prof (a). Juçara Terezinha Paranhos

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Symplocos uniflora*
(POHL.) BENTH. (SYMPLOCACEAE)**

Elaborada por

Simone Ribeiro Lucho

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Juçara Terezinha Paranhos (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Cleber Witt Saldanha, Dr. – FEPAGRO

Hilda Hildebrand Soriani, Dr^ª. – UFSM

Santa Maria, 10 de março de 2014.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu **filho Lorenzo** e ao meu amado **esposo Lefor**, por tudo o que passamos e abdicamos para chegar até aqui e principalmente pelos momentos que precisei me ausentar para a realização de mais esta etapa da minha vida profissional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me inspira, cativa e me oportuniza aperfeiçoar meus conhecimentos, estudos e trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, instituição que me possibilitou a realização da Pós-Graduação (Mestrado) e a CAPES pelo incentivo e fomento financeiro através da bolsa de estudos.

Ao meu amado filho Lorenzo, razão de tudo em minha vida, obrigada por fazer minha vida muito mais feliz e minhas conquistas mais valiosas e ao meu amado esposo Lefor pelo amor, carinho, apoio e amizade. Amo você!

À minha mãe Neli, por me dar a vida, por me ensinar a lutar, pelos valores, por ser minha grande incentivadora, amiga e por me apoiar sempre, compartilhando alegrias e dificuldades e ao meu pai Abrilino, tudo o que faço é para retribuir o mínimo do que já fez por mim.

À minha querida irmã Silvana que se fez presente em momentos fáceis e difíceis sempre com muita dedicação e compreensão, você foi um dos pilares dessa conquista e ao meu irmão Luciano, pelo carinho e atenção em todos os momentos, esta conquista também é sua.

Às minhas sobrinhas Júlia e Fernanda e ao mais novo membro da família Leonardo, uma doce surpresa durante o mestrado, obrigada por todos os momentos de alegria, vocês são o meu orgulho.

À minha sogra Alaídes, que assim como minha mãe deixou o seu lar por um período e compartilhou comigo este desafio, obrigada pelo carinho e amizade.

À minha orientadora professora, Dra. Juçara Terezinha Paranhos, que sempre me orientou com paciência, dedicação, disponibilidade, compreensão e ética, orientando-me desde a projeção desta pesquisa, passando pela execução, escrita e apresentação deste trabalho, serei eternamente grata por tudo o que fez por mim.

À professora Dra. Luciane Tabaldi pela amizade, carinho e principalmente por transmitir com tanto prazer e dedicação parte do que sabe, pela injeção de coragem nos momentos em que fraquejei, pelo estímulo constante em qualquer que fosse a atividade.

À professora Dra. Hilda Hildebrandt pelo apoio, pelas contribuições e auxílio na estatística deste trabalho.

À professora Dra. Thais do Canto Dorow, pelas contribuições e colaboração nas saídas de campo.

Ao professor Renato Zachia, pela autorização para as coletas do material vegetativo e reprodutivo da espécie em estudo no Jardim Botânico da UFSM.

Aos professores Fabiano Alves e Daniel Ruschel por me mostrarem o quão maravilhoso é a natureza e por terem me incentivado a prosseguir os meus estudos.

À minha amiga Tânia Maria Viana, pela acolhida em Santa Maria, pelo carinho e principalmente pelo apoio dentro e fora da universidade, sem você tudo seria muito mais difícil.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Lisiane Lobler, Bruna Rocha, Rosiana Bertê, Marina Pissato, Tiéle Fernandes, Gabriela Richter, Alberi Zuliani e Aline Pereira por toda a ajuda, disponibilidade e apoio.

Aos professores do PPG em Agrobiologia, pelas contribuições dentro de suas áreas, para a minha formação e também aos colegas de curso que contribuíram de uma forma ou outra para o meu desenvolvimento profissional.

À todos meu muito obrigado, com votos de vitória e sucesso para todos!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Symplocos uniflora* (POHL.) BENTH. (SYMPLOCACEAE)

AUTORA: SIMONE RIBEIRO LUCHO
ORIENTADORA: JUÇARA TEREZINHA PARANHOS

Symplocos uniflora (Symplocaceae) é uma árvore que atinge até 10 m de altura, nativa e conhecida popularmente como pau-de-canga, maria-mole-do-banhado e sete-sangria. O trabalho visou estudar a propagação sexuada e vegetativa da espécie, através de protocolos para a germinação de sementes e micropropagação. Endocarpos concrecidos com as sementes (diásporos) foram utilizados para estudos da germinação das sementes avaliando temperatura de armazenamento (10 e 25°C), temperaturas de incubação (15, 20, 25 e 30°C), regimes de luz (fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo), época de coleta dos frutos (janeiro e março de 2013), escarificação química (ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos), escarificação mecânica (desponte do endocarpo) e ácido giberélico (GA₃), 1,5 mg L⁻¹. Plantas cultivadas em casa de vegetação, com 18 meses de idade, foram utilizadas como doadoras de explantes (segmento nodal e apical), visando à obtenção da organogênese direta. No estudo foi utilizado o meio MS e diferentes combinações (tratamentos) de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), em mg L⁻¹: 0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 e 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0, respectivamente. A temperatura de 25°C promoveu a maior porcentagem de germinação das sementes (24%). Frutos maduros apresentaram as melhores porcentagens de germinação (30%) e índice de velocidade de germinação (1,19). A presença de luz favoreceu à germinação das sementes, sendo classificadas como fotoblásticas positivas preferenciais. O tratamento pré-germinativo com ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos promoveu a superação da dormência das sementes. Na germinação *in vitro* o uso de GA₃ no meio de cultura propiciou os melhores índices de velocidade de germinação (0,18), não influenciando na porcentagem da mesma. No cultivo *in vitro*, a maior porcentagem de explantes com brotações aéreas (29%) ocorreu na combinação de 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, sem ocorrência de formação de raízes. Os explantes utilizados e brotações obtidas *in vitro* apresentaram taxas de oxidação variando de 10 a 70%.

Palavras-chave: germinação de sementes, propagação vegetativa, sete-sangrias

ABSTRACT

Post-Graduate Program in Agrobiolology
Federal University of Santa Maria

PROPAGATION *IN VITRO* AND *EX VITRO* OF *Symplocos uniflora* (POHL.) BENTH. (SYMPLOCACEAE)

AUTHOR: SIMONE RIBEIRO LUCHO
ADVISOR: JUÇARA TEREZINHA PARANHOS

The *Symplocos uniflora* species is a native tree that reaches up to 10m tall, belonging to the Symplocaceae family. It is popularly known as *pau-de-canga*, *maria-mole-do-banhado* and *sete-sangria*. Virtually, there is no information in the literature on reproduction, growth and development of this species, whose studies of forms of propagation is essential. Thus, the present study intended to examine the sexual and vegetative propagation of the species *S. uniflora* through protocols for seed germination and micropropagation. Fruit and vegetative material of adult plants from the Botanical Garden of UFSM were collected. The fruits without pulp, containing the seeds were used to evaluate the effect of temperature, storage time, light, collection time, the application of chemical and mechanical scarification, besides the use of gibberellic acid on seed germination of *S. uniflora*. Plants grown in a greenhouse were used as donor explants (nodal and apical segment) in order to obtain the direct organogenesis. In the study, MS medium and different combinations of auxin naphthaleneacetic acid (NAA) and cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) were used. The presence of light is essential for the germination of *Symplocos uniflora*, being classified as positive photoblastic preferred. The use of pre-germination treatment with concentrated sulfuric acid is favorable for overcoming seed dormancy. Of the substrates analyzed, the filter paper showed the best germination percentages and speed of germination. Plantmax® substrate offered the highest length of air shoots. In micropropagation, the average percentage of air shoots was 29% with no occurrence of root formation.

Keywords: seed germination, vegetative propagation, *sete-sangrias*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta de *Symplocos uniflora* crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** vista geral em período vegetativo; **B:** inflorescência; **C:** detalhe do tamanho do fruto maduro. **D:** detalhe da coloração da polpa carnosa dos frutos no estágio imaturo e maduro. Fonte: Simone Lucho.....18

Figura 2: Detalhes morfoanatômicos dos frutos de *Symplocos uniflora*. **A:** Aspecto longitudinal da drupa; **B:** Aspecto transversal dos lóculos que podem ou não conter sementes. Fonte: BURKART, A. In: Flora Ilustrada de Entre Rios, Buenos Aires: Coleccion Científica Del Inta.....19

Figura 3: Frutos de *Symplocos uniflora* coletados em janeiro de 2012, em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** detalhe dos diásporos maduros e imaturos; **B:** detalhe dos diásporos após a remoção da polpa carnosa.....25

Figura 4: Frutos de *Symplocos uniflora* coletados em janeiro de 2013, em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** detalhe dos diásporos após remoção da polpa carnosa; **B:** assepsia dos diásporos antes da inoculação e **C:** detalhe das bandejas com diferentes substratos.....26

Figura 5: Sementes de *Symplocos uniflora* colocadas para germinar em câmaras de germinação do tipo BOD, testando-se quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C). **A:** Porcentagem de germinação, **B:** Índice de velocidade de germinação. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dez repetições, com dez diásporos por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas ($P < 0.05$).....30

Figura 6: Frutos de *Symplocos uniflora* coletados em janeiro de 2012, em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** detalhe das sementes germinadas na presença de luz, **B:** detalhe das sementes germinadas na ausência de luz, **C:** detalhe do sistema radicular e aéreo das sementes germinadas na presença de luz e **D:** plântula com 70 dias, após transferência para substrato.....31

Figura 7: Sementes de *Symplocos uniflora* armazenadas na geladeira ($\pm 10^\circ\text{C}$) ou em temperatura ambiente, a $25^\circ\text{C} \pm 2$, por 10 dias e colocados para germinar na ausência ou presença de luz. **A:** Porcentagem de germinação, **B:** índice de velocidade de germinação. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dez repetições, com dez diásporos por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas e os regimes de luz testadas ($P < 0.05$).....31

Figura 8: Germinação das sementes de *Symplocos uniflora*. **A:** Porcentagem de germinação **B:** índice de velocidade de germinação. **1:** Frutos maduros com endocarpo intacto; **2:** Frutos maduros com desponte do endocarpo; **3:** Frutos imaturos com endocarpo intacto e **4:** Frutos imaturos com desponte do endocarpo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dez repetições, com dez

diásporos sem polpa carnosa por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas e os regimes de luz testadas ($P < 0.05$).....32

Figura 9: Germinação das sementes de *Symplocos uniflora* coletadas em **janeiro** de 2013. **A:** Porcentagem de germinação. **B:** Índice de velocidade de germinação. Cada tratamento teve dez repetições e dez diásporos por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas e os regimes de luminosidades testadas ($P < 0.05$).....34

Figura 10: Germinação das sementes de *Symplocos uniflora* coletadas em **março** de 2013. **A:** Porcentagem de germinação. **B:** índice de velocidade de germinação. Cada tratamento teve dez repetições e dez diásporos por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas e os regimes de luminosidades testadas ($P < 0.05$).....34

Figura 11: Germinação das sementes de *Symplocos uniflora*. **A:** Porcentagem de germinação, **B:** índice de velocidade de germinação. Cada tratamento teve quatro repetições e 80 diásporos por tratamento, em DIC. Santa Maria-RS, 2013.*Médias seguidas de letras maiúsculas indica comparação entre temperatura dentro do mesmo substrato, enquanto que letras minúsculas indicam comparação entre substratos dentro da mesma temperatura ($P < 0.05$).....36

Figura 12: Comprimento da parte aérea de plântulas de *Symplocos uniflora*. **A:** Plântulas com 10 dias após a emergência, **B:** Plântulas com 30 dias após a emergência. Santa Maria-RS, 2013.* Médias seguidas de letras maiúsculas indica comparação entre temperatura dentro do mesmo substrato, enquanto que letras minúsculas indicam comparação entre substratos dentro da mesma temperatura. Os tratamentos foram apresentados como média \pm desvio padrão de quatro repetições ($P < 0.05$).....36

Figura 13: Plântulas de *Symplocos uniflora* em substrato *Plantmax*®. **A:** início da emergência da parte aérea, **B:** plântula aos 10 dias após a emergência e **C:** plântula aos 30 dias após a emergência.....38

Figura 14: Respostas obtidas *in vitro* de *Symplocos uniflora* cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, testando-se quatro combinações de fitorreguladores. **A:** Porcentagem de brotações aéreas, **B:** Porcentagem de contaminação, **C:** Porcentagem de explantes oxidados e **D:** Porcentagem de explantes sem respostas. *Médias seguidas de letras maiúsculas para comparação entre doses de hormônios dentro do mesmo segmento e letras minúsculas para comparação entre os segmentos na mesma dose. Os tratamentos foram apresentados como média \pm desvio padrão de seis repetições ($P < 0.05$).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de germinação das sementes de *Symplocos uniflora* nas duas épocas de coleta. Santa Maria, RS, 2013. Cada tratamento teve dez repetições e dez diásporos por repetição, em delineamento inteiramente casualizado.....35

Tabela 2: Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes de *Symplocos uniflora*. Cada tratamento teve cinco repetições e 30 diásporos (semente recoberta por endocarpo lignificado) por repetição, em delineamento inteiramente casualizado. Santa Maria-RS, 2013.....40

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Família Symplocaceae e Gênero <i>Symplocos</i>	16
2.1.1 <i>Symplocos uniflora</i> (Pohl.) Benth.....	18
2.2 Formas de propagação.....	20
2.2.1 Propagação sexuada.....	20
2.2.2 Propagação vegetativa.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Germinação <i>ex vitro</i>	24
3.2 Germinação <i>in vitro</i>	27
3.3 Cultivo <i>in vitro</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Germinação <i>ex vitro</i>	29
4.2 Germinação <i>in vitro</i>	38
4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	40
5 CONCLUSÕES.....	45
6 REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui diferentes climas, relevos e solos, fatores que possibilitam a ocorrência de uma diversidade de espécies de plantas, número superior a 55 mil, o que corresponde a 22% do total mundial (PEREIRA et al., 2007). O conhecimento, ainda incipiente, sobre a maioria das espécies, associado à necessidade de preservação dessa biodiversidade, requer estudos básicos ecológicos e fisiológicos passíveis de serem utilizados em processos de conservação, preservação e reposição de plantas no ambiente natural.

Symplocos uniflora (Pohl) Benth. (Symplocaceae), conhecida popularmente como sete-sangria, pau-de-canga, maria-mole-do-banhado, é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, presente principalmente em matas ciliares, na qual desempenha função vital na qualidade dos rios. Por ser uma árvore de pequeno porte, pioneira e de crescimento rápido, é utilizada para reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (LORENZI; MATTOS, 2008). Na medicina popular, o chá da casca do caule auxilia na digestão e combate febres tropicais, terçã ou malária; a casca da raiz possui funções adstringentes e seus frutos são comestíveis servindo de alimento para a fauna silvestre.

Segundo Carvalho (2008), esta espécie possui a germinação das sementes epígea ou fanerocotiledonar e produz anualmente uma grande quantidade de sementes, porém as mesmas são consideradas recalcitrantes ao armazenamento, uma vez que perdem rapidamente a viabilidade quando mantidas em ambiente não controlado. Sementes recalcitrantes apresentam alta suscetibilidade à perda de água quando armazenadas, sendo necessário manter o ambiente com alto grau de umidade, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos.

As plantas podem propagarem-se por via sexuada ou vegetativa. A propagação sexuada é baseada no processo meiótico de divisão celular, em que o número de cromossomos das células reprodutivas é reduzido à metade para formar os gametas: oosfera e o grão de pólen, promovendo maior variabilidade genética (BORÉM, 1998). A propagação vegetativa é um processo baseado na teoria da totipotência celular, que apresenta o princípio de que todas as células vivas têm a capacidade de reproduzir um organismo inteiro, desde que possuam condições adequadas e informações genéticas necessárias para ocorrerem as transformações morfogenéticas, originando órgãos ou tecidos vegetais. Esse processo ocorre por

mecanismos de divisão e diferenciação celular, possibilitando a regeneração e formação de raízes, ramos, folhas, calos e embriões (HARTMANN et al., 2002).

Várias são as técnicas desenvolvidas para a propagação vegetativa de plantas. Dentre elas, pode-se citar estaquia, enxertia, miniestaquia e micropropagação. A estaquia e a miniestaquia, consistem basicamente no enraizamento adventício em segmentos de caules, ramos, raízes ou rizomas, denominados estacas. A micropropagação é uma das técnicas do cultivo *in vitro* de maior impacto na propagação de espécies vegetais, a qual consiste no isolamento de um explante (segmento de planta) e o cultivo *in vitro* em condições assépticas em meio nutritivo e condições ambientais controladas. Segundo Grattapaglia; Machado (1998), o cultivo *in vitro* vegetal possibilita a manipulação e propagação de plantas de forma contínua, independentemente da época do ano.

A micropropagação *in vitro* de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento *in vitro* de plantas de interesse econômico e ambiental. Conforme Assis et al. (1992), esta técnica possibilita o rejuvenescimento de espécies arbóreas, recuperando a competência do enraizamento de propágulos advindos de plantas adultas.

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar a propagação sexuada e vegetativa da espécie *Symplocos uniflora*, através de estabelecimentos de protocolos para a germinação de sementes e micropropagação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Symplocaceae e Gênero *Symplocos*

Symplocaceae é uma família constituída somente do gênero *Symplocos*, com cerca de 500 espécies distribuídas nas regiões tropicais do mundo, exceto na África (SOUZA; LORENZI, 2005). Segundo Carvalho (2008), o principal centro de diversidade genética desse gênero está no Sudeste Asiático, onde ocorrem cerca de 140 espécies e o segundo na América do Sul, com 40 espécies no Brasil e cerca de 60 espécies na região andina. Estudos moleculares recentes sustentam Symplocaceae como um grupo monofilético dentro das Angiospermae (SOEJIMA; NAGAMASU, 2004; WANG et al. 2004; FRITSCH et al. 2006).

Segundo Badoni et al. (2010), as plantas deste gênero contêm flavonoides, lignanas, fenois, esteroides, alcaloides e iridoides. Os terpenoides são os principais constituintes dentro do gênero *Symplocos* e a maioria deles exibem efeitos antiproliferativos. Além destes, um grande número de compostos pertencentes à classe dos alcaloides (loturina), lactonas diterpenoides têm sido encontrados em espécies de *Symplocos*.

Um grande número de plantas deste gênero são tradicionalmente usadas no tratamento de doenças causadas por bactérias, diarréias, disenterias, doenças nos olhos, gengivites hemorrágicas, desordens uterinas, complicações no intestino, úlceras, malária, enterites, picadas de cobras. Recentemente, os membros do gênero *Symplocos* ganharam popularidade devido às suas diversas atividades biológicas, particularmente como anti-HIV, antitumoral e atividades inibitórias da fosfodiesterase (BADONI et al. 2010).

Symplocos racemosa é uma planta largamente utilizada na medicina indiana e possui atividade afrodisíaca, pois atua no tratamento da disfunção erétil, através da inibição da enzima fosfodiesterase. Esta mesma espécie também se mostrou eficaz contra anemia, problemas epiteliais e gastrointestinais (NAGORE et al., 2012). É uma espécie rica em compostos fenólicos glicosilados, denominados de salireposídeos (AHMAD et al., 2003).

Um estudo sobre o perfil fitoquímico de *S. racemosa* revelou que extratos alcoólicos apresentam carboidratos, glicosídeos, saponinas, terpenoides, alcaloides

e apresentaram presença de atividade antibacteriana considerável (KUMAR et al., 2007). Segundo Devmurari (2010) os extratos etéreos apresentaram glicosídeos, fitosterol e esteróis, mas sem atividade biológica relevante. Extratos alcoólicos e clorofórmicos de *S. racemosa* mostraram atividade antineoplásicas contra leucemia e câncer cervical (RAVAL et al., 2009).

Dados recentes identificaram que o simplocosídeo (glicosídeo de salirepina – composto fenólico glicosilado) isolado de *Symplocos racemosa* é capaz de inibir a enzima urease de *Bacillus pasteurii* (ABBASI et al., 2012). Outros compostos glicosilados como os locoracemosídeos foram isolados da casca de *S. racemosa* e apresentaram atividade inibitória da enzima alfa-quimiotripcina (RASHID et al., 2008). Extratos etanólicos desta mesma espécie apresentaram atividade antipirética, justificando seu uso na etnofarmacologia (VIJAYABASKARAN et al., 2010).

Recentes pesquisas relatam que a espécie *Symplocos paniculata* acumula óleos e ácidos graxos largamente utilizados na indústria, incluindo aqueles que podem ser utilizados como fonte de biodiesel, possuindo considerável valor econômico (LIU et al., 2013).

Extratos hexânicos de folhas de *Symplocos cochinchinensis* apresentaram evidente atividade hipolipidêmica, ao reduzir os níveis de lipídeos, colesterol total e triglicérides, quando testados em ratos (SUNIL et al., 2012). Recente revisão da espécie *Symplocos laurina* revelou atividades antiinflamatória, antidiabética, além de ocasionar diversos efeitos alelopáticos, sendo de grande importância ecológica em seu ecossistema (BANU; KASHYAP, 2013).

As raízes de *Symplocos caudata* são usadas como remédio para artrite, disenterias e hemorragias uterinas na medicina popular da China (BADONI et al. 2010).

2.1.1 *Symplocos uniflora* (POHL.) BENTH.

Symplocos uniflora, popularmente conhecida como pau-de-canga, maria-mole-do-banhado ou sete-sangria é uma espécie nativa, medicinal e de ocorrência em todas as formações florestais do Rio Grande do Sul (SOBRAL et al., 2006). Árvore de pequeno porte, atingindo até 10 m de altura, caducifólia, pioneira, heliófila, seletiva higrófila e de crescimento rápido, recomendada para a arborização urbana e recuperação de áreas degradadas (Figura 1A). Na medicina popular o chá da casca

do caule auxilia na digestão e combate às febres tropicais, terçã ou malária; a casca da raiz possui funções adstringentes e seus frutos são comestíveis servem de alimento para a fauna silvestre. A madeira, pelas pequenas dimensões disponíveis, é indicada para lenha e carvão, possuindo pouco valor comercial (LORENZI; MATTOS, 2008).

As folhas são simples, alternas, obovadas a elípticas. A base e o ápice são agudos, a margem é serrada, com pequenos múcrons em alguns dentes. A lâmina foliar mede 1,5 a 14,5 cm de comprimento por 0,7 a 6,0 cm de largura, com nervação peninérveas. O pecíolo mede 4 a 8 mm de comprimento, é rosado e fracamente piloso. A face superior é glabra e a face inferior fracamente pilosa. Apresenta tom verde um pouco mais escuro na face superior e a consistência é subcoriácea (CARVALHO, 2008).

Segundo Carvalho (2008) as inflorescências (Figura 1B) apresentam-se em racemos paucifloros com 3 a 5 flores ou reduzidas a 1 única flor e suas flores são monóclinas, de coloração branca, rósea e roxa, isoladas ou aos pares, com sépalas ciliadas, medindo de 1,0 a 1,2 cm de comprimento, com odor suavemente doce. Apesar da beleza de suas flores é pouco utilizada como ornamental, florescendo de outubro a dezembro e frutificando de dezembro a março (LAHITTE; HURREL, 1999).

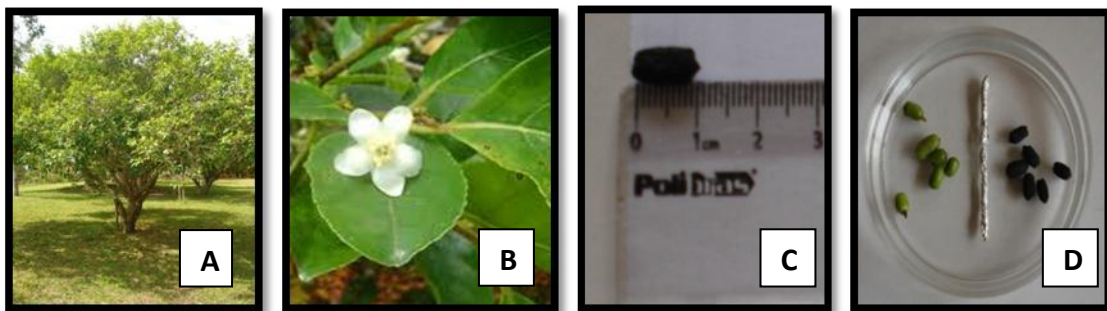


Figura 1: Planta de *Symplocos uniflora* crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** vista geral em período vegetativo; **B:** inflorescência; **C:** detalhe do tamanho do fruto maduro. **D:** detalhe da coloração da polpa carnosa dos frutos no estágio imaturo e maduro. Fonte: Simone Lucho

Os frutos são drupas cilíndricas a obovais, medindo de 0,8 a 1,5 cm de comprimento por 0,5 a 1,0 cm de largura (Figura 1C), apresentando o pericarpo passando de verde-claro para roxo-enegrecido (Figura 1D). Essa coloração também está presente nas partes carnosas do fruto, que apresenta sabor adocicado; as sementes geralmente medem de 0,5 a 0,9 cm de comprimento. Os frutos são tetralocular contendo ou não uma semente cada (Figura 2A). As sementes são envoltas pelo endocarpo que geralmente, apresenta-se como um revestimento duro,

lignificado e impermeável ao ar e à água (Figura 2B), constituindo-se numa barreira física à germinação da semente (MEEROW, 1991). Segundo Angevine; Chabot (1979), sob condições naturais, essa camada pode ser uma estratégia para que a espécie sobreviva em épocas de seca.

Symplocos uniflora, produz anualmente uma grande quantidade de sementes, porém as mesmas são consideradas recalcitrantes ao armazenamento, uma vez que perdem rapidamente a viabilidade quando mantidas em ambiente não controlado (LORENZI; MATTOS, 2008).

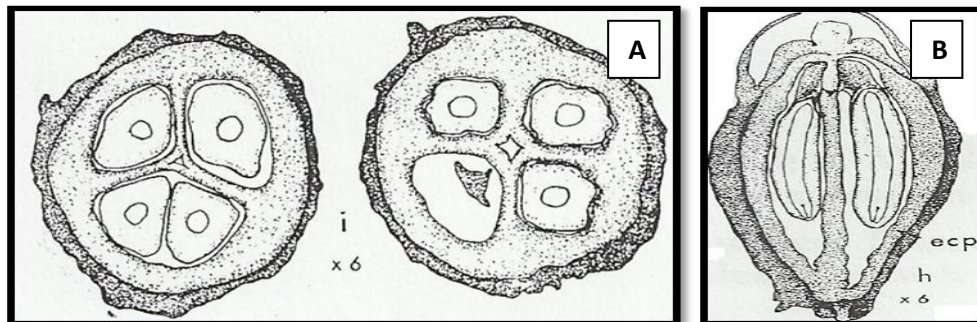


Figura 2: Detalhes morfoanatômicos dos frutos de *Symplocos uniflora*. **A:** Aspecto transversal do fruto com lóculos contendo ou não sementes, **B:** Aspecto longitudinal da drupa; Fonte: BURKART, A. In: Flora Ilustrada de Entre Ríos, Buenos Aires: Colección Científica Del Inta, 1979, p. 49.

Segundo Tschesche et al. (1980) o constituinte químico isolado nesta espécie foi o symplocosídeo, um flavonoide glicosídico.

2.2 Formas de Propagação das espécies

As plantas reproduzem-se de forma sexuada ou vegetativa, onde a primeira implica na partilha de material genético, produzindo novas combinações e fenótipos diferentes e na segunda, não há compartilhamento genético, uma vez que é utilizado partes da planta, gerando clones da planta doadora.

2.2.1 Propagação sexuada

O ciclo de vida em plantas superiores compreende o desenvolvimento das sementes seguido da germinação e desenvolvimento pós-germinativo através do crescimento da planta (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

A germinação é um processo biológico caracterizado por uma sequência ordenada de eventos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos que resultam na

retomada do crescimento do embrião, originando uma plântula (COSTA; MARCHI, 2008).

O processo germinativo é influenciado por fatores externos e internos às sementes, que podem atuar isoladamente ou em interação com os demais (NASSIF et al., 1998). Os principais fatores ambientais que influenciam a germinação das sementes são oxigênio, temperatura, luz e água. A água é o fator que exerce maior influência sobre o processo germinativo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000), estando envolvida direta ou indiretamente em todas as etapas do processo. Segundo COSTA; MARCHI (2008) a absorção de água pelas sementes contribui para amolecer o tegumento, intensificar a atividade respiratória, favorecer as trocas gasosas e induzir a atividade e síntese de enzimas e hormônios. A entrada de água nas sementes promove o aumento do volume do embrião e dos tecidos de reserva, resultando na ruptura do tegumento e na protusão da raiz primária (MARCOS FILHO, 2005).

Outro fator ambiental que interfere tanto na porcentagem final como na velocidade de germinação é a temperatura. As sementes germinam em uma faixa de temperatura variável de acordo com a espécie, sendo a temperatura ótima quando ocorre o máximo de germinação em um menor período de tempo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; BEZERRA et al., 2002).

O substrato também é importante para a germinação, pois a capacidade de retenção de água e oxigênio, presença de patógenos, estrutura física, entre outros, podem variar de um substrato para outro, interferindo na porcentagem de germinação das sementes (POPINIGIS, 1985; FIGLIOLIA et al., 1993; PEREZ et al., 1999, WENDLING; GATTO, 2002; FLORIANO, 2004). O substrato deve apresentar condições adequadas ao desenvolvimento do sistema radicular. Setubal; Afonso Neto (2000) citam que o substrato pode ocasionar a ausência ou irregularidade de germinação, má formação de plantas e o aparecimento de sintomas de deficiência ou excesso de alguns nutrientes.

Em muitas espécies a presença de luz, de alguma forma, favorece a germinação das sementes, designando-se este efeito como fotoblastismo positivo; em outras espécies o comportamento germinativo das sementes é melhor na ausência do que na presença de luz, o que se designa como fotoblastismo negativo (Labouriau, 1976). Klein; Felipe (1991) denominaram o caráter fotoblástico positivo

de “preferencial”, quando alguma germinação ocorre na ausência de luz, e de “absoluto”, quando a germinação é nula na ausência de luz.

Segundo Bryant (1985) e Vázquez-Yanes; Orozco-Segovia (1991), o fitocromo é o pigmento receptor responsável pela captação de sinais luminosos que podem ou não desencadear a germinação das sementes. O modo de ação desse pigmento depende do tipo de radiação incidente, pois luz com alta relação vermelho/vermelho-extremo (V/VE) pode induzi-lo a assumir a forma ativa (FVe), promovendo a germinação de sementes fotossensíveis, enquanto luz com baixa relação V/VE pode levá-lo a assumir a forma inativa (FV), impedido a germinação.

Os reguladores de crescimento apresentam papel relevante na germinação de sementes. As giberelinas estão envolvidas na superação da dormência por controlar a hidrólise das reservas nas sementes, induzindo a síntese *de novo* da α -amilase, enzima responsável pela hidrólise do amido. Segundo Braun et al. (2010), a aplicação do ácido giberélico (GA_3), considerado ativador enzimático endógeno, influencia o metabolismo protéico, podendo dobrar a taxa de síntese de proteínas das sementes. Além disso, o tratamento das sementes com GA_3 pode promover maior taxa e uniformidade de germinação, pela atuação no alongamento celular, fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem o seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As sementes da maioria das espécies germinam prontamente quando as condições ambientais são favoráveis (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000), no entanto, cerca de dois terços das espécies arbóreas apresentam certo grau de dormência. Esta pode ser classificada em dois grupos: endógena e exógena. A dormência endógena ou embrionária é causada por algum bloqueio à germinação relacionado ao próprio embrião, que, eventualmente, pode envolver tecidos extra-embrionários, e pode ser dividida em fisiológica, morfológica e morfofisiológica (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). A dormência exógena ou extra-embrionária é causada pelo tegumento, pelo endocarpo, pelo pericarpo e/ou órgãos extra-florais, em geral com pouca ou nenhuma participação direta do embrião em sua superação (CARDOSO, 2004).

De acordo Carvalho (2008) a propagação de *Symplocos uniflora* por sementes apresenta obstáculos aos métodos normalmente utilizados, pelo fato de a semente ser coberta e aderida ao endocarpo lignificado que impedem e/ou dificultam a entrada de água. Para superar a dormência exógena vários métodos podem ser

utilizados, sendo os mais comuns a escarificação mecânica, escarificação química, imersão em água quente ou fria, entre outros (SANTARÉM; ÁQUILA, 1995).

2.2.2 Propagação vegetativa

Várias são as técnicas de propagação vegetativa que podem ser utilizadas para espécies arbóreas, sendo o método definido conforme o objetivo, a espécie, a característica genotípica da planta matriz, os tipos de propágulos, a época do ano, entre outras (WENDLING et al., 2005). Dentre estas técnicas tem-se o cultivo *in vitro* que compreende o cultivo de plantas em um ambiente artificial, controlado, em condições assépticas e em meio nutritivo definido (ALENCAR, 1999). O sucesso da propagação *in vitro* de plantas depende de muitos fatores, principalmente da espécie estudada, meio de cultura, balanço hormonal e tipo de explantes, os quais influenciam diretamente as respostas morfogenéticas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O meio de cultura possui substâncias essenciais que suprem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células, sendo constituído basicamente de macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas e fitorreguladores (CALDAS et al., 1998). Os fitorreguladores são utilizados para induzir respostas específicas nos explantes, sendo as auxinas e citocininas substâncias de maior destaque na promoção da competência e da determinação celular dos tecidos à formação de parte aérea e raízes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical. O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (PASQUAL, 2001).

Segundo Grattapaglia; Machado (1998), das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP), é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo, seguida da cinetina (KIN), com cerca de 23%. Quanto ao enraizamento, as auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Assis; Teixeira, 1998). As respostas às auxinas, no entanto, não são universais. Certas espécies,

principalmente as lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (Rohr; Hanus, 1987).

Considerando que a técnica da propagação *in vitro* de plantas possibilita a preservação e a reprodução das características desejáveis da planta matriz, além de possibilitar a obtenção de elevado número de plantas em um curto período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (BAJAJ et al., 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001).

A micropropagação tem sido apontada como um método de propagação viável para várias espécies medicinais, muitas das quais já são facilmente multiplicadas *in vitro*, tais como, *Aloe vera* (L.) Burm. F., com propriedades laxativas e cicatrizantes; *Camptotheca acuminata* Decne. com atividade anticancerígena; *Egletes viscosa* (L.) Less., antiespasmódica e antidiarréica; *Artemisia annua* L., utilizada para tratamento contra malária (PLETSCH, 1998; DINIZ et al., 2003; LIU et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Local e Material Botânico

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pertencente ao Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Um exemplar da espécie *Symplocos uniflora* foi coletado e devidamente identificado, segundo normas usuais em taxonomia (Mori et al., 1989) e está depositado no herbário SMDB do Departamento de Biologia da UFSM sob número 14536.

3.1 Germinação *ex vitro*

Frutos maduros foram coletados em Janeiro de 2012 e Janeiro e Março de 2013 em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM, Santa Maria–RS (29°42'S; 53°42'W).

Os frutos coletados em Janeiro de 2012 foram separados em três lotes. Em todos os lotes foram retirados a polpa carnosa dos frutos correspondente ao epicarpo e mesocarpo, obtendo-se o endocarpo endurecido com sementes no seu interior, aqui denominados diásporos. Antes da inoculação, em câmara de fluxo laminar os diásporos foram desinfestados em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, em seguida imersos em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) por 15 minutos, e então, enxaguados em água destilada e autoclavada e após, inoculados em placas de petri com 90 mm de diâmetro, revestidas com papel filtro (três por placa), ambos previamente autoclavados e umedecidos com 10 mL de água destilada e autoclavada.

No primeiro lote, os diásporos foram imediatamente inoculados e colocados para germinar em câmaras de germinação do tipo BOD, com fotoperíodo de 16 horas, testando-se quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C). O segundo lote de diásporos foi colocado em caixas germbox e estas armazenadas em refrigerador a 10°C ±1 ou em temperatura ambiente a 25°C ±1, por 10 dias. Após assepsia e inoculação, os diásporos foram mantidos na ausência ou presença de luz (fotoperíodo de 16 horas). Os tratamentos foram: (T1) armazenamento dos

diásporos em temperatura ambiente e ausência de luz (T2) armazenamento dos diásporos em temperatura ambiente e presença de luz (T3) armazenamento dos diásporos em refrigerador e ausência de luz (T4) armazenamento dos diásporos em refrigerador e presença de luz.

No terceiro lote, os diásporos maduros foram separados dos imaturos. Os estádios de maturação dos frutos foram identificados pela coloração do epicarpo, em que os frutos imaturos são aqueles com epicarpo verde e os maduros com epicarpo roxo (Figura 3A). Após a coleta e remoção da polpa dos frutos (Figura 3B) (epicarpo e mesocarpo), foi realizado ou não o desponte do endocarpo (corte nas extremidades), e a combinação desses fatores constituíram os tratamentos: Frutos maduros com endocarpo intacto (T1); Frutos maduros e com desponte do endocarpo (T2); Frutos imaturos com endocarpos intactos (T3); e frutos imaturos com desponte do endocarpo (T4). Posteriormente, os diásporos foram mantidos em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

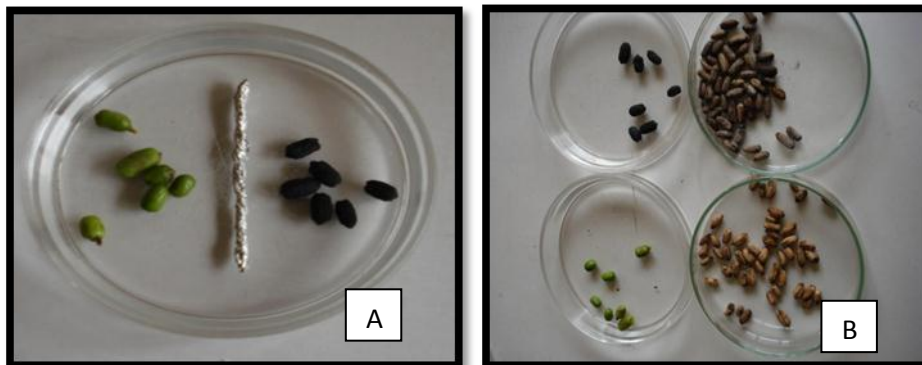


Figura 3: Frutos de *Symplocos uniflora* coletados em janeiro de 2012, em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCiNE, UFSM. **A:** detalhe dos diásporos maduros e imaturos; **B:** detalhe dos diásporos após a remoção da polpa carnosa.

Frutos maduros foram novamente coletados no mesmo local em Janeiro e Março de 2013. Após cada coleta foi realizada a remoção do epicarpo e mesocarpo e os endocarpos com as sementes (diásporos) foram armazenados em caixas germbox no refrigerador ($10^{\circ}\text{C} \pm 1$) ou em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), por 10 dias. A assepsia dos diásporos e condições de semeadura foram iguais aos experimentos anteriores. Posteriormente foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, na ausência ou presença de luz (fotoperíodo de 16 horas). Em cada época de coleta, os experimentos constaram de um bifatorial 2×2 (duas condições de armazenamento \times dois regimes de luz), totalizando quatro tratamentos.

Em todos os estudos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, dez repetições e dez diásporos por repetição, totalizando 100 diásporos por tratamento.

Para o experimento germinação em substrato a coleta foi realizada em março de 2013 a remoção da polpa (Figura 4A) e assepsia dos diásporos foi a mesma dos experimentos anteriores. Os diásporos foram acondicionados em caixas germbox em duas condições de armazenamento, temperatura de $10^{\circ}\text{C} \pm 1$ (refrigerador) ou ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), por 15 dias. Os substratos estudados foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 45 minutos, repetidos três vezes com intervalo de 24 horas e constituíram-se de: substrato comercial *Plantmax*®, com pH 6,0 (60% vermiculita e perlita, 0,47% de K_2O , 0,70% de P_2O_5 e o restante constituído de turfa e casca de pinus compostada); substrato comercial *Plantmax*® e vermiculita (2:1); substrato comercial *Plantmax*® e vermiculita e casca de arroz (2:1:1). Após assepsia (Figura 4B) efetuou-se a semeadura em bandejas com capacidade para 1 kg de substrato (Figura 4C), colocando-se um diásporo por cova de 5 mm de profundidade e 10 diásporos por bandeja. Posteriormente, as bandejas com os diásporos foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 16 horas (densidade de fluxo de fótons de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias).

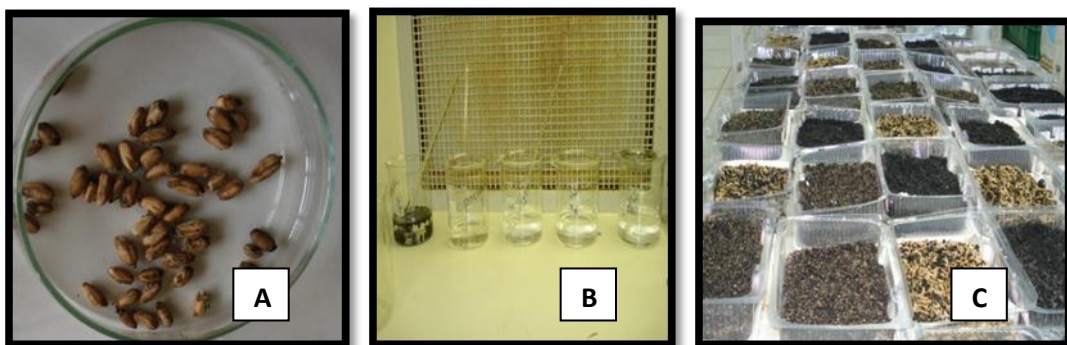


Figura 4: Frutos de *Symplocos uniflora* coletados em janeiro de 2013, em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** detalhe dos diásporos após remoção da polpa carnososa; **B-:** assepsia dos diásporos antes da inoculação e **C-** detalhe das bandejas com diferentes substratos.

O experimento constou de um bifatorial referente a duas condições de armazenamento e três tipos de substratos, totalizando seis tratamentos. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições (20 diásporos /repetição).

3.2 Germinação *in vitro*

A coleta, remoção da polpa, o tempo e as condições de armazenamento dos diásporos (duas condições de armazenamento, temperatura de 10°C ±1 ou 25°C ±1, por 10 dias), assim como a assepsia foram iguais aos experimentos anteriores. Após, foi realizado ou não a escarificação química com ácido sulfúrico P. A. (H₂SO₄) concentrado por 10 minutos. Os diásporos foram inoculados em tubos de ensaio medindo 25 X 150 mm (um diásporo por tubo) contendo 15 mL de meio de cultura com 20% dos sais minerais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 10 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar em pó bacteriológico puro Vetec e acrescidos ou não de 1,5 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) em câmara de fluxo laminar. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. As culturas foram mantidas em sala de crescimento (fotoperíodo de 16 horas), com temperatura de 25°C ±1. O experimento foi um trifatorial 2x2x2 (duas condições de armazenamento x realização ou não da escarificação química x presença ou ausência de ácido giberélico no meio de cultura), totalizando oito tratamentos, cinco repetições por tratamento e 30 diásporos por repetição, em delineamento inteiramente casualizado.

Em todos os experimentos de germinação as avaliações foram feitas semanalmente e consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão de 0,3 cm da radícula, determinando a porcentagem de germinação (%G) conforme Labouriau & Valadares (1976) utilizando a fórmula $G = (N/A) \times 100$, onde N é o total de sementes germinadas e A é o número total de sementes colocadas para germinar. Foi determinado o índice de velocidade de germinação (IVG) calculado segundo Maguire (1962): $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ onde: G₁, G₂, G_n = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N₁, N₂, N_n = número de semanas desde a primeira, segunda, até a última contagem.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Todos os dados foram transformados quando necessário para atender as pressuposições dos testes de normalidade.

3.3 Cultivo *in vitro*

Foram utilizados como explantes segmentos apicais e nodais, com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidas de plantas jovens com aproximadamente 18 meses de idade, adquiridas no Centro de Pesquisa em Florestas (FEPAGRO), localizado em Boca do Monte, distrito de Santa Maria-RS, e cultivadas durante sete meses em casa de vegetação a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Durante dois meses antes da instalação do experimento as plantas matrizes foram pulverizadas a cada 20 dias com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fungicida Bendazol (Carbendazim 500 mg L^{-1}) dissolvido em um litro de água destilada.

Para a desinfestação, os ramos aéreos coletados foram lavados em água corrente e água destilada. Em câmara de fluxo asséptica os mesmos foram imersos em etanol 70% (v/v) por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio 2,0% (v/v) durante 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada esterilizada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio medindo 25 X 150 mm contendo cada tubo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) completo, semi-solidificado com 60 g L^{-1} de ágar, 30 g L^{-1} de sacarose, 10 g L^{-1} de carvão ativado, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fungicida Bendazol e o pH ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, antes da inclusão do ágar e da autoclavagem (1 atm, 120°C , 20 min). Os meios foram acrescidos das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0; $4,0 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0; 0,1; 0,2; $0,4 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente, totalizando quatro tratamentos.

Os tubos foram fechados com papel alumínio e as culturas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, fotoperíodo de 16 horas (densidade de fluxo de fótons de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos arranjados num fatorial 2 X 4 (tipos de explantes e combinações de fitorreguladores), seis repetições por tratamento e 25 explantes por repetição, totalizando 150 explantes por tratamento.

Após 60 dias da inoculação as avaliações foram realizadas obtendo-se, em porcentagem, as respostas *in vitro*: brotações aéreas, contaminação fúngica e bacteriana, explantes oxidados e sem resposta.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Todos os dados foram transformados quando necessário para atender as pressuposições dos testes de normalidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação *ex vitro*

Após a coleta, os diásporos que faziam parte do primeiro lote foram imediatamente inoculados em placas de petri e colocados para germinar em câmaras BOD, testando-se quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C). A germinação das sementes teve início 21 dias após a sementeira e o resumo da análise de variância demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos testados, no entanto as sementes apresentaram porcentagem de germinação máxima, cerca de 25% (Figura 5A), quando expostas para germinar em temperatura de 25°C. Por outro lado, não ocorreu germinação em 15°C, demonstrando que baixas temperaturas inibiram o processo germinativo de *S. uniflora*. De acordo com Okusanya (1980) a maioria das espécies tropicais é sensível à baixa temperatura, pois seu metabolismo fica reduzido, entretanto a germinação poderá ocorrer, só que requer um período mais longo. Segundo Araújo Neto (2005) a temperatura de 15°C também foi prejudicial para o desempenho germinativo das sementes de *Acacia polyphylla*.

As sementes de *S. uniflora* colocadas para germinar em câmaras de germinação nas temperaturas de 25°C e 30°C apresentaram o índice de velocidade de germinação (Figura 5B) superior às demais temperaturas testadas. Entretanto as melhores porcentagens de germinação (23%) e índices de velocidade de germinação (0,17) foram verificadas na temperatura de 25°C. Conforme Bewley & Black (1994), a temperatura afeta tanto a capacidade como a velocidade de germinação. As sementes têm a capacidade de germinar dentro de uma determinada faixa de temperatura, característica para cada espécie, mas o tempo necessário para se obter a porcentagem máxima de germinação é dependente da temperatura. De acordo com Carvalho; Nakagawa (2000), temperaturas inferiores ou superiores à ótima tendem a reduzir a velocidade do processo germinativo, expondo as plântulas por maior período a fatores adversos, o que pode levar à redução no total de germinação.

De acordo com Silva et al. (2002), a temperatura ótima para germinação é diferente da ótima para velocidade de germinação das sementes de *Myracrodruon*

urundeuva, contrariando os resultados deste experimento uma vez que a mesma temperatura (25°C) apresentando as maiores médias para ambas as variáveis analisadas. A temperatura influencia a germinação, sendo considerada ótima a temperatura na qual a semente expressa seu potencial máximo de germinação no menor espaço de tempo, pois ela possivelmente atua sobre a velocidade de absorção de água, além de participar nas reações bioquímicas que determinam todo o processo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

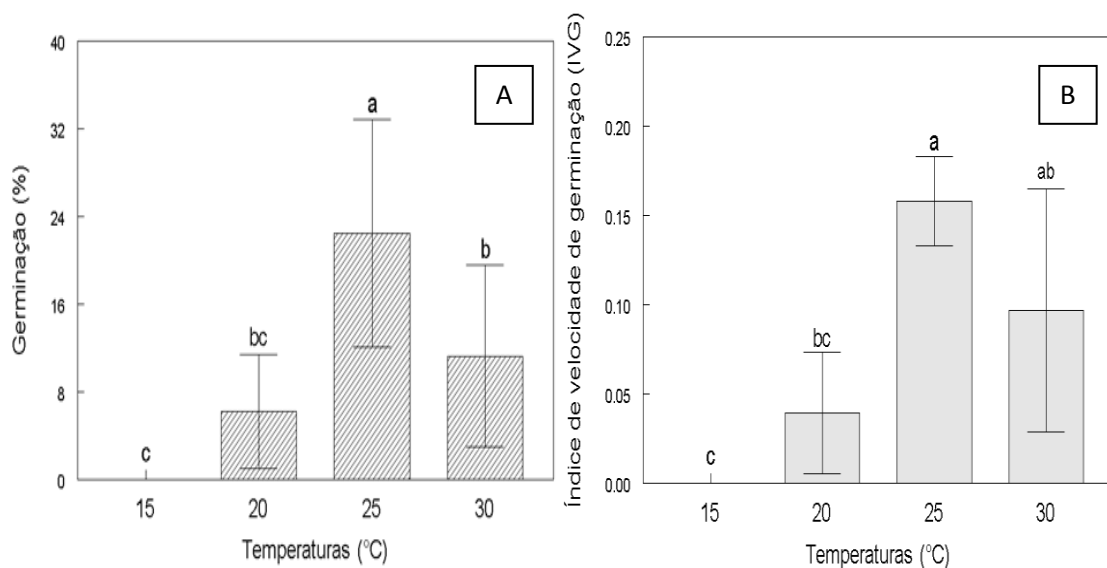


Figura 5: Sementes de *Symplocos uniflora* colocadas para germinar em câmaras de germinação do tipo BOD, testando-se quatro temperaturas (15, 20, 25 e 30°C). **A:** Porcentagem de germinação, **B:** Índice de velocidade de germinação. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dez repetições, com dez diásporos por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas ($P < 0.05$).

Os diásporos pertencentes ao segundo lote foram colocados em caixas germbox e estes armazenados em refrigerador a $10^{\circ}\text{C} \pm 1$ ou em temperatura ambiente a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, por 10 dias. Após assepsia e inoculação, os diásporos foram mantidos na ausência ou presença de luz. A germinação das sementes teve início 15 dias (Figura 6A) após a semeadura e o resumo da análise de variância demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos testados, no entanto a maior porcentagem de germinação ocorreu nas sementes armazenadas em temperatura ambiente e colocadas para germinar na presença de luz (18%) diferindo estatisticamente dos tratamentos cujos diásporos foram mantidos no escuro (Figura 7A).

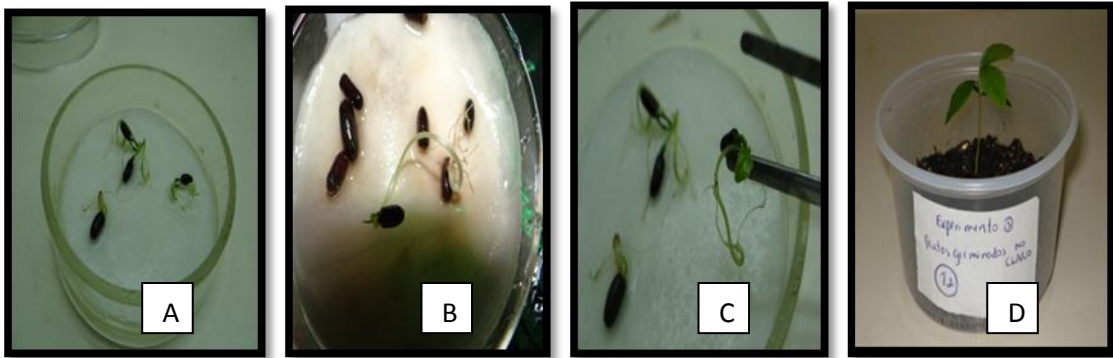


Figura 6: Frutos de *Symplocos uniflora* coletados em janeiro de 2012, em populações crescendo naturalmente no Jardim Botânico, CCNE, UFSM. **A:** detalhe das sementes germinadas na presença de luz, **B:** detalhe das sementes germinadas na ausência de luz, **C:** detalhe do sistema radicular e aéreo das sementes germinadas na presença de luz e **D:** plântula com 70 dias, após transferência para substrato.

Estudos realizados por Adami et al. (2008) mostraram que as sementes de *Erythrina verna* germinaram indiferente do regime de luz utilizado, podendo ser classificadas como fotoblásticas neutras. Estes resultados foram observados em outras espécies florestais como *Enterolobium contortisiliquum* (HEBLING, 1997), *Bauhinia forficata* (ROSA; FERREIRA, 2001) e *Myracrodruon urundeuva* (SILVA et al., 2002). Ao contrário do observado neste estudo com *S. uniflora*.

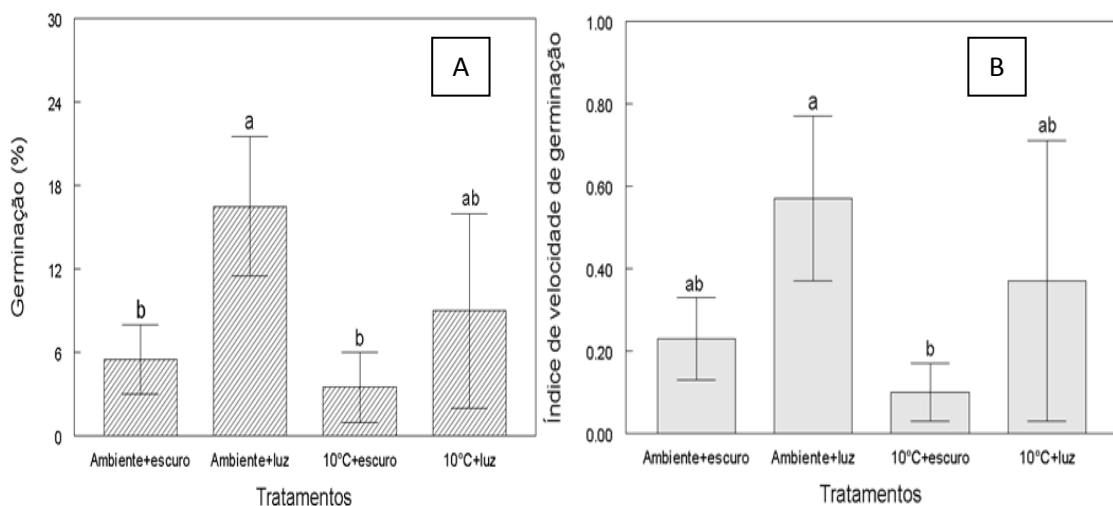


Figura 7: Sementes de *Symplocos uniflora* armazenadas na geladeira ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) ou em temperatura ambiente, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, por 10 dias e colocados para germinar na ausência ou presença de luz. **A:** Porcentagem de germinação, **B:** índice de velocidade de germinação. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dez repetições, com dez diásporos por repetição. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas e os regimes de luz testadas ($P < 0.05$).

Nas duas condições de armazenamento e regime de luz testadas, as sementes germinaram, porém mais lentamente quando os frutos foram

armazenados a 10°C e colocadas para germinar no escuro e mais rapidamente quando armazenados a 25 °C e colocadas para germinar no claro (Figura 7B).

No terceiro lote, os diásporos maduros foram separados dos imaturos, após a separação foi realizado ou não o desponte do endocarpo, conforme os tratamentos. A germinação das sementes teve início 18 dias após a sementeira e o resumo da análise de variância demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos testados. As maiores percentagens de germinação 30% (Figura 8A) foram observadas nos frutos maduros e com endocarpo intacto. Trabalhos realizados por Lin (1988) indicaram que a germinação dos frutos maduros de *Euterpe edulis* foi significativamente maior do que a germinação dos frutos imaturos no mesmo período de avaliação. Concordando com Negreiros et al. (2006) que ao avaliar a influência do estágio de maturação dos frutos de maracujazeiro-amarelo, concluíram que os frutos maduros obtiveram as melhores percentagem de germinação. De acordo com Carvalho; Nakagawa (2000), as sementes que não se encontram completamente maduras podem germinar, contudo não resultam em plântulas tão vigorosas como aquelas colhidas no ponto adequado.

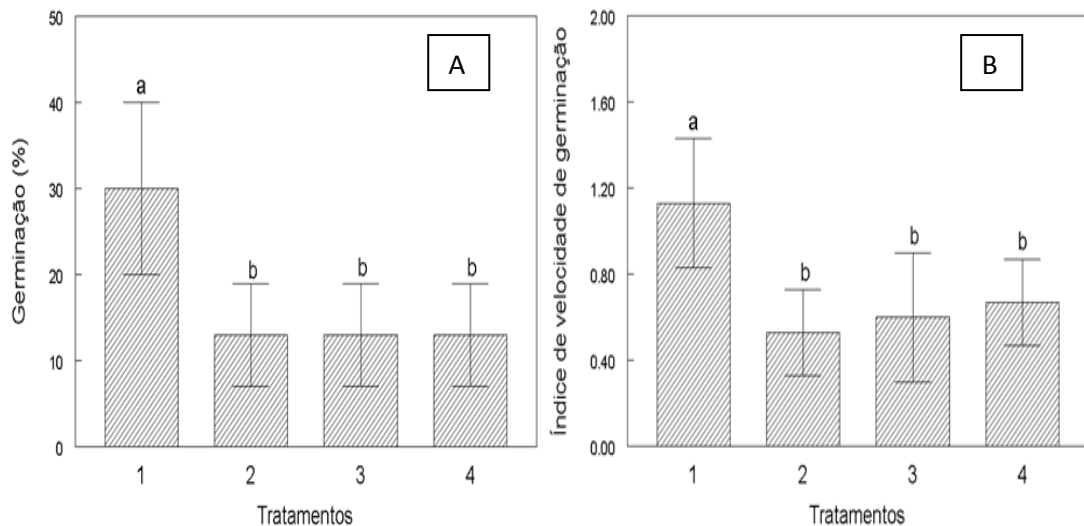


Figura 8: Germinação das sementes de *Symplocos uniflora*. **A:** Porcentagem de germinação, **B:** Índice de velocidade de germinação. **1:** Frutos maduros com endocarpo intacto; **2:** Frutos maduros com desponte do endocarpo; **3:** Frutos imaturos endocarpo intacto e **4:** Frutos imaturos com desponte do endocarpo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dez repetições, com dez diásporos por repetição. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Segundo Dias (2001), a maturidade fisiológica das sementes pode ser completada quando os frutos colhidos passam por um período de descanso ou repouso, podendo variar de 7 a 10 dias, em local fresco e ventilado, antes da

extração das sementes. Nestes casos, sementes imaturas ainda presentes no fruto, mesmo desligado da planta-mãe, completam seu desenvolvimento, resultando em melhor qualidade fisiológica. Fato que não pode ser comprovado neste estudo uma vez que os frutos imaturos foram colocados imediatamente para germinar, não ficando armazenados.

A escarificação mecânica, através do despoje do endocarpo, não influenciou positivamente nas porcentagens de germinação e no índice de velocidade de germinação das sementes (Figura 8B).

Um segundo estudo foi elaborado e a coleta foi realizada nos meses de Janeiro e Março de 2013, no mesmo local, após cada coleta foi realizada a remoção da polpa carnosa e os diásporos foram armazenados em caixas germbox no refrigerador ($10^{\circ}\text{C} \pm 1$) ou em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), por 10 dias. Posteriormente em condições assépticas os diásporos foram inoculados em placas de petri e mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, na ausência ou presença de luz.

Nas duas épocas de coletas (Figuras 9 e 10), a germinação das sementes ocorreu a partir do 20º dia após a inoculação dos frutos e os melhores resultados de germinação das sementes (33 e 40%) foram observados na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas), independente das condições de armazenamento dos diásporos, diferindo dos valores observados para diásporos mantidos em escuro contínuo, com máximo de 16%. Estes resultados sugerem que as sementes de *S. uniflora* sejam fotoblásticas preferenciais, pois segundo Klein; Felipe (1991) o caráter fotoblástico positivo preferencial é quando a germinação também ocorre na ausência de luz, porém com menor representatividade.

No experimento realizado em Janeiro o pré-armazenamento dos diásporos em temperatura ambiente e condições de escuro contínuo propiciaram os menores Índices de velocidade de germinação (Figura 9B), entretanto no experimento realizado em março os menores índices foram observados também nas condições de escuro, independente das condições de armazenamento (Figura 10B). Estudos relatam que as sementes de diferentes espécies são fotossensíveis quanto ao processo germinativo, podendo apresentar comportamento positivo, negativo ou neutro (RENNER et al., 2007; ADAMI et al. 2008). Entretanto, essa categoria não pode ser considerada como definitiva, uma vez que outros fatores podem alterar estas respostas (BEWLEY e BLACK, 1994; TAKAKI, 2001). Conforme Scalon et al.

(2009), mesmo algumas sementes apresentando fotoblastismo neutro, na presença de luz a germinação é significativamente aumentada, sugerindo que a luz estimula reações metabólicas mais rápidas que culminam em maior velocidade de desenvolvimento das células do eixo embrionário Silveira et al. (2004) classificaram as sementes de *Marctia taxifolia* (Melastomataceae) como fotoblásticas positivas, apesar de terem apresentado uma pequena percentagem de germinação das sementes no escuro.

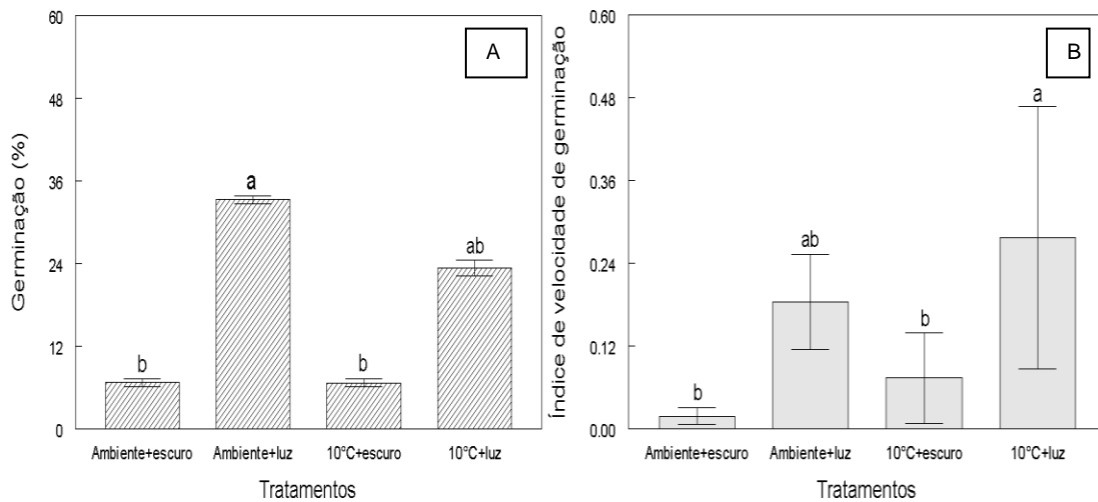


Figura 9 – Germinação das sementes de *Symplocos uniflora* coletadas em **janeiro** de 2013. **A**: Porcentagem de germinação. **B**: Índice de velocidade de germinação. Cada tratamento teve dez repetições e dez diásporos por repetição, em delineamento inteiramente casualizado.

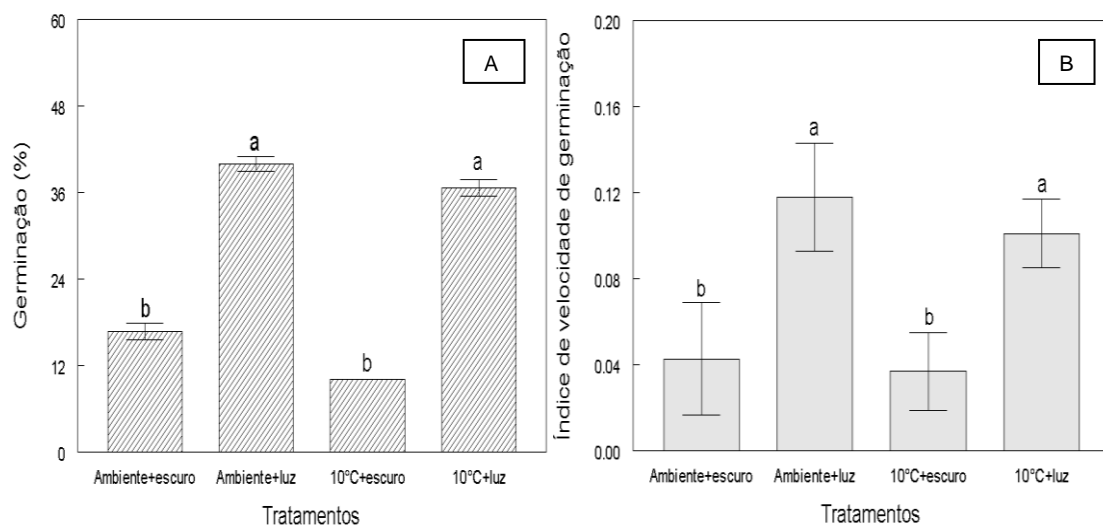


Figura 10 – Germinação das sementes de *Symplocos uniflora* coletadas em **março** de 2013. **A**: Porcentagem de germinação. **B**: índice de velocidade de germinação. Cada tratamento teve dez repetições e dez diásporos por repetição, em delineamento inteiramente casualizado.

Comparando a germinação das sementes de *S. Uniflora* coletadas em janeiro e março, não houve diferença significativa entre as duas épocas de coletas e os tratamentos estudados (Tabela 1). No entanto, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, as percentagens de germinação mostraram-se superiores nos frutos coletados em março de 2013, indicando que estas sementes possivelmente estivessem em um estágio mais avançado de maturidade fisiológica. Segundo Nakada et al. (2011) na maturidade fisiológica, as sementes atingem o máximo de germinação e vigor, devido à formação completa dos sistemas bioquímico, morfológico e estrutural.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação das sementes de *Symplocos uniflora* nas duas épocas de coleta. Santa Maria, RS, 2013. Cada tratamento teve dez repetições e dez diásporos por repetição, em delineamento inteiramente casualizado.

Porcentagem de germinação		
Tratamentos	Janeiro 2013	Março 2013
Temperatura ambiente + escuro	6,73 ± 0,58 a	16,73 ± 1,15 a
Temperatura ambiente + claro	33,3 ± 0,58 a	40,00 ± 1,0 a
Refrigerador + escuro	6,70 ± 1,67 a	10,10 ± 0 a
Refrigerador + claro	23,40 ± 1,15 a	36,70 ± 1,15 a

* Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Para a germinação em substrato, os diásporos foram armazenados por 15 dias em duas condições de temperatura e posteriormente efetuou-se a semeadura em bandejas com três tipos de substrato. As avaliações foram encerradas 180 dias após a instalação do experimento e a germinação das sementes ocorreram a partir do 64º dia após a inoculação dos frutos. Não houve interação significativa entre os fatores analisados para porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento da parte aérea das plântulas.

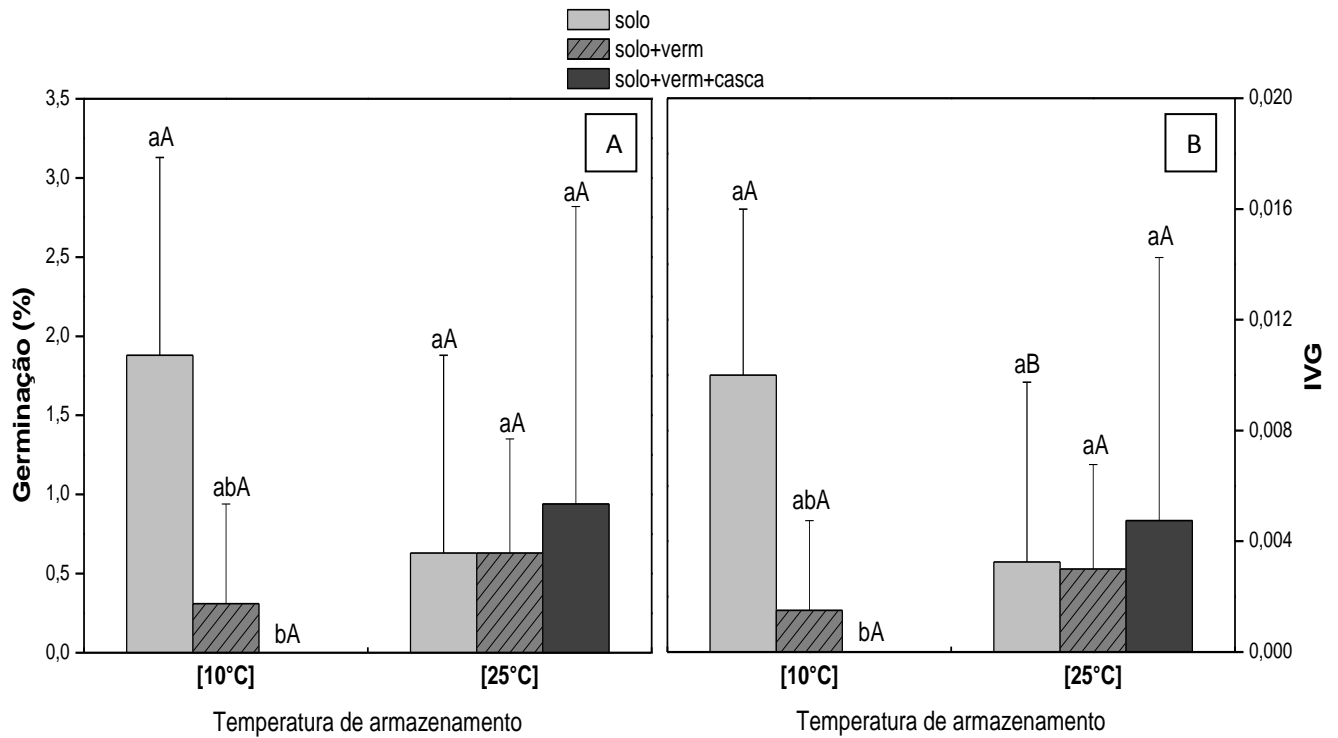


Figura 11: Germinação das sementes de *Symplocos uniflora*. **A:** Porcentagem de germinação, **B:** índice de velocidade de germinação. Cada tratamento teve quatro repetições e 80 diásporos por tratamento, em DIC. Santa Maria-RS, 2013.* Médias seguidas de letras maiúsculas indica comparação entre temperatura dentro do mesmo substrato, enquanto que letras minúsculas indicam comparação entre substratos dentro da mesma temperatura. Os tratamentos foram apresentados como média \pm desvio padrão de quatro repetições.

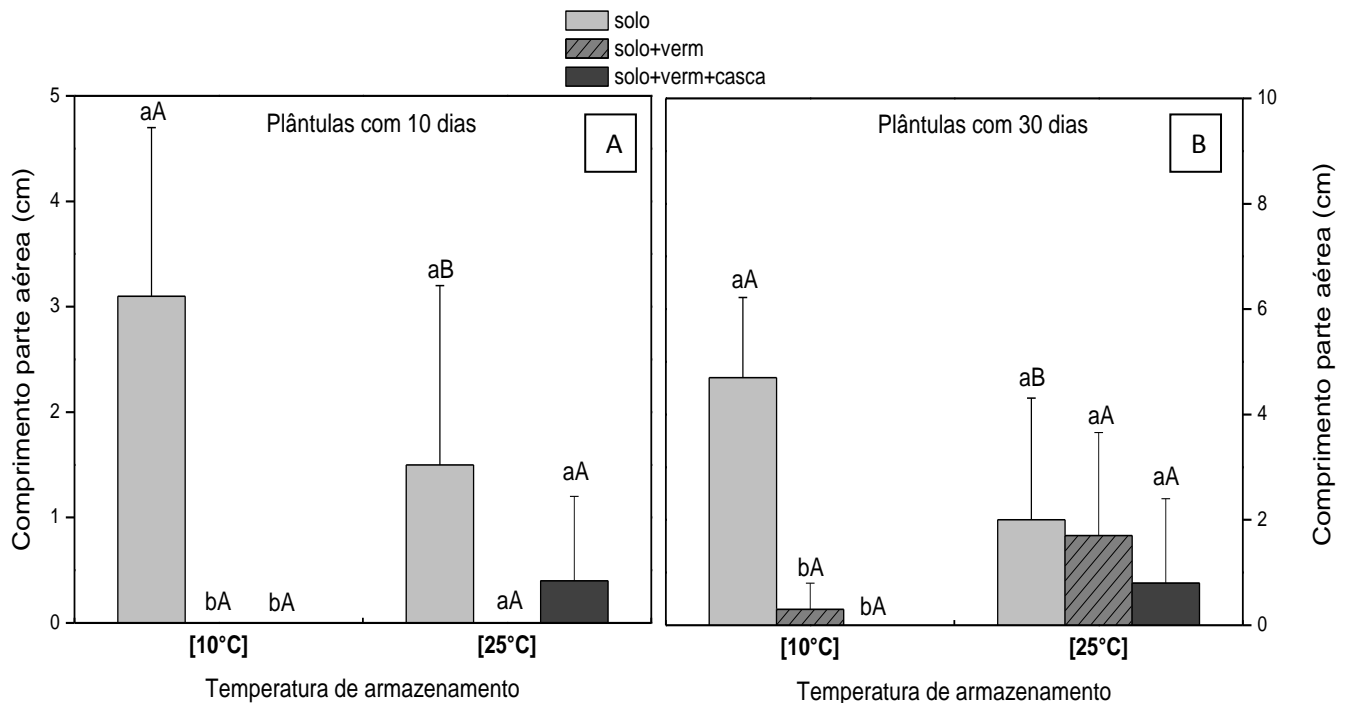


Figura 12: Comprimento da parte aérea de plântulas de *Symplocos uniflora*. **A:** Plântulas com 10 dias após a emergência, **B:** Plântulas com 30 dias após a emergência. Santa Maria-RS, 2013.* Médias seguidas de letras maiúsculas indica comparação entre temperatura dentro do mesmo substrato, enquanto que letras minúsculas indicam comparação entre substratos dentro da mesma temperatura. Os tratamentos foram apresentados como média \pm desvio padrão de quatro repetições.

Entretanto observou-se diferença significativa entre os substratos utilizados apenas para as sementes armazenadas a $10^{\circ}\text{C} \pm 1$ (Figura 11), sendo a maior porcentagem de germinação observada no substrato comercial *Plantmax*® (1,88%) e a velocidade de germinação (0,01). Independente dos fatores estudados, as porcentagens de germinação das sementes de *Symplocos uniflora* foram baixas. É provável que a capacidade de retenção da água de cada substrato, aliada às características intrínsecas que regulam o fluxo de água para as sementes, possa ter influenciado os resultados.

Dos substratos utilizados, o substrato comercial *Plantmax*® e vermiculita e casca de arroz apresentaram as menores porcentagens de germinação, quando os frutos foram armazenados na temperatura de $10^{\circ}\text{C} \pm 1$. Embora o substrato comercial utilizado *Plantmax*® tenha proporcionado as porcentagens de germinação mais altas, estas foram abaixo de 2%. Pode-se verificar também neste estudo, um grande desenvolvimento de fungos em todos os substratos testados, o que possivelmente pode ter contribuído para a redução das porcentagens de germinação. Segundo Dousseau et al. (2008), na espécie *Plantago tomentosa* e *Psidium guajava* (PARIZOTTO, 2011) a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação foram os menos significativos quando utilizado o substrato comercial *Plantmax*®, contrariando os resultados de Lopes et al. (1996) e Silva et al. (2001), que ao analisar a influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro amarelo, observaram que o substrato comercial *Plantmax*® foi superior em todas as características analisadas nas plantas.

A emergência das plântulas oriundas da germinação das sementes armazenadas em temperatura de $\pm 10^{\circ}\text{C}$ teve início 105 dias após a semeadura em substrato comercial *Plantmax*® e aos 30 dias após a emergência, estas se apresentavam com três pares de folhas (Figura 13B), este substrato propiciou os maiores comprimentos de parte aérea das plântulas de *S. uniflora*, indicando que o crescimento destas plântulas foi influenciado pelos diferentes substratos analisados, verificando-se melhor desenvolvimento aos 150 dias após a semeadura. Segundo Silva et al., (2000) o substrato comercial *Plantmax*® possui em sua composição alto teor de matéria orgânica, favorecendo o crescimento das plântulas.

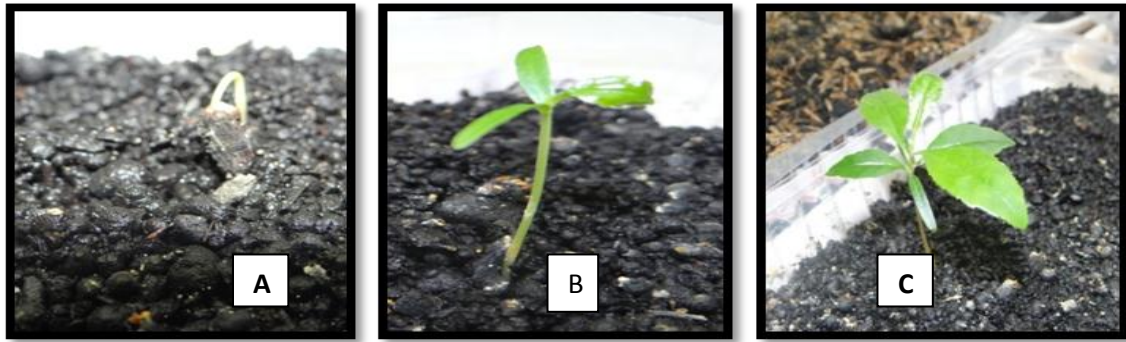


Figura 13: Plântulas de *Symplocos uniflora* em substrato *Plantmax*®. **A:** início da emergência da parte aérea, **B:** plântula aos 10 dias após a emergência e **C:** plântula aos 30 dias após a emergência.

4.2 Germinação *in vitro*

Após a coleta e remoção da polpa, os diásporos foram armazenados em duas condições de temperatura, após o armazenamento por 10 dias foi realizado ou não a escarificação química com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 10 minutos, em seguida os mesmos foram inoculados em meio de meio de cultura contendo ou não ácido giberélico. As avaliações foram encerradas 180 dias após a instalação do experimento e a germinação das sementes ocorreram a partir do 40º dia após a inoculação dos frutos observando-se a maior porcentagem de germinação das sementes 27,3%, (Tabela 2), nos diásporos armazenados por 10 dias em temperatura de 10 °C, imersos anteriormente em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 10 minutos e na ausência de GA_3 no meio de cultura, porém não diferiu significativamente dos demais tratamentos com H_2SO_4 , obtendo-se uma porcentagem média de germinação de 26,3%.

Quando não foi realizado a escarificação química dos diásporos de *S. uniflora* como tratamento pré-germinativo (exposição ao H_2SO_4 concentrado por 10 minutos), todos os diásporos contaminaram, indicando que o uso deste ácido pode atuar na superação da dormência imposta pelo endocarpo e/ou tegumentos das sementes lignificados bem como na desinfestação e/ou desinfecção dos mesmos.

Provavelmente o pré-tratamento químico diminuiu a barreira física imposta pelo endocarpo endurecido, propiciando seu rompimento, facilitando assim, as trocas gasosas e a absorção de água pelas sementes. De acordo com Diógenes et al. (2010), *Ziziphus joazeiro* apresenta dormência imposta pelo endocarpo duro e resistente e o uso de ácido sulfúrico concentrado se faz necessário para obtenção de melhores porcentagens de germinação, resultados semelhantes foram

observados para *Adenanthera pavonina* L. (KISSMAN et al., 2008); *Stryphnodendron adstringens* Mart.; *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (MARTINS et al., 2008); *Albizia lebbbeck* L. (BENEDITO et al., 2009); *Passiflora alata* (ZONTA et al. 2009) e *Parkia platycephala* Benth. (NASCIMENTO et al., 2009).

A impermeabilidade do tegumento à água é o fator considerado por Popinigis (1985) como uma das causas mais comuns de dormência em sementes. Isto pode ser comprovado neste estudo, uma vez que a porcentagem de germinação foi relativamente baixa em todos os tratamentos.

Os melhores índices de velocidade de germinação (0,17) foram observados quando os diásporos foram armazenados na temperatura de 10°C e inoculados em meio de cultura contendo ácido giberélico, entretanto não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos avaliados.

Conforme a tabela 2 não houve diferença significativa na porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes quando os diásporos foram previamente armazenados em 10° ou 25° e inoculados em meio de cultura contendo ou não ácido giberélico, embora o seu uso seja uma das alternativas para superação de dormência em sementes de diversas espécies, a adição de 1,5 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) no meio de cultura não influenciou positivamente a germinação *in vitro* de sementes de *S. uniflora*, provavelmente as sementes necessitem de uma dose maior ou menor para estimular a germinação desta ou por não apresentarem dormência causada pela imaturidade do embrião. Entretanto respostas positivas foram observadas em sementes de *A. squamosa* L. (FERREIRA et al. 2002); *Hancornia speciosa* (PINHEIRO et al. 2001); *Didymopanax morototoni* (FRANCO; FERREIRA, 2002); *Passiflora nítida* (PASSOS et al. 2004) entre outras. Segundo Holey (1994) o GA₃ promove a germinação das sementes, estimula o crescimento do embrião e induz a produção de hidrolases para enfraquecer as estruturas ao redor do embrião.

Tabela 2: Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de *Symplocos uniflora*. Cada tratamento teve cinco repetições e 30 diásporos (semente recoberta por endocarpo lignificado), por repetição em DIC. Santa Maria-RS, 2013.

		Presença H ₂ SO ₄	
		10°C	25°C
Porcentagem de germinação	+ GA ₃	26,0 Aa	25,3 Aa
	- GA ₃	27,3 Aa	26,7 Aa
(IVG)	+ GA ₃	0,176 Aa	0,096 Aa
	- GA ₃	0,092 Aa	0,082 Aa

* Médias seguidas de letras maiúsculas indica comparação entre a presença e ausência de GA₃ na temperatura de 10°C e letras minúsculas indica comparação entre a presença e ausência de GA₃ na temperatura de 25°C. (coluna). Teste t (P ≤ 0,05).

4.3 Cultivo *in vitro*

Foram utilizados como explantes segmentos apicais e nodais, obtidos de plantas jovens. Após assepsia os mesmos foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) completo, semi-solidificado com ágar e acrescido de sacarose, carvão ativado e combinações de BAP e ANA, após 60 dias de cultivo houve formação de brotações em todos os tratamentos testados, mesmo na ausência do regulador de crescimento, entretanto as porcentagens de explantes com brotações foram relativamente baixas (29%) (Figura 14A), não havendo diferença significativa em relação ao tipo de segmento utilizado e entre os meios contendo as quatro combinações de reguladores de crescimento. As menores porcentagens de explantes com brotações aéreas foram observadas quando utilizadas as combinações mais altas de hormônio 4,0 mg L⁻¹ (BAP) e 0,4 mg L⁻¹ (ANA), o que pode ter causado um efeito fitotóxico aos explantes. Alguns autores relatam que o BAP, por ter um efeito mais expressivo quanto à multiplicação *in vitro*, quando comparado às outras citocininas, pode realmente, apresentar fitotoxicidade em algumas espécies, acarretando um efeito negativo quando o objetivo é a indução de múltiplos brotos (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Souza et al., 2007).

O efeito negativo atribuído a altas concentrações de BAP quanto à indução de múltiplos brotos *in vitro*, pode estar também, relacionado ao reduzido crescimento das brotações, visto que, em alguns casos ela acontece, mas pode ser mascarada pelo baixo crescimento dos brotos formados, não sendo possível a individualização para a contagem.

Não houve diferença significativa para o número de brotações entre as concentrações de hormônio e o tipo de segmento utilizado. Porém, pode-se inferir que o segmento nodal e a suplementação do meio MS com 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA é o tratamento mais favorável para a multiplicação *in vitro* de *S. uniflora*, haja vista a obtenção de maior porcentagem de explantes com brotação. Da mesma forma, Pinto et al. (1994) observaram que segmentos nodais apresentaram maior produção média de brotações em *Kielmeyera coriacea* corroborando com os resultados de Paiva; Aloufa (2009) que indicaram o segmento nodal como o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de *Schinus terebinthifolius*.

A formação de brotos sem raízes observadas neste estudo pode demonstrar que alguns explantes não apresentavam células determinadas para a formação destas. Neste caso, uma segunda fase de cultivo *in vitro*, onde as brotações são transferidas para meio de enraizamento com auxina no meio de cultura, principalmente ácido indol butírico (AIB) pode ser necessária para estimular a indução do enraizamento nas brotações. O enraizamento dos explantes está relacionado, entre outros fatores, a qualidade das partes aéreas utilizadas na micropropagação, pois embora a capacidade de multiplicação e a competência de enraizamento sejam características correlacionadas, elas não são adquiridas ao mesmo tempo pelas culturas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os explantes apicais foram os que resultaram na maior porcentagem de explantes sem resposta com 73% aos 60 dias de cultivo *in vitro*, diferindo estatisticamente dos explantes nodais (Figura 14D). A ausência de respostas *in vitro* é freqüentemente um problema no cultivo *in vitro* de espécies nativas (BONGA; VON ADERKAS, 1992), assim como a oxidação, que provavelmente ocorre em função da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos, em resposta a danos físicos ou as altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura.

No que se refere à oxidação (Figura 14C), a porcentagem também foi elevado (70%) quando utilizado o segmento nodal com a concentração de 4,0 mg L⁻¹ BAP e 0,4 mg L⁻¹ de ANA, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Neste

estudo, após a inoculação, as culturas foram mantidas durante sete dias em escuro contínuo e após foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas. A ausência de luz ou a baixa intensidade luminosa limita a ativação de enzimas envolvidas na oxidação dos compostos fenólicos, enquanto o carvão ativado adicionado ao meio de cultura adsorve compostos tóxicos, contribuindo para a sobrevivência dos explantes (Grattapaglia; Machado, 1998).

Para explantes de *Carapa guianensis*, Amaral et. al (1997) observaram ser necessária a manutenção das culturas por sete a quinze dias no escuro para diminuir a oxidação fenólica. Para Assis; Teixeira (1998), espécies lenhosas, em geral, são beneficiadas com o uso de carvão ativado. Contudo, esta substância possui alta capacidade de adsorção e pode reter parte dos elementos que compõem o meio de cultura, inclusive substâncias promotoras do enraizamento, o que também possivelmente pode ter contribuído para a ausência de raízes observadas neste estudo.

Segundo Marinho et al. (2011) a elevada porcentagem de oxidação também pode ser atribuído a fatores relacionados à época do ano, idade do explante ou mecanismos de defesa da planta expressos através da produção de polifenóis, os quais sofrem a ação das polifenases provocando o escurecimento do meio e/ou do explante. De acordo com George; Sherrington, (1984) a oxidação pode ocorrer em função do tecido injuriado ou senescente de espécies nativas, especialmente as tropicais, que contêm alta concentração desses componentes fenólicos. Arello (1991) ao estabelecer *in vitro* explantes de *Kielmeyera coriacea*, observou que a oxidação diminuiu a taxa de emissão de novas brotações e indicou a utilização de produtos que adsorvem os oxidantes, como o carvão ativado e o polivinilpirrolidona. No presente estudo, o uso destes dois adsorventes no meio de cultivo não foi eficiente para evitar a oxidação dos explantes. Esses agentes redutores servem como substrato para enzimas oxidativas, diminuindo a produção de substâncias tóxicas para as plantas e adsorvendo os compostos fenólicos (RIBAS; ZANETTE, 1992).

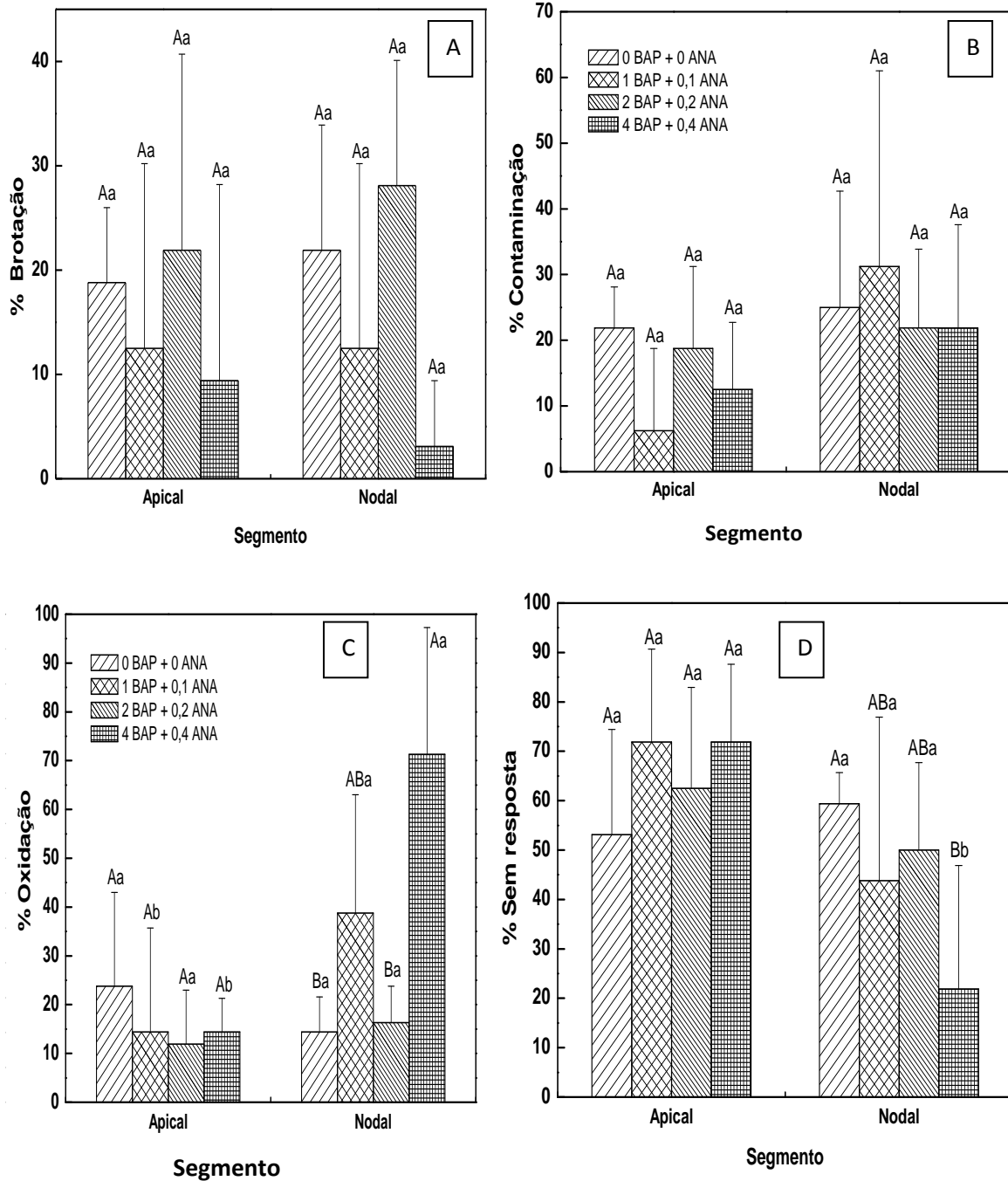


Figura 14: Respostas obtidas *in vitro* de *Symplocos uniflora* cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, testando-se quatro combinações de fitorreguladores. **A:** Percentagem de brotações aéreas, **B:** Percentagem de contaminação, **C:** Percentagem de explantes oxidados e **D:** Percentagem de explantes sem respostas. *Médias seguidas de letras maiúsculas para comparação entre doses de hormônios dentro do mesmo segmento e letras minúsculas para comparação entre os segmentos na mesma dose. Os tratamentos foram apresentados como média \pm desvio padrão de seis repetições ($P < 0.05$).

A maior percentagem de contaminação ocorreu em explantes do segmento nodal, com 30% de contaminação aos 60 dias (Figura 14A). Possivelmente o pré-tratamento com a aplicação de fungicida nas plantas matrizes, a desinfestação

superficial e o uso de fungicida no meio de cultura contribuíram no controle da contaminação *in vitro*. Vários autores ressaltam que os cuidados iniciais na seleção e na desinfestação dos explantes são fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro* (Bajaj et al., 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

5. CONCLUSÕES

A temperatura de 25°C é favorável para a germinação das sementes de *Symplocos uniflora*.

Frutos maduros apresentam melhores porcentagens de germinação e índice de velocidade de germinação.

As sementes de *Symplocos uniflora* são fotoblásticas positivas preferenciais.

A escarificação mecânica não influencia a germinação e a velocidade de germinação das sementes.

A utilização de tratamento pré-germinativo com ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos é favorável para superação da dormência das sementes causada pelo endocarpo duro e/ou tegumento endurecido das sementes, assim como para desinfestação e/ou desinfecção destas.

O uso do ácido giberélico no meio de cultura na concentração de 1,5 mg L⁻¹ propicia melhores índices de velocidade de germinação e não influencia na porcentagem.

Segmentos nodais retirados de brotações novas de plantas com 18 meses de idade e cultivados *in vitro* formam brotações aéreas sem ocorrência de raízes. Os explantes e brotações obtidas *in vitro* apresentam alta taxa de oxidação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M.A. et al. Kinetics studies on symplocomoside: a urease inhibitor. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 34, n. 1, p. 43-46, 2012.

ADAMI, C.; MAURI, J.; DALCOLMO, S.; HEBLING, S. A. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Erythrina verna* (Leguminosae, Papilionoideae) **Mus. Biol. Mello Leitão** p. 101-110, 2008.

AHMAD, V.U. et al. Phenolic glycosides from *Symplocos racemosa*: natural inhibitors of phosphodiesterase I. **Phytochemistry**, v. 63, p. 217–220, 2003.

ALENCAR, A. P. **Estabelecimento do cultivo *in vitro* do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr.)**. 1999. 87 p. Dissertação – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1999.

AMARAL, et. al. Uso de tratamentos como antioxidantes de explantes (embrião, endosperma) de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). In: Seminário de Iniciação Científica da FCAP,7. **Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental**, 1. Resumos. Belém: FCAP. p. 122-124, 1997.

ANGEVINE, M. W.; CHABOT, B. F. **Seed germination syndromes**. In: SOLBRIG, O. T. et al. Topics in plant population biology. New York: Columbia University, 1979, p. 189-206.

ARAÚJO NETO, J.C. Armazenamento e requerimento fotoblástico de sementes de *Acacia polyphylla*. **Rev. bras. Sementes**, vol.27 no.1, 2005.

ARELLO, E. F. 1991. **Aspectos gerais do comportamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* Martins (Guttiferae): Produção e enraizamento de brotações**. Dissertação de mestrado. Lavras, Escola Superior de Agricultura de Lavras. 148p

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: **Congresso Florestal Estadual**, Santa Maria: UFSM, p. 824-837, 1992.

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

BADONI, R.; SENWAL, D. K.; KOTHIYAL, S. K.; RAWAT, U. Chemical constituents and biological applications of the genus *Symplocos*. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol 12, p. 1069-1080, 2010.

BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S. Medicinal and aromatic plants. v.1, p.60-103, 1988.

BANU, S.; KASHYAP, K. *Symplocos laurina*: an unexplored important medicinal plant of Shola forest system. **International Journal of Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 366-374, 2013.

BENEDITO, C.P. et al. Influência da cor e métodos de superação de dormência em sementes de *Albizia lebbbeck* L. **Caatinga**, v.22, n.2, p.121-124, 2009.

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

BEZERRA, A.M.E. et al. Germinação e desenvolvimento de plântulas de melão-de-são-caetano em diferentes ambientes e substratos. **Revista Ciência Agrônômica**, v.33, p.39-44, 2002.

BRAUN, H. et. al. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 539-546, 2010.

BONGA, J.M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Kluwer Academic Publishers, 1992, 236p.

BORÉM, A. **Pequeno glossário de termos agrônômicos**. Viçosa: UFV, 1998, 169p.

BRYANT, J.A. 1985. **Fisiologia da semente**. EPU, São Paulo.

BURKART, S. **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Colección Científica Del Inta Buenos Aires, 1979, v. 6, p.106.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p.87-132.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 95-108.

CARVALHO, P. E. R. Maria-Mole-do-Banhado (*Symplocos uniflora*) Embrapa Florestas Circular Técnica (148), 2008, 6p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.

COSTA, C.J.; MARCHI, E.C.S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. **Informativo Abrates**, v.18, n. 1, p. 39-50, 2008.

DEVMURARI, V.P. Antibacterial evaluation and phytochemical screening of *Symplocos racemosa* Roxb. **International Journal of Pharmaceutical Technology Research CODEN (USA)**, v. 2, n. 2, p.1359-1363 2010.

DIAS, D. C. F. Maturação de sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 5, n. 6, p. 22-24, 2001.

DINIZ, J.D.N. et al. Ácido giberélico (GA3) e 6 - benzilaminopurina (BAP) no crescimento in vitro de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.4, p.934-8, 2003.

DIOGENES, F.E.P. et al. Pré-tratamento com ácido sulfúrico na germinação de sementes de *Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.2, p.188-194, 2010.

DOUSSEAU, S. et al. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciênc. agrotec.** vol.32, no.2, p.438-443, 2008.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Editora Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA, G.; ERIG, P. R.; MORO, E. Uso de ácido giberélico em sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) visando à produção de mudas em diferentes embalagens. **Rev. Bras. Frutic.** v. 24, n. 1, p. 178-182, 2002.

FIGLIOLIA, M. B. et al. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 137-174.

FLORIANO, E. P. Germinação e dormência de sementes florestais. Santa Rosa: **Anorgs**, 2004. (Caderno didático, 2).

FRANCO, E.T. H.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré -germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2002.

FRITSCH, P. W., CRUZ, B. C., ALMEDA, F., WANG, Y. & SHI, S. Phylogeny of *Symplocos* based on DNA sequences of the chloroplast trnC-trnD intergenic region. **Systematic Botany**, v.31, p.181-192, 2006.

GEORGE, E.F; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture – handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley, 1984, 709p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1998, p.99-169.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HEBLING, S. A. 1997. **Aspectos ecofisiológicas da germinação de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Velloso) Morong**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 116 p.

HOOLEY, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, p. 1529-1555, 1994.

KISSMAN, C. et al. Tratamentos para quebra de dormência, temperaturas e substratos na germinação de *Adenanthera pavonina* L. **Ciência Agrotécnica**, v.32, n.2, p.668-674, 2008.

KLEIN, A.; FELIPPE, G. M. Efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 7, p. 955-966, 1991.

KUMAR, G.S.; UMACHIGI, P.S.; SWAMY, B.M.V.; DHANAPAL, R.; KUMAR, A.; JAYVEERA, K.N. Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the stem bark of *Symplocos racemosa* and in its formulations. **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 3537-3540, 2007.

LABORIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 263-284, 1976.

LAHITTE, H. B.; HURREL, J. A. **Arboles Rioplatenses**. Buenos Aires- Argentina, 1999, 300p.

LIN, S. S. Efeito do tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de palmitero. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 57-66, 1988.

LIU, C.Z. et al. *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.63-71, 2004.

LIU, Q.-Q. et al. Chinese Oil Plants Information System (COPIS): an on-line information store, query and management system for three chinese industrial oil plants. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 90, p. 86–92, 2013.

LOPES, P. S. N.; RAMOS, J. D.; CARVALHO, J. G. de; MORAIS, A. R. de. Efeito da adubação nitrogenada e substratos no crescimento de mudas de maracujazeiro azedo em tubetes. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, Curitiba. Anais, 1996. p. 342.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Mediciniais: Nativas e Exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.197-252.

MARINHO, M.J.M et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 246-252, 2011.

MARTINS, C.C.; CAMARA, A.T.R. da.; MACHADO, C.G.; NAKAGAWA, J. Métodos de superação de dormência de sementes de barbatimão. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.3, p.381-385, 2008.

MEEROW, A. W. **Palm seed germination**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida Cooperative Extension Service Bulletin 274. Gainesville, University of Florida, 1991.

MORI, S.A. et al. 1989. **Manual de Manejo de Herbário Fanerogâmico**. 2ª ed. Ilhéus, Centro de Pesquisas do Cacau.

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

NAGORE, D.H. et al. Assessment of loturine from different extracts of bark of *Symplocos racemosa* (Roxb) by using high performance thin layer chromatography. **International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 204-208, 2012.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 113-122, 2011.

NASCIMENTO, I.L. et al. Superação da dormência em sementes de faveira (*Parkia platycephala* Benth.). **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.35-45, 2009.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, J.G.; FERNANDES, G.D. Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes. **Piracicaba: IPEF**, 1998.

NEGREIROS, J. R. S. Influência do estágio de maturação e do armazenamento pós-colheita na germinação de maracujazeiro-amarelo. **Rev. Bras. Frutic.** v. 28, n. 1, p. 21-24, 2006.

OKUSANYA, O.T. Germination and growth of *Celosia cristata* L., under various light and temperature regimes. **American Journal of Botany** V.67, p. 854-858, 1980.

PAIVA, A.M.S.; ALOUFA, M.A.I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6 benzilaminopurina (BAP). **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.3, p.300-304, 2009.

PARIZOTTO, D.; COSTA, J. A.; MOREIRA, G. C. Teste de germinação de sementes da cultura da goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. **Cascavel**, v.4, n.3, p. 32-36, 2011.

PASSOS, I. R. S. et al. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Rev. Bras. Frutic.** v. 26, n. 2, p. 380-381, 2004.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PEREIRA A. M.; LIMA D. A. L. L.; REYDON B. P. As políticas de comando e controle são a melhor alternativa para o conhecimento tradicional. “**VII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**”, 2007.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biociência & Desenvolvimento**, v.4, p.12-5, 1998.

PINHEIRO, C. S. R. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura **Rev. Bras. Frutic.** v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

PINTO et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n. 6, p. 867-873, 1994.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985, 289 p.

RASHID, M. A.; AHMAD, V. U.; ABBASI, M. A. Alpha-Chymotrypsin inhibiting benzylated glycosides from *Symplocos racemosa*. **Phytochemistry Letters**, v.1, n.1, p. 54-58, 2008.

RAVAL, B.P.; SUTHAR, M.P.; PATEL, R.K. Potent *in vitro* anti-tumor activity of *Symplocos racemosa* against leukaemia and cervical cancer. **Electronic Journal of Biology**, v. 5, n. 4, p. 89-91, 2009.

RENNER, G.D.R.; CAMACHO, F.; PEIXE, S. Ação da temperatura, ácido giberélico e luz na germinação de sementes de fáfia – *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 349-54, 2007.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Parada de crescimento de mudas de macieira da cv. Gala, clone FZ, durante a aclimatização em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.145-152, 1992.

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

ROSA, S.G.T. & FERREIRA, A.G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botanica Brasilica**,15: 147-288, 2001.

SANTARÉM, E.R.; ÁQUILA, M.E.A. Influência de métodos de superação de dormência e do armazenamento na germinação de sementes de *Senna macranthera* (Colladon) Irwin e Barneby (*Leguminosae*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 205-209, 1995.

SCALON, S. P. Q. et al. Enraizamento e germinação na propagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (ginseng-brasileiro). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 5, p. 1249-54, 2009.

SETUBAL, J.W.; AFONSO NETO, F.C. Efeito de substratos alternativos e tipos de bandejas na produção de mudas de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.593-594, 2000.

SILVA, A. C. R.; FERNANDES, H. S.; MARTINS, S. R. Produção de mudas de alface com vermicomposto em diferentes tipos de bandejas. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.18, p.512-513, 2000.

SILVA, R. P. da; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de muda de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 377-381, 2001.

SILVA, L. M. M.; RODRIGUES, T.J.D.; AGUIAR, E.B. Efeito da luz e a temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, p.691-697, 2002.

SILVEIRA, F.A.O.; NEGREIROS, D.; FERNANDES, G.W. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Marsetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.847-851, 2004.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R. S. **Flora Arbórea e Arborecente do Rio Grande Do Sul**, Brasil. São Carlos, SP, 2006, 350p.

SOEJIMA, A. & NAGAMASU, H. Phylogenetic analysis of Asian *Symplocos* (Symplocaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.117, p.199-207, 2004.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SUNIL, C.; IGNACIMUTHU, S.; KUMARAPPAN, C. Hypolipidemic activity of *Symplocos cochinchinensis* S. Moore leaves in hyperlipidemic rats. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n.1, p. 32-38, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TAKAKI, M.. New proposal of classification of seed based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13 p.103-107, 2001.

TSCHESCHE, R.; BRAUN, T.M.; SASSEN, W.V. Symplocoside, a flavanol glycoside from *Symplocos uniflora*. **Phytochemistry**, 19p,1980.

VÁZQUEZ-YANES, C. & OROZCO-SEGOVIA, A. 1991. Seed viability, longevity and dormancy in a tropical rain forest. In **Anais do II Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais** (M.B. Figliolia, coord.). Instituto Florestal, São Paulo, p.175-196.

VIJAYABASKARAN, M. et al. Isolation and characterization of phenolic glycoside from the bark of *Symplocos racemosa* Roxb. **Journal of Chemistry**, v. 7, suppl.1, p. S255-S260, 2010.

WANG, Y.; FRITSCH, P.W.; SHI, S.; ALMEDA, F.; CRUZ, B.C. & KELLY, L.M. Phylogeny and infrageneric classification of *Symplocos* (Symplocaceae) inferred from DNA sequence data. **Amer. J. Bot.** V.91, p.1901-1914, 2004.

WENDLING, I.; GATTO, A. Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas. Viçosa: **Aprenda Fácil**, 2002.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais. Viçosa: **Aprenda Fácil**, v. 3. 223 p, 2005.

ZONTA, J. B et al. Germinação de sementes do maracujazeiro (*Passiflora alata* DRYAND) submetidas a tratamentos físicos no tegumento e a pre-embebição em ácido giberélico (GA₃). **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba, 2009.