

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

Larissa Bittencourt

**CONTRIBUIÇÕES PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA  
EM *Eugenia involucrata* E PARA A CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE INDIVÍDUOS DE *Carya illinoensis***

Santa Maria, RS  
2017

Larissa Bittencourt

**CONTRIBUIÇÕES PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA  
EM *Eugenia involucrata* E PARA A CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE INDIVÍDUOS DE *Carya illinoensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria, RS (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bittencourt, Larissa  
CONTRIBUIÇÕES PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM  
Eugenia involucrata E PARA A CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
INDIVÍDUOS DE *Carya illinoensis* / Larissa Bittencourt.-  
2017.  
96 p. ; 30 cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger  
Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2017

1. Cultura de tecidos 2. Calogênese 3. Diversidade  
genética 4. Marcadores moleculares I. Silveira Reiniger,  
Lia Rejane II. Brião Muniz, Marlove Fátima III. Título.

Larissa Bittencourt

**CONTRIBUIÇÕES PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA  
EM *Eugenia involucrata* E PARA A CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE INDIVÍDUOS DE *Carya illinoensis***

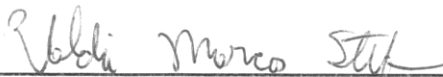
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria, RS (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

**Aprovada em 22 de fevereiro de 2017:**



---

**Lia Rejane Silveira Reiniger, Profª Drª (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)**



---

**Valdir Marcos Stefenon, Prof. Dr. (UNIPAMPA)**



---

**Aline Ferreira Palm, Drª (UFSM)**

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a meus pais, Aida e Cesar, pois, sem eles, eu nada seria, agradecer por sempre me apoiarem, e por aguentar os meus piores momentos, e que mesmo sem entender, estavam sempre com a mão estendida para mim, sem perguntas, somente com amor.

E com todo o amor do mundo agradecer ao meu irmão Julio César, que é simplesmente o meu porto seguro, aquele que eu sei que posso sempre contar, e que me apoia e me dá forças para continuar.

Também queria agradecer a toda a minha família, que sempre esteve ao meu lado, me dando força, principalmente a minha prima Vanessa, e meu afilhado Gabriel, minhas tias amadas, Maria Luiza e Rose, e meu tio querido Antônio Carlos, que sempre tinham uma palavra de incentivo, e que nunca me deixaram desistir.

Gostaria de agradecer a todos os professores que tive, por me mostrarem que o estudo e o conhecimento são a base para a vida, e, por me fazerem ser apaixonada pela área que decidi seguir na vida acadêmica.

À todos meus amigos, que faltam palavras para demonstrar a gratidão que sinto, pelo apoio, em todos os momentos da minha vida.

Especialmente agradecer a minha orientadora e amiga professora Dr<sup>a</sup> Lia Rejane Silveira Reiniger, por ser essa pessoa especial, e que fez parte de uma fase muito importante da minha vida, e, por todos ensinamentos, broncas (que só me fizeram melhorar), e por estar ao meu lado sempre.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES, pela bolsa concedida, fundamental para a viabilização deste trabalho.

À Universidade Federal do Pampa campus São Gabriel, que viabilizou a realização de parte desse trabalho.

Ao professor Dr. Valdir M. Stefenon, pela disponibilidade e auxílio nessa etapa, e aos amigos Cristiane e Rafael, pela disposição e empenho em me ajudar, e ensinar.

À todas as pessoas que direta e indiretamente, foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

Só tenho a dizer: Muito Obrigada de coração!

**Gratidão**

“Você nunca achará o arco-íris, se estiver olhando para baixo”.

Charlie Chaplin

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Aspectos silviculturais de *Eugenia involucrata* DC., em: (a) árvore matriz; (b) folhas e flores; (c) frutos e sementes; e (d) casca e madeira.....23
- Figura 2: Aspectos das formações calogênicas e oxidação fenólica em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, em: (a) disco foliar com a presença de baixa oxidação fenólica e maior formação de calos, em destaque a formação de calo nodular; e (b) disco foliar com a presença de intensa oxidação fenólica e formação de calos.....36
- Figura 3: Potencial embriogênico dos calos formados a partir de discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 60 dias de cultivo *in vitro* na presença de TDZ e 2,4-D, em que as células avermelhadas que reagiram fortemente ao carmim acético são consideradas putativas à embriogênese somática. ....38
- Figura 4: Efeito das diferentes concentrações de 2,4-D na oxidação fenólica em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS.....39
- Figura 5: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) em meio nutritivo MS acrescido de 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose, após 120 dias de cultivo *in vitro*, em: (a) com a presença de contaminação bacteriana (aparência rosada indicada pelas setas); e (b) com a presença de oxidação fenólica. ....43
- Figura 6: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), em meio nutritivo MS, após 90 dias de cultivo *in vitro*, em: (a) com 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose; e (b) e com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose. ....44
- Figura 7: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), em 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose em meio nutritivo MS, em período prolongado de cultivo *in vitro*, em: (a) calo nodular putativo à embriogênese somática com explante e calo oxidado; (b) calo nodular com explante verde e parte do calo oxidado; (c) calo friável, com grande parte oxidada, em destaque para o disco foliar verde; e (d) calo oxidado com destaque para parte com necrose. As setas indicam os destaques. 45
- Figura 8: Formação calogênica em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS em função das concentrações de TDZ (5 ou 10 µM), independentemente das concentrações de sacarose (30, 60 ou 90 gL<sup>-1</sup>), em: (a) presença de calos friáveis (indicado pelas setas) de coloração branco-amarelada. e (b) destaque para calo nodular putativo à embriogênese somática.....47
- Figura 9: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, com as seguintes concentrações de sacarose (gL<sup>-1</sup>) e TDZ (µM) respectivamente, em: (a) 30 e 5; (b) 30 e 10; (c) 60 e 5; (d) 60 e 10; (e) 90 e 5; e (f) 90 e 10. Com destaques para os calos nodulares putativos a embriões somáticos indicados pelas setas. ....48
- Figura 10: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS adicionado de 10 µM de TDZ, independentemente da concentração de sacarose (30, 60 ou 90 gL<sup>-1</sup>), em: (a) presença de oxidação fenólica somente nos calos; (b) presença de alta oxidação fenólica somente no

explante, com formação de calos sem oxidação; e (c) presença de oxidação fenólica no explante e nos calos, com destaque para alguns calos necrosados.....	49
Figura 11: Aspectos da contaminação fúngica em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS suplementado com sacarose e TDZ. Observa-se que a contaminação está associada a apenas um explante, enquanto os demais estão livres de contaminação. ....	50
Figura 12: Contaminação microbiana em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS acrescido de 90 gL <sup>-1</sup> de sacarose, 5 µM de 2,4-D e 10 µM de TDZ, em: (a) presença de colônia bacteriana junto ao explante e oxidação fenólica; e (b) presença de micélios fúngicos junto ao explante e oxidação fenólica intensa.....	52
Figura 13: Formação de calos em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS. Em destaque, em: (a) explante com formação calogênica na presença de 5 µM de 2,4-D e 10 µM de TDZ; (b) explante com baixa formação calogênica na presença de 5 µM de 2,4-D e 5 µM de TDZ; e (c) explante com baixa formação calogênica e com oxidação fenólica na ausência de 2,4-D e presença de 5 µM de TDZ. ....	53
Figura 14: Esquema ilustrativo da amplificação de fragmentos de DNA por meio de PCR.....	62
Figura 15: Aspectos silviculturais de <i>Carya illinoensis</i> : (a) Árvore matriz; (b) Folha com folíolos; (c) Casca; (d) Frutos.....	66
Figura 16: Saídas do software do Nanovue® GE mostrando o gráfico (à esquerda) e uma das três leituras realizadas a 260 nm (à direita) de duas amostras de soluções de DNA genômico de <i>Carya illinoensis</i> (Nogueira pecã), representando a amplitude de variação na concentração, em (a) indivíduo 23, e (b) indivíduo 19. A seta indica a curva próxima àquela que seria considerada ideal, com o pico a 260 nm. ....	76
Figura 17: Aspecto dos fragmentos resultantes da amplificação de DNA genômico pela combinação de iniciadores AFLP PST I – GAG e MSE I - GAG utilizada em 12 indivíduos de <i>Carya illinoensis</i> (Nogueira pecã). Os fragmentos foram revelados por eletroforese em gel de poliacrilamida em sequenciador de DNA Li-Cor 4300 L® (Li-Cor Inc.), marcados e analisados por meio do SAGA <sup>GT</sup> Software®. ....	78
Figura 18: Relação genética de 12 indivíduos de <i>Carya illinoensis</i> (Nogueira pecã) obtida pela Análise de Componentes Principais no Software PAST 3.04. Demonstrando a variabilidade existente nos dados de marcadores AFLP. ....	81



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contaminação bacteriana (%) e formação de calos (%) em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS, em função das concentrações de Thidiazuron, independentemente das concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. ....	36
Tabela 2: Contaminação bacteriana (%) em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), em função da interação entre as concentrações de sacarose adicionadas ao meio nutritivo MS e os períodos de cultivo <i>in vitro</i> .....	41
Tabela 3: Contaminação fúngica (%) e formação de calos (%) em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em função das concentrações de Thidiazuron adicionadas ao meio nutritivo MS, independentemente das concentrações de sacarose.....	46
Tabela 4: Informação do município de coleta das folhas de <i>Carya illinoensis</i> (Nogueira pecã), a identificação da amostra e o nome da provável cultivar, quando conhecido. n.c – não conhecida; f – proveniente de semente, não monitorada. ....	69
Tabela 5: Média, moda e mediana da concentração ( $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ ) de DNA das amostras de <i>Carya illinoensis</i> (Nogueira pecã), após o isolamento pelos protocolos A e B. ....	75
Tabela 6: Matriz de similaridade obtida pelo <i>Software</i> PAST 3.04, calculada baseada em estatísticas de similaridade de Jaccard, das soluções amplificadas pela técnica de marcadores AFLP em 12 indivíduos de <i>Carya illinoensis</i> (Nogueira pecã).....	80

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 CAPÍTULO I</b> .....	15
<b>EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM <i>Eugenia involucrata</i> DE CANDOLE</b> .....	15
2.1 RESUMO.....	15
2.2 ABSTRACT .....	16
2.3 OBJETIVO GERAL .....	17
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
2.5 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
<b>2.5.1 Conservação da diversidade genética de espécies nativas</b> .....	17
<b>2.5.2 Importância econômica de espécies frutíferas nativas do sul do Brasil</b> ...	20
<b>2.5.3 Descrição da espécie <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	21
<b>2.5.4 Cultura de tecidos</b> .....	24
<b>2.5.5 Micropropagação</b> .....	25
<b>2.5.6 Embriogênese somática</b> .....	27
2.6 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
<b>2.6.1 Efeito de diferentes concentrações e combinações de TDZ e 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	30
<b>2.6.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	31
<b>2.6.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	32
<b>2.6.4 Efeito de diferentes concentrações e combinações de sacarose e TDZ sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	32
<b>2.6.5 Avaliação do sistema de cultivo de duas etapas na indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	33
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	34
2.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
<b>2.8.1 Efeito de diferentes concentrações e combinações de TDZ e 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	34
<b>2.8.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	38
<b>2.8.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	40
<b>2.8.4 Efeito de diferentes concentrações e combinações de sacarose e TDZ sobre a indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	45

<b>2.8.5 Avaliação do sistema de cultivo de duas etapas na indução da calogênese em discos foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	51
<b>2.9 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>3 CAPÍTULO II</b> .....	56
<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE INDIVÍDUOS DE <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch</b> .....	56
<b>3.1 RESUMO</b> .....	56
<b>3.2 ABSTRACT</b> .....	57
<b>3.3 OBJETIVO GERAL</b> .....	58
<b>3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	58
<b>3.5 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	58
<b>3.5.1 Isolamento do DNA</b> .....	58
<b>3.5.2 Marcadores moleculares</b> .....	60
<b>3.5.3 Descrição da espécie <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch</b> .....	64
<b>3.6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	68
<b>3.6.1 Material vegetal</b> .....	68
<b>3.6.2 Isolamento do DNA genômico</b> .....	69
<b>3.6.3 Avaliações das soluções de DNA genômico</b> .....	71
<b>3.6.4 Restrição e amplificação do DNA pela técnica de marcadores AFLP</b> .....	72
<b>3.6.5 Análises dos dados moleculares</b> .....	73
<b>3.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>3.8 CONCLUSÃO</b> .....	82
<b>4 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a demanda por conhecimento e conservação dos recursos florestais brasileiros, bem como o interesse em atividades que visam a preservação do ambiente são crescentes. Essa preservação vem ocorrendo por meio de projetos de recuperação de áreas degradadas, conscientização da população quanto ao uso das florestas e diminuição da exploração não sustentável de florestas nativas.

Nos âmbitos econômico e social, o conhecimento, a conservação e o uso sustentável das espécies florestais nativas são de grande importância, pois, cada vez mais se nota a fragmentação florestal e, em decorrência disso, uma eventual perda de fluxo gênico que pode ocasionar uma indesejável diferenciação genética das populações florestais nativas brasileiras, já que, o isolamento de populações por atividades naturais e/ou antrópicas, pode ocasionar um aumento da endogamia, ou seja, aumentar os cruzamentos entre indivíduos aparentados, e conseqüentemente pode resultar na redução da capacidade de evolução e de adaptação das espécies, entre outras causas que são desfavoráveis tanto para a economia quanto para as comunidades tradicionais que realizam extrativismo. Na economia brasileira, em particular, as espécies florestais apresentam um papel de grande relevância, gerando empregos direta e indiretamente, e mesmo em épocas de crise têm participação crescente no Produto Interno Bruto do país. Porém, muitas vezes, essa representatividade está voltada para grandes empresas e grandes produtores, que utilizam espécies exóticas, na maioria das vezes para gerar produtos madeireiros, enquanto as espécies nativas não são incluídas em sistemas produtivos, o que faz com que seu potencial não seja explorado e, também, não seja conservado.

Adicionalmente, deve-se considerar que a fruticultura, uma atividade econômica de grande destaque na agricultura brasileira, favorece muitos pequenos produtores, e vem sendo utilizada como uma alternativa de renda. Nesse sentido, foram estudadas, no presente trabalho, duas espécies florestais com potencialidade de uso não madeireiro, uma exótica, a *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch (Nogueira pecã) e uma nativa do bioma Mata Atlântica, a *Eugenia involucrata* De Candolle (Cerejeira-do mato), as quais são carentes em conhecimentos científicos e tecnológicos.

A *Carya illinoensis*, embora seja muito comercializada por seus frutos apresentarem elevados valores nutricionais, é carente de informações genéticas. Há

muitos materiais, mas não se sabe se eles são realmente diferentes, em decorrência da falta de controle de polinização e de coleta de propágulos nos plantios, uma vez que sua propagação é efetuada principalmente por enxertia. Nesse sentido, a caracterização molecular a partir de marcadores de DNA pode solucionar este problema, diferenciando cultivares e acessos, e propiciando, simultaneamente, as bases para o planejamento de um eventual programa de melhoramento genético. Além disso, contribuiria, também para a melhoria do sistema de manejo dos pomares, com repercussão direta na produtividade, haja vista a necessidade do emprego de materiais genéticos diferentes em decorrência da existência de autoincompatibilidade na espécie.

Igualmente, em *Eugenia involucrata*, a falta de conhecimentos, aliada à dificuldade de produção de mudas de origem seminal em virtude da recalcitrância das sementes, também comprometem a sua utilização em projetos de recuperação de áreas degradadas ou, ainda, em áreas de reserva legal ou de preservação permanente, com potencialidade de se tornar uma fonte de renda extra para os pequenos produtores a partir da fabricação de diversos produtos não madeireiros, a partir de seus frutos, além do consumo *in natura*. Assim, o cultivo *in vitro*, em particular via indução da embriogênese somática indireta, desponta como alternativa para solucionar os problemas de produção de mudas, pois tem potencialidade para multiplicar clones de matrizes selecionadas, ou, ainda, para conservar a variabilidade genética da espécie, aumentando o conhecimento científico a seu respeito e diminuindo o uso de espécies exóticas que são ou poderão se tornar invasoras.

Assim, o presente trabalho foi realizado dentro do escopo da biotecnologia aplicada às espécies florestais, seguindo duas frentes: a cultura de tecidos e o uso de marcadores moleculares. Tem por finalidade contribuir para a conservação pelo uso, bem como para o melhoramento genético dessas duas espécies frutíferas de importância econômica e social para o Rio Grande do Sul. Em *Eugenia involucrata* objetivou-se estabelecer um método eficiente de indução à calogênese, a partir de explantes foliares, visando à embriogênese somática indireta, e, simultaneamente, o aperfeiçoamento de técnicas de cultivo *in vitro* dessa espécie. Já, em *Carya illinoensis*, consistiu em avaliar a diversidade genética existente entre acessos coletados em dois municípios gaúchos, por meio da análise de marcadores de DNA

baseados em polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (marcadores AFLP).

O trabalho está dividido em dois capítulos, que estão organizados de acordo com os objetivos, e as espécies em estudo, em que:

- no capítulo I, estão apresentados os experimentos relacionados à indução da calogênese *in vitro* em *Eugenia involucrata*;
- no capítulo II, àqueles de isolamento, restrição por enzimas e amplificação do DNA e avaliação da diversidade genética entre indivíduos de *Carya illinoensis*.

## 2 CAPÍTULO I

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM *Eugenia involucrata* DE CANDOLE

#### 2.1 RESUMO

Em decorrência do aumento nas alterações dos ecossistemas florestais, por ação natural ou antrópica, tem havido uma demanda por conhecimento e conservação de recursos genéticos florestais do Brasil, haja vista que é de grande interesse social e econômico a preservação do ambiente. A *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) por ser uma espécie frutífera florestal, nativa do Brasil, que vem sendo utilizada em projetos de recuperação de áreas degradadas, em áreas de reserva legal e de preservação permanente, pode servir, também, como uma alternativa de renda para a agricultura familiar, por meio da utilização de seus produtos não madeireiros. Entretanto, além dessa espécie possuir sementes recalcitrantes, que perdem a viabilidade com rapidez, há carência de informações científicas e tecnológicas que subsidiem a sua utilização sustentável. Em virtude disso, o presente trabalho objetivou selecionar métodos eficientes de indução à calogênese a partir de explantes foliares, visando à embriogênese somática indireta, e, simultaneamente, o aperfeiçoamento de técnicas de cultivo *in vitro* dessa espécie. No que diz respeito à calogênese *in vitro*, foram avaliadas e selecionadas, sobre a oxidação fenólica, a contaminação microbiana e a indução de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata*: as combinações de concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e Thidiazuron (TDZ), bem como foi avaliado o potencial embriogênico, por meio de teste histoquímico, dos calos formados; as concentrações de sacarose; as combinações de concentrações de sacarose e TDZ; e, ainda, a diminuição de concentrações de sacarose e dos fitorreguladores 2,4-D e TDZ. Todos adicionados ao meio nutritivo MS. Como principais resultados destacam-se: a oxidação fenólica foi maior na presença do 2,4-D, e a combinação de 2,4-D e TDZ não foi significativa na formação de calos, somente a citocinina, entretanto a presença da auxina no meio nutritivo é essencial para a calogênese. Igualmente, os calos apresentaram potencial embriogênico com aspecto friável e estruturas nodulares; o TDZ influenciou a contaminação microbiana, já que na sua presença há menor incidência de colônias bacterianas e micélios fúngicos. A sacarose e o TDZ, quando empregados isoladamente, influenciaram a formação e a qualidade dos calos, entretanto, a interação entre eles não foi significativa. A diminuição da sacarose e dos fitorreguladores 2,4-D e TDZ não afetaram as variáveis testadas. As melhores combinações de 2,4-D e TDZ para a calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* são 5 e 5  $\mu\text{M}$  ou 5 e 10  $\mu\text{M}$  respectivamente. A concentração de TDZ mais indicada é de 5  $\mu\text{M}$ , por ser a concentração em que os calos têm a qualidade incrementada, e, simultaneamente, contribui para a redução de custos. As concentrações de sacarose mais eficientes para a calogênese são 30 ou 90  $\text{gL}^{-1}$ , sendo que na maior, a qualidade dos calos é superior. É possível a formação calogênica em discos foliares de *Eugenia involucrata* visando à embriogênese somática indireta.

Palavras-chave: Cerejeira-do-mato, calogênese, cultura de tecidos.

## 2.2 ABSTRACT

Due to a raise in forest ecosystem alterations, either by anthropic or natural action, there has been a need for knowledge and conservation of Brazilian forest genetic resources, since environment preservation has a great social and economical interest. *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), a Brazilian forest fruit species which has been used in projects for the recovery of degraded areas and legal and permanent reservation areas can as well be an alternative income for family agriculture, through the use of its non-timber products. However, besides this species having recalcitrant seeds, which lose viability fast, there is a lack of scientific and technological information that subsidize its sustainable use. Because of this, the present paper aimed at selecting efficient methods of calogenesis induction from leaf explants, addressing indirect somatic embryogenesis and, simultaneously, the improvement of this species *in vitro* cultivation techniques. In regard to calogenesis *in vitro*, microbial contamination and callus induction on leaf discs of *Eugenia involucrata* were assessed and selected, about phenolic oxidation: the combinations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Thidiazuron (TDZ) concentrations, the same way, the embryogenic potential of the calluses formed was assessed, through a histochemical test; sucrose concentrations; the combinations of sucrose and TDZ concentrations; and, also, the reduction of sucrose and 2,4-D and TDZ phytohormones concentrations. All of them added to MS nutrient medium. As main results, the following stand out: the phenolic oxidation was higher in the presence of 2,4-D, and the combination of 2,4-D and TDZ was not significant in callus formation, only cytokinin, however the presence of auxin in the nutrient medium is essential for calogenesis. The same way, the calluses presented embryogenic potential with a friable aspect and nodular structures; TDZ has influenced the microbial contamination, once in its presence there is a smaller occurrence of bacterial colonies and fungal mycelia. Sucrose and TDZ, when applied in isolation, influenced the formation and quality of the calluses, however, the interaction between them was not significant. The decrease of sucrose and phytohormones 2,4-D and TDZ did not affect the tested variables. The best combinations of 2,4-D and TDZ for calogenesis on leaf discs of *Eugenia involucrata* are 5 and 5  $\mu\text{M}$  and 5 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively. The most indicated concentration of TDZ is 5  $\mu\text{M}$ , for it being the concentration with which the calluses have an improved quality and, simultaneously, contributes for cost reduction. The most efficient sucrose concentrations for calogenesis are 30 or 90  $\text{g L}^{-1}$ , being that the calluses quality is superior in the bigger one. The calogenic formation on leaf discs of *Eugenia involucrata* aiming at an indirect somatic embryogenesis is possible.

Key-words: "Cerejeira-do-mato", calogenesis, tissue culture.



## 2.3 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo avaliar e selecionar metodologias eficientes de indução à calogênese visando à embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC., com a finalidade de aperfeiçoar técnicas de cultivo *in vitro* da espécie.

## 2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e identificar as combinações e concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético e Thidiazuron mais eficientes à formação calogênica em explantes foliares de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar o potencial embriogênico dos calos formados por meio de coloração histoquímica.
- Avaliar a influência de concentrações de sacarose sobre a formação calogênica em explantes foliares de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar o efeito das diferentes concentrações e combinações de sacarose e Thidiazuron sobre a formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar a influência da diminuição de sacarose e dos fitorreguladores ácido 2,4-diclorofenoxiacético e Thidiazuron na formação calogênica em explantes foliares de *Eugenia involucrata*.

## 2.5 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.5.1 Conservação da diversidade genética de espécies nativas

Os ecossistemas naturais vêm sofrendo alterações ao longo do tempo, as quais possuem causas diversas, naturais e antrópicas, mas que se devem, principalmente, pelos processos de ocupação acelerada e desordenada em todo o território brasileiro, ocasionando desmatamento e o subsequente emprego da área e da madeira para distintas finalidades, simultaneamente ou não à introdução de espécies exóticas e superexploração das espécies existentes. Essas alterações

causam um distúrbio no equilíbrio dinâmico das florestas, e, recentemente, as mudanças que podem ser destacadas são as fragmentações florestais, ou seja, os remanescentes naturais são divididos em pedaços progressivamente menores, ficando isolados tanto por áreas agrícolas, industriais ou urbanas. Esse processo antrópico intensifica a modificação da paisagem, e, por consequência a composição e a diversidade genética de muitas espécies, bem como interfere na dispersão e colonização das espécies, não só vegetais como também animais (LONGHI et al., 2000; NASCIMENTO e LAURENCE, 2006; SARMENTO e VILLELA, 2010; SERROTE et al., 2016; VIANA e PINHEIRO, 1998; VIEIRA, et al., 2001).

Nesse contexto, o conhecimento da biodiversidade das espécies nativas e a sua conservação genética, têm importância crescente, tanto no âmbito econômico, geopolítico e social, além da questão ecológica relevante para a reprodução da vida e equilíbrio ambiental, estando, também, ligados ao técnico-científico, subsidiando a engenharia genética e a biotecnologia. Destaca-se, em decorrência do exposto, a importância de se pesquisar e incentivar a busca por um maior conhecimento sobre espécies nativas, seus usos e exigências, a fim de desenvolver programas para a conservação genética das espécies, e conservação da biodiversidade das florestas (ALBAGLI, 2003; BRACK et al., 2007; CARVALHO, L. et al., 2006; KUNZ et al., 2014; NARVAES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; PIRES et al., 2011; RAMALHO et al., 2012; SILVA et al., 2012; VIANA e PINHEIRO, 1998).

Considerada a necessidade de manter a variabilidade genética existente tanto entre como dentro de populações vegetais, são utilizados, basicamente, dois métodos de conservação: “in situ” e “ex situ. Na conservação “in situ” a espécie é mantida no seu habitat natural, garantindo assim conhecimento do padrão de distribuição, ecologia, entre outros, porém trazendo como desvantagem a suscetibilidade dos indivíduos a condições adversas, prejudiciais ao desenvolvimento e a própria conservação. Já na conservação “ex situ”, a espécie é mantida protegida em locais fora do seu habitat natural, como em laboratórios com o cultivo *in vitro*, jardins botânicos com exemplares a campo, e, ainda, por meio do armazenamento de sementes, porém este processo é dependente da viabilidade das sementes, devendo ser realizado de forma complementar à conservação “in situ” (CARVALHO, L. et al., 2006; GUERRA et al., 2008; PIRES et al. 2011; RAMALHO et al., 2012; SARMENTO e VILLELA, 2010; SARMENTO et al., 2012).

O Brasil, detentor de grande reserva de biodiversidade, possui uma diversidade biológica muito grande, mesmo havendo grandes perdas pelo desmatamento, e, nos últimos tempos, vem progredindo em seu programa de conservação, embora ainda muitas espécies nativas com grande potencial não estejam sendo pesquisadas e conservadas de maneira expressiva (ROSSI e SARTORETTO, 2014; SIQUEIRA et al., 2013).

No estado do Rio Grande do Sul, em particular, ocorrem dois biomas, Mata Atlântica e Pampa, ambos com biodiversidade típica. O bioma Mata Atlântica possui importância expressiva, por ser o segundo maior ecossistema do mundo em biodiversidade, todavia é considerado um dos mais ameaçados do planeta, devido ao processo acelerado de devastação, o que pode acarretar na eliminação de algumas espécies. Inobstante, contém as formações florestais menos conhecidas e estudadas (PINTO, 2002; SCIPIONI et al., 2011). Uma das vegetações que predominam na Mata Atlântica é a Floresta Estacional Decidual, abrangendo grandes altitudes e baixas temperaturas, ocorrendo na porção noroeste e central do Rio Grande do Sul. Já o bioma Pampa, é caracterizado principalmente pelo predomínio de campos nativos, com gramíneas e vegetação rasteira, entretanto há a presença de matas de galeria, butiazais, banhados, capões de mata e formações arbustivas. Constitui assim como a Mata Atlântica um patrimônio natural, genético e cultural, com importância global, e, também vem sendo ameaçado pela degradação acelerada, com a implantação de pastagens e monocultura com espécies exóticas, o que está descaracterizando as paisagens naturais do Bioma (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017; PINTO, 2002).

No município de Santa Maria, onde o presente estudo foi realizado, os dois tipos de formações vegetais que ocorrem basicamente são a floresta estacional decidual e os campos limpos, havendo uma descaracterização na estrutura natural na região, pois grande parte dos remanescentes florestais encontram-se na forma de fragmentos devido ao desenvolvimento urbano e à alteração antrópica que vem sofrendo (FARIAS et al., 1994; LONGHI et al., 2000). Em consequência dessa pressão antrópica sobre os ecossistemas naturais, os processos evolutivos são afetados, e como sua manutenção é de suma importância para a conservação da diversidade genética, a permanência, sobrevivência e reprodução das populações e espécies nas condições atuais (SERROTE et al., 2016) são igualmente ameaçadas.

### 2.5.2 Importância econômica de espécies frutíferas nativas do sul do Brasil

Além da conservação genética das espécies vegetais nativas, também cabe salientar a crescente demanda pelo incremento de estudos sobre estas espécies, que possuem potencial econômico, porém apresentam dificuldades na produção de mudas, em decorrência de seu sistema reprodutivo complexo, e, muitas vezes, problemático no que diz respeito à produção de sementes. Em decorrência disso, muitas vezes essas espécies são tratadas como inapropriadas para plantios em escala comercial, pela falta de estudos e de conhecimento, principalmente na área do melhoramento vegetal, comparadas com espécies que vem sendo estudadas e utilizadas há muito tempo. Adicionalmente, deve-se considerar que, em alguns casos, as espécies nativas não despertam interesse por seus produtos madeireiros, mas, sim, por seus extrativos, alimentos, óleos, entre outros (PIRES et al., 2011). Dentre essas espécies, estão incluídas frutíferas que apresentam um grande potencial econômico e social, especialmente para a agricultura, mas, também, para as áreas medicinal e cosmética, que estão em constante crescimento, e nas quais, cada vez mais, há preocupações relacionadas à conservação e proteção ambiental (SARMENTO e VILLELA, 2010; SARMENTO et al., 2012).

As frutas nativas do Brasil têm grande potencial econômico, sendo que, além de permitirem o consumo *in natura*, podem ser exploradas pela agroindústria, para a fabricação de sucos, geleias, doces, licores, etc. Também na indústria farmacêutica há crescente interesse para uso na confecção de medicamentos e cosméticos, devido às propriedades nutricionais, antioxidantes, presença de óleos essenciais extraídos das folhas e outras partes da planta. Adicionalmente, muitas têm características que as tornam adequadas para uso na arborização urbana, bem como em recuperação de áreas degradadas (BRACK et al., 2007; SANTOS et al., 2004; VIEIRA, R. et al., 2006).

No contexto sócio-econômico do país, a fruticultura pode apresentar fortes impactos, como a manutenção do homem no meio rural, proporcionando um grande rendimento por área, sendo muito importante para a agricultura familiar, em especial, pelo desenvolvimento de agroindústrias, entre outros. Entretanto, se fazem necessários incentivos e o estabelecimento de parcerias com setores públicos e privados, tanto na produção como na comercialização (CLEMENT, 2006; FACHINELLO et al., 2008).

O Sul do Brasil é reconhecido como centro de origem e diversidade de espécies frutíferas nativas (HOSSEL et al., 2014; SARMENTO et al., 2012), sendo que, dentre muitas dessas, àquelas da família *Myrtaceae* (NODARI et al., 2008) se destacam, por contemplar cerca de 102 gêneros e 3024 espécies conhecidas (CLEMENT, 2006). O gênero *Eugenia* é um dos que se sobressaem em relação à importância econômica e a *Eugenia uniflora* (Pitangueira), em especial, vem recebendo muita atenção no que diz respeito à pesquisa e domesticação, enquanto a *Eugenia involucrata*, sua congênere, continua praticamente inexplorada (BRACK et al., 2007; DANNER et al., 2010; DEGENHARDT et al., 2007).

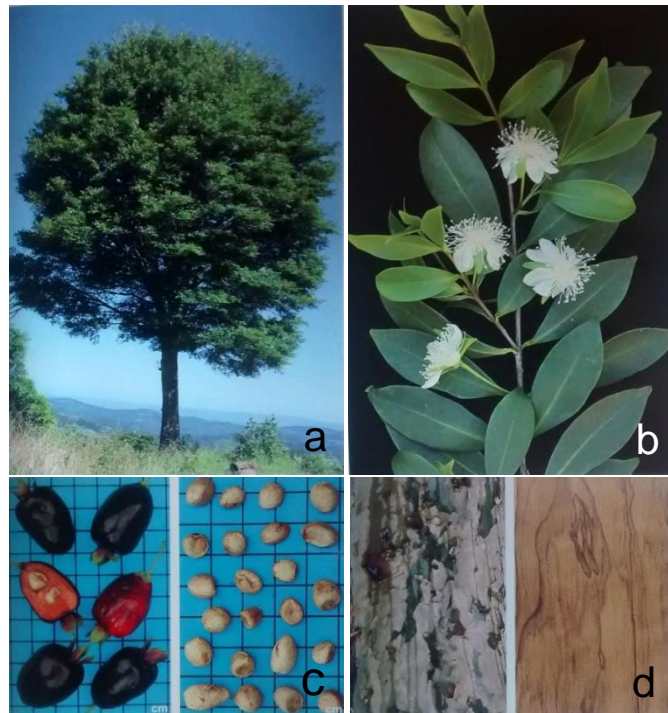
Devido a isto os programas de melhoramento genético são indispensáveis e ainda tem muito que explorar destas espécies, tanto na diversidade genética, como em métodos de propagação vegetativa (DIAS et al., 2012; GOLLE et al., 2009), que podem contribuir para a sua inserção produtiva, pois, apesar do potencial econômico existente, a maioria dos pomares são implementados por meio de mudas de origem seminal, o que causa uma alta heterogeneidade entre as plantas, uma qualidade inferior dos frutos, além da baixa produtividade. Haja vista que para a finalidade de plantios comerciais, que visam à produtividade, a homogeneidade entre as plantas é desejada. Em consequência do exposto, a propagação vegetativa pode propiciar a melhoria, a fixação de genótipos importantes e de interesse, em especial de *Eugenia involucrata*, na cadeia produtiva de frutas, e assim, se explorada adequadamente, pode vir a tornar-se fonte de renda alternativa, para agricultores familiares, agroindústrias, incorporação em modelos agroflorestais, entre outros (DEGENHARDT et al., 2007; LATTUADA et al., 2010).

### **2.5.3 Descrição da espécie *Eugenia involucrata* DC.**

Pertencente à família *Myrtaceae* é uma espécie frutífera, conhecida popularmente como Cerejeira-do-mato, cereja-preta, cerejeira-do-rio-grande, cerejeira-da-terra (CAMARGOS et al., 1996; LORENZI, 2014). Apresenta vários sinônimos botânicos, como: *Phyllocalyx involucratus* (DC.) O. Berg., *Phyllocalyx laevigatus* O. Berg., *Eugenia paraguayensis* Barb. Rodr. (LORENZI, 2014), *Eugenia laevigata* (O. Berg.) Legr. e *Stenocalyx involucratus* (DC.) Kausel (CORADIN et al., 2011).

De acordo com suas características morfológicas é considerada de médio porte medindo em torno de 5 a 8 metros, mas podendo atingir de 10 a 15 m na mata nativa. Possui copa longa, estreita e arredondada, com ramificações ascendentes, e com ramos resistentes, normalmente apresentando folhagem densa de coloração verde escura brilhante. Suas folhas, quando jovens apresentam um aspecto membranáceo e coriáceo quando adultas; são simples, de filotaxia oposta, glabras, variando de oval-oblongas a oblongas-lanceoladas, com nervuras salientes e ápice obtuso. O tronco é retilíneo, mais ou menos cilíndrico de 30 a 40 cm de diâmetro a altura do peito (DAP), com fuste de aproximadamente 7 m, revestido por uma casca parda, lisa e com deiscência em placas ao longo do seu crescimento em diâmetro, a qual, conforme a idade altera sua coloração, passando de esverdeado até o castanho acinzentado. As flores têm coloração branca, longo-pedunculadas, axilares e solitárias, pentâmeras e muito estaminadas. Seus frutos são caracterizados como drupas piriformes, coroados pelo cálice persistente, com polpa carnosa e adocicada, comestível, de coloração vinho ou negro-vinácea quando maduros. Apresenta sementes de coloração cinéreo-amarelada de formato irregular, e há, geralmente, 1 a 3 sementes por fruto (Figura 1) (BACKES e IRGANG, 2002; BRANDÃO et al., 2002; CARVALHO, P., 2008; CARVALHO, P., 2009; CORADIN et al., 2011; LONGHI, 1995; LORENZI, 2014).

Figura 1: Aspectos silviculturais de *Eugenia involucrata* DC., em: **(a)** árvore matriz; **(b)** folhas e flores; **(c)** frutos e sementes; e **(d)** casca e madeira.



Fonte: Lorenzi (2014).

*Eugenia involucrata* ocorre, naturalmente, na Argentina, Paraguai, Uruguai e, no Brasil, desde o estado de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (CARVALHO, P., 2009; CORADIN et al., 2011; LONGHI, 1995; LORENZI, 2014), sendo frequentemente encontradas em florestas semidecíduas de altitude (BRANDÃO et al., 2002; LORENZI, 2014), crescendo nos sub-bosques mais desenvolvidos dos pinhais, com solos úmidos e não muito acidentados (CORADIN et al., 2011). Quanto à ecologia, é planta decídua, heliófita, seletiva higrófito, com baixíssima frequência em formações secundárias (LORENZI, 2014) e não muito frequente em matas primárias (CORADIN et al., 2011).

No grande mercado de papel e celulose, a madeira de *Eugenia involucrata* não tem utilidade, porém é empregada para geração de energia, na fabricação de lenha e carvão de excelente qualidade, e, ainda, para a fabricação de cabos de ferramentas agrícolas em geral (BACKES e IRGANG, 2002; CORADIN et al., 2011; LORENZI, 2014), haja vista sua madeira ser moderadamente pesada, compacta, com características elásticas, muito resistente e de boa durabilidade natural (LORENZI, 2014). A utilidade da espécie como planta viva é grande no paisagismo,

na arborização urbana, por ser uma espécie extremamente ornamental (BARBEDO et al., 1998; DELGADO e BARBEDO, 2007; FRANZON e RASEIRA, 2006). Além disso, seu emprego também é recomendado em projetos de recuperação de áreas degradadas (RAD) e em áreas de preservação permanente (APP), pois, é uma espécie muito apreciada pela avifauna, com seus frutos comestíveis e saborosos, e ser uma espécie melífera. Igualmente, esses motivos justificam o seu uso na fabricação de doces, geleias e licores, e na produção de mel, além de diversos estudos que comprovam sua utilização na área medicinal. (BACKES e IRGANG, 2002; BARBEDO et al., 1998; BRANDÃO et al., 2002; LORENZI, 2014).

Como a maioria das espécies nativas, a espécie possui crescimento lento, baixo índice germinativo das sementes, que apresentam germinação hipógea, iniciando-se 30-40 dias depois da sementeira, e cujas sementes tendem a perder o poder germinativo em 15 dias (LONGHI, 1995). Adicionalmente, suas sementes são recalcitrantes, ou seja, aquelas que morrem, quando dessecadas abaixo de níveis críticos específicos de umidade, o que torna seu armazenamento complicado (CARVALHO, P., 2009; TONETTO et al., 2013). Nesse sentido, alguns estudos realizados em relação à secagem e armazenamento de suas sementes, mostraram que as sementes de *Eugenia involucrata* são sensíveis à redução abaixo de 45% no teor de água (DELGADO e BARBEDO, 2007). Com um teor de água das sementes de 53% e armazenamento em câmara fria e embalagens plásticas, os diásporos podem ser conservados por até 180 dias (MALUF et al., 2003).

Face ao exposto, como alternativa à produção de mudas pela via sexual, a propagação assexuada por estaquia foi considerada viável para a espécie, sendo obtidas médias de enraizamento em torno de 25-27% a partir do emprego de reguladores vegetais e de cerca de 21% em sua ausência (CARVALHO, P., 2009). A responsividade da espécie na cultura de tecidos, após a avaliação de técnicas de micropropagação ou de indução à calogênese, já foi realizada em nosso Grupo de Pesquisa e está registrada em alguns trabalhos acadêmicos e científicos (GOLLE, 2010; GOLLE et al., 2012; 2013; GOLLE e REINIGER, 2013; STEFANEL, 2016).

#### **2.5.4 Cultura de tecidos**

A cultura de tecidos ou cultivo *in vitro*, bem como sua aplicação prática são de extrema importância para o avanço do conhecimento em áreas como fisiologia,



genética de plantas e bioquímica. É uma das áreas biotecnológicas, e que compreende um conjunto de técnicas que permitem a propagação *in vitro* de plantas através do isolamento e cultivo de células e tecidos ou órgãos, em um meio nutritivo artificial, que tem como função o fornecimento das substâncias necessárias para o crescimento, ou guiar um padrão de desenvolvimento *in vitro* (BUENO et al., 2006; PIRES et al., 2011). A cultura de tecidos tem como princípio básico a aplicação da totipotência celular, ou seja, a capacidade que as células somáticas têm para originar um indivíduo geneticamente idêntico àquele do qual foram isoladas, por meio de multiplicações mitóticas sucessivas (BUENO et al., 2006; HOFFMANN et al., 2005; RAMALHO et al., 1990; RAMALHO et al., 2012).

No setor florestal, a cultura de tecidos vem atraindo cada vez mais interesse, em decorrência da potencialidade da aplicação de suas técnicas no melhoramento genético, principalmente no que tange à conservação de germoplasma, limpeza viral, micropropagação, obtenção de material genético homozigoto em curto prazo, entre outros (BUENO et al., 2006; PIRES et al., 2011; RAMALHO et al., 2012).

### **2.5.5 Micropropagação**

A micropropagação é uma técnica que possibilita propagar vegetativamente ou clonar genótipos de interesse, de grande utilidade, em especial, para espécies de difícil propagação pela via sexuada. A técnica utiliza o cultivo de partes de plantas, denominado “explantos”, em ambiente livre de contaminantes, com temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controladas e em local apropriado, podendo ser utilizados segmentos nodais ou apicais, folhas, embriões zigóticos, entre outras partes da planta (BUENO et al., 2006; MANTOVANI et al., 2008; PIRES et al., 2011).

Uma das vantagens da micropropagação é a possibilidade de produzir mudas de excelente qualidade sanitária, o ano inteiro, em período de tempo e área reduzidos, e com características genéticas selecionadas. Bueno et al. (2006) afirmaram que a micropropagação é indicada para frutíferas que se propagam por enxertia e também para plantas ornamentais. Da mesma maneira, Abreu e Pedrotti (2003) e Ramalho et al. (1990) consideraram o cultivo *in vitro* como uma das melhores soluções para a propagação de espécies frutíferas, pois resulta em plantas com melhor qualidade sanitária, livre de vírus e outros patógenos. Contudo, deve ser considerado que há dificuldades na obtenção de culturas assépticas, ocorrendo

frequentes associações com micro-organismos endofíticos de difícil controle, bem como oxidação fenólica dos explantes (SCHUCH e ERIG, 2005) que podem comprometer a continuidade dos cultivos e ocasionar prejuízos na multiplicação. Igualmente, deve ser mencionado que há limitações em relação ao seu emprego em nível comercial, pois além de dificuldades técnicas podem ocorrer variações somaclonais, o que pode encarecer sobremaneira os custos de produção das mudas (MANTOVANI et al., 2008; SCHUCH e ERIG, 2005).

Nesse sentido, a pesquisa inicial de micropropagação de uma espécie deve incluir o tipo de explante e a seleção das plantas doadoras de explantes a serem utilizadas. O explante a ser utilizado deve ser escolhido de acordo com a proposta de estudo, porém, geralmente, deve-se dar a preferência àqueles que possuam maior capacidade regenerativa *in vitro*, ou seja, que possuam grandes proporções de tecidos meristemáticos. Quando se deseja a clonagem de plantas superiores, ou seja, a produção de mudas geneticamente iguais à planta doadora, são utilizados, preferencialmente, explantes contendo gemas apicais ou axilares, que possuem um número maior de células meristemáticas e são mais estáveis, já quando se tem a finalidade de se conduzir estratégias para o melhoramento genético, podem-se utilizar como explantes folhas e entrenós, que, após submetidos à aplicação dos tratamentos adequados sofrerão desdiferenciação, ou seja, formarão calos e, na sequência, órgãos ou embriões (via organogênese ou embriogênese indiretas). Essa preferência é decorrente do fato de que, em plantas regeneradas por meio de calos, a variabilidade é muito maior do que quando regeneradas a partir de gemas, o que fornece perspectivas para a identificação e seleção de características novas (MANTOVANI et al., 2008; RAMALHO et al., 1990).

Na micropropagação de *Eugenia involucrata*, segmentos nodais foram considerados mais promissores que segmentos apicais (GOLLE et al., 2012), sendo possível conseguir cultivos assépticos e um elevado percentual de estabelecimento *in vitro* quando esses explantes são provenientes de ramos herbáceos, para o que se faz necessário que haja podas e tratamentos sanitários e fisiológicos nas plantas doadoras (GOLLE et al., 2013).

Outro aspecto a ser pesquisado está relacionado à composição dos meios nutritivos a serem utilizados, os quais, normalmente, são suplementados com nutrientes, vitaminas, carboidratos, podendo, também, serem adicionados reguladores de crescimento, fungicidas e antibióticos para o controle de

contaminantes, antioxidantes, entre outros, dependendo das exigências das espécies, e do estudo previsto. Os meios nutritivos básicos mais utilizados são o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado também com compostos inorgânicos, sendo o mais utilizado nas espécies vegetais, e, ainda, o meio 'Woody Plant Medium' (WPM) desenvolvido especificamente para espécies lenhosas (LLOYD e MCCOWN, 1981). Igualmente, as combinações e as concentrações dos fitorreguladores utilizados interferem no desenvolvimento da cultura, sendo de maneira geral, as citocininas, auxinas e giberelinas as classes de reguladores mais utilizadas, variando de acordo com o tipo de explante, capacidade e a fase de desenvolvimento da espécie *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Na micropropagação de *Eugenia involucrata*, os meios nutritivos MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$  MS) e WPM foram considerados apropriados para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais, recomendando-se o meio  $\frac{1}{2}$  MS pela economia e praticidade. Já para segmentos apicais, o uso do meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS foi mais adequado que o dos meios MS e WPM (GOLLE et al., 2012).

### 2.5.6 Embriogênese somática

Um exemplo substancial da totipotência celular é a embriogênese somática, processo em que as células somáticas se desenvolvem regenerando uma planta completa a partir de uma única célula, salvo em alguns explantes, que o embrião somático é formado pela diferenciação de um grupo de células embriogênicas. O desenvolvimento da embriogênese *in vitro*, segue estágios característicos ao dos embriões obtidos pela fusão de gametas (embriões zigóticos), a saber: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (BARROS, 1999; GUERRA et al., 1999; PERES, 2002; ZIMMERMANN, 2010).

Os embriões somáticos diferenciam-se dos embriões zigóticos pelo fato de seu desenvolvimento ser livre de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, possuem sistema vascular fechado, embora que igualmente ao embrião zigótico possua diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (PERES, 2002; ZIMMERMANN, 2010), e ainda não possuem endosperma, o que pode ocasionar desenvolvimento anormal (GUERRA et al., 1999).

Quando os embriões são originados de tecidos-matrizes, ou seja, explantes com competência embriogênicas, sem passar pelo estágio de calo, ocorre a

embriogênese somática direta, e, quando passa pelo estágio de calo, tem lugar a embriogênese somática indireta. Para a regeneração de plantas utilizam-se combinações ou concentrações de alguns componentes, como as auxinas, citocininas, entre outros (CID, 2005). Quando há uma concentração de auxina maior ou favorável ao explante, tem-se a formação de raízes, já quando há uma concentração de citocinina maior ou favorável ao explante, formam-se gemas caulinares, contudo quando há uma combinação equilibrada de auxina e citocinina, tem-se a multiplicação das células e, por consequência, a formação e o crescimento de calos (PERES, 2002 apud SKOOG e MILLER, 1957).

Os calos são grupos de células desordenadas, em divisão celular, são considerados um tecido indiferenciado, ou pouco diferenciado, com baixa determinação e elevada competência, quando estimulado para formar a estrutura desejada, raízes, embriões somáticos, gemas, e de acordo com o balanço hormonal aplicado. Quanto ao tipo, os principais tipos de calos são: nodulares, com aspecto heterogêneo e geralmente são putativos à embriogênese somática; friáveis, com estrutura tenra com alta atividade mitótica; rizogênicos, com tendência à formação de raízes; entre outros (GOLLE e REINIGER, 2013; PERES et al., 2002).

Dos reguladores que são indutores de calos, destacam-se pela maior utilização as auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) (ZIMMERMANN, 2010). O 2,4-D, quando utilizado em altas concentrações promove a hipermetilação, e, com isso, a divisão celular. Já em baixas concentrações causa a hipometilação, o que implica na diferenciação celular (alongamento, espessamento da parede celular, etc.) (COSTA, A. et al., 2015; HINOJOSA, 2005). Já as citocininas, que são fundamentais na multiplicação de gemas axilares ou apicais, muitas vezes são necessárias, também, para a formação de calos, em função de ajuste do balanço hormonal. No caso específico de indução de calogênese visando à embriogênese somática indireta, o Thidiazuron (TDZ) é o fitorregulador classificado como citocinina mais utilizado, que além de ser efetivo em promover multibrotações em gemas axilares de espécies lenhosas, também contribui para a estabilidade morfogênica do calo (CID, 2005).

Além das auxinas e citocininas mencionadas, a utilização de ácido abscísico (ABA) na embriogênese somática está relacionada ao controle da sequência na produção de embriões somáticos, bem como a sua estruturação e seu desenvolvimento, pois, em sua presença os embriões somáticos apresentam

desenvolvimento igual aos embriões zigóticos. Por outro lado, deve-se considerar que a ação do ABA pode ser inibitória ao crescimento de embriões, quando aplicado no meio, porém esta situação geralmente está associada a elevadas concentrações do regulador. Esta inibição que o ABA pode causar no embrião é semelhante àquela que ocorre naturalmente na semente, impedindo que ocorra germinação precoce, portanto, o regulador pode ser utilizado para se obter o armazenamento dos embriões para futuras germinações, pois, quando adicionado ao meio nutritivo uma determinada concentração de ABA, há a paralisação do embrião, mas que os mantêm viáveis, sendo que, após retirado, seu desenvolvimento prossegue (LEMOS, 2005; ZIMMERMANN, 2010).

Os calos visando à embriogênese somática indireta, assim como na micropropagação, podem ser obtidos através de diversos tipos de explantes, como, segmentos foliares, hipocótilos, ápices caulinares, raízes, discos foliares, entre outros (GUERRA et al., 1999). No caso de espécies florestais nativas, vários estudos têm relatado calogênese em explantes foliares, como por exemplo, em *Ilex paraguariensis* (Erva-mate) (STACHEVSKI et al., 2013), em *Caesalpinia echinata* (Pau-Brasil) (WERNER et al., 2010), e, em particular, em *Eugenia involucrata* (GOLLE e REINIGER, 2013). Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes formas de inoculação (posições abaxial, adaxial, com e sem cortes no limbo foliar) de explantes foliares de *Eugenia involucrata* no meio nutritivo MS acrescido de 10  $\mu\text{M}$  de ANA isolado ou em combinações com 2,4-D e BAP (a 5-5 ou a 5-10  $\mu\text{M}$ ). Foi observado que, além da posição dos explantes afetar a calogênese e a organogênese, sendo mais adequada a abaxial sem cortes na região do limbo, a associação dos reguladores de crescimento 2,4-D + BAP na concentração 5 e 10  $\mu\text{M}$  foi mais promissora para a obtenção de calos, especialmente os nodulares, putativos à embriogênese somática.

## 2.6 MATERIAL E MÉTODOS

Como doadores dos explantes para os experimentos foram utilizados espécimes de *Eugenia involucrata* cultivados em casa de vegetação com aproximadamente 9 anos de idade. Esses indivíduos receberam irrigações diárias, e, semanalmente, as plantas, além de pulverização até seu encharcamento total com solução à base de Orthocide500PM<sup>®</sup> (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-

dicarboximide) a  $1,5 \text{ gL}^{-1}$  e Sulfato de Estreptomicina a  $0,1 \text{ gL}^{-1}$ , 400 mL de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) a  $1,5 \text{ gL}^{-1}$ . Quinzenalmente, foram aplicados 400 mL de solução a  $1 \text{ gL}^{-1}$  de nitrogênio (ureia).

Foram utilizados, como explantes, discos foliares isolados de folhas jovens (de tamanho igual à de folhas completamente expandidas e não recentemente emitidas). Os discos foliares foram confeccionados com o auxílio de um cortador cilíndrico de aço inoxidável com 1,4 cm de diâmetro, os quais foram inoculados com a posição abaxial em contato com o meio nutritivo, sem cortes no limbo foliar, seguindo desta forma, resultados satisfatórios obtidos por Golle (2010).

Para realizar a assepsia dos explantes, as folhas coletadas foram imediatamente imersas em solução de água destilada contendo,  $1,5 \text{ gL}^{-1}$  do fungicida Orthocide500PM<sup>®</sup>,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  do antibiótico sulfato de estreptomicina, objetivando uma pré-desinfestação das folhas, juntamente com  $1 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico, para reduzir a ocorrência de oxidação fenólica dos explantes. Posteriormente em laboratório, foram submetidas à lavagem com água corrente e detergente comercial, em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram imersas em etanol a 70% (v/v) por 30 s, e, após enxague em água destilada e autoclavada, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% (v/v) com três gotas de detergente inseridas na solução para quebrar a tensão superficial, por 15 min, e, por fim, foram enxaguadas três vezes em água destilada e autoclavada seguindo a metodologia de Golle e Reiniger (2013). Igualmente, as folhas permaneceram em água destilada autoclavada acrescida de  $1 \text{ gL}^{-1}$  de ácido ascórbico até a confecção dos discos e a subsequente inoculação no meio nutritivo.

### **2.6.1 Efeito de diferentes concentrações e combinações de TDZ e 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 2x3, em que os níveis do fator "A" foram as concentrações de 2,4-D (ausência ou  $5 \text{ } \mu\text{M}$ ) adicionadas ao meio nutritivo, e os níveis do fator "B", as concentrações de TDZ (ausência, 5 ou  $10 \text{ } \mu\text{M}$ ), totalizando seis tratamentos com 10 repetições, cada uma constituída por uma placa de petri contendo três explantes. As placas de petri continham 25 mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de mio-inositol e  $7 \text{ gL}^{-1}$  de ágar.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar, e, após, foi efetuada a autoclavagem por 20 min a 121°C e 1,5 atm de pressão. As placas de petri foram vedadas com plástico filme de polivinilcloro (PVC) transparente, nas laterais, e foram mantidas na ausência de luz em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C.

Foram avaliadas: a oxidação fenólica (50% ou mais do explante com coloração marrom), a contaminação por fungos (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes) e bactérias (presença de colônias bacterianas junto aos explantes), além da formação de calos, todas expressas em porcentagem. Após concluídas as avaliações, uma amostra de calos formados foi submetida a um teste histoquímico sendo a metodologia de Durzan (1988) com azul de Evans (a 0,1%; p/v) e carmim acético (a 2%; p/v). À verificação do potencial embriogênico da massa de calos foi realizada da seguinte maneira: (1) uma pequena quantidade da massa calogênica foi retirada, macerada e adicionada três gotas de azul de Evans, e deixado descansar por 2 min; (2) o excesso foi retirado e então adicionada três gotas de Carmim acético pelo mesmo período de tempo; (3) após, a retirada do excesso do corante, parte do material foi transferido para uma lâmina, coberto pela lamínula; (4) e por fim, foram analisadas em uma lupa eletrônica Opticon® TIM-2T. São considerados calos putativos à embriogênese somática aqueles que reagem fortemente ao carmim acético, que adquirem uma coloração avermelhada.

### **2.6.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

Neste experimento realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo unifatorial, em que os tratamentos consistiram na adição de 2,4-D (ausência; 1; 2; 3; 4 ou 5 µM) ao meio nutritivo, combinadas com uma concentração fixa de TDZ a 5 µM, os quais foram codificados como T1; T2; T3; T4; T5 ou T6 respectivamente. Cada tratamento contou com 10 repetições, sendo cada uma composta por um frasco contendo três discos foliares. Os explantes foram inoculados em frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio MS acrescido de 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mgL<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 gL<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar, após o que foi efetuada a autoclavagem por 20 min a 121°C e 1,5 atm de pressão. Os frascos foram vedados

com papel alumínio e filme plástico transparente de PVC, sendo mantidos na ausência de luz em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .

Foram avaliadas a oxidação fenólica, a contaminação por fungos e bactérias, bem como a formação de calos, as quais foram expressas em porcentagem.

### **2.6.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial  $3\times 4$ , em que os níveis do fator "A" foram as concentrações de sacarose (30, 60 ou  $90\text{ gL}^{-1}$ ) adicionadas ao meio nutritivo, e os níveis do fator "B", o tempo de cultivo (30, 60, 90 ou 120 dias), com 10 repetições, sendo cada uma constituída por placa de petri contendo quatro explantes. As placas de petri continham 25 mL de meio MS acrescido de  $30\text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $100\text{ mgL}^{-1}$  de mio-inositol e  $7\text{ gL}^{-1}$  de ágar, e, também, suplementado com  $5\text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D e  $10\text{ }\mu\text{M}$  de TDZ. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar, após o que foi efetuada a autoclavagem por 20 min a  $121^\circ\text{C}$  e 1,5 atm de pressão. As placas de petri foram vedadas com plástico filme transparente de PVC, nas laterais, e foram mantidas na ausência de luz em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .

Foram avaliadas a oxidação fenólica, a contaminação por fungos e bactérias, bem como a formação de calos, todas expressas em porcentagem.

### **2.6.4 Efeito de diferentes concentrações e combinações de sacarose e TDZ sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial  $3\times 2$ , em que os níveis do fator "A" foram as concentrações de sacarose (30, 60 ou  $90\text{ gL}^{-1}$ ) adicionadas ao meio nutritivo, e os níveis do fator "B", as concentrações de TDZ (5 ou  $10\text{ }\mu\text{M}$ ), com 10 repetições, cada uma constituída por uma placa de petri contendo quatro explantes. As placas de petri continham 25 mL de meio MS acrescido de  $30\text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $100\text{ mgL}^{-1}$  de mio-inositol e  $7\text{ gL}^{-1}$  de ágar, e, também, suplementado com  $5\text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar, após foi efetuada a autoclavagem por 20 min a



121°C e 1,5 atm de pressão. As placas de petri foram vedadas com filme plástico transparente de PVC, nas laterais, e foram mantidas na ausência de luz em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C.

Foram avaliadas a oxidação fenólica, a contaminação por fungos e bactérias, bem como a formação de calos, expressas em porcentagem.

### **2.6.5 Avaliação do sistema de cultivo de duas etapas na indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

Inicialmente, foi realizada a inoculação de discos foliares de *Eugenia involucrata*, previamente desinfestados conforme descrito anteriormente, em frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo MS acrescido de 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mgL<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 gL<sup>-1</sup> de ágar, e, também, suplementado com 5 µM de 2,4-D e 10 µM de TDZ. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar, após o que foi efetuada a autoclavagem por 20 min a 121°C e 1,5 atm de pressão. Foram inoculados dois explantes por frasco, em um total de 33 frascos, vedados com papel alumínio e filme plástico transparente de PVC, e mantidos na ausência de luz em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C por 30 dias. Esse período constituiu a primeira etapa do sistema de cultivo.

Decorrido esse período inicial de 30 dias de cultivo *in vitro* nessas condições, instalou-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, cujos tratamentos consistiram na diminuição da concentração de sacarose de 90 gL<sup>-1</sup> para 30 gL<sup>-1</sup> e, simultaneamente, na combinação com as concentrações de 2,4-D e TDZ a seguir listadas: 5 e 10; 5 e 5; ou ausência e 5 µM, os quais foram codificados como T1; T2 ou T3 respectivamente. Cada tratamento contou com nove repetições, sendo cada uma constituída por um frasco com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio MS acrescido de 100 mgL<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 gL<sup>-1</sup> de ágar, e dois discos foliares. Os discos foram cultivados por um período adicional de 60 dias, nas mesmas condições descritas para o período inicial. Esse período constituiu a segunda etapa do sistema de cultivo.

Decorridos 90 dias, foram avaliadas a oxidação fenólica, a contaminação por fungos e bactérias, bem como a formação de calos, expressas em porcentagem.

## 2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função  $\sqrt{x + 0,5}$ , sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foram utilizados para a comparação das médias de tratamentos qualitativos o teste de Tukey ou a análise de regressão para os quantitativos, ambos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2011). Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o Índice de Variação (IV), calculado por  $IV = \frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

## 2.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **2.8.1 Efeito de diferentes concentrações e combinações de TDZ e 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

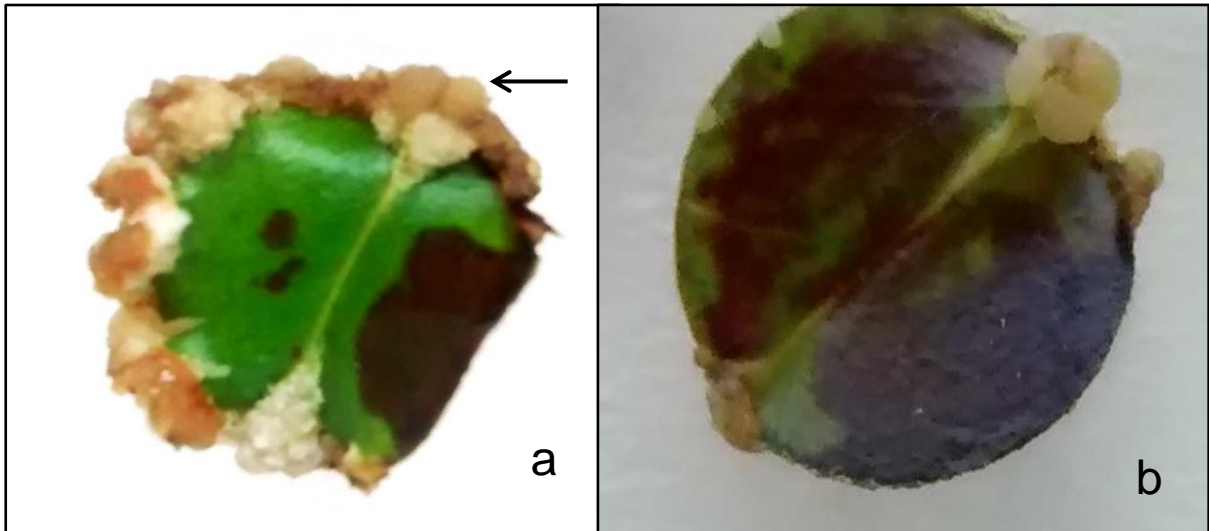
Houve efeito significativo dos fatores principais: 2,4-D, para a variável oxidação fenólica ( $p=0,0000$ ), e TDZ, para a contaminação bacteriana ( $p=0,0404$ ) e para a formação de calos ( $p=0,0028$ ) (Tabela 1), não sendo observada interação significativa entre os fitorreguladores. Para a variável contaminação fúngica que não foi observado efeito significativo de nenhum dos fatores, observou-se uma média geral reduzida (8,25%).

A menor média observada para a oxidação dos explantes foi na ausência do fitorregulador 2,4-D (6,6%), que diferiu significativamente daquela observada na presença de 5  $\mu\text{M}$  (34,13%), apresentando um Índice de Variação (IV) de 4,85. A oxidação é o escurecimento dos explantes causada por compostos polifenólicos, que pode prejudicar o crescimento e a formação de calos, devido ao acúmulo de polifenóis e a liberação, no meio nutritivo, dos produtos da oxidação, como a melanina, lignina, cutina, entre outros, que causam alteração no meio e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000; OLIVEIRA, et al., 2013; UTINO et al., 2001), quando o tecido está sobre estresse, ou seja, quando há ferimento na confecção do

explante, o qual estimula a atividade de enzimas que metabolizam compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina que são polimerizados por peroxidases ou outros sistemas fenólicos oxidativos. A concentração e a atividade das peroxidases são afetadas pela auxina, o que pode explicar a maior oxidação na presença do 2,4-D, haja vista ser uma auxina potente e que pode afetar a oxidação dos explantes (BASSAN et al., 2006; SILVA et al., 2009; SOUZA e ABREU, 2007). Diversos autores relataram uma alta taxa de oxidação na presença de 2,4-D, como Costa e Pereira (2005) em espécies herbáceas como *Piper hispidinervum* (Pimenta longa), como Cardoso (2009) em espécies frutíferas como *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira-preta), como Silva et al. (2009), que também observou altas taxas de oxidação em *Coffea arabica* (Café) na presença de 2,4-D, e, como Reis et al. (2007), em *Schizolobium parahyba* (Guapuruvu), corroborando com os resultados observados no presente experimento. A oxidação é um dos principais problemas enfrentados no cultivo *in vitro*, contudo sua presença, mesmo não sendo desejada, na maioria das vezes, não inibiu a formação de calos nos explantes foliares de *Eugenia involucrata* (Figura 2), ratificando os resultados obtidos por Golle e Reiniger (2013) e Golle et al. (2013).

Já para a contaminação bacteriana (Tabela 1), apesar de ter havido efeito significativo do TDZ, o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, não diferenciou as médias em decorrência da variação entre os dados obtidos ser muito baixa, o que é considerado comum quando se trabalha com dados biológicos, mostrando que há o efeito biológico, porém, a análise estatística não é capaz de discriminar a diferença entre os tratamentos.

Figura 2: Aspectos das formações calogênicas e oxidação fenólica em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, em: **(a)** disco foliar com a presença de baixa oxidação fenólica e maior formação de calos, em destaque a formação de calo nodular; e **(b)** disco foliar com a presença de intensa oxidação fenólica e formação de calos.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Tabela 1: Contaminação bacteriana (%) e formação de calos (%) em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, em função das concentrações de Thidiazuron, independentemente das concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Contaminação Bacteriana (%)	Formação de Calos (%)
0	23,10a	6,60b
5	8,25a	38,10a*
10	8,25a	33,00a
<b>Média</b>	13,2	25,9
<b>IV</b>	4,84	5,92

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

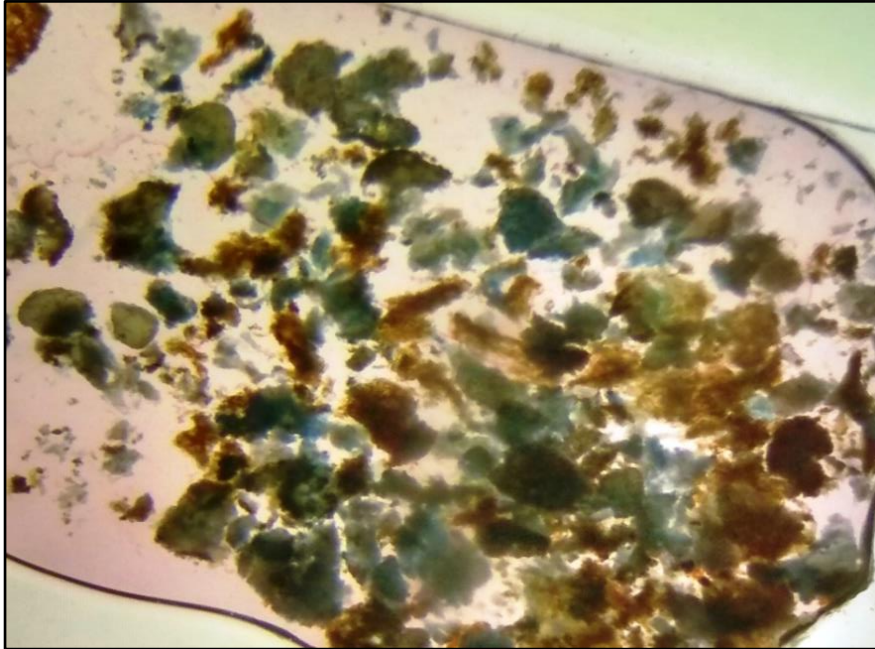
Para a formação de calos, os melhores resultados obtidos foram na presença do TDZ (Tabela 1), demonstrando que essa citocinina é essencial para a calogênese, mas que a auxina testada não apresentou efeito, nas condições testadas.

Para Guerra et al. (1999) as auxinas como o 2,4-D desencadeiam os processos de desdiferenciação celular, ou seja, a formação de calos, diferentemente do que foi observado no presente estudo, em que esse fitorregulador não apresentou efeito sobre a calogênese. Golle (2010), por sua vez, identificou maior formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata* com o emprego da associação de 2,4-D (a 5  $\mu\text{M}$ ) e TDZ (a 5 ou a 10  $\mu\text{M}$ ), contrariando os resultados observados no presente experimento. Já o TDZ, usado de maneira isolada, mostrou-se eficiente na indução da embriogênese somática em *Eugenia involucrata*, no presente trabalho, conforme mencionado ocorrer em espécies recalcitrantes por Aderkas e Bonga (2000). Da mesma maneira, em *Paulownia tomentosa* (Kiri japonês) a indução da calogênese significativamente melhorou na presença do TDZ, sendo considerada a ideal neste caso (CORREDOIRA et al., 2008). Também em *Cardia verbenacea* (Erva-baleeira) foi identificado que a maior porcentagem de formação de calos (75%) foi na presença de 6,13  $\mu\text{M}$  de TDZ (LAMEIRA et al., 1997), concentração próxima aos 5  $\mu\text{M}$  em que foi observada, igualmente, a maior porcentagem de calos no presente experimento.

Contudo, alguns autores obtiveram resultados contrários àqueles verificados no presente estudo, como em *Byrsonima intermedia* (Murici-pequeno), em que a calogênese não é favorecida na presença de citocininas (NOGUEIRA et al., 2007), e, também, em internódios de *Malus* spp cv. Gala RW1 (Macieira), nos quais o TDZ não foi indicado na calogênese devido à alta taxa de hiperhidricidade dos tecidos (MORALES et al., 1999).

Os calos quando submetidos ao teste histoquímico com azul de Evans e Carmim acético apresentaram potencial embriogênico (Figura 3), haja vista que muitas células reagiram fortemente ao carmim acético, apresentando coloração avermelhada, demonstrando que as massas de calos formadas podem se transformar em embriões somáticos. Igualmente em *Byrsonima intermedia*, uma espécie frutífera do Cerrado, as células das massas de calos testadas apresentaram coloração avermelhada (SILVA, L., 2009). Da mesma maneira em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Pinheiro-brasileiro) quando submetidas ao mesmo teste, também apresentaram potencial embriogênico, reagindo fortemente ao carmim acético (ANDRADE, 2010; VALENTE, 2007).

Figura 3: Potencial embriogênico dos calos formados a partir de discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 60 dias de cultivo *in vitro* na presença de TDZ e 2,4-D, em que as células avermelhadas que reagiram fortemente ao carmim acético são consideradas putativas à embriogênese somática.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

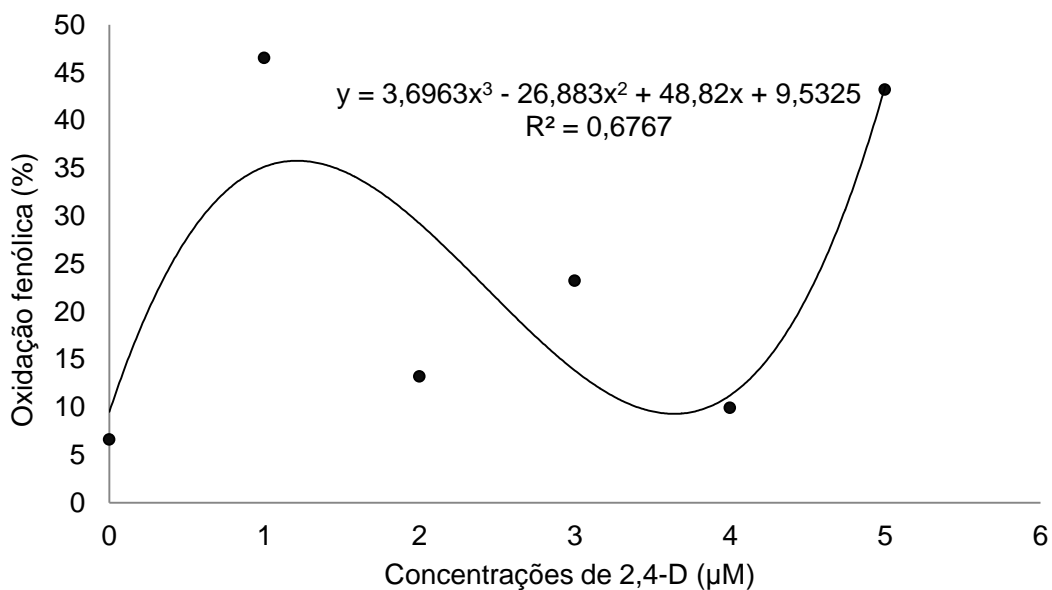
### 2.8.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.

Houve efeito significativo somente para a variável oxidação fenólica ( $p=0,0267$ ). Para as demais variáveis não foi observado efeito significativo, com médias gerais de 27,11% para a contaminação fúngica, 10,46% para a contaminação bacteriana e 12,15% para a formação de calos.

A oxidação fenólica ajustou-se a um comportamento cúbico (Figura 4), em que a menor média foi observada na ausência de 2,4-D, corroborando com os resultados obtidos no experimento anterior. Essa oscilação da oxidação entre as concentrações de 2,4-D, provavelmente foi devido ao estágio de desenvolvimento da folha utilizada como explante, pois folhas muito no início do seu desenvolvimento e folhas em avançado desenvolvimento têm maior propensão à oxidação (BASSAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013), ou, ainda, foi decorrente da resposta diferenciada de cada explante ao estresse causado no momento do corte. Adicionalmente, a oxidação pode ter sido ocasionada pelo fato de os explantes terem sido inoculados

em frascos com capacidade para 150 mL, o que causou uma maior concentração de oxigênio e, provavelmente, aumentou os níveis de etileno, o qual libera enzimas que promovem a oxidação fenólica (BARRIA, 2000). Isso também pode ter prejudicado a formação de calos, pois o etileno é um hormônio inibidor, e pode ter diminuído a atividade celular dos explantes.

Figura 4: Efeito das diferentes concentrações de 2,4-D na oxidação fenólica em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Pode-se observar, também, que não houve a formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata* na ausência do 2,4-D, enfatizando a necessidade de adicionar auxina para promover a calogênese. Igualmente, não houve a formação de calos com 3 µM de 2,4-D, devido às maiores porcentagens de contaminação fúngica (53,2%) e bacteriana (23,2%) serem observadas neste tratamento, pois, além de às altas taxas de contaminação diminuírem a produção de calos, os frascos com micélios fúngicos e colônias bacterianas presentes, são descartados, o que leva à perda significativa de amostras e aumenta os custos da indução calogênica. Outro fator a ser levado em consideração é que as maiores taxas de contaminação foram observadas nos primeiros 30 dias de cultivo, e a formação de calos se inicia, aproximadamente, a partir dos 45 dias.

Na indução de calos embriogênicos em híbridos de *Ocimum basilicum* (Manjeriço) não houve desenvolvimento de calos na ausência de 2,4-D no meio nutritivo (COSTA, A. et al., 2015), corroborando com os resultados obtidos no presente experimento. Em *Caesalpinia echinata* (Pau-Brasil) foi identificada como satisfatória a combinação de reguladores de crescimento 2,4-D (a  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  – equivalente a  $2,5 \text{ }\mu\text{M}$ ) com BAP (a  $5,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) para a proliferação da massa de calos (WERNER et al., 2010), sendo esta considerada uma concentração baixa de 2,4-D. Já em segmentos apicais e intercotiledonares de *Schizolobium parahyba* (Paricá), a formação de calos foi elevada na ausência do 2,4-D (REIS et al., 2007), discordando dos resultados obtidos no presente estudo.

A maior formação de calos (27%) com características embriogênicas verificada em explantes foliares de *Pfaffia tuberosa* ocorreu no cultivo em meio acrescido de  $1 \text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D (FLORES et al., 2007), de maneira similar ao que foi observado no presente experimento, em que a maior porcentagem de calogênese (29,9%) deu-se a  $1 \text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D.

### **2.8.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

Não foi observado efeito significativo dos fatores principais, nem, tampouco, da interação entre eles para a oxidação fenólica (média geral de 19,58%). Por outro lado, houve efeito significativo da interação entre os fatores para a contaminação bacteriana ( $p=0,0015$ ), e, também, dos fatores principais, período de cultivo para a contaminação fúngica ( $p=0,0076$ ), e concentrações de sacarose para a formação de calos ( $p=0,0065$ ).

A porcentagem de oxidação fenólica neste experimento foi menor que nos anteriores, provavelmente pela fase de desenvolvimento da planta que doou os explantes ou pela época de coleta das folhas e implantação do experimento (outubro/2015), haja vista que estes fatores são considerados influenciar a oxidação dos explantes (OLIVEIRA et al., 2013). Em decorrência disso, a formação de calos foi maior, além do que, as baixas taxas de contaminação também acarretaram um aumento na calogênese.

A maior perda de material vegetal ocorre por contaminação microbiana, pois apesar de toda a manipulação ser realizada em ambiente asséptico, ainda há



contaminação, pois, geralmente os micro-organismos são endógenos, e, portanto, não são expostos aos agentes desinfestantes, o que dificulta a assepsia dos explantes. Além disso, muitos dos micro-organismos mesmo não sendo patogênicos, competem com o explante por nutrientes, dificultando o seu desenvolvimento e crescimento (OLIVEIRA et al., 2013; XAVIER et al., 2013).

No presente experimento, a contaminação fúngica foi maior (8,33%) nos primeiros 30 dias de cultivo, independentemente da concentração de sacarose adicionada ao meio, e que tendeu a diminuir ou zerar com tempo (60 dias - 0,83% versus 90 e 120 dias - ausência de micélios fúngicos junto ao explante, médias que não diferiram entre si), com IV de 2,61. Por outro lado, para contaminação bacteriana foi observado que há relação entre o período de cultivo e a concentração de sacarose (Tabela 2). Igualmente ao que foi observado em relação à contaminação fúngica, a maior média observada da presença de colônias bacterianas junto aos explantes, foi nos primeiros 30 dias na menor concentração testada (30 gL<sup>-1</sup>) de sacarose.

Tabela 2: Contaminação bacteriana (%) em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), em função da interação entre as concentrações de sacarose adicionadas ao meio nutritivo MS e os períodos de cultivo *in vitro*.

<b>Contaminação bacteriana (%)</b>			
<b>Período (Dias)</b>	<b>Concentrações de Sacarose (gL<sup>-1</sup>)</b>		
	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>
<b>30</b>	15 bB	0 aA	2,5 aA*
<b>60</b>	0 aA	0 aA	0 aA
<b>90</b>	0 aA	0 aA	2,5 aA
<b>120</b>	0 aA	0 aA	7,5 aB
<b>IV</b>	<b>2,05</b>		

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a ou A' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

O aumento na taxa de contaminação ao longo da permanência no meio nutritivo na concentração 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 2), pode ter sido causado pela manipulação das culturas, haja vista que, a cada 30 dias, ocorreu transferência para um meio nutritivo fresco. Pode, também, ter sido decorrente do crescimento de

alguma bactéria endógena de manifestação lenta, ou, ainda, pelo fato de haver uma maior concentração de carbono no meio, que, apesar de ser fonte de energia para os micro-organismos, promove um aumento no potencial osmótico (BANDINELLI et al., 2013; BESSON et al., 2010; FARIA et al., 2006; LEMES et al., 2016) que desfavorece a multiplicação bacteriana, conforme será discutido a seguir em relação à calogênese.

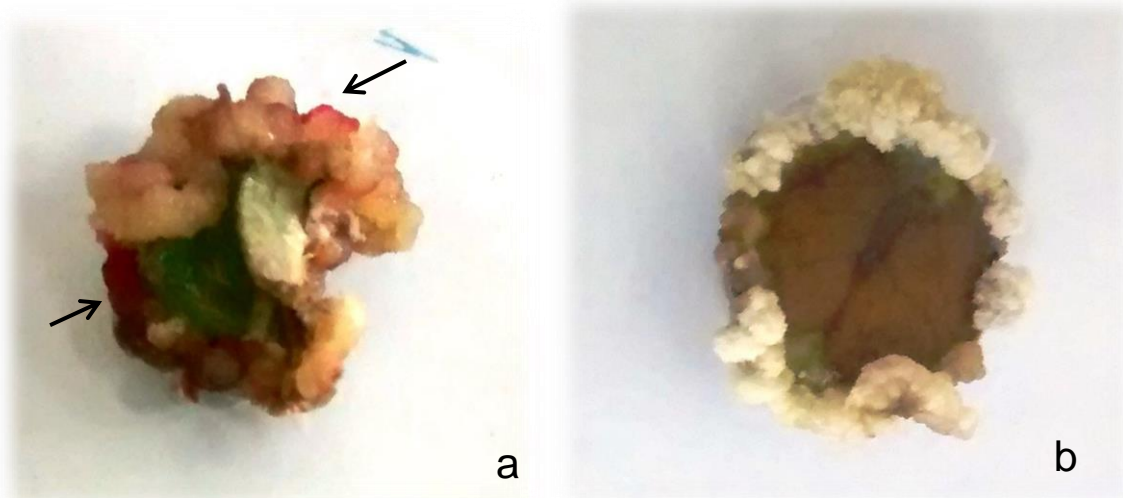
A formação de calos foi afetada significativamente pela concentração de sacarose, observando-se médias de 21,87, 16,25 e 40% para 30, 60 e 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose respectivamente, sendo que a primeira não diferiu significativamente das demais concentrações, já a segunda e a terceira diferiram significativamente entre si, apresentou um IV de 6,77. Assim, verifica-se que, embora as médias das concentrações 30 e 90 gL<sup>-1</sup> do carboidrato utilizado não tenham diferido estatisticamente entre si, é notável a diferença na qualidade dos calos formados na presença de maior concentração de sacarose, conforme pode ser observado na Figura 6, indicando que esta fonte de carboidrato pode estar relacionada à iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (GUERRA et al., 1999), além de ser a fonte externa de carboidrato que fornece energia para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento celular (CALDAS et al., 1998; PEREIRA et al., 2003). Além disso, mesmo que a média observada aos 30 gL<sup>-1</sup> não tenha diferido daquela aos 60 gL<sup>-1</sup>, observou-se, igualmente, qualidade inferior na menor concentração, diferindo do que foi observado em *Coffea arabica*, em que um maior número de embriões globulares ocorreu em meio 'R' de regeneração, acrescido de 60 gL<sup>-1</sup> de sacarose a partir de calos já cultivados. Os autores também descreveram que, com o aumento na concentração de sacarose pode-se obter um incremento na formação de embriões (PEREIRA et al. 2003), o que corrobora com os resultados obtidos no presente experimento.

Adicionalmente, outro fator que pode estar relacionado é que a sacarose aumenta o potencial osmótico do meio, uma das exigências na cultura de embriões somáticos, o que, simultaneamente, como discutido anteriormente, pode explicar a baixa contaminação bacteriana observada no presente trabalho. Em *Pfaffia glomerata*, foi observado que não houve a formação de calos na ausência de sacarose, e os melhores resultados ocorreram com 20 e 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose (RIBEIRO et al., 2009). Em *Hevea brasiliensis* (Seringueira) igualmente foi observado os melhores calos embriogênicos em altas concentrações de sacarose

(234 mM – equivalente a aproximadamente 80 gL<sup>-1</sup> de sacarose) (MODESTE et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos. Também em *Cissus sicyoides* (Insulina-vegetal) foram verificados os melhores resultados para a calogênese com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose (ABREU et al., 2003). De maneira similar, em *Caesalpinia echinata* a concentração 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose, a mais utilizada na indução da calogênese, foi empregada na indução de calos em explantes foliares (WERNER et al., 2007).

Assim como foi observado nos experimentos anteriores houve a formação de calos em explantes associados a bactérias e com presença de oxidação, os quais apresentaram aspecto friável e coloração branco-amarelada (Figuras 5 e 6).

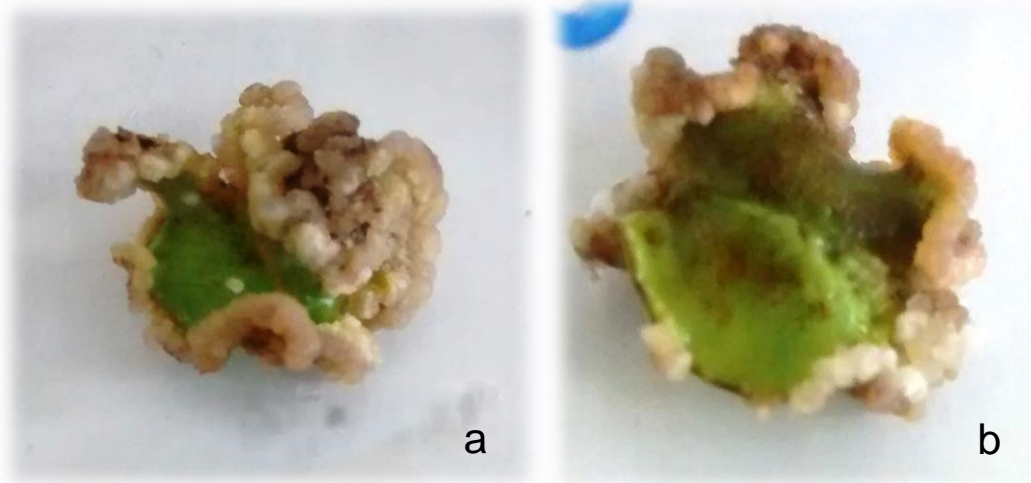
Figura 5: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) em meio nutritivo MS acrescido de 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose, após 120 dias de cultivo *in vitro*, em: **(a)** com a presença de contaminação bacteriana (aparência rosada indicada pelas setas); e **(b)** com a presença de oxidação fenólica.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

A contaminação bacteriana e a oxidação fenólica embora sejam indesejadas não interferiram na formação de calos neste caso. Cabe ressaltar, também, que houve alguns explantes em que a oxidação se iniciou antes da formação do calo, enquanto em outros, contrariamente, o disco foliar começou a se oxidar após a formação do calo, independentemente da concentração de sacarose, e em ambos os explantes se desdiferenciaram e formaram calos nodulares.

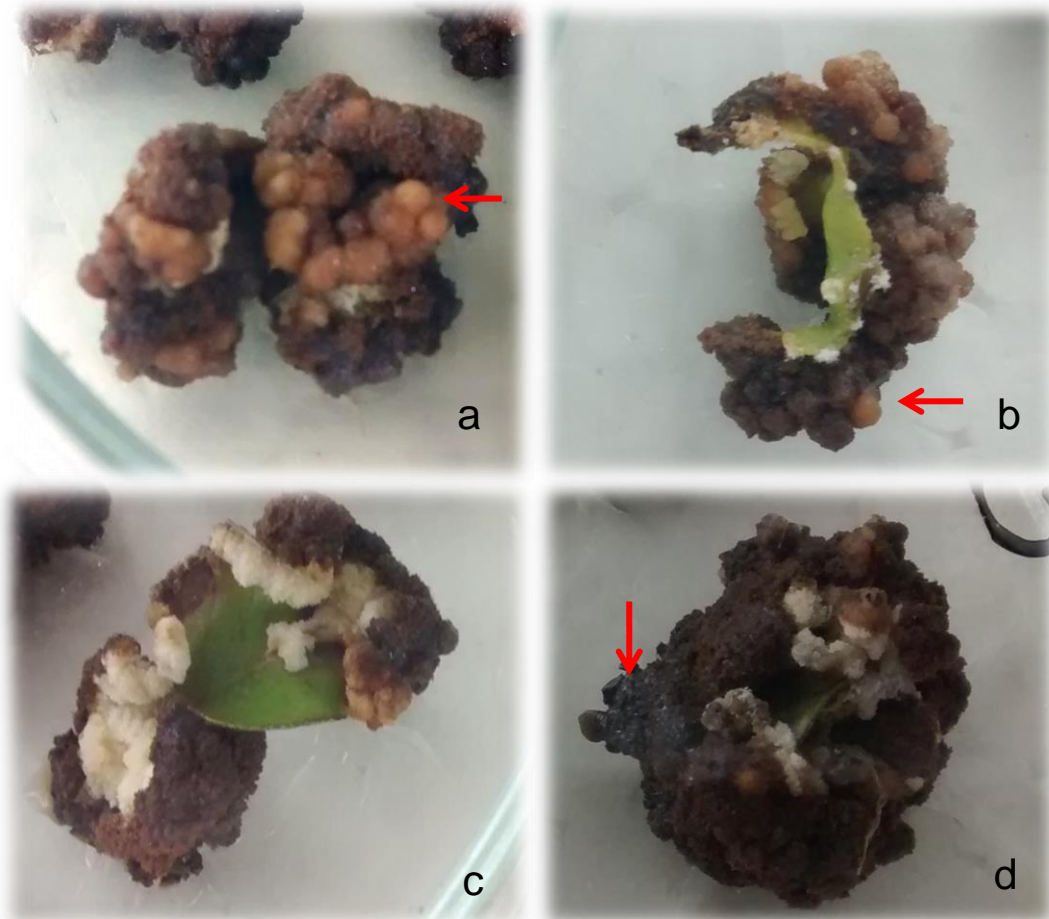
Figura 6: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), em meio nutritivo MS, após 90 dias de cultivo *in vitro*, em: **(a)** com 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose; e **(b)** e com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Notou-se que a permanência dos calos em meio nutritivo de igual composição, porém fresco, em seguidas transferências ocasionou uma diferenciação maior, promovendo um aumento dos calos nodulares, putativos à embriogênese somática, porém, simultaneamente, houve um aumento na oxidação fenólica e início de necrose (Figura 7), provavelmente devido a uma exaustão de nutrientes e acúmulo de substâncias tóxicas no explante (ABREU et al. 2003). Isso sugere que, após um período de cultivo, os calos devem ser transferidos e repicados para um meio com menor concentração de sacarose, na ausência de fitorreguladores, para que se promova plena proliferação e o subsequente desenvolvimento dos embriões somáticos.

Figura 7: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), em 90 gL<sup>-1</sup> de sacarose em meio nutritivo MS, em período prolongado de cultivo *in vitro*, em: **(a)** calo nodular putativo à embriogênese somática com explante e calo oxidado; **(b)** calo nodular com explante verde e parte do calo oxidado; **(c)** calo friável, com grande parte oxidada, em destaque para o disco foliar verde; e **(d)** calo oxidado com destaque para parte com necrose. As setas indicam os destaques.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

#### 2.8.4 Efeito de diferentes concentrações e combinações de sacarose e TDZ sobre a indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.

Houve efeito significativo somente para o fator principal TDZ sobre a contaminação fúngica ( $p=0,0104$ ) e formação de calos ( $p=0,0031$ ) (Tabela 3), enquanto para as demais variáveis não foi observado efeito dos fatores principais tampouco da interação entre sacarose e TDZ. Assim, para a oxidação e contaminação bacteriana observaram-se médias relativamente elevada (41,66%) e reduzida (2,08%) respectivamente.

Foi observada baixa contaminação microbiana, independentemente da concentração de sacarose adicionada ao meio nutritivo, a qual pode estar relacionada à qualidade e à época de coleta dos explantes (setembro/2016), e, também, a posterior transferência das culturas para meio nutritivo fresco, o que contribuiu para o aumento na formação de calos.

Tabela 3: Contaminação fúngica (%) e formação de calos (%) em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após 90 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Thidiazuron adicionadas ao meio nutritivo MS, independentemente das concentrações de sacarose.

TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Contaminação Fúngica (%)	Formação de Calos (%)
5	0,0 a	82,5 a*
10	5,0 b	55,0 b
<b>Média</b>	2,5	68,75
<b>IV</b>	2,03	5,1

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

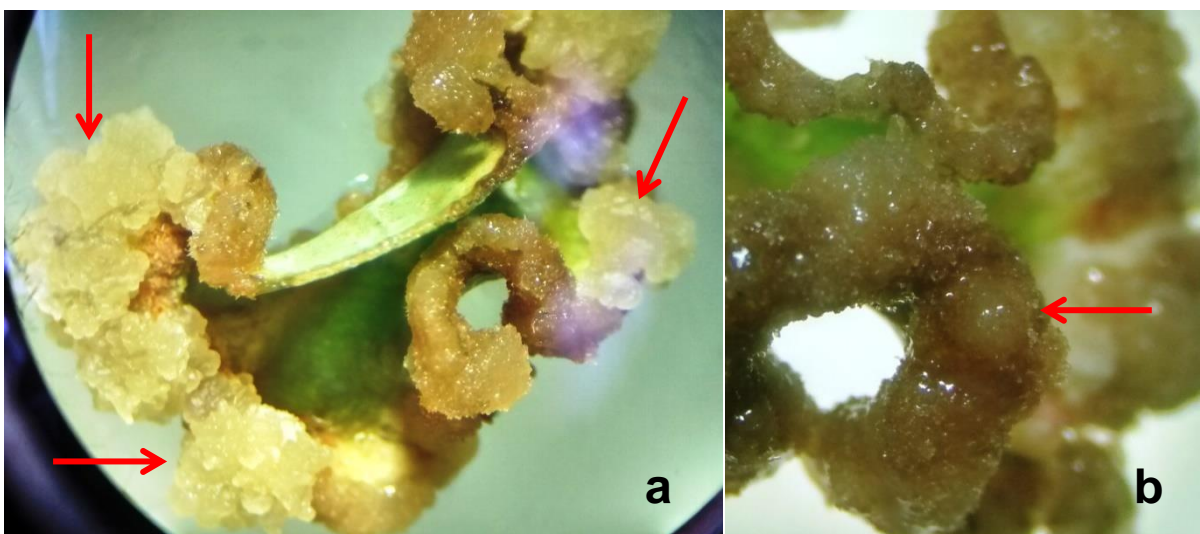
Em relação à calogênese, observaram-se calos em todas as combinações de sacarose e TDZ, contudo, contrariamente ao observado no experimento anterior, neste caso, o carboidrato não apresentou efeito significativo, apenas a citocinina, resultando em maior porcentagem de calos na presença da menor concentração testada do fitorregulador. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao estágio fenológico em que a planta doadora de explantes se encontrava no momento da coleta, apresentando um teor endógeno de citocininas menor que o de auxinas, e a suplementação de TDZ com a menor concentração testada favoreceu o balanço hormonal em direção à calogênese. Por outro lado, como o TDZ é uma citocinina muito ativa na multiplicação, aumentando a atividade enzimática da fosfatase ácida, tornaria as citocininas endógenas biologicamente mais ativas, o que explicaria a inibição no crescimento dos calos com o aumento na concentração de TDZ.

De maneira similar, em *Croton urucurana* (Sangra d'água) a indução da calogênese somente foi eficiente na presença de TDZ associado a 2,4-D, diferindo

apenas da concentração utilizada da auxina (LIMA et al., 2008), que correspondeu à metade daquela testada no presente experimento [ $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (equivalente a  $2,5 \text{ }\mu\text{M}$ ) versus  $1 \text{ mgL}^{-1}$  (equivalente a  $5 \text{ }\mu\text{M}$ ) de 2,4-D]. Em *Eucalyptus dunnii* (Eucalipto), brotações cultivadas na presença de 1 ou  $5 \text{ }\mu\text{M}$  de TDZ apresentaram calosidade excessiva na base e prejudicaram o desenvolvimento da parte aérea (GRAÇA et al., 2001), o que demonstra que o TDZ estimula a calogênese, e que, assim como no presente trabalho, a concentração  $5 \text{ }\mu\text{M}$  é adequada para essa finalidade. Por outro lado, diferentemente do que foi observado no presente estudo, em discos foliares de *Actinidia deliciosa* (Kiwizeiro), a intensidade de formação de calos aumentou até a concentração  $2,21 \text{ mgL}^{-1}$  (equivalente a cerca de  $10 \text{ }\mu\text{M}$ ) de TDZ, após o que, começou a diminuir, sendo que concentrações superiores causaram a morte dos explantes (CHOER et al., 1997).

Além disso, há que se destacar que, no presente trabalho, os calos formados apresentaram ótima qualidade, coloração branco-amarelada, aspecto friável e incluíam calos nodulares, o que sugere a possibilidade de uma transformação em embriões somáticos (Figura 8).

Figura 8: Formação calogênica em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS em função das concentrações de TDZ ( $5$  ou  $10 \text{ }\mu\text{M}$ ), independentemente das concentrações de sacarose ( $30$ ,  $60$  ou  $90 \text{ gL}^{-1}$ ), em: **(a)** presença de calos friáveis (indicado pelas setas) de coloração branco-amarelada. e **(b)** destaque para calo nodular putativo à embriogênese somática.

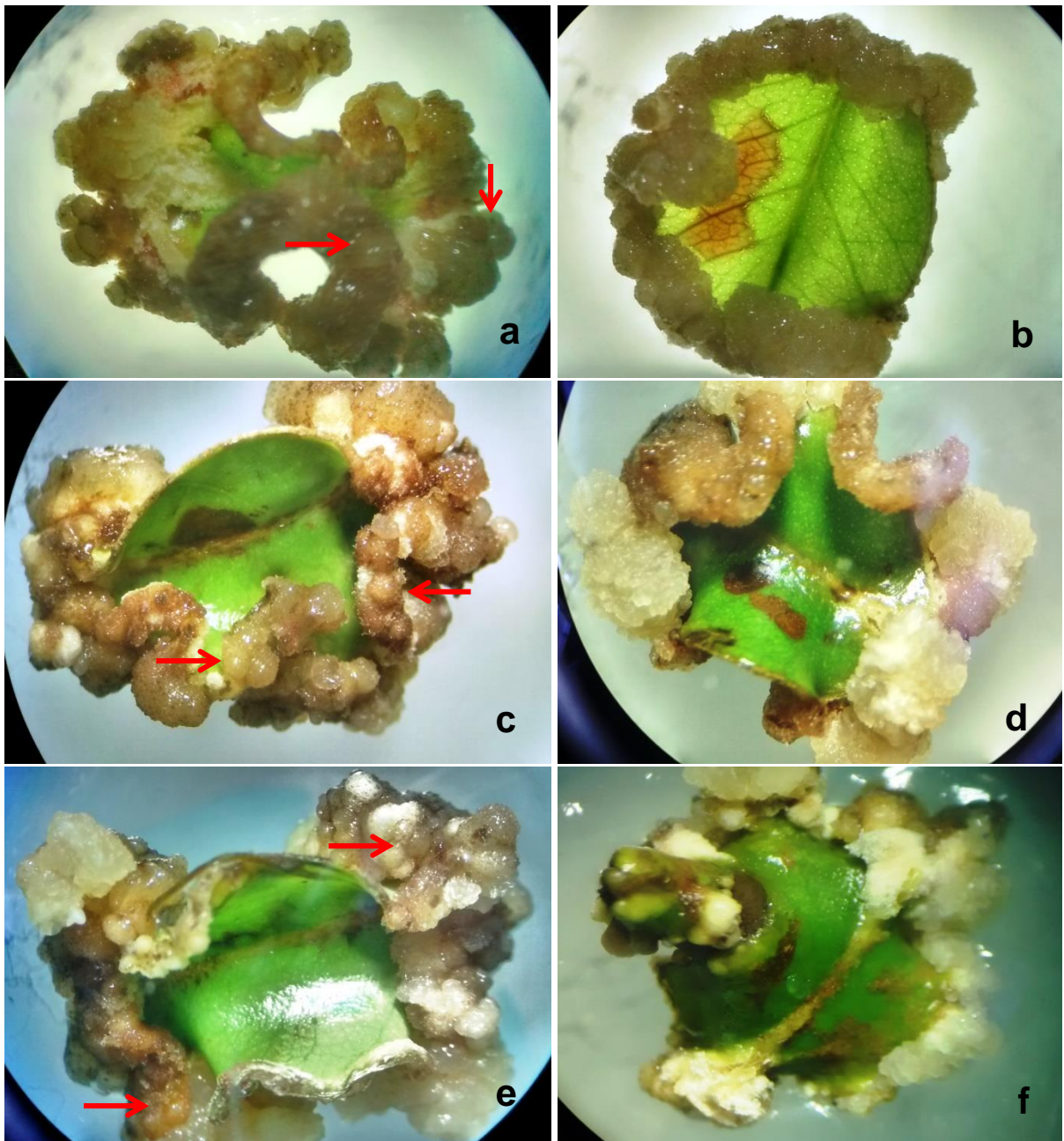


Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

De maneira similar ao que foi observado em relação à porcentagem de calos formados na menor concentração testada de TDZ, foram verificadas diferenças na

qualidade desses calos, e isso ocorreu independentemente da concentração de sacarose adicionada ao meio (Figura 9).

Figura 9: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, com as seguintes concentrações de sacarose ( $\text{gL}^{-1}$ ) e TDZ ( $\mu\text{M}$ ) respectivamente, em: **(a)** 30 e 5; **(b)** 30 e 10; **(c)** 60 e 5; **(d)** 60 e 10; **(e)** 90 e 5; e **(f)** 90 e 10. Com destaques para os calos nodulares putativos a embriões somáticos indicados pelas setas.

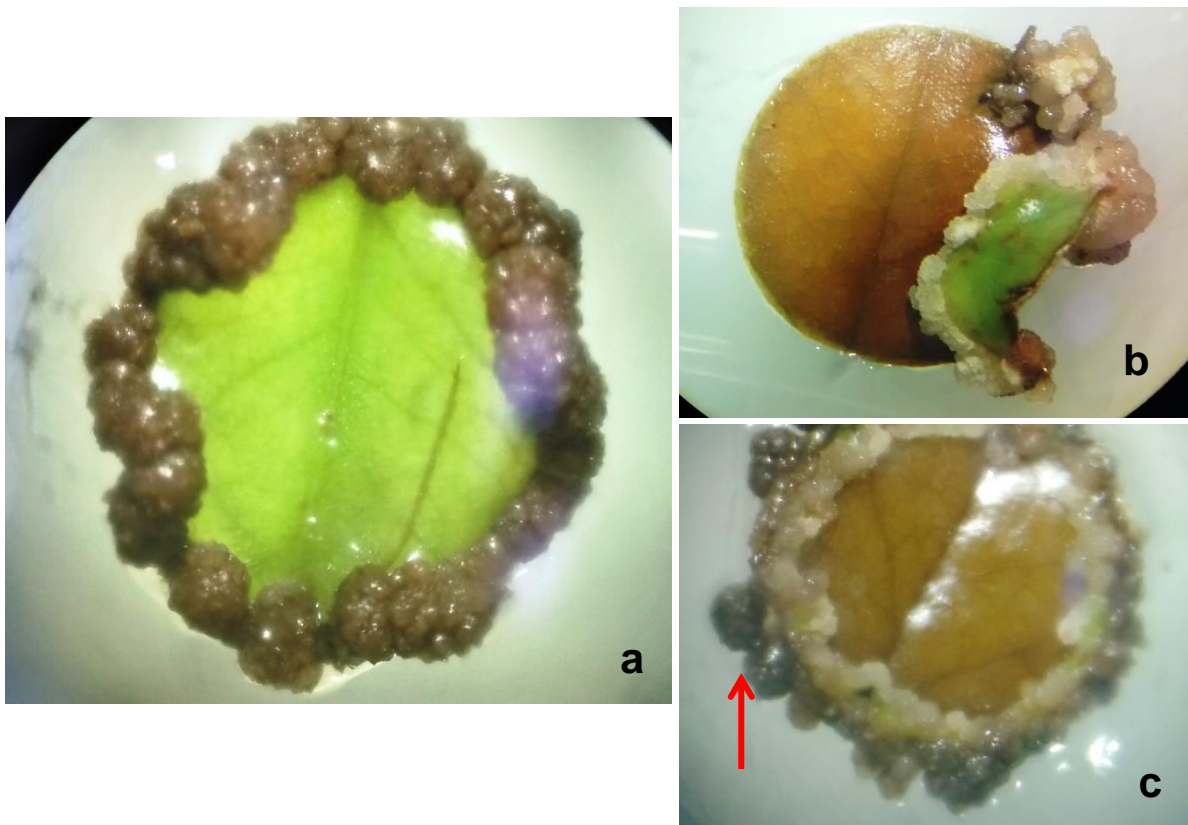


Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.



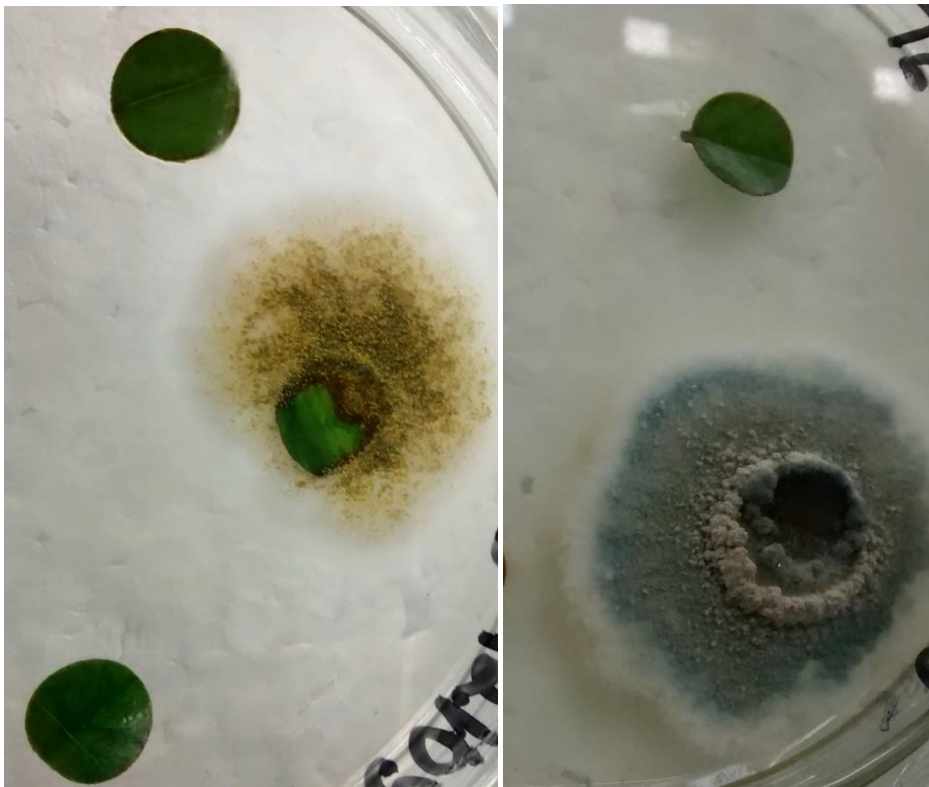
Conforme pode ser observado na Figura 9 houve maior incidência de calos friáveis e nodulares putativos a embriões somáticos na presença de 5  $\mu\text{M}$  de TDZ, a menor concentração testada. Igualmente, verificou-se que, na maior concentração de TDZ (10  $\mu\text{M}$ ), a oxidação fenólica foi mais extensa, tanto no explante em si, como nos calos formados. Notou-se, também, que, em alguns explantes, ocorreu a oxidação fenólica do calo formado, e não do explante, como pode ser observado na Figura 10, e isso diminuiu o crescimento desses calos, provavelmente devido a uma saturação de citocinina presente no meio nutritivo, já que isso foi registrado somente na presença da maior concentração de TDZ. Porém, conforme mencionado em relação aos experimentos anteriores, a oxidação do explante não impediu a formação calogênica (Figura 10).

Figura 10: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS adicionado de 10  $\mu\text{M}$  de TDZ, independentemente da concentração de sacarose (30, 60 ou 90  $\text{gL}^{-1}$ ), em: **(a)** presença de oxidação fenólica somente nos calos; **(b)** presença de alta oxidação fenólica somente no explante, com formação de calos sem oxidação; e **(c)** presença de oxidação fenólica no explante e nos calos, com destaque para alguns calos necrosados.



Outro fator que pode ter influenciado uma maior formação de calos na presença de 5  $\mu\text{M}$  de TDZ foi a ausência de contaminação fúngica, o que fez com que aumentasse a quantidade de explantes passíveis de formar calos. Isso ocorre porque quando é identificada a presença de micélios fúngicos junto ao explante, é realizado o descarte de toda a unidade experimental, mesmo se os demais explantes presentes não estejam contaminados (Figura 11).

Figura 11: Aspectos da contaminação fúngica em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS suplementado com sacarose e TDZ. Observa-se que a contaminação está associada a apenas um explante, enquanto os demais estão livres de contaminação.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Adicionalmente, deve-se considerar que as diferenças que foram observadas na formação de calos, oxidação fenólica e contaminação microbiana podem, também, estar relacionadas à variabilidade dos explantes entre si, haja vista que a coleta das folhas e o isolamento dos discos foliares ocorreu de maneira aleatória. Da mesma maneira, a sensibilidade aos fitorreguladores pode ser diferente, assim como o teor endógeno de hormônios, e, igualmente, a presença de micro-organismos endofíticos.

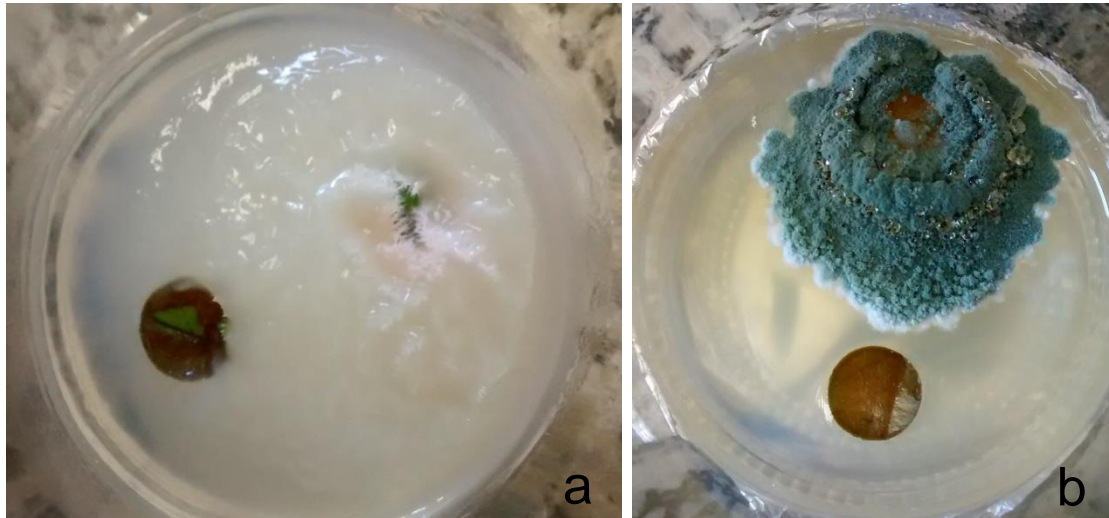
Em *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu), em tecidos testados como estaminódios e lígulas, a concentração  $10 \mu\text{gL}^{-1}$  (equivalente a  $0,05 \mu\text{M}$ ) de TDZ promoveu a formação de calos, entretanto, os autores sugeriram que o aumento na concentração desse fitorregulador pode fornecer resultados mais favoráveis. Por outro lado, em outros tecidos, como cógulas, os resultados foram desprezíveis. Além disso, relataram a presença de uma elevada variância na resposta entre os explantes utilizados (SILVA et al., 2006), semelhante ao que pode ter ocorrido no presente trabalho.

#### **2.8.5 Avaliação do sistema de cultivo de duas etapas na indução da calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.**

Nos primeiros 30 dias de cultivo *in vitro* dos discos foliares em meio nutritivo MS acrescido de  $90 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $5 \mu\text{M}$  de 2,4-D e  $10 \mu\text{M}$  de TDZ houve a contaminação de apenas 3% dos explantes por colônias bacterianas, de 4,5% por micélios fúngicos, e 4,5% de oxidação fenólica, não se verificando a formação de calos (Figura 12). Em decorrência disso, na continuação do experimento, foram descartados os frascos contaminados e com intensa oxidação, o que acarretou em uma redução nas unidades experimentais, restando 27 frascos, cada um com dois discos foliares.

Decorridos 60 dias adicionais, na avaliação da segunda etapa do sistema de cultivo, não foi observado efeito significativo dos tratamentos para as variáveis, oxidação fenólica (média geral 31,48%), contaminação fúngica (média geral 1,85%), contaminação bacteriana (média geral de 3,7%) e formação de calos (média geral 38,89%).

Figura 12: Contaminação microbiana em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS acrescido de  $90 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $5 \text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D e  $10 \text{ }\mu\text{M}$  de TDZ, em: **(a)** presença de colônia bacteriana junto ao explante e oxidação fenólica; e **(b)** presença de micélios fúngicos junto ao explante e oxidação fenólica intensa.



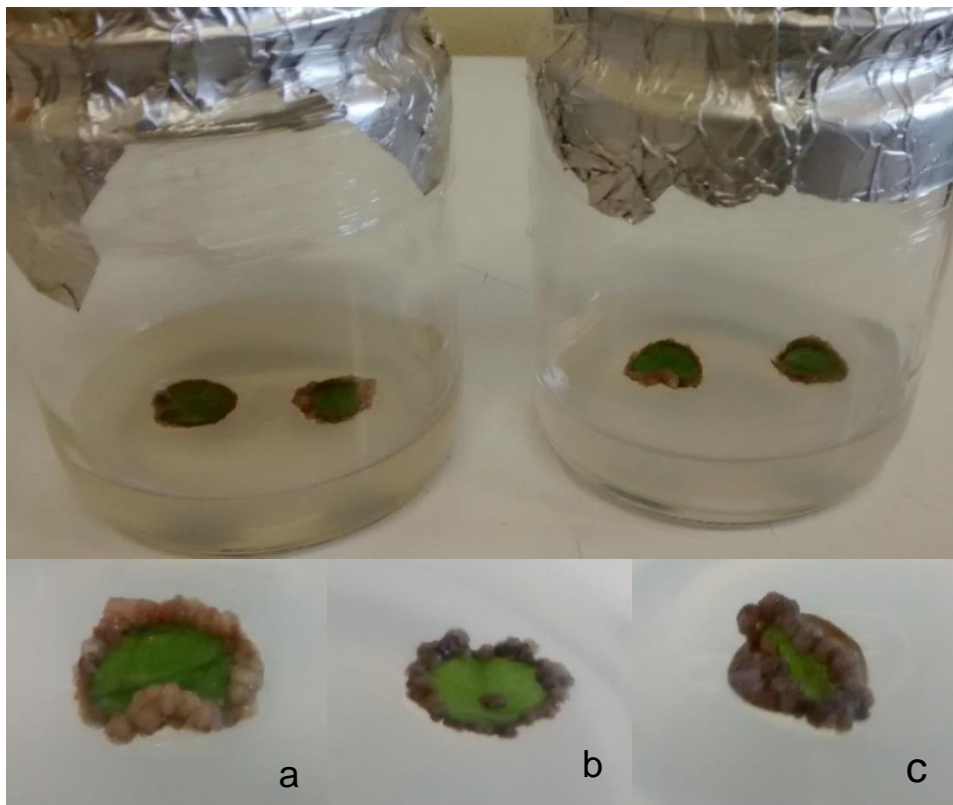
Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Houve uma redução na contaminação microbiana da segunda etapa (cultivo de mais 60 dias após a primeira etapa, na qual foram testadas as combinações de concentrações 5-10, 5-5 ou 0-5  $\mu\text{M}$  de TDZ e 2,4-D, respectivamente, acrescidas de  $30 \text{ gL}^{-1}$  sacarose) em relação à primeira (cultivo inicial de 30 dias, no qual foram utilizadas as concentrações  $90 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $5 \text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D e  $10 \text{ }\mu\text{M}$  de TDZ), apesar de não ter havido efeito significativo dos tratamentos. Esse resultado está de acordo com a expectativa, haja vista que, geralmente, a maior incidência de contaminação ocorre nos primeiros 30 dias de cultivo. Entretanto, mesmo no cultivo inicial, observou-se que a porcentagem de contaminação foi baixa, o que pode estar relacionado ao maior potencial osmótico decorrente da concentração de sacarose utilizada ( $90 \text{ gL}^{-1}$ ) nesses primeiros 30 dias. Essa associação com micro-organismos pode ser decorrente da presença de contaminantes endógenos, os quais são de difícil eliminação pela desinfestação superficial, e que podem se manifestar em qualquer período de cultivo. Inobstante, sugere-se a utilização de uma concentração maior no período de estabelecimento *in vitro*, ou seja, nos primeiros 30 dias de cultivo, a qual mostrou ser eficiente no controle da contaminação microbiana de explantes foliares de *Eugenia involucrata*. Entretanto, devem ser realizados estudos adicionais para sua confirmação.

A oxidação fenólica foi de média a alta, independentemente do tratamento, o que, como já foi descrito anteriormente, no segundo experimento, pode ter ocorrido devido à utilização de frascos com capacidade para 150 mL, ao contrário dos demais em que foram empregadas placas de petri. Esses frascos permitem armazenar um volume maior de oxigênio e, em consequência, causar um aumento nos níveis de etileno, acarretando oxidação e morte dos explantes.

Em relação aos calos formados observou-se que sua qualidade foi decrescente, proporcionalmente à redução realizada nas concentrações de 2,4-D e TDZ, com coloração amarelo-escuro à marrom, ao passo que, quando foram mantidas as concentrações dos fitorreguladores na segunda etapa, os calos apresentaram coloração amarelada e do tipo nodular (Figura 13).

Figura 13: Formação de calos em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Em destaque, em: **(a)** explante com formação calogênica na presença de 5  $\mu$ M de 2,4-D e 10  $\mu$ M de TDZ; **(b)** explante com baixa formação calogênica na presença de 5  $\mu$ M de 2,4-D e 5  $\mu$ M de TDZ; e **(c)** explante com baixa formação calogênica e com oxidação fenólica na ausência de 2,4-D e presença de 5  $\mu$ M de TDZ.



Em estudos realizados com *Eucalyptus urophylla*, a utilização do 2,4-D e TDZ foi eficiente na produção de calos (AMARAL de DEUS et al., 2007), de maneira similar ao que foi observado no presente experimento. Igualmente, na ausência de fitorreguladores em explantes foliares de *Bactris gasipaes* (Pupunha) não houve a formação de calos, e, também, quando utilizadas concentrações elevadas de 2,4-D ocorreu necrose total dos explantes (SANTOS et al., 2012).

Finalmente, assim como também foi comentado em relação à oxidação, a baixa qualidade e a diminuição no tamanho dos calos formados pode ter sido ocasionada pela utilização dos frascos com capacidade para 150 mL. Considerando-se que, durante a formação calogênica as atividades de respiração e mitose que estão ocorrendo resultam, naturalmente, na liberação de etileno e, que o frasco permite um acúmulo desse hormônio, que causa entre outros efeitos, a senescência, isso pode ter acarretado uma redução na qualidade dos calos, o que está de acordo com Luz et al. (1999), que trabalhou com híbridos de *Capsicum* spp. (Pimentão).

## 2.9 CONCLUSÃO

As combinações de 2,4-D e TDZ mais eficientes para a formação calogênica em explantes foliares de *Eugenia involucrata* são 5 e 5 ou 5 e 10  $\mu\text{M}$ .

Os calos formados apresentam potencial embriogênico, são friáveis, têm coloração branco-amarelada, e presença de estruturas nodulares.

A concentração de sacarose presente no meio nutritivo é significativa para a formação de calos, sendo que a 30 ou a 90  $\text{gL}^{-1}$  a calogênese é mais expressiva, contudo, com a maior concentração do carboidrato, a qualidade dos calos é incrementada.

A sacarose quando combinada com a citocinina TDZ, não apresenta efeito significativo sobre a formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata*, somente o TDZ.

A citocinina TDZ (a 5  $\mu\text{M}$  ou a 10  $\mu\text{M}$ ) influencia significativamente na formação de calos, ocorrendo em ambas, porém a concentração mais indicada é a de 5  $\mu\text{M}$ , por proporcionar maior qualidade na formação calogênica, além de reduzir custos.

O TDZ também influencia a contaminação microbiana, pois em sua presença há menor incidência de colônias bacterianas e micélios fúngicos.

O 2,4-D interfere significativamente na oxidação fenólica dos discos foliares de *Eugenia involucrata* DC., cujas médias são maiores na presença dessa auxina. A oxidação fenólica é de difícil controle e muitas vezes leva à morte dos explantes foliares, entretanto a presença do 2,4-D é essencial para a formação de calos.

### 3 CAPÍTULO II

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE INDIVÍDUOS DE *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch

### 3.1 RESUMO

A *Carya illinoensis* (nogueira pecã) é uma espécie frutífera florestal, nativa dos Estados Unidos. O interesse pelos seus frutos tem apresentado um crescimento exponencial no Brasil e outros países, principalmente por seu elevado valor nutricional. Além disso, é uma alternativa de renda para agricultores familiares, haja vista sua potencialidade de uso em áreas de reserva legal, tornando-se uma espécie de interesse econômico e social, principalmente no sul do Brasil. Entretanto, a espécie é carente em informações genéticas e, em decorrência da falta de controle de polinização e de registro de coleta de propágulos nos pomares, os materiais genéticos em cultivo, geralmente, não têm origem conhecida. Nesse sentido, a caracterização molecular a partir de marcadores de DNA pode solucionar este problema, identificando e diferenciando cultivares, e propiciando, simultaneamente, as bases para o planejamento de um eventual programa de melhoramento genético. Além disso, contribuiria, também para a melhoria do sistema de manejo dos pomares, com repercussão direta na produtividade. Em virtude disso, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade genética existente em indivíduos de *Carya illinoensis* em desenvolvimento em condições de campo, por meio de marcadores AFLP. Para tanto, foi realizado o isolamento do DNA genômico em folhas coletadas em 67 indivíduos de Anta Gorda e Arroio do Meio, RS, utilizando-se o protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle, em 1987, com modificações. Foram realizadas análises de concentração das soluções de DNA em espectrofotômetro UV-Vis e, a seguir, as etapas de restrição e amplificação, de acordo com protocolo descrito por Vos e colaboradores, em 1995, com modificações. Foi avaliada a relação genética entre os indivíduos por meios de estimativas dos coeficientes de similaridade de Jaccard e de Análise de Componentes Principais (ACP). A concentração média de DNA das soluções teve amplitude de 31,33 a 949  $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ . Na técnica AFLP, apenas 12 amostras obtiveram êxito (1, 5, 6, 8, 11, 23, 24, 34, 39, 44, 50 e 55), todas de Anta Gorda. A similaridade genética variou de 0,6595 a 0,0357. Na ACP o Eixo 1 explicou 25,54% da variabilidade existente nos dados de marcadores AFLP, enquanto o eixo 2, outros 17,53%. Foram observados dois grupos, um formado por quatro indivíduos e o outro, por sete, ficando um indivíduo isolado. As soluções de DNA genômico apresentam grande amplitude de concentração e resulta elevado polimorfismo entre as amostras pela técnica AFLP. Dentre as 67 soluções de DNA genômico obtidas, somente 12 apresentam funcionalidade na técnica de AFLP com a combinação de iniciadores testada. Os 12 indivíduos avaliados apresentam uma grande amplitude de variação em relação às estimativas de similaridade de Jaccard, e revelam uma baixa similaridade genética. A ACP explica apenas cerca de 43% da variabilidade total. Os 12 indivíduos distribuem-se em dois grupos principais, um deles, de maior similaridade, é formado por indivíduos da mesma propriedade, enquanto o segundo, de menor similaridade, é constituído por indivíduos que se encontram localizados em quatro propriedades diferentes. A ACP demonstra coerência com as estimativas de similaridade obtidas e ambas as análises sugerem



que há correlação positiva entre dissimilaridade genética e distância geográfica entre os indivíduos de *Carya illinoensis* estudados.

Palavras-chave: Nogueira pecã, marcadores AFLP, diversidade genética.

### 3.2 ABSTRACT

*Carya illinoensis* (Nogueira pecã) is a forest fruit species, native from the United States. The interest for its fruit has presented an exponential growth in Brazil and other countries, due mainly to its high nutritional value. Besides, it is an alternate income for family farmers because of its use potential in legal reservation areas, becoming a species of social and economical interest, mainly in the south of Brazil. However, there is a lack of genetic information on this species and, due to a lack of pollination control and of propagules collection records in orchards, the genetic material in cultivation has usually unknown sources. In this sense, molecular characterization from DNA markers may solve that problem, identifying and differentiating grow crops and, simultaneously, providing the bases for the planning of an eventual genetic improvement program. Moreover, it would contribute for the improvement of orchards management, directly connected to productivity. Because of that, the present paper aimed at assessing the genetic diversity existing in developing individuals of *Carya illinoensis* in field conditions, through AFLP markers. Therefore the isolation of genomic DNA in leaves collected from 67 individuals from Anta Gorda and Arroio do Meio, RS, was realized using the protocol developed by Doyle and Doyle, in 1987, with modifications. DNA solution concentrations analyses were carried out in UV-Vis spectrophotometer and, then, restriction and amplifying stages, according to the protocol described by Vos and colleagues, in 1995, with modifications. The genetic relation between individuals was assessed by means of estimates of Jaccard's similarity coefficients and Principal Component Analysis (PCA). The average DNA concentration in the solutions had amplitude of 31,33 in 949  $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ . In the AFLP technique, only 12 samples succeeded (1, 5, 6, 8, 11, 23, 24, 34, 39, 44, 50 and 55), all of them from Anta Gorda. Genetic similarity varied from 0,6595 to 0,0357. In the PCA technique, the Axis 1 explained 25,54% of the existing variability in AFLP markers data, while the axis 2 explained other 17,53%. Two groups were observed, one of them formed by four individuals and the other by seven, one individual being isolated. The genomic DNA solutions present high concentration amplitude and it results in elevated polymorphism among the samples by the AFLP technique. Among the 67 genomic DNA solutions obtained, only 12 present functionality in the AFLP technique with the combination of primers tested. The 12 individuals assessed present a great amplitude variation in relation to Jaccard's similarity estimates, and show a low genetic similarity. PCA explains only around 43% of the whole variability. Those 12 individuals are distributed in two main groups, being one of them, of bigger similarity, formed by individuals from the same property while the second group, of a smaller similarity, is constituted by individuals located in four different properties. PCA shows coherence with the similarity estimates obtained and both analyses suggest there is a positive correlation between genetic dissimilarity and geographical distance between the *Carya illinoensis* individuals studied.

Key-words: "Nogueira pecã", AFLP markers, genetic diversity.

### 3.3 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética existente em indivíduos de *Carya illinoensis* em desenvolvimento em condições de campo, por meio de marcadores do tipo Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).

### 3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração das soluções de DNA genômico de *Carya illinoensis* por meio da leitura em espectrofotômetro UV-Visível Nanovue®.
- Avaliar a funcionalidade das soluções de DNA genômico de *Carya illinoensis* por meio da visualização em gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados.
- Analisar o relacionamento genético de 12 indivíduos de *Carya illinoensis* por meio de estimativas de similaridade e da Análise de Componentes Principais de dados obtidos a partir de marcadores AFLP.

### 3.5 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.5.1 Isolamento do DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) integra o tripé que sustenta a biologia, juntamente com o ácido ribonucleico (RNA) e as proteínas. De uma maneira reduzida, o DNA é, basicamente, transcrito em RNA, que, por sua vez, é traduzido em proteínas. Em um organismo superior qualquer, o material genético tem a capacidade de armazenar e transportar informações genéticas de uma célula para outra, ser copiado com precisão, e, no momento que for necessária a expressão do gene, realizar a tradução da informação para determinar o fenótipo do caráter pelo qual é responsável (PIRES et al., 2011).

Para que seja possível, entretanto, relacionar fenótipos e genótipos em nível molecular é imprescindível isolar o DNA dos demais componentes celulares, e, a

seguir, aplicar as diferentes técnicas da biologia molecular. Nesse sentido, a quantidade de DNA e, principalmente, sua qualidade são essenciais para as posteriores análises genéticas através de marcadores, que permitem a identificação e caracterização de cultivares, a análise da variabilidade genética de populações, a análise da estrutura e organização do genoma, o sequenciamento, entre outras aplicações (ALAGU LAKSHMANAN et al., 2016; DANNER et al., 2011). É importante considerar, também, que a coleta e o armazenamento do material vegetal podem interferir na qualidade do DNA, já que as características do tecido antes do isolamento afetam significativamente a qualidade, e, em decorrência disso, é recomendado utilizar tecido o mais fresco possível. Entretanto, têm-se a possibilidade da utilização do material armazenado congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  à  $-80^{\circ}\text{C}$ , por maior período de tempo, sendo necessários estudos específicos para testar a viabilidade desse material.

Existem na literatura diversos métodos de isolamento, e há também muitos registros de testes de variações realizadas de maneira a permitir a obtenção de soluções de DNA de qualidade e concentração adequadas, haja vista que os procedimentos devem ser adequados à espécie a ser estudada, e, também, à parte da planta que será empregada (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998; KOTZ et al., 2013). Dentre os problemas apresentados nos protocolos de isolamentos podem-se destacar: amostras com coloração escura ou marrom, com aspecto gelatinoso e viscoso em excesso, arraste vertical no gel antes da digestão com enzimas de restrição, entre outros, sendo utilizados reagentes como a polivinilpirrolidona (PVP), a proteinase K e a ribonuclease (RNase), para evitar contaminações ou, ainda, realizar procedimentos de purificação do DNA (PAIVA et al., 2014; ROMANO e BRASILEIRO, 1999).

Após o isolamento, o DNA deve estar livre de contaminantes, como proteínas, polissacarídeos, fenóis e outros compostos secundários, pois essas substâncias interferem no rendimento e, também, na qualidade do DNA. Além disso, interferem na eficiência da enzima *Taq* DNA polimerase, o que representa um dos principais problemas do processo de amplificação, haja vista que alguns protocolos de isolamento não são eficientes em sua eliminação efetiva. Adicionalmente, deve ser considerada a grande diversidade de espécies que apresentam níveis de polissacarídeos e fenóis, entre outros metabólitos secundários diferentes, o que torna necessária a otimização dos protocolos de isolamento do DNA para cada

espécie (DANNER et al., 2011; DESHMUKH et al., 2007; FERREIRA E GRATTAPLAGLIA, 1998; MAZZA e BITTENCOURT, 2000; PAIVA et al., 2014; SILVA, 2010; YAMAMOTO et al., 2013).

O protocolo de isolamento de DNA baseado em brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) é o mais utilizado, principalmente por ser mais adaptável a diversos tipos de tecidos e ser eficiente a partir de pequenas quantidades de material vegetal. Recebe essa denominação, pois utiliza o detergente de mesmo nome no tampão de extração, que solubiliza as membranas celulares. Para o tampão de extração ser eficiente, o pH deve ser selecionado; o CTAB utiliza um sistema tris-HCl pH 8 para manutenção do pH constante. Geralmente os protocolos de isolamento utilizam o pH entre 8 e 9, evitando, assim, que o pH fique ótimo para enzimas degradativas. Alguns componentes do tampão de extração têm como função a proteção do DNA contra enzimas ou compostos secundários que são liberados quando do rompimento das células, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), usado para inibir enzimas dependentes de metais, PVP, para reduzir o efeito da oxidação fenólica, entre outros.

As etapas de isolamento dos protocolos são, basicamente, a maceração do material vegetal, para a quebra da parede e da membrana celular, seguida pela adição do tampão de extração, para desnaturação da proteína e proteção do DNA, e, posteriormente, a adição do solvente orgânico clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), para separar a fase orgânica da aquosa, por centrifugação, em que o DNA e o RNA ficam retidos na solução aquosa enquanto as proteínas e contaminantes, na solução orgânica. Em seguida, é realizada a adição de álcool isopropílico, para precipitação do DNA, e, por fim, é realizada a lavagem do precipitado, e diluição em água ultra pura (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; KOTZ et al., 2013; PAIVA et al., 2014; ROMANO e BRASILEIRO, 1999).

### **3.5.2 Marcadores moleculares**

Os programas de melhoramento genético de plantas têm tido um ganho na sua eficiência, através da aplicação de tecnologias como os marcadores moleculares, que podem aumentar o entendimento sobre a domesticação, a variação, a evolução e o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas características de interesse (CAIXETA et al., 2013). Os marcadores, como seu nome

já diz, entre outras funções, identificam algo, ou seja, dentro do contexto da genética são utilizados para marcar alelos cuja expressão seja de difícil identificação.

Para um marcador ser eficiente é essencial que seja herdável, de fácil avaliação e esteja intimamente ligado ao alelo desejado (RAMALHO et al., 2012). Os marcadores são divididos em grupos de acordo com o método de análise: os que são baseados em hibridização; na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); e em sequenciamento. No primeiro grupo, a técnica mais utilizada é a de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP). Já no segundo grupo existe uma grande diversidade de técnicas, como a de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP), de microsátélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs), de Repetições entre Sequências Simples (ISSRs), de minissátélites ou Repetições em Tandem de Número Variável (VNTRs), entre outros. No terceiro grupo, há a técnica de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) (CAIXETA et al., 2013; GOLLE, 2010).

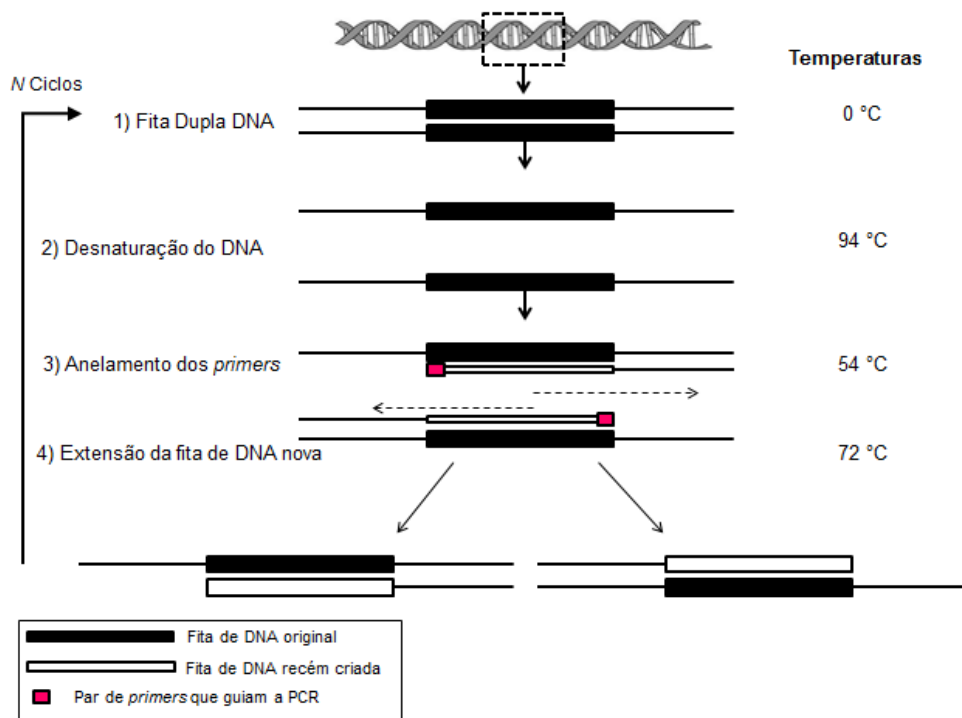
A hibridização consiste na detecção do grau de semelhança genética por meio de uma sonda específica, comparando uma sequência de DNA conhecida marcada com os fragmentos de DNA, obtidos pela digestão e restrição com enzimas, após a separação por eletroforese em gel de agarose e a transferência para um suporte sólido (membrana de nylon ou de nitrocelulose) (CAIXETA et al., 2013; MILACH, 1998).

A PCR é a técnica da biologia molecular que amplifica *in vitro* fragmentos de DNA pela ação de uma enzima de replicação que é adicionada. O ciclo da PCR envolve três etapas: desnaturação da fita dupla, anelamento dos iniciadores e extensão da cópia. O procedimento consiste basicamente em: (1) com alta temperatura (geralmente de 92 a 95 °C) ocorre a desnaturação do DNA de fita dupla para fita simples, a qual irá servir de molde para a amplificação; (2) a ligação do iniciador (pequeno fragmento de DNA de fita simples) ao molde, pela complementariedade de bases; (3) através da enzima DNA polimerase há a síntese da segunda fita do DNA-molde; (4) a desnaturação do fragmento de DNA dupla fita formado e início do novo ciclo. São repetidos ciclos até que se formem inúmeras moléculas de DNA (Figura 14) (CAIXETA et al., 2013; FERREIRA e GRATTAPLAGIA, 1998).

Como vantagem, a técnica da PCR tem a possibilidade de gerar quantidades expressivas de DNA a partir de fragmentos específicos do genoma, porém a

necessidade de construção de iniciadores específicos é limitante quando as espécies em estudo não possuem sequenciamento de nenhuma região de seu genoma. Em decorrência disso, como avanço na biologia molecular, eliminando a necessidade do conhecimento prévio de sequências, para marcadores RAPD podem-se utilizar iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2012).

Figura 14: Esquema ilustrativo da amplificação de fragmentos de DNA por meio de PCR.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Os marcadores de DNA são pouco influenciados pelo ambiente (BERED et al., 1997), o que constitui grande vantagem em análises genéticas, pois elimina a necessidade de homogeneização das condições em que os indivíduos a ser estudados estão se desenvolvendo. Os marcadores geram uma grande quantidade de informações sobre a identidade genética, diversidade, frequência gênica de um determinado germoplasma, bem como permitem conhecer relacionamentos filogenéticos e, também, a criação de estratégias de conservação dos recursos genéticos. Os marcadores podem ser empregados: na análise da diversidade

genética e seleção de genitores; proteção de cultivares e “fingerprinting” do DNA (ou seja, padrão molecular do DNA); análise da pureza genética de sementes; mapeamentos de genes e características complexas; melhoramento assistido por marcadores moleculares, como, retrocruzamentos assistidos e seleção assistida, entre outros (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al., 2009; LOPES et al., 2002; MILACH, 1999; TOPPA e JADOSKI, 2013).

A escolha do marcador a ser utilizado depende muito de qual o resultado se espera, e da espécie em estudo, por isso, é importante identificar as características de interesse e estabelecer objetivos claros para o programa de melhoramento ou conservação (MILACH, 1998). Para exemplificar, os marcadores RAPD, AFLP e microssatélites são mais apropriados para testes de paternidade, estudos de variabilidade dentro da mesma espécie, identidade genética. Já os marcadores RFLP são mais indicados para estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas (AZOFEIFA-DELGADO, 2006; CONNER e WOOD, 2001; FALEIRO, 2007; MILACH, 1999).

As técnicas RAPD e AFLP utilizam soluções de DNA de baixa concentração, são relativamente simples, rápidas e sensíveis, e são capazes de revelar uma grande quantidade de *locos* dispersos no genoma, não necessitando do conhecimento prévio da sequência de DNA da espécie estudada, como é o caso de diversas espécies, geralmente nativas. Porém, nos marcadores RAPD, os fragmentos de DNA são amplificados a partir de iniciadores aleatórios, já nos AFLP, com o uso de iniciadores específicos para adaptadores que são ligados aos fragmentos (LOPES et al., 2002; VENDRAME et al., 1999).

A técnica AFLP combina princípios dos marcadores RAPD e RFLP, e compreende algumas etapas necessárias, após o isolamento do DNA, a saber: digestão com enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente, a ligação a adaptadores, a amplificação em géis de alta resolução (poliacrilamida) e a visualização de fragmentos por coloração com prata ou fluorescência. É uma técnica de multilocus, considerada de alta eficiência, possui alto grau de polimorfismo, podendo se analisar um maior número de bandas. Em contrapartida, tem como desvantagem o fato de ser um marcador dominante, os quais não permitem a detecção de heterozigotos, ou seja, não é possível a diferenciar se a banda amplificada no gel é proveniente de um ou dois alelos. Desta maneira, estes marcadores revelam menos informações por loco comparado aos codominantes,

como, por exemplo, os microssatélites. Possui alto custo, pelas etapas e reagentes necessários, e, em decorrência disso, há a necessidade de se realizar testes e alterações visando otimização dos protocolos de amplificação por AFLP (AZOFEIFA-DELGADO, 2006; BUTTOW et al., 2010; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FREITAS et al., 2005; LOPES et al., 2002; MILACH, 1998).

Em espécies florestais, principalmente espécies nativas brasileiras ou até mesmo em exóticas de interesse econômico, porém pouco estudadas em relação à distribuição da variabilidade genética, entre e dentro de populações, têm sido utilizados marcadores dominantes, principalmente porque seu genoma não está sequenciado e, não há iniciadores específicos desenvolvidos. Para exemplificar, há estudos em *Butia capitata* (Butia), em que foi realizada a caracterização molecular de populações por meio de marcadores AFLP (BUTTOW et al., 2010), em *Nectandra megapotamica* (Canela preta), em que foi estudada a diversidade genética e analisada a estrutura de populações usando marcadores RAPD (COSTA, L. et al., 2015), em *Araucaria angustifolia*, para análise de diversidade genética em populações naturais, com RAPD (STEFENON et al., 2004), em *Psidium guajava* (Goiabeira), sendo avaliada a diversidade genética com a técnica RAPD (GOMES FILHO et al., 2010), entre outras espécies florestais que vêm sendo estudadas. Em *Carya illinoensis*, em especial, espécie estudada no presente trabalho, foi realizada uma análise da variação de embriões somáticos por marcadores AFLP (VENDRAME et al., 1999).

### 3.5.3 Descrição da espécie *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch

*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch é uma espécie florestal frutífera de clima temperado, popularmente conhecida como Nogueira pecã, pertencente à família Juglandaceae, originária dos Estados Unidos, nativa das matas ciliares da América do Norte, desde o Nebraska, Iowa, Illinois, Texas, até Oaxaca, no sul do México (FRONZA et al., 2013; MARCHIORI, 1997; ORO, 2007). É decídua, com folhas compostas e imparipinadas, com folíolos oblongo-lanceolados de margem serrilhada, casca de coloração acinzentada e tronco ereto relativamente curto.

Possui sistema radicular pivotante que pode ser quatro vezes maior que a largura da copa da árvore. Seus frutos (nozes) são de forma e tamanho variados, de acordo com a cultivar, variando de cilíndricos, alongados, até ovais com ápices



pontiagudos, estão inseridos em uma capsula esverdeada externamente e carnosa, que abre em quatro zonas de sutura equivalentes (Figura 15). Suas sementes apresentam dormência embrionária, o que dificulta a propagação via seminal.

É considerada uma espécie diploide, monoica-díclina, pois as inflorescências masculinas e femininas estão dispostas em estruturas florais diferentes na mesma planta, caracterizando-se como alógama, em que ocorre 95% de fecundação cruzada, assegurada por um sistema de heterodicogamia. Os padrões de herança para o tipo de dicogamia (protoginia ou protandria) foram determinados a partir de estudos de cruzamento realizados pelo programa de melhoramento de pecã do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, em Brownwood, Texas. Um clone (a cultivar 'Mahan') produziu progênie completamente protogínica ao passo que cruzamentos entre clones protândricos geraram apenas progênies protândricas. Um único par de alelos determina o tipo de dicogamia, com a protoginia sendo dominante (PP ou Pp) em relação à protandria, que é recessiva (pp) (THOMPSON e ROMBERG, 1985). A polinização é do tipo anemófila, sendo que seu pólen pode ser carregado pelo vento até 50 metros de distância (FRONZA et al., 2013; POLLETO et al., 2015; RASEIRA, 1990; STELLA e LUCCHESI, 2015).

A propagação da *Carya illinoensis* é normalmente realizada por enxertia de cultivares melhoradas sobre mudas de porta-enxertos. Entretanto, esse método de propagação, apesar de produzir mudas clonais dotadas de uniformidade, tem como desvantagem o tempo que consome, o custo e a baixa sobrevivência das mudas (RENUKDAS et al., 2010).

Atualmente, os maiores produtores de noz-pecã são os Estados Unidos e o México, porém também vem sendo cultivada na Argentina, Uruguai, Chile, Brasil e Austrália. No Brasil, o cultivo da *Carya illinoensis* se estende da região Sul ao estado de Minas Gerais, sendo que, na região Sul, em particular, as maiores extensões de área plantada estão nas regiões do Vale do Taquari, Rio Pardo e Central do estado do Rio Grande do Sul (POLETTO et al., 2015).

É uma espécie de grande importância em sistemas agroflorestais, pois, além de produzir frutos saborosos, possui madeira de boa qualidade, considerada nobre em seu país de origem, e muito utilizada na fabricação de móveis vergados (BELTRAME et al., 2012; GATTO et al. 2012). Seus frutos possuem alto valor nutricional, sendo uma fonte de potássio, tiamina, zinco, cobre, magnésio, fósforo, niacina, ácido fólico, ferro e vitamina B6, e, também, são uma ótima fonte de fibras,

além de ser ricos em ácido oleico, que é uma gordura monoinsaturada que pode auxiliar na prevenção de doenças cardíacas.

Os frutos são comercializados para o consumo *in natura* e para emprego na indústria farmacêutica, e, também, além das nozes, outras partes da planta têm sido utilizadas, especialmente as folhas. Também são reportados outros usos da *Carya illinoensis*, como em reposições de áreas de preservação permanente, auxiliando a rentabilidade das propriedades familiares, as quais, por conta da manutenção de áreas de preservação, têm que abandonar áreas de cultivo agrícola, e podem fazer do cultivo da *Carya illinoensis*, uma alternativa produtiva (CRUZ et al., 2014; STELLA e LUCCHESI, 2015; TERABE et al., 2008).

Figura 15: Aspectos silviculturais de *Carya illinoensis*: **(a)** Árvore matriz; **(b)** Folha com folíolos; **(c)** Casca; **(d)** Frutos.



Fonte: Adaptação de sites: [www.wholesalenurseryco.com](http://www.wholesalenurseryco.com), [DaleysFruit.com.av](http://DaleysFruit.com.av) e [www.treetopics.com](http://www.treetopics.com).

Com o crescente estímulo da imprensa, que vem demonstrando as propriedades benéficas das nozes à saúde, seu consumo tem aumentado, gerando uma expansão no cultivo da *Carya illinoensis*, também aliado ao alto valor pago pela fruta, demonstrando ser uma ótima fonte de renda, tanto para pequenos como grandes produtores.

Dentre os fatores a serem levados em consideração na produção de nozes, está a escolha das cultivares a serem implantadas, sendo importante que o plantio seja realizado com mais de uma cultivar, pois cada uma apresenta características diferenciadas em relação à precocidade de produção e polinização, resistência a doenças, tamanho do fruto, rendimento e qualidade (POLETTTO et al., 2012; STELLA e LUCCHESI, 2015). Nesse sentido, as principais cultivares de *Carya illinoensis* plantadas no Brasil são oriundas dos Estados Unidos, sendo as mais importantes: 'Mahan', 'Frotscher', 'Schley', 'Success' e 'MoneyMaker Barton', 'Shawnee', 'Cape Fear', 'Chickasaw' e 'Choktaw', 'Desirable', 'Melhorada', 'Imperial', 'Importada', 'Burkett', 'Chpecear', 'Shoshon'e (POLETTTO et al., 2012; ROVANI et al., 2015). Muitas dessas cultivares foram desenvolvidas no final do século XIX e anos iniciais do século XX por viveiristas que não realizavam registros e que não utilizavam práticas de proteção contra polinizações cruzadas indesejadas em seus pomares. Como consequência, somente o parental de semente de muitas cultivares é conhecido, ou nenhum deles (CONNER e WOOD, 2001). No Brasil, não há registro, na literatura técnica ou científica, de informações relacionadas à caracterização morfoagronômica nem, tampouco, molecular das cultivares utilizadas.

No Rio Grande do Sul, a introdução da *Carya illinoensis* teve início em 1943, com o plantio de quatro mudas no município de Anta Gorda, originárias dos Estados Unidos, as quais ainda existem no município e são consideradas ancestrais. A partir das décadas de 1960 e 1970, por meio da vigência de leis e incentivos governamentais, houve uma rápida expansão da cultura, a qual não foi acompanhada pelos necessários incrementos em conhecimentos científicos e tecnológicos que auxiliassem a qualificar a assistência técnica especialmente no que diz respeito à produção de mudas de qualidade genética. Assim, muitas vezes, os agricultores não sabem quais cultivares têm no campo, pois, geralmente, a identificação desses materiais é realizada após a frutificação, por meio de descritores morfológicos de frutos, o que demanda tempo e pode gerar confusão, haja vista que, muitas vezes, a diferença é apenas fenotípica, podendo ser alterada pelo ambiente, sem ter relação com o genótipo da planta (FRONZA et al., 2013). Adicionalmente, como os agricultores não dispõem de informações corretas sobre o manejo dos pomares, ocorrem cruzamentos não controlados, entre cultivares diferentes, resultando progênies seminais que podem gerar mudas com variações fenotípicas consideráveis (ÁVILA-TREVIÑO et al., 2013), e cuja paternidade é

desconhecida, o que contribui para aumentar a confusão existente em relação à origem dos materiais cultivados, apesar de predominarem mudas provenientes de enxertia, para comercialização.

Na Universidade da Geórgia, nos Estados Unidos, 100 marcadores RAPD foram utilizados para avaliar a relação genética entre 43 cultivares comerciais de *Carya illinoensis*, nas quais estão incluídas cinco ('Desirable', 'Barton', 'Mahan', 'MoneyMaker' e 'Success') das sete cultivares conhecidas avaliadas no presente estudo, sendo obtido um 'fingerprint' distinto para cada um dos genótipos estudados (CONNER e WOOD, 2001). Igualmente, como já mencionado anteriormente, também foi realizada uma análise da variabilidade genética em embriões somáticos de *Carya illinoensis* via marcadores AFLP, em que, embriões derivados da mesma linha de cultura apresentaram alta similaridade, no entanto, dentro de uma mesma linha houve algumas diferenças entre embriões, que exibiram polimorfismo elevado (VENDRAME et al., 1999).

Estudos relacionados à caracterização genética de cultivares de *Carya illinoensis* utilizadas no estado do Rio Grande do Sul podem auxiliar tanto na conservação da variabilidade genética como na melhoria das técnicas de manejo da produção dessa espécie. Podem constituir um subsídio importante para técnicos e produtores, fornecendo informações precisas acerca das cultivares e, como consequência, aumentando a qualidade do produto a ser comercializado e, desta forma, sua rentabilidade.

### 3.6 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia (CIPBiotec) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), São Gabriel, Rio Grande do Sul. Em seus laboratórios foram efetuadas as etapas de isolamento, restrição e amplificação do DNA, bem como as análises de diversidade genética.

#### 3.6.1 Material vegetal

Foram coletadas folhas de 67 indivíduos de *Carya illinoensis* que se encontram em desenvolvimento em condições de campo nos municípios de Anta

Gorda e Arroio do Meio, no Rio Grande do Sul (Tabela 4). Em todos os indivíduos amostrados realizou-se o referenciamento geográfico com o auxílio de um equipamento dotado de Sistema de Posicionamento Global (GPS) Garmin®, e, ainda, a identificação com placas de alumínio numeradas, visando auxiliar à localização desses indivíduos oportunamente.

Após a coleta, as folhas foram armazenadas, ainda levemente umedecidas, em sacos plásticos, previamente identificados, e transportadas até o laboratório. A seguir, foram selecionadas aquelas de maior sanidade e vigor, as quais foram armazenadas em sacos plásticos com sílica gel, sendo mantidas congeladas a -20°C, até o isolamento do DNA.

Tabela 4: Informação do município de coleta das folhas de *Carya illinoensis* (Nogueira pecã), a identificação da amostra e o nome da provável cultivar, quando conhecido. n.c – não conhecida; f – proveniente de semente, não monitorada.

Município	Amostra	Cultivar	Município	Amostra	Cultivar	Município	Amostra	Cultivar
	1	n.c		24	n.c		47	n.c
	2	n.c		25	n.c		48	n.c
	3	n.c		26	n.c		49	n.c
	4	n.c		27	n.c		50	'Melhorada'
	5	n.c		28	n.c		51	n.c
	6	n.c		29	n.c		52	n.c
	7	n.c		30	n.c		53	'Sucess'
	8	n.c		31	n.c	<b>Anta Gorda</b>	54	n.c
	9	n.c		32	'Maham'		55	n.c
	10	n.c		33	n.c		56	'Maham'
	11	n.c		34	n.c		57	'Desirable'
<b>Anta Gorda</b>	12	n.c	<b>Anta Gorda</b>	35	n.c		59	'Melhorada'
	13	n.c		36	n.c		60	'Barton'
	14	n.c		37	n.c		61	'Importada'
	15	n.c		38	n.c		62	'Melhorada'
	16	n.c		39	n.c	<b>Arroio do meio</b>	63	f
	17	n.c		40	'Melhorada'	<b>Anta Gorda</b>	65	'Moneymaker'
	18	n.c		41	'Melhorada'	<b>Arroio do meio</b>	66	f
	19	n.c		42	n.c	<b>Anta Gorda</b>	67	n.c
	20	n.c		43	n.c		69	f
	21	n.c		44	n.c	<b>Arroio do meio</b>	70	f
	22	n.c		45	f			
	23	n.c		46	f			

Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

### 3.6.2 Isolamento do DNA genômico

O isolamento do DNA das amostras de *Carya illinoensis* foi realizado de acordo com dois protocolos diferentes, sendo, ambos, modificações efetuadas no

protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Para 48 amostras foi utilizado o protocolo A, enquanto para 19 delas (identificadas como: 1; 4; 8; 11; 12; 23; 24; 34; 44; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 57; 60; 62; e 67), foi aplicado o protocolo B. Os protocolos são descritos a seguir.

- **Protocolo A**

Foram colocados aproximadamente 200 mg de folhas picadas em tubos tipo eppendorf de 2 mL, sendo inseridas duas *beads* em seu interior. A seguir, os tubos foram mantidos em nitrogênio líquido por 5 min, após o que foram colocados no TissueLyser II (Quiagen®), durante dois ciclos de 30 s, para a maceração das folhas.

Na continuidade, foi acrescentado o tampão de extração Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio - CTAB a 2% (NaCl a 1,4 M; EDTA a 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) a 100 mM; PVP-40 a 2%), e homogeneização com vórtex. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 min, homogeneizando por inversão a cada 10 min. Após este tempo, foram deixados na bancada até alcançar a temperatura ambiente, e, então, foram acrescentados 800 µL de clorofórmio-álcool isoamílico – CIA (24:1; v/v) em cada tubo, e homogeneizados por inversão durante 3 min. Em seguida, centrifugou-se a 14000 RPM por 5 min. Depois da centrifugação e da separação das partes orgânica e aquosa, foram transferidos 600 µL do líquido para dois tubos novos de 2 mL por amostra, e acrescentados 600 µL de CIA em cada tubo, os quais foram homogeneizados durante 3 min por inversão, e centrifugados a 14000 RPM por 5 min, novamente.

Após esta etapa foram transferidos para um tubo novo de 1,5 mL, 600 µL do líquido, e adicionados 2 µL de RNase A (a 10 µg mL<sup>-1</sup>) e incubados a 37°C por 30 min. Terminado esse tempo, foram adicionados 800 µL de álcool isopropílico (a -20°C) e mantidos por 1 h a -20°C. A seguir, foram centrifugados a 10000 RPM por 5 min, e depois disso, o álcool foi descartado com cuidado, e acrescentado 1 mL de etanol a 70% a -20°C, mantido por 5 min para a lavagem do precipitado de DNA, e centrifugado a 14000 RPM por 5 min. Na sequência, o etanol a 70% foi descartado, e acrescentou-se 1 mL de etanol a 90% a -20°C, sendo mantido por 3 min. Após o descarte do etanol a 90%, foi mantido o precipitado em temperatura ambiente, para secagem, por aproximadamente 10 min. Em seguida, o DNA foi diluído em 100 µL

de água ultra pura, mantido por 12 h em temperatura ambiente, e após armazenado a -20°C até o uso.

- **Protocolo B**

Neste protocolo, aproximadamente  $\frac{1}{4}$  do tubo de 2 mL foi, inicialmente, preenchido com folhas picadas, sendo colocadas duas *beads* em seu interior. Os tubos foram mantidos em nitrogênio líquido por 5 min, após o que foram colocados no TissueLyser II (Quiagen®) durante dois ciclos de 30 s, para a maceração das folhas.

A seguir, foi acrescentado o tampão de extração CTAB a 2% (NaCl a 1,4 M; EDTA a 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) a 100 mM; PVP-40 a 2%), mais 3  $\mu$ L de Proteinase K e 2  $\mu$ L de RNase A, e ocorreu a homogeneização com vórtex. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 min, homogeneizando por inversão a cada 10 min. Após este tempo, foram deixados na bancada até alcançar a temperatura ambiente, e, então, foram acrescentados 800  $\mu$ L de CIA em cada tubo, e homogeneizados por inversão durante 3 min. Em seguida, centrifugou-se a 14000 RPM por 5 min. Depois da centrifugação e da separação das partes orgânica e aquosa, 600  $\mu$ L do líquido foram transferidos para um tubo novo de 1,5 mL, foram adicionados 350  $\mu$ L de álcool isopropílico a -20°C e mantidos por 30 min a -20°C. Então, foram centrifugados a 10000 RPM por 5 min, e depois o álcool foi descartado com cuidado, sendo acrescentado 1 mL de etanol a 70% a -20°C, mantido por 5 min para a lavagem do precipitado de DNA, e centrifugado a 14000 RPM por 5 min. Após, o etanol a 70% foi descartado, e acrescentou-se 1 mL de etanol a 90% a -20°C, sendo mantido por 3 min. Após o descarte do etanol a 90% foi mantido o precipitado em temperatura ambiente para secagem, por aproximadamente 10 min. Em seguida, o DNA foi diluído em 100  $\mu$ L de água ultra pura, mantido por 12 h em temperatura ambiente, e, após, armazenado a -20°C até o uso.

### **3.6.3 Avaliações das soluções de DNA genômico**

As soluções de DNA genômico foram analisadas em espectrofotômetro UV-Visível Nanovue® GE, realizando-se três leituras sucessivas de cada amostra. O 'software' do equipamento realiza as leituras a 230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm,

sendo que o DNA absorve luz no comprimento de onda de 260 nm, e as proteínas, a 280 nm. Para estimar a concentração de DNA foi considerada a seguinte relação: 1 unidade de absorvância a 260 nm ( $Abs_{260}$ ) equivale a 50  $\mu\text{g}$  de DNA dupla fita. Portanto, a concentração de DNA na amostra pode ser obtida utilizando-se o cálculo a seguir:

$$\text{Concentração de DNA} = \text{leitura da } Abs_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição}$$

Deve-se considerar, adicionalmente, que para a mensuração da concentração de DNA é frequentemente utilizada uma correção, que pode ajustar os efeitos de turbidez, partículas dispersas e soluções tampão de alta absorção. O programa usa a correção padrão a 320 nm, a qual é subtraída da leitura no comprimento de onda de 260 nm, antes da utilização nas equações, em que:  $\text{Concentração} = (Abs_{260} - Abs_{320}) \times 50$  (General Electric Company, 2010).

Apesar de serem efetuadas, automaticamente, leituras em todos os comprimentos de onda mencionados anteriormente, serão apresentadas apenas as médias das três leituras efetuadas no comprimento de onda 260 nm.

### 3.6.4 Restrição e amplificação do DNA pela técnica de marcadores AFLP

As etapas de restrição e amplificação, foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Vos et al. (1995), com modificações descritas a seguir. Para a restrição enzimática do DNA foi adicionado, em tubos de reação de 0,5 mL, um Mix contendo: 0,25  $\mu\text{L}$  de MSE I ( $10 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ ); 0,125  $\mu\text{L}$  de PST I ( $20 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ ); 0,25  $\mu\text{L}$  de BSA (*Bovine Serum Albumin*) ( $10 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ ); 0,5  $\mu\text{L}$  de cada adaptador, *Mse* I e *Pst* I (50 pmol); 0,5  $\mu\text{L}$  da T4 DNA ligase; 2,5  $\mu\text{L}$  do tampão T4 DNA ligase 10x; 10  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, e por fim 10  $\mu\text{L}$  do DNA diluído 4X (10  $\mu\text{L}$  de DNA + 30  $\mu\text{L}$  de água pura). As reações foram realizadas em Termociclador Bioanalyzer C1000<sup>®</sup> durante 15 h a 37°C e 15 min a 72°C, e mantidas a 8°C.

Após o término da digestão do DNA, para a realização da amplificação foi adicionado, em tubos de reação de 0,5 mL, um Mix contendo: 2,5  $\mu\text{L}$  do *primer* marcado (PST I – GAG – 10 pmol); 0,5  $\mu\text{L}$  do *primer* MSE I (M – GAG – 50 pmol); 2  $\mu\text{L}$  de Mix de dNTPs (Desoxirribonucleotídeos fosfatados); 0,1  $\mu\text{L}$  da enzima *Taq* DNA polimerase; 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 2  $\mu\text{L}$  de tampão 10x sem  $\text{MgCl}_2$ ; 8  $\mu\text{L}$  de água



ultra pura, e 4 µL do DNA (produto resultante da primeira etapa de digestão). As reações foram realizadas em Termociclador Bioanalyzer C1000<sup>®</sup> constando de um ciclo de 2 min a 95°C, 26 ciclos de 95°C, 56°C e 72°C por 1 min cada, e por fim um ciclo de 5 min a 72°C, sendo mantidos a 4°C.

A separação dos fragmentos digeridos e amplificados foi realizada por eletroforese utilizando-se um sequenciador de DNA automatizado Li-Cor 4300 L<sup>®</sup> (Li-Cor Inc.), e analisados em SAGA<sup>GT</sup>Software<sup>®</sup>, para a análise das bandas, foi utilizando como base de identificação o *Ladder* do Licor IR-Dye<sup>®</sup> em que, os fragmentos cobrem uma gama de bandas de 50 a 350 pares de bases (pb). Após, foi realizada uma análise visual do gel para a correção de possíveis faixas mal marcadas, e, para cada amostra, a presença e ausência de bandas AFLP, foi transformada em uma matriz binária (0, 1) para posterior análise.

### 3.6.5 Análises dos dados moleculares

A partir da matriz de dados, foi calculado o coeficiente de similaridade de Jaccard para todos os pares de indivíduos, adotando-se a expressão:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

a - número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos simultaneamente;

b - número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i; e

c - número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j.

Com as estimativas dos coeficientes de similaridade de Jaccard foi realizada uma análise de componentes principais (ACP), com o auxílio do software PAST 3.04 (HAMMER et al., 2001), avaliando a relação genética entre os indivíduos, a partir dos dados dos marcadores AFLP.

### 3.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à concentração média de DNA das 67 soluções obtidas, observou-se uma amplitude de 31,33 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> na amostra 23 a 949 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> na amostra 19, obtendo-se um valor central dos dados analisados (mediana) de 412,83 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> correspondente à amostra 65, sendo que o valor que mais se repetiu entre os dados (moda) foi aquele de 142 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> (Tabela 5). A amplitude das concentrações foi muito ampla, e, ainda, houve variância nas concentrações de DNA entre as amostras, entretanto, foi observado que, mesmo naquelas amostras que apresentaram valores considerados inferiores, houve eficiência nas análises subsequentes (digestão e amplificação), por outro lado, amostras com valores superiores não apresentaram eficiência (Figura 16). Isso sugere que houve problemas nas leituras realizadas no equipamento, os quais podem ter sido ocasionados pelo *software* ou, então, por eventuais contaminações (por proteínas, polissacarídeos, polifenóis) associadas às soluções avaliadas, já que não foram realizadas análises de qualidade. De maneira similar, foi observado em tecidos humanos arquivados em hospitais, que, mesmo quando os resultados espectrofotométricos não detectaram a presença de DNA, a amplificação foi bem-sucedida. O que levou os autores a considerar que estes resultados não são parâmetros confiáveis para direcionar exclusivamente os procedimentos técnicos de isolamento (BAREA et al., 2004).

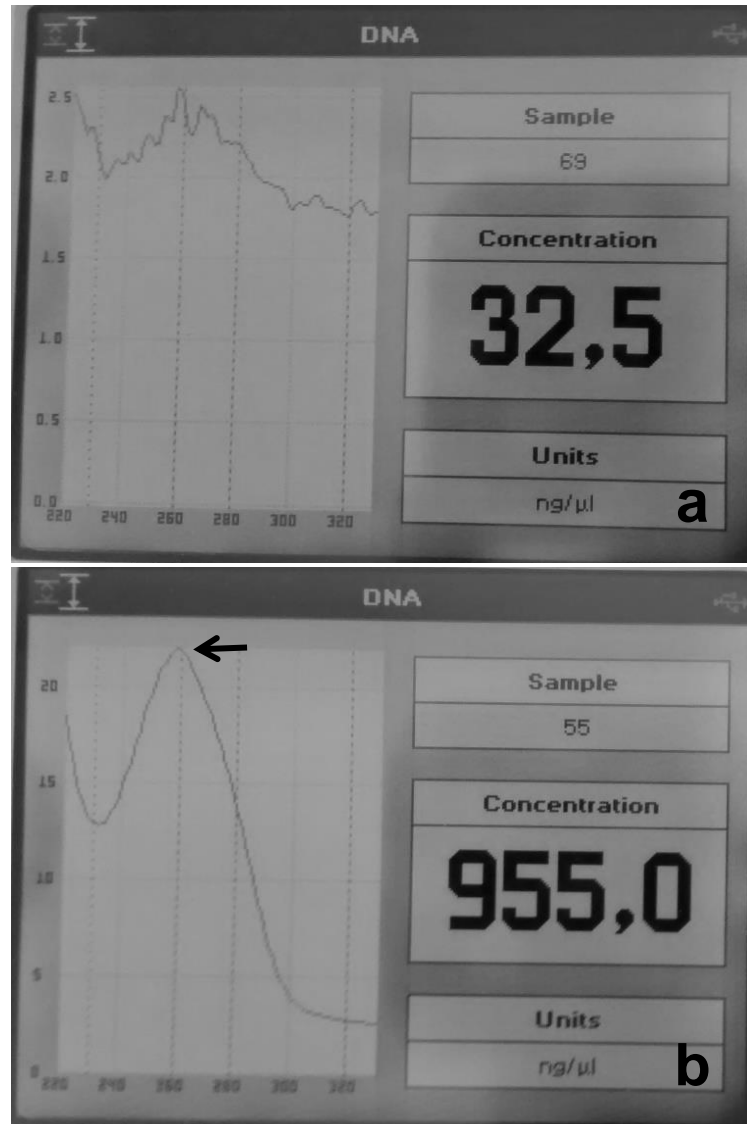
Adicionalmente, deve ser considerado que marcadores dominantes, como é o caso da técnica AFLP, apresentam relativa insensibilidade à concentração de DNA, o que constitui uma vantagem, ou seja, não são necessários valores elevados para a realização de análises subsequentes, sendo recomendadas concentrações em torno de 50 ng $\mu$ L<sup>-1</sup>. Entretanto, a pureza do DNA afeta diretamente as técnicas de marcadores AFLP (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998; VOS et al., 1995), o que pode explicar os resultados obtidos no presente trabalho com aquelas amostras que apresentaram concentrações elevadas, mas que não se revelaram funcionais, como será discutido a seguir.

Tabela 5: Média, moda e mediana da concentração ( $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ ) de DNA das amostras de *Carya illinoensis* (Nogueira pecã), após o isolamento pelos protocolos A e B.

Amostra	Média ( $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ )	Amostra	Média ( $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ )	Amostra	Média ( $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ )
1	84,33	24	103,83	47	490,50
2	69,50	25	713,50	48	653,17
3	142,00	26	501,00	49	571,83
4	130,33	27	688,17	50	208,33
5	94,00	28	607,00	51	138,00
6	172,50	29	846,67	52	106,33
7	205,67	30	584,17	53	187,33
8	138,33	31	464,33	54	105,67
9	130,50	32	324,17	55	64,67
10	196,33	33	788,83	56	726,50
11	144,00	34	78,50	57	190,67
12	79,67	35	439,50	59	446,17
13	142,00	36	508,83	60	137,33
14	295,00	37	672,17	61	482,33
15	728,00	38	353,67	62	154,67
16	685,17	39	347,83	63	568,50
17	668,67	40	473,83	65	412,83
18	707,00	41	496,33	66	456,83
19	949,00	42	428,00	67	103,00
20	518,67	43	506,33	69	709,83
21	628,50	44	95,83	70	452,67
22	561,33	45	386,00		
23	31,33	46	374,33		
<b>Moda</b>			142		
<b>Mediana</b>			412,83		

Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Figura 16: Saídas do software do Nanovue® GE mostrando o gráfico (à esquerda) e uma das três leituras realizadas a 260 nm (à direita) de duas amostras de soluções de DNA genômico de *Carya illinoensis* (Nogueira pecã), representando a amplitude de variação na concentração, em (a) indivíduo 23, e (b) indivíduo 19. A seta indica a curva próxima àquela que seria considerada ideal, com o pico a 260 nm.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Como resultado dos procedimentos de isolamento de DNA, digestão e amplificação pela técnica AFLP, somente 12 das amostras tiveram êxito, três (5, 6 e 39) das quais foram isoladas com o emprego do protocolo A, e nove (1, 8, 11, 23, 24, 34, 44, 50 e 55), com o B (Figura 17), todas coletadas em quatro propriedades localizadas no município de Anta Gorda. Dentre esses indivíduos, apenas o de número 50 é de uma cultivar conhecida na região, denominada 'Melhorada'.

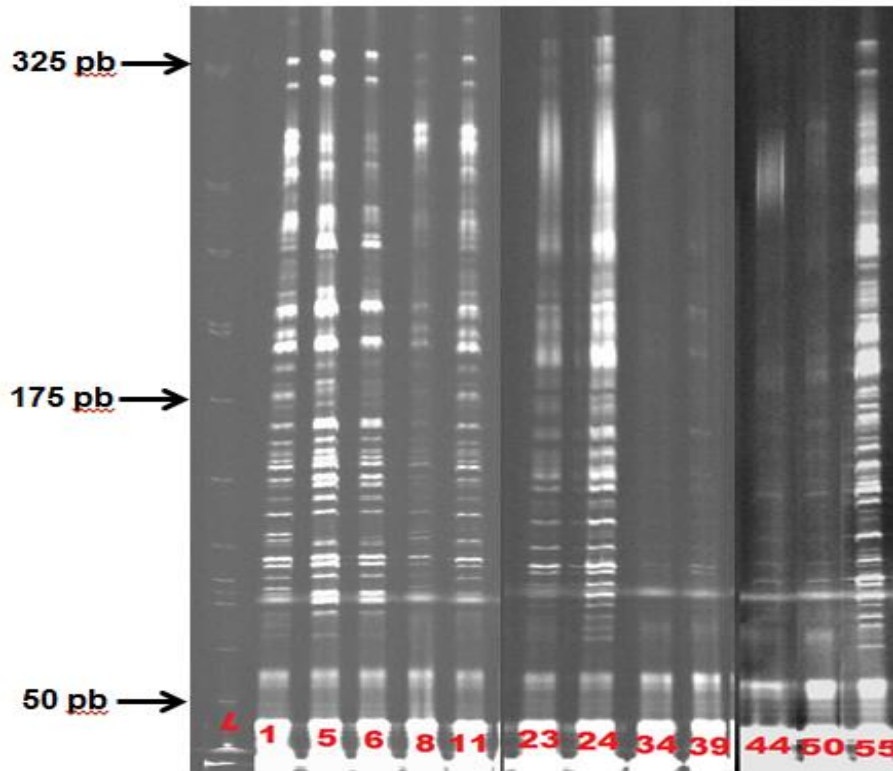
Entretanto, como não constituía objetivo do presente trabalho comparar protocolos de isolamento e selecionar o(s) mais eficiente(s), não foram isoladas todas as amostras com ambos os protocolos, e, portanto, não é possível afirmar que há superioridade de um em relação ao outro.

Com o par de iniciadores AFLP utilizado foram encontrados 97 fragmentos polimórficos. Já em estudo com acessos de várias espécies de *Jatropha*, quatro combinações de iniciadores AFLP produziram 369 fragmentos, com uma média de 92,25 fragmentos por combinação (SINHA et al., 2014).

Na Figura 17 pode-se observar a amplitude dos fragmentos amplificados, que variaram de 78 a 319 pb, e, também, o polimorfismo existente entre os indivíduos. De maneira similar, em *Jatropha* sp., as combinações de iniciadores produziram fragmentos entre 80 e 400 pb.

Na Figura 17 verifica-se que os fragmentos das amostras 34, 39, 44 e 50 apresentaram menor resolução, o que pode ser decorrente de diferenças na qualidade das soluções de DNA. Igualmente, em *Olea europaea* (Oliveira), o isolamento de DNA foi o passo mais crítico para o procedimento AFLP, haja vista que a pureza e a degradação do ácido nucléico, possivelmente afetaram a detecção de alguns fragmentos, entretanto foi possível a identificação de fragmentos com alta intensidade, entre as cultivares testadas (PAFUNDO et al., 2005), assim como foi observado no presente estudo. Da mesma maneira, a combinação de iniciadores AFLP foi capazes de produzir um elevado número de fragmentos polimórficos, e foram eficientes na caracterização de cultivares de *Vitis vinifera* (Videira) (CERVERA et al., 2000).

Figura 17: Aspecto dos fragmentos resultantes da amplificação de DNA genômico pela combinação de iniciadores AFLP PST I – GAG e MSE I - GAG utilizada em 12 indivíduos de *Carya illinoensis* (Nogueira pecã). Os fragmentos foram revelados por eletroforese em gel de poliacrilamida em sequenciador de DNA Li-Cor 4300 L® (Li-Cor Inc.), marcados e analisados por meio do SAGA<sup>GT</sup> Software®.



Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Na Tabela 6 é apresentada a matriz de similaridade, calculada a partir de estimativas de Jaccard, na qual pode-se observar uma amplitude de variação de 0,0357 a 0,6595 entre os 12 indivíduos avaliados, em que a maior similaridade (0,6595) foi estimada ocorrer entre os indivíduos 5 e 6, enquanto a menor similaridade (0,0357), entre os pares 34 e 50. Em outro trabalho, as estimativas de similaridade genética, obtidas para 43 cultivares de *Carya illinoensis* a partir dos dados de 100 iniciadores RAPD e baseadas no coeficiente de Nei e Li, apresentaram uma amplitude menor, variando de 0,46 a 0,91 (CONNER e WOOD, 2001), mas revelaram uma similaridade maior entre as cultivares analisadas. Assim, pode-se inferir que os indivíduos de Pecã avaliados no presente estudo são relativamente mais dissimilares. Em acessos de várias espécies de *Jatropha*, as estimativas de Jaccard variaram de 0,165 a 0,993, sendo relatado que níveis de

variação similares têm sido observados em muitos estudos em nível de espécie (SINHA et al., 2014).

No que diz respeito à localização, os indivíduos 5, 6 (o par mais similar) e 34 estão em desenvolvimento na mesma propriedade em Anta Gorda, enquanto o 50 foi coletado em outra propriedade, no mesmo município, sugerindo uma aparente relação da dissimilaridade genética com a distância geográfica, a qual deve ser melhor investigada. De maneira similar, em estudos realizados com *Butia capitata* para caracterização de indivíduos entre populações dentro de regiões por meio de marcadores AFLP, foi demonstrado que as maiores similaridades ocorreram entre dois indivíduos da mesma região (BUTTOW et al., 2010), concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, os autores identificaram também que dois indivíduos de regiões diferentes apresentaram similaridade elevada, discordando do observado no presente experimento.

Adicionalmente, três genótipos de *Prunus mume* (Umezeiro) (Clone 05; cv. Rigitano e Clone 15), provenientes de mudas de origem seminal, cujos parentais são desconhecidos, foram diferenciados geneticamente por meio dos marcadores fAFLP, sendo que os dois primeiros apresentaram similaridade maior entre si, do que entre estes e o terceiro. Além disso, os autores afirmaram que a técnica AFLP é uma excelente alternativa para realizar caracterização genética de espécies cujos indivíduos são semelhantes fenotipicamente (WICKERT et al., 2007), o que está de acordo com o presente trabalho, haja vista que os indivíduos de *Carya illinoensis* amostrados não diferem fenotipicamente. Igualmente, em *Heliconia ortotricha* e *Heliconia caribaea* (Caeté) os marcadores AFLP foram eficientes na diferenciação entre espécies, entretanto a alta variabilidade genética dos indivíduos dificultou a análise a nível intraespecífico, não sendo possível sua associação com uma cultivar em específico (GIRALDO, 2014). Por outro lado, as análises de similaridade realizadas após a amplificação com marcadores AFLP, não foram capazes de diferenciar acessos de *Morus alba* (Amoreira) com frutos roxos e frutos brancos (KAFKAS et al., 2008).

Tabela 6: Matriz de similaridade obtida pelo *Software* PAST 3.04, calculada baseada em estatísticas de similaridade de Jaccard, das soluções amplificadas pela técnica de marcadores AFLP em 12 indivíduos de *Carya illinoensis* (Nogueira pecã).

Amostras	1	5	6	8	11	23	24	34	39	44	50	55
1	1											
5	0,5	1										
6	0,362	0,6595	1									
8	0,1607	0,1228	0,2173	1								
11	0,421	0,4285	0,3584	0,2888	1							
23	0,1851	0,2352	0,2222	0,1388	0,1632	1						
24	0,2295	0,2758	0,2	0,1818	0,2363	0,3783	1					
34	0,1702	0,0588	0,0454	0,1428	0,0909	0,1071	0,0769	1				
39	0,2653	0,22	0,2325	0,1818	0,1956	0,2666	0,1951	0,3181	1			
44	0,08	0,06	0,0465	0,1071	0,0681	0,1111	0,1714	0,05	0,1666	1		
50	0,1071	0,109	0,0816	0,1818	0,1	0,2258	0,1666	0,0357	0,125	0,2173	1	
55	0,2533	0,2916	0,25	0,2033	0,2253	0,228	0,3064	0,0701	0,0967	0,0714	0,1724	1

Fonte: Autor, Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

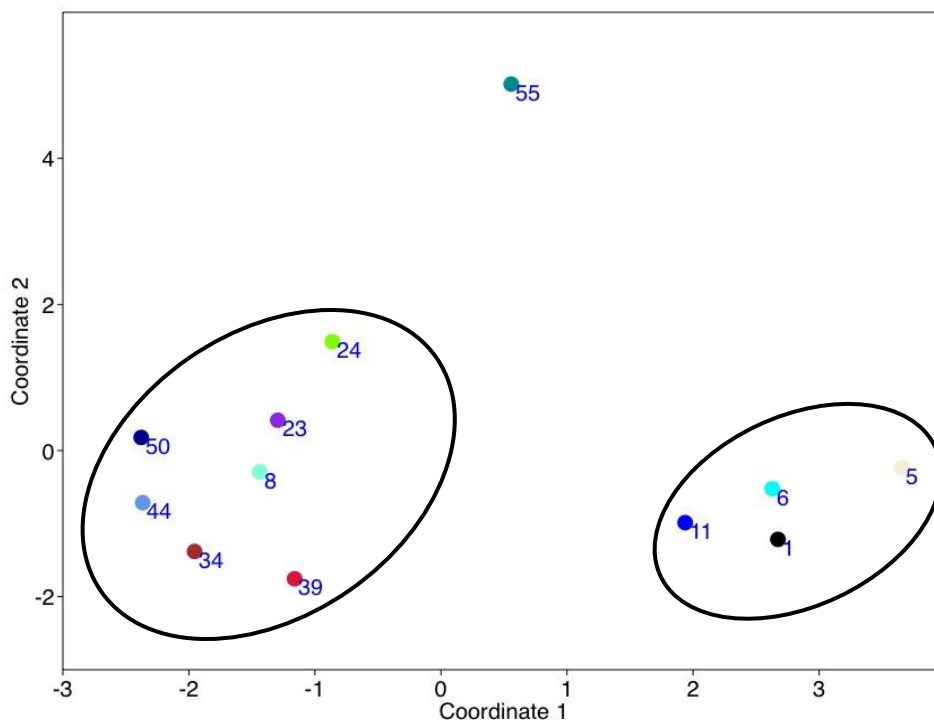
Na Figura 18 é apresentada a relação genética entre os 12 indivíduos resultante da Análise de Componentes Principais (ACP). O Componente Principal (CP) 1 foi responsável pelo máximo da variabilidade revelada pelos marcadores AFLP (25,54%), enquanto o CP 2, por 17,53%, dessa variância, que não está correlacionada àquela do CP 1 anterior; os dois componentes explicaram, no total, 43,07% da variabilidade total observada. Esse total é reduzido, e explica uma parte pequena da variância total, haja vista que pelo menos 70% da variância total devem ser explicadas pelos dois primeiros componentes principais (RENCHER, 2002). Essa análise agrupou os indivíduos de acordo com sua variação, com base no comportamento apresentado em relação à presença/ausência de fragmentos amplificados pela combinação de enzimas e iniciadores utilizados, mas considerando que foram gerados por apenas uma combinação de enzima-iniciador, é possível que a utilização de um número maior de combinações possa explicar melhor a variação observada.

Observa-se, também, na Figura 18, a formação de dois grupos: o primeiro, de maior similaridade genética (com estimativas variando de 0,3584 a 0,6595), formado por quatro indivíduos (1, 5, 6, e 11), os quais estão em desenvolvimento na mesma propriedade e podem ter uma origem comum, e o segundo, de menor similaridade genética (estimativas variando de 0,0357 a 0,3787), constituído por sete outros indivíduos (8, 23, 24, 34, 39, 44 e 50), os quais encontram-se localizados em quatro



propriedades diferentes, sendo que uma delas, na qual se encontram os indivíduos 8, 23, 24 e 34 (suas estimativas variaram entre 0,0769 – par 24-34 – e 0,3783 – par 23-34), é a mesma em que estão os quatro membros do primeiro grupo, aqueles que são mais similares entre si. Os três indivíduos restantes do segundo grupo encontram-se, portanto, em três propriedades diferentes e suas estimativas variaram entre 0,125 (39 e 50) e 0,2173 (44 e 50). O indivíduo 55 (o qual encontra-se localizado na mesma propriedade do indivíduo 50), cujas estimativas de similaridade variaram de 0,0714 a 0,3064 em relação às árvores 44 e 24, respectivamente, ficou isolado entre os dois grupos, apresentando similaridade intermediária. Assim, o gráfico resultante da Análise de Componentes Principais demonstra coerência com as estimativas de similaridade obtidas e ambas as análises, portanto, revelam indícios de uma correlação positiva entre dissimilaridade genética e distância geográfica entre os indivíduos de *Carya illinoensis* estudados. Em *Butia capitata* foi observada uma tendência de agrupamento dos indivíduos provenientes da mesma região (BUTTOW et al., 2010), o que está de acordo com os resultados observados no presente trabalho.

Figura 18: Relação genética de 12 indivíduos de *Carya illinoensis* (Nogueira pecã) obtida pela Análise de Componentes Principais no *Software* PAST 3.04. Demonstrando a variabilidade existente nos dados de marcadores AFLP.



O indivíduo 50, o único que é de cultivar conhecida, denominada 'Melhorada', apresentou maior similaridade com a amostra 23 (0,2258), porém de baixa magnitude, indicando que, provavelmente, constituem cultivares diferentes.

### 3.8 CONCLUSÃO

As soluções de DNA genômico apresentam grande amplitude de concentração e elevado polimorfismo entre as amostras resultantes da técnica de marcadores AFLP, entretanto, amostras que apresentam concentrações elevadas não se revelam funcionais, sugerindo que não é afetada pela quantidade de DNA, mas por sua pureza.

Dentre as 67 soluções de DNA genômico obtidas, somente 12 apresentam funcionalidade na técnica de AFLP com a combinação de iniciadores testada.

Os 12 indivíduos avaliados apresentam uma grande amplitude de variação em relação às estimativas de similaridade de Jaccard, e revelam uma baixa similaridade genética.

A Análise de Componentes Principais explica apenas cerca de 43% da variabilidade existente nos dados de marcadores AFLP. Os 12 indivíduos distribuem-se em dois grupos principais, o primeiro, de maior similaridade genética, é formado por que estão em desenvolvimento na mesma propriedade e podem ter uma origem comum, e o segundo, de menor similaridade genética, é constituído por indivíduos que se encontram localizados em quatro propriedades diferentes, sugerindo uma aparente relação da dissimilaridade genética com a distância geográfica.

A Análise de Componentes Principais demonstra coerência com as estimativas de similaridade obtidas e ambas as análises, portanto, revelam indícios de uma correlação positiva entre dissimilaridade genética e distância geográfica entre os indivíduos de *Carya illinoensis* estudados.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avançou em alguns aspectos em relação àquele realizado por Golle (2010), e confirmou que é possível a formação calogênica em discos foliares de *Eugenia involucrata* visando à embriogênese somática indireta.

Pode-se observar que, em alguns casos, a contaminação bacteriana não interfere na desdiferenciação celular do explante e os primeiros dias de cultivo *in vitro*, até a primeira transferência para meio fresco, é o período mais crítico à contaminação.

Adicionalmente, a manutenção dos calos formados em discos foliares de *Eugenia involucrata* em meio nutritivo, por período prolongado, pode causar exaustão de nutrientes e acúmulo de substâncias tóxicas. Assim, após a formação de uma grande massa de calos, devem ser transferidos para um meio nutritivo isento de fitorreguladores, e com concentração de sacarose reduzida, para posterior transferência para as fases de desenvolvimento e maturação dos eventuais embriões formados.

Por fim, embora não tenham sido realizadas análises comparativas sobre o tipo de recipiente mais adequado para a indução à calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata*, pode-se observar que o processo é mais eficiente quando realizado em placas de petri do que em frascos com capacidade para 150 mL.

No que diz respeito análise molecular exploratória de indivíduos de *Carya illinoensis* também foi obtido êxito, haja vista que foi possível a amplificação de fragmentos por meio da técnica de marcadores AFLP e a identificação de, pelo menos, dois grupos diferentes dentro da amostragem de 12 indivíduos com o emprego de apenas um par de *primers*. Análises com um maior número de *primers* e indivíduos deverão ser realizadas e, provavelmente, propiciarão maior conhecimento sobre o relacionamento genético entre eles, permitindo, simultaneamente, avanços no conhecimento científico dessa cultura.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. F. de; PEDROTTI, E. L. Micropropagação de macieira: Avanços nos protocolos de micropropagação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Edição 31, jul/dez. 2003.
- ABREU, I. N. et al. Avaliação de diferentes concentrações de auxinas e tipos de explantes na indução e crescimento de calos de *Cissus sicyoides* L., uma planta medicinal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 83-89, 2003.
- ADERKAS, P. V.; BONGA, J. M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, v. 20, 2000.
- ALAGU LAKSHMANAN, G. M.; MANIKANDAN, S.; GOPI, R. A New Improved Protocol to Obtain Pure Genomic DNA from *Plectranthus forskohlii* (Willd.) Briq. **Species**, 17(54), 15-27, 2016.
- ALBAGLI, S. **Interesse global no saber local: geopolítica da biodiversidade**. Seminário “Saber Local/ Interesse Global: propriedade intelectual, biodiversidade e conhecimento tradicional na Amazônia, Cesupa, Belém, set. 2003.
- AMARAL de DEUS, D. et al. Calogênese em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 717-719, jul. 2007.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodouon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ANDRADE, J. B. R. **Efeito dos agentes de maturação, ABA, PEG e maltose, na produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em cultura embriogênicas de *Araucaria angustifolia***. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, departamento de Botânica. Universidade de São Paulo. São Paulo - SP, 2010.
- ÁVILA-TREVIÑO, J. A. et al. Respuestas morfogénicas en la propagación *in vitro* de nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Revista Chapingo**, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 2013.
- AZOFEIFA-DELGADO, Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía Mesoamericana**, 17(2): 221-242. 2006.
- BACKES, P; IRGANG, B. **Árvores do sul: Guia de identificação e interesse ecológico – As principais espécies nativas do sul – brasileiras**. 1 ed., Pallotti Clube da árvore: Instituição Souza Cruz, 2002. 325p.: il.

- BANDINELLI, M. G. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, 31: 242-247, 2013.
- BARBEDO, C. J. et al. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 20, no 1, p.184-188 – 1998.
- BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Rev. bras. hematol. Hemoter.**, 26(4):274-281, 2004.
- BARRIA, M. J. Etileno. In: **Introdução aos Hormônios Vegetais**. CID, L. P. B. (Ed.), Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.
- BARROS, L. de M. Embriogênese Somática: Pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano 2, Número 7 - Janeiro/Fevereiro 1999.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, 2006
- BELTRAME, R. et al. Resistência ao impacto da madeira de noqueira-pecã em diferentes condições de umidade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.9, set, 2012.
- BESSON, J. C. F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, jan./mar. 2010.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.
- BRACK, P.; KINUPP, V. F.; SOBRAL, M. E. G. Levantamento preliminar de espécies frutíferas de árvores e arbustos nativos com uso atual ou potencial do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, fev. 2007.
- BRANDÃO, M; LACA-BUENDÍA, J. P; MACEDO, J. F. **Árvores Nativas e Exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528.: il. color.
- BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G., CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2º ed., Lavras: UFLA, 2006. 319p.
- BUTTOW, M. V. et al. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 1, p. 230-239, Março 2010.

- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Capítulo 2: Marcadores Moleculares. In: **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. 336p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. . In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A (Ed.), Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v. 1, il., 1998.
- CAMARGOS, J. A. A. et al. **Catálogo de árvores do Brasil**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Laboratório de produtos florestais, 1996. 888p.: il.
- CARDOSO, N. S. N. **Avaliação da *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão sob diferentes formas de cultivo: Crescimento, atividade antimicrobiana e compostos fenólicos**. Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana – Bahia, 2009.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. 593p. il. Color, v. 3.
- CARVALHO, P. E. R. Cerejeira: *Eugenia involucrata*. **Comunicado técnico – 224**. ISSN 1517-5030. Embrapa florestas, Colombo – PR, 2009.
- CERVERA, M. T. et al. Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers. **Vitis**, 39 (3), 109- 114 2000.
- CHOER, E.; MONKS, P. L.; FORTES, G. R. L. Calogênese e brotações adventícias em tecido somático de Kiwi suplementados com Thidiazuron. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 369-373, 1997.
- CID, L. P. B. **Citocininas em Plantas Superiores: Síntese e Propriedades Fisiológicas. Capítulo II do livro: Hormônios Vegetais em Plantas Superiores / editor técnico L. Pedro Barrueto Cid**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188p.
- CLEMENT, C. R. Frutas latino-americanas pouco utilizadas: oportunidades para desenvolvimento rural. In: **III Simpósio nacional do morango, II encontro sobre pequenas frutas e Frutas nativas do Mercosul (palestras)**, ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B.(Ed.), Documento 171 – Embrapa Pelotas – RS, out. 2006.
- CONNER, P. J.; WOOD, B. W. Identification of Pecan Cultivars and Their Genetic Relatedness as determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. **J. AMER. SOC. HORT. SCI.** 126(4):474–480. 2001.

CORADIN, L; SIMINSKI, A; REIS, A. **Espécies nativas da Flora Brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília – DF: MMA, 2011. 934p.: il.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Thidiazuron – induced highfrequency plant regeneration from leaf explants of *Paulownia tomentosa* mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 2, p. 197 - 208, Nov. 2008.

COSTA, A. S. et al. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. **Scientia plena**, v. 11, n. 1, 2015.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S. Seleção de auxinas para a indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* visando o estabelecimento de cultivo de células em suspensão. In: 45 Congresso Brasileiro de Olericultura, 15 Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas ornamentais e 2 Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 23, 2. 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: CBCEARÁ, 2005. p. 656.

COSTA, L. S. et al. Study of the genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, 14 (4): 18407-18413, 2015.

CRUZ, F. G. et al. Efectividad biológica de extractos de *Carya illinoensis*, para el control de *Meloidogyne incognita*. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Vol.5 Núm.7, p. 1317-1323, 2014.

DANNER, M. A. et al. Fenologia da floração e frutificação de mirtáceas nativas da floresta com araucária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 32, n. 1, p. 291-295, março, 2010.

DANNER, M. A. et al. Proposta de protocolo para extração de DNA de jaboticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, abr.-jun., 2011.

DEGENHARDT, J.; FRANZON, R. C.; COSTA, R. R. **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 211, p. 22, 2007.

DELGADO, L. F; BARBEDO, C. J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.265-272, fev. 2007.

DESHMUKH, V. P. et al. A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Argot. **Electronic Journal of Biotechnology**, Vol.10 No.3, Issue of July 15, 2007.

DIAS, P. C. et al. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 36, n. 3, p. 389-399, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-5, 1987.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: **Molecular Genetics of Forest Trees**. J.-E. Hällgren (ed.), Frans Kempe Symp., Swedish Univ. Ag. Sci., Umea, Sweden, pp. 147-186, 1988.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: Fundamentos e Práticas**. Pelotas - RS, 2008.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina – DF, Embrapa Cerrados, 102p., 2007.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 267-270, Agosto 2006.

FARIAS, J. A. C. et al. Estrutura fitossociológica de uma Floresta Estacional Decidua na região de Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 4, n. 1, p. 109-128, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3º ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. p. 220.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FLORES, R. et al. Embriogênese somática e Organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 993-995, 2007.

FRANZON, R. C; RASEIRA, M. do C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 18-20, Abril 2006.

FREITAS, M. L. M. et al. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, n. 68, p.21-28, ago. 2005.

FRONZA, D.; POLETTO, T.; HAMANN, J. J. **O cultivo da noqueira-pecã**. UFSM, Colégio politécnico, Núcleo de Fruticultura Irrigada. 2013.

GATTO, D. A. et al. Segregação do lenho de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) pela variação radial da massa específica básica. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, suplemento, p.838-843, 2012.



GENERAL ELECTRIC COMPANY. Product User Manual of NAnoVue Plus®. GE Healthcare, 2010. Disponível em:  
<https://issuu.com/gehealthcarelifesciences/docs/nanovue-plus-user-manual>.

GIRALDO, L. M. L. **Caracterización de dos genotipos de *Heliconias* propagadas *in vitro* y estabilidad genética de *H. caribaea* mediante marcadores moleculares AFLP**. Trabajo de investigación presentado para optar al título de magíster en biología vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira, Universidad de Caldas, Universidad del Quindío, Pereira, 2014.

GOLLE, D. P. et al. Melhoramento Florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1606-1613, ago., 2009.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). 2010. 159 f. ; il.

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S. Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução a calogênese em Cerejeira-do-mato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1759-1762, out., 2013.

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, jan./mar., 2013.

GOMES FILHO, A. et al. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas Benzilamino purina e Thidiazuron, na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* MAID. **Bol. Pesquisa Florestal**, Colombo, n.43, p.107-112, jul./dez. 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 183-242, 1998.

GUERRA, M. P; TORRES, A. C; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A (Ed.), Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 2, (510; 354p.); il., 1999.

GUERRA, M. P. et al. Araucária: Evolução, ontogênese e diversidade genética. In: **Origem e evolução de plantas cultivadas**. BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (Ed.) Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 149-184.

GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, nov./dez., 2009.

HAMMER O.; HARPER, DAT; RYAN PD. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** 4: 4, 2001

HINOJOSA, G. F. Auxina em Plantas Superiores: Síntese e Propriedades Fisiológicas. In: **Hormônios Vegetais em Plantas Superiores**. CID, L. P. B. (Ed.), Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188p.

HOFFMANN, A; FACHINELLO, J. C; NACHTIGAL, J. C. Formas de propagação de plantas frutíferas. In: **Propagação de Plantas Frutíferas**. FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Ed.), Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.; il.

HOSSEL, C. et al. Manejo da poda de raízes no transplante de mudas de fruteiras nativas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 36, n. 3, p. 761-765, set. 2014.

KAFKAS, S. et al. Molecular Characterization of Mulberry Accessions in Turkey by AFLP Markers. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 133(4):593–597. 2008.

KOTZ, F. A.; ARTMANN, M.; AARESTRUP, J. R. O uso de etanol e isopropanol na extração de DNA de plantas. **Revista de Biologia e Farmácia**, vol. 09, n. 04, 2013.

KUNZ, S. H. et al. Fitossociologia do componente arbóreo de dois trechos de floresta estacional perenifolia, Bacia do Rio das Pacas, Querência - MT. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 1-11, jan.-mar. , 2014.

LAMEIRA, O. A. et al. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de Erva-baleeira (*Cardia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 47-49, 1997.

LATTUADA, D. S.; SOUZA, P. V. D.; GONZATTO, M. P. Enxertia herbácea em Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 32, n. 4, p. 1285-1288, dez. 2010.

LEMES, C. S. R. et al. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.3, p.499-505, mar, 2016.

LEMOS, E. E. P. de. Ácido Abscísico em Plantas Superiores: Síntese e Propriedades Fisiológicas. In: **Hormônios Vegetais em Plantas Superiores**. CID, L. P. B. (Ed.), Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188p.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev., 2008.

- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, **Washington**, v. 30, 1981.
- LONGHI, R. A. **Livro das árvores: Árvores e arvoretas do sul**. Porto Alegre: L&PM. 1995. 176p.: il.
- LONGHI, S. J. et al. Aspectos fitossociológicos de fragmento de Floresta Estacional Decidual, Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 59-74, 2000.
- LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, 2002.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, vol. 1, 6<sup>o</sup> ed., 2014.
- LUZ, J.M.Q. et al. Ação do etileno em combinação com Thidiazuron, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico na cultura de anteras de pimentão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 226-230, nov. 1999.
- MALUF, A. M; BILIA, D. A. C; BARBEDO, C. J. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 471-475, Jul/Sept. 2003.
- MANTOVANI, N. et al. Micropropagação de plantas ornamentais. In: **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. PETRY, C. (Org.), 2<sup>o</sup> ed. ver. E ampl., Passo Fundo: Ed. UPF, 2008.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 217p.: il., 1997.
- MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Bol. Pesquisa Florestal**, Colombo-PR, n. 41, p.12-17, jul./dez., 2000.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 5, 1998.
- MILACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. QUEIRÓZ, M. A. de.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. Petrolina – PE: Embrapa Semi-Árido/ Brasília – DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, nov., 1999.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Bioma Pampa**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>. Acesso em: Janeiro de 2017.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, 174-177, set.-dez., 1999.

MODESTE, K. K. et al. Callogenesis and Somatic embryogenesis induction in *Hevea brasiliensis*: effects of fruit shelf-life and carbon source. **Research in Biotechnology**, 3(6): 42-50, 2012.

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

NARVAES, I. S.; BRENA, D. A.; LONGHI, S. J. Estrutura da regeneração natural em Floresta Ombrófila mista na floresta nacional de São Francisco de Paula, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 4, p. 331-342, 2005.

NASCIMENTO, H. E. M.; LAURANCE, W. F. Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de floresta de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. **Acta amazonica**, vol. 36(2), 2006. p. 183-192.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*byrsonima intermedia* a. juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 2013.

ORO, T. **Composição nutricional, compostos bioativos e vida de prateleira de noz e óleo prensado a frio de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]**. Dissertação de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. (UFSC). Florianópolis, 2007.

PAFUNDO, S.; AGRIMONTI, C.; MARMIROLI, N. Traceability of Plant Contribution in Olive Oil by Amplified Fragment Length Polymorphisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 18, p. 6995-7002, 2005.

PAIVA, R. M. S. de. et al. Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima. **Bol. Mus. Int. de Roraima**, v. 8(2): 68-74, 2014.

PEREIRA, A. R. et al. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de Cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, v.4, n.1-2, p.77-80, 2003.

PERES, L. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: Um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Biociência** - n.º 25- março/abril 2002.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15 ed. Piracicaba: FEALQ, 451p. 2009.

PINTO, L. P. (Coord.). Mata Atlântica e Campos Sulinos. In: **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. MAURY, C. M. (Org.). Brasília: MMA/SBF, 2002.

PIRES, I. E. et al. **Genética Florestal**. Viçosa – MG: Arka, 2011. 318p.

POLETTI, T. et al. Análise de características dos frutos de cultivares de noqueira-pecã cultivadas no Rio Grande do Sul. In: **XVI Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Santa Maria: UNIFRA, 2012.

POLETTI, T. et al. Métodos de superação de dormência da semente de Nogueira pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 39, n. 6, p. 1111-1118, 2015.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 2º ed., São Paulo: Globo; Lavras, MG: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 1990.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na Agropecuária**. 5º ed. rev., Ed. UFLA, Lavras – MG, 2012.

RASEIRA, A. **A cultura da Nogueira-pecã**. Embrapa, comunicado técnico. 1990.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 498-500, jul., 2007.

RENCHER, A.C. Methods of Multivariate Analysis. **A John Wiley & Sons**, inc. Publication.p.727. 2 ed. 2002.

RENUKUN, N. N.; MANOHARAN, M.; GARNER, J. O. Jr. In vitro propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. **Plant Biotechnology**, 27, 211–215, 2010.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. C. Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 537-541, set/out., 2009.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biociência** - n.º 9, 1999.

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Caracterização de três espécies florestais de importância econômica. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 5, n. 2, p. 145-152, jul./dez., 2014.

ROVANI, F. F. M.; WOLLMANN, C. A.; MONTEIRO, A. Exigências bioclimáticas e riscos climáticos ao cultivo da noqueira pecã (*Carya illinoensis*) no Rio Grande do Sul, Brasil. In: **Atas do X Congresso Da Geografia Portuguesa: Os Valores da Geografia**, ROXO, M. J. et al., Ed. Associação Portuguesa de Geógrafos, Lisboa, set., 2015.

SANTOS, C. M. R. et al. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de *Myrtaceae* nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 13-20, 2004.

SANTOS, M. R. A. et al. Estabelecimento *in vitro* e calogênese em explantes foliares de pupunheira. **Rev. Ciências Agrárias**, v. 55, n. 3, p. 197-203, jul./set. 2012.

SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies florestais nativas do sul do Brasil. **Informativo ABRATES**, v. 20, n. 1,2 p. 039-044, 2010.

SARMENTO, M. B.; SILVA, A. C. S.; SILVA, C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no Sul do Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v. 24, n. 4, p. 250-262, out./dez. 2012.

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

SCIPIONI, M. C. et al. Fitossociologia em fragmento florestal no noroeste do estado do rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 409-419, jul.-set., 2011.

SERROTE, C. M. L.; REINIGER, L. R. S.; STEFENON, V. M. **Simulações em Genética de Populações e Conservação de Recursos Florestais**. Jundiáí, Paco Editorial: 2016. 116p.

SILVA, A. C. et al. Relações florísticas e fitossociologia de uma Floresta Ombrófila Mista Montana secundária em Lages, Santa Catarina. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 193-206, jan.-mar., 2012.

SILVA, A. S. et al. Diferentes reguladores de crescimento na indução de calos e pró-embriões em anteras de cafeeiro. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 19-27, July/Aug. 2009.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de Murici-pequeno**. Dissertação de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Lavras. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, 2009.

SILVA, M. B.; RAMOS, A. R.; VENTURIERI, G. A. Indução de calos em espécies amazônicas do gênero *Theobroma*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 257-265, mar./abr., 2006.

SILVA, M. N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010.

SIQUEIRA, H. F. et al. A família Myrtaceae no Brasil. 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte, MG, nov. 2013.

SINHA, P. et al. Genetic variability among *Jatropha* species as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 496-501, October, 2014.

SOUZA, K. C. A.; ABREU, H. S. Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação. **Floresta e Ambiente**, v. 14, n. 1, p. 93 – 109, 2007.

STACHEVSKI, T. W.; FRANCISCON, L.; GOLDBACH, J. D. Efeito do meio de cultura na calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 75, p. 339-342, jul./set., 2013.

STEFANEL, C. M. **Aspectos da qualidade de sementes e do estabelecimento *in vitro* de *eugenia involucrata* De Candolle**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). 2016. 101 f.

STEFENON, V. M.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. **Biotemas**, 17 (1): 47 - 63, 2004.

STELLA, A. L. S.; LUCHESE, O. A. Avaliação da bibliografia livre como subsídio aos sistemas de cultivo de noqueira pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. **V seminário de Inovação e Tecnologia**, UNIJUÍ, 2015.

TERABE, N. I.; MARTINS, C. M.; HOMECHIN, M. Microrganismos associados a frutos de diferentes cultivares de noz pecan. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 659-662, mar./abr., 2008.

THOMPSON, T. E.; ROMBERG, L. D.; HERED, J. Inheritance of heterodichogamy in pecan. **Oxford journals**, 76 (6): 456-458., Nov., 1985. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110144>

TONETTO, T. da S; et al. Dinâmica Populacional e Produção de Sementes de *Eugenia involucrata* na Floresta Estacional Subtropical. **Floresta e Ambiente**, 2013; 20(1):62-69.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

UTINO, S; CARNEIRO, I. F; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*. I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 225-229, agosto 2001.

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. Dissertação de mestrado no programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Universidade do Paraná (UFPR), Curitiba – PR, 2007.

VENDRAME, W. A.; KOCHERT, G.; WETZSTEIN, H. Y. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. **Plant Cell Reports**, 18: 853–857 1999.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série técnica IPEF – ESALQ/USP**, v. 12, n. 32, p. 25-42, dez. 1998.

VIEIRA, A. H. et al. Técnicas de produção de sementes florestais. **Comunicado técnico 205**, Embrapa – CPAF Rondônia, p. 2-4, ago. 2001.

VIEIRA, R. F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2006. 320 p.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Vol. 23, No. 21 4407-4414, 1995.

WICKERT, E. et al. Marcadores fAFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1741-1746, dez. 2007.

WERNER, E. T. et al. Indução da calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1053-1055, jul. 2007.

WERNER, E. T. et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Bot. Bras.** 24(4): 1046-1051, 2010.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

YAMAMOTO, E. L. M. et al. Otimização de protocolo para extração de DNA em umbu-cajazeira. In: **I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO (v.2)**, Universidade Católica de Pernambuco - Recife - PE - Brasil – nov., 2013.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: **Cultivo *in vitro* de plantas**. CID, L. P. B. (Ed.), Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 303p.