

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

Charlene Moro Stefanel

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE
GENÉTICA EM *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE (MYRTACEAE)**

Santa Maria, RS
2020

Charlene Moro Stefanel

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM
Eugenia involucrata DE CANDOLLE (MYRTACEAE)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal**

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Stefanel, Charlene
PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE
GENÉTICA EM *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE (MYRTACEAE) /
Charlene Stefanel.- 2020.
125 p.; 30 cm

Orientadora: Lia Reiniger
Coorientadora: Marlove Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2020

1. Cerejeira-do-mato 2. Micropropagação 3.
Ministaquia 4. Microssatélites I. Reiniger, Lia II.
Muniz, Marlove III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

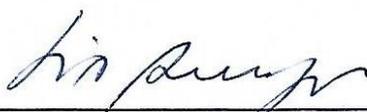
Declaro, CHARLENE STEFANEL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Charlene Moro Stefanel

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM
Eugenia involucrata DE CANDOLLE (MYRTACEAE)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal**

Aprovado em 20 de fevereiro de 2020



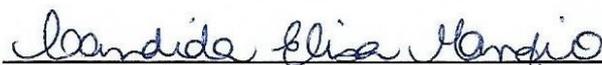
Lia Rejane Silveira Reiniger Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



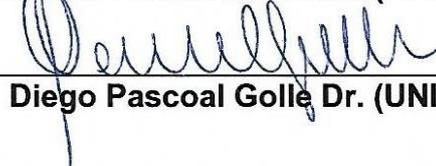
Aline Ferreira Paim Dra. (UFSM)



Aline Ritter Curti Dra. (UFPEL)



Candida Elisa Manfio Dra. (EPAGRI/SC)



Diego Pascoal Golle Dr. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS
2020

*Dedico esse trabalho aos meus pais
Anílze e Mauro, por todo o amor e dedicação!*

“Me recordo de cada flor que veio à tona só porque tive coragem de cuidar da semente. Só porque não me acovardei, mesmo que tantas vezes com todo medo do mundo”.

(Ana Jácomo)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas, proteção e força para concluir esse trabalho.

Aos meus pais, Anílze e Mauro, por todo o amor, carinho, dedicação e confiança, não terei palavras para agradecer todo o esforço feito por vocês para a realização de mais essa etapa.

À minha irmã, Eveline, pelo carinho e apoio durante toda a minha trajetória.

Ao Jardel, por todo apoio, carinho e companheirismo.

À minha orientadora, professora Dra. Líia Rejane Silveira Reiniger, pela oportunidade, confiança, ensino e dedicação para que fosse possível a conquista de mais esta etapa da minha vida. Serei eternamente grata à você!

À Universidade Federal de Santa Maria por todo o conhecimento, ensino e formação.

À Universidade Federal do Pampa (Campus São Gabriel), em especial ao professor Dr. Valdir Stefenon pela oportunidade de realizar as análises moleculares no Núcleo de Genômica e Ecologia Molecular.

À CAPES pela concessão da bolsa, que viabilizou a execução deste trabalho.

À banca, pelas sugestões e auxílio na elaboração da tese.

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, muito obrigada pelo auxílio nos experimentos e momentos de descontração.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero reconhecimento e gratidão.

Muito obrigada!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria
Data e local da defesa: Santa Maria, 20 de fevereiro de 2020.

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE (MYRTACEAE)

AUTORA: Charlene Moro Stefanel
ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger

Eugenia involucrata é dotada de elevado potencial econômico e ambiental, entretanto, a recalcitrância de suas sementes ao armazenamento dificulta a produção de mudas por via sexuada e justifica a realização de estudos relacionados à propagação vegetativa. Igualmente, a sustentabilidade dos remanescentes naturais encontra-se ameaçada devido à crescente fragmentação a que os ecossistemas florestais têm sido submetidos nas últimas décadas. Essas questões expõem a necessidade da realização de estudos que forneçam subsídios para a produção de mudas por propagação vegetativa e para a conservação de recursos genéticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar aspectos das técnicas de micropropagação e miniestaquia, bem como quantificar a variabilidade genética e analisar a estruturação genética de três fragmentos naturais de *E. involucrata*. Foram realizados diversos experimentos, sendo que, primeiramente, foi analisado o modo de utilização do antibiótico sulfato de estreptomicina e seu efeito no controle *in vitro* de bactérias endógenas em brotações de *E. involucrata*. Também, avaliou-se o efeito do antioxidante Polivinilpirrolidona (PVP) no meio nutritivo ½MS e do ácido giberélico (GA₃) no alongamento *in vitro* de segmentos nodais. Ainda, observou-se a influência de quatro cores de Diodos Emissores de Luz - LEDs (branca, azul, vermelha e verde) e lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia no cultivo *in vitro* de *E. involucrata*. Foi analisada a influência de diferentes concentrações dos fitorreguladores BAP, AIB, CIN e ANA na multiplicação *in vitro*. Ainda, foi avaliado o efeito do PVP e ácido ascórbico previamente ao enraizamento e, também, analisado o efeito de AIB no enraizamento das miniestacas de *E. involucrata*. Além disso, foram efetuados experimentos para analisar a estrutura e a diversidade genética de três fragmentos naturais de *E. involucrata*, utilizando-se marcadores microssatélites. Foi observado que a adição do antibiótico sulfato de estreptomicina ao meio nutritivo ½MS na ausência de contaminação prévia nos explantes controla a proliferação das colônias bacterianas. Por outro lado, a imersão dos explantes no antibiótico não controla a proliferação de bactérias. O uso do PVP no meio nutritivo ½MS é dispensável. GA₃ apresentou efeito positivo no alongamento *in vitro*. As lâmpadas LEDs possuem efeito favorável no desenvolvimento *in vitro* da espécie. Os fitorreguladores BAP, CIN e AIB são dispensáveis, entretanto, ANA a 2µM é importante na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. involucrata*. Em relação à propagação da espécie via miniestaquia, não se observou efeito dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico sobre a oxidação fenólica, a qual, inclusive, teve média reduzida (11,81%). No experimento subsequente, a oxidação foi baixa (18,33%) e a rizogênese foi igualmente muito

reduzida (1,11%) e não foi afetada pelo AIB apesar de serem testadas concentrações altas (até 10.000mg L⁻¹) da auxina. Os fragmentos de *E. involucrata* analisados apresentaram elevada variabilidade genética, a maior parte distribuída dentro dos próprios remanescentes, e baixa diferenciação genética. Em relação ao modo de reprodução, classificam-se como mistos com predominância de cruzamentos. O conjunto de resultados obtidos poderá contribuir para a continuidade das pesquisas relacionadas à *E. involucrata* em diversas áreas de conhecimento, as quais ainda não haviam sido exploradas.

Palavras-chave: Cerejeira-do-mato; Micropropagação; Miniestaquia; Microssatélites.

ABSTRACT

Doctor Thesis
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria
Date and place of defense: Santa Maria, RS, February 20th, 2020.

VEGETATIVE PROPAGATION AND ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE (MYRTACEAE)

AUTHOR: Charlene Moro Stefanel
ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

Eugenia involucrata is endowed with high economic and environmental potential, however, the recalcitrant seed storage makes it difficult to produce seedlings by sexual way and justify studies related to vegetative propagation. Besides that, the sustainability of natural remnants is under threat due to the increasing fragmentation to which forest ecosystems have been subjected in recent decades. These questions justify studies that provide subsidies for seedling production by vegetative propagation and for the conservation of genetic resources. Thus, the present study aimed to investigate aspects of micropropagation and minicutting techniques, as well as to quantify genetic variability and to analyze the genetic structure of three natural fragments of *E. involucrata*. Several experiments were performed whereby, first, the antibiotic was analyzed using the method streptomycin sulfate and its effect *in vitro* control of endogenous bacteria in shoots of *E. involucrata*. Also, the effect of antioxidant PVP on the nutrient medium $\frac{1}{2}$ MS and gibberellic acid (GA_3) on *in vitro* elongation of nodal segments was evaluated. The influence of four colors of Light Emitting Diodes - LEDs (white, blue, red and green) and cold white fluorescent lamps of daylight type were observed in the *in vitro* culture of *E. involucrata*. Also, the influence of different concentrations of BAP, IBA, KIN and NAA on *in vitro* multiplication was analyzed. Also, the effect of PVP and ascorbic acid prior to rooting was evaluated and the effect of IBA on rooting of *E. involucrata* minicuttings was also analyzed. In addition, experiments were performed to analyze the structure and genetic diversity of three natural *E. involucrata* fragments using microsatellite markers. Addition of the antibiotic streptomycin sulfate to the $\frac{1}{2}$ MS nutrient medium in the absence of prior explant contamination controls the proliferation of bacterial colonies. Moreover, immersion of explants in the antibiotic does not control the proliferation of bacteria. The use of PVP in the nutritional medium $\frac{1}{2}$ MS is not necessary. GA_3 has a positive effect on *in vitro* elongation. LEDs lamps have a favorable effect on the *in vitro* development of the species. BAP, KIN and IBA phytohormones are dispensable, however, 2 μ M NAA is important in the *in vitro* multiplication of *E. involucrata* shoots. Regarding the propagation of the species via minicutting, there was no effect of antioxidants PVP and ascorbic acid on phenolic oxidation, which even had a reduced average (11.81%). In the subsequent experiment, oxidation was low (18.33%) and rhizogenesis was also very low (1.11%) and unaffected by IBA despite high concentrations (to 10.000mg L⁻¹) of auxin being tested. The *E. involucrata* fragments analyzed showed high genetic variability, mostly distributed within the remnants themselves, and low genetic differentiation. Regarding the mode of reproduction, they are classified as mixed with predominance of crosses. The set of results obtained may contribute to the continuity

of research related to *E. involucrata* in several areas of knowledge, which had not yet been explored.

Keywords: Wild Cherry; Micropropagation; Minicutting; Microsatellites.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 - Representação dos locais de ocorrência de *Eugenia involucrata* De Candolle no Brasil.20
- Figura 2 - Aspecto do fuste (A), frutos (B), sementes (C), tronco (D), botões florais (E) e flores (F) característicos da espécie *Eugenia involucrata* De Candolle. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.....22

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Oxidação fenólica em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, inoculados em meio nutritivo MS com a concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS) contendo $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de PVP, após 30 dias de cultivo *in vitro*, cuja oxidação não prejudicou o desenvolvimento das gemas axilares pré-existentes. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.....47
- Figura 2 - Altura média dos brotos (cm) obtidos a partir de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em função das concentrações de GA_3 (0; 1; 2 ou $4 \mu\text{M}$) adicionadas ao meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 201749
- Figura 3 - Número de brotos obtidos a partir de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em função das concentrações de GA_3 (0; 1; 2 ou $4 \mu\text{M}$) adicionadas ao meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 201750
- Figura 4 - Representação ilustrativa das brotações de *Eugenia involucrata* cultivadas *in vitro*, em função de diferentes concentrações de GA_3 adicionadas ao meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS, independentemente do período de cultivo *in vitro*. Observa-se em "A" brotações na ausência do fitorregulador; "B" brotações na presença de $1 \mu\text{M}$ de GA_3 ; "C" brotações na presença de $2 \mu\text{M}$ de GA_3 ; e "D" brotações na presença de $4 \mu\text{M}$ de GA_3 . Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.50

CAPÍTULO IV

- Figure 1 - Number of shoots (A), number of leaves (B) and number of calluses per explant (%) (C) in *E. involucrata* nodal segments on different 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations, regardless 6-benzylaminopurine (BA) concentrations, after 60 days of *in vitro* culture on $\frac{1}{2}$ MS nutritive medium..70
- Figure 2 - Aspects of *E. involucrata* explants in the MS nutritive medium, in the absence of phytohormones, after 60 days of *in vitro* culture. It is observed, in 'A', the emission of several shoots (highlighted by the arrows) and, in 'B', the aspect of bud formation (arrow 1) and the development of adventitious bud (arrow 2). Bar = 1 cm.....71
- Figure 3 - Leaf emission in *E. involucrata* explants after 60 days of *in vitro* culture on the $\frac{1}{2}$ MS nutritive medium as a function of different 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations, regardless 6-benzylaminopurine (BA) concentrations. A. Several leaves emitted in the absence of phytohormones. B. The aspect of leaf formation in the presence of IBA ($30 \mu\text{M}$) (highlighted by the arrows). Bar = 1 cm.72

Figure 4 - Callus formation in *E. involucrata* after 60 days of *in vitro* culture on the ½MS nutritive medium as a function of different 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations, regardless 6-benzylaminopurine (BA) concentrations. A. Callus formation in the presence of IBA (20 µM) (highlighted by the arrow), shoot emission (arrow 1) and adventitious bud formation (arrow 2). B. The aspect of callus formation in the presence of IBA (30 µM) (highlighted by the arrow). Bar = 1 cm.....73

CAPÍTULO V

Figura 1 - Aspectos da indução de gemas, brotações e folhas em *Eugenia involucrata* na presença de 2 µM de Ácido α-naftalenoacético (ANA) no meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS), após 90 dias de cultivo *in vitro*. Observa-se em 'A' aspecto da formação de gemas (setas); em 'B' emissão de brotações (destacadas pelas setas); e em 'C' emissão de diversas folhas no explante (setas). Barra = 1 cm..83

CAPÍTULO VI

Figura 1 - Miniestacas de *Eugenia involucrata* tratadas com diferentes concentrações de dois antioxidantes – ácido ascórbico ou PVP - (0; 0,5; 1,0 ou 1,5g L⁻¹), aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação, dotada apenas de nebulização controlada (UR 80%). Em 'A' miniestacas dispostas em bandeja. Em 'B' detalhe de uma miniestaca de *E. involucrata*. Barra = 1cm.91

Figura 2 - Miniestaca de *Eugenia involucrata* aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação, dotada apenas de nebulização controlada (UR 80%). Em 'A' miniestaca enraizada com a utilização de 0,5g L⁻¹ de ácido ascórbico. Em 'B' detalhe da raiz originada em miniestaca de *E. involucrata*. Barra = 1cm93

Figura 3 - Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Eugenia involucrata* em função das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s, independentemente do período de cultivo.....94

Figura 4 - Oxidação (%) de miniestacas de *Eugenia involucrata* em função das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10.000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s, independentemente do período de cultivo.....98

Figura 5 - Miniestaca enraizada de *Eugenia involucrata*, independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s, e do período de cultivo, que se deu em casa de vegetação dotada apenas de nebulização controlada (UR 80%). Em 'A' miniestaca enraizada. Em 'B' detalhe da raiz originada em miniestaca de *E. involucrata*. Barra = 1cm.99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Contaminação bacteriana (%) e número de folhas por explante em brotações de *Eugenia involucrata* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), em função da imersão e/ou inoculação no sulfato de estreptomicina (SE).....39

CAPÍTULO II

Tabela 1. Sobrevivência (%), estabelecimento *in vitro* (%) e oxidação fenólica (%), observadas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, após a inoculação em meio $\frac{1}{2}$ MS contendo diferentes concentrações de PVP, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.....46

Tabela 2. Sobrevivência (%) observada em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, após a inoculação em meio $\frac{1}{2}$ MS contendo diferentes concentrações de GA₃.....48

CAPÍTULO III

Tabela 1. Estabelecimento (%), número de folhas, número de brotos e contaminação bacteriana (%) em explantes de *Eugenia involucrata*, em função de diferentes tipos de luz, cultivados em meio nutritivo MS, com a concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*.....61

CAPÍTULO V

Tabela 1. Número médios de brotos e folhas aos 90 dias de multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*, em meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS) em função de Ácido α -naftalenoacético (ANA) independentemente de Cinetina (CIN). Santa Maria, RS, UFSM, 2019... 81

CAPÍTULO VI

Tabela 1. Sobrevivência (%) e número de folhas em miniestacas de *Eugenia involucrata* em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias) independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.96

CAPÍTULO VII

Tabela 1. Estimativa de parâmetros genéticos por loco microssatélite e por fragmento de *Eugenia involucrata*. A é o número médio de alelos por loco por fragmento; A_e é o número médio efetivo de alelos por loco por fragmento; H_o é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; F_{IS} é o Índice de Fixação; n é o número de indivíduos analisados; At é o número total de alelos; A_{excl} é o número de alelos exclusivos..... 117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	Ácido 3-Indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
CIN	Cinetina
CV	Coeficiente de variação
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GA₃	Ácido giberélico
IV	Índice de variação
LEDs	Diodos emissores de luz
MET	Máxima eficiência técnica
MS	Murashige e Skoog
SSR	Simple sequence repeat
PVP	Polivinilpirrolidona
SE	Sulfato de Estreptomicina
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UR	Umidade relativa do ar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
WPM	<i>Woody Plant Medium</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	17
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. CAPÍTULO I	27
ARTIGO 1 – USO DE ANTIBIÓTICO NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Eugenia involucrata</i>	28
4. CAPÍTULO II	40
ARTIGO 2 – ANTIOXIDANTE E GIBERELINA NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eugenia involucrata</i> DE CANDOLLE	41
5. CAPÍTULO III	56
ARTIGO 3 – DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eugenia involucrata</i>	57
6. CAPÍTULO IV	67
ARTIGO 4 – 6-BENZYLAMINOPURINE AND 3-INDOLBUTYRIC ACID ON THE <i>IN VITRO</i> MULTIPLICATION OF <i>Eugenia involucrata</i>	68
7. CAPÍTULO V	77
ARTIGO 5 – ÁCIDO α -NAFTALENOACÉTICO E CINETINA NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eugenia involucrata</i>	78
8. CAPÍTULO VI	87
MINIESTAQUIA DE <i>Eugenia involucrata</i>	88
9. CAPÍTULO VII	104
ARTIGO 6 – VARIABILIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA EM FRAGMENTOS DE <i>Eugenia involucrata</i> DE CANDOLLE	105
10. CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
APÊNDICE A – ENSAIO PUBLICADO NOS ANAIS DA XXXIII JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	125

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é composto pela sua apresentação e a discussão dos resultados obtidos nos experimentos que compõem a Tese de Doutorado em Engenharia Florestal. No primeiro momento, apresenta-se uma introdução com informações sobre a espécie florestal em estudo, suas principais utilizações e potenciais de exploração. São relatados os principais entraves na sua propagação, bem como duas técnicas visando contornar a dificuldade da reprodução por sementes, bem como o estado da arte da silvicultura da espécie, de modo a fornecer informações que permitam compreender o conjunto de dados e resultados já obtidos. Tais informações são primordiais no processo de identificação de incoerências, lacunas e vieses no processo de evolução da ciência, contribuindo, portanto, com informações ainda desconhecidas e complementando o conhecimento já obtido.

Os resultados estão organizados na forma de artigos científicos, com formatação específica de cada periódico escolhido para submissão e, também, uma comunicação científica. O primeiro artigo contempla o modo de utilização do antibiótico sulfato de estreptomicina no controle da contaminação *in vitro* em brotações de *Eugenia involucrata*, o qual encontra-se com formatação da Revista Investigación Agraria. O segundo artigo, formatado de acordo com as normas da Revista de Ciências Agrárias (Lisboa), aborda o efeito do antioxidante Polivinilpirrolidona e do Ácido Giberélico (GA₃) quando adicionados ao meio nutritivo ½MS visando o controle da oxidação fenólica e o alongamento *in vitro* de segmentos nodais. O terceiro, formatado de acordo com as normas do periódico Pesquisa Florestal Brasileira, relata a influência de quatro cores (branca, azul, vermelha e verde) de Diodos Emissores de Luz (LEDs) e lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. O quarto manuscrito, com formatação da Revista Ceres, contempla a influência da citocinina 6-benzilaminopurina e da auxina Ácido 3-indolbutírico na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*. O quinto artigo, formatado de acordo com as normas do periódico Pesquisa Florestal Brasileira, aborda, por sua vez, o efeito da auxina Ácido α-naftalenoacético e da citocinina Cinetina na multiplicação *in vitro* da espécie. Também estão incluídos na Tese dois experimentos de miniestaquia com *Eugenia involucrata*, o primeiro, avaliando o efeito dos antioxidantes Ácido Ascórbico e Polivinilpirrolidona aplicados previamente ao

enraizamento e, o segundo, analisando o efeito do Ácido 3-indolbutírico no enraizamento das miniestacas, sendo que o primeiro foi apresentado e publicado nos Anais do evento “Jornada Acadêmica Integrada” realizado pela Universidade Federal de Santa Maria. O sexto manuscrito, com formatação específica da Revista Ciência Rural, apresenta os ensaios relacionados à análise da diversidade molecular de três fragmentos naturais de *Eugenia involucrata*.

Por fim, é apresentada a conclusão geral e as referências bibliográficas da presente Tese.

1. INTRODUÇÃO

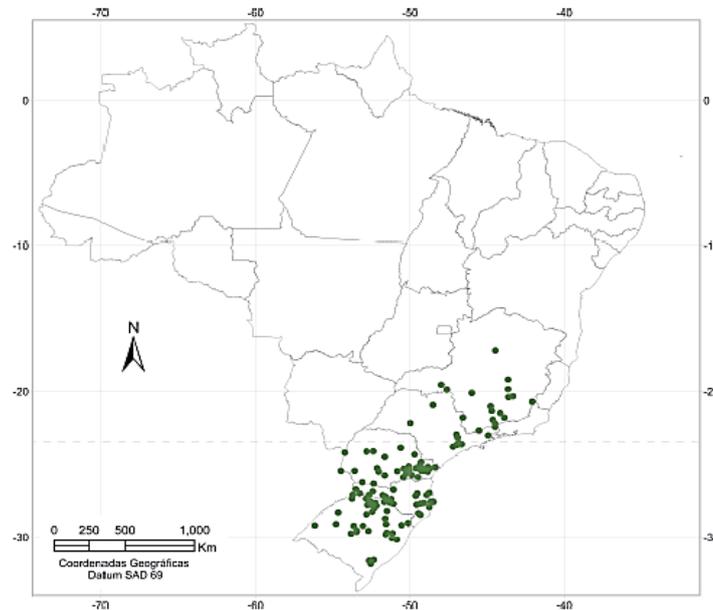
A espécie *Eugenia involucrata* De Candolle é popularmente conhecida como Cerejeira, Cerejeira-do-mato, Cerejeira-da-terra, Cerejeira-do-rio-grande, entre outros (CARVALHO, 2009). Pertence à família Myrtaceae, uma das famílias botânicas mais conhecidas pelo potencial biotecnológico das espécies nativas, com frutos utilizados para a industrialização, os quais apresentam bom rendimento em polpa, aroma característico e presença de compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes (CAMLOFSKI, 2008).

Nesta família, destaca-se o gênero *Eugenia*, considerado o maior no continente americano, distribuído do México ao Uruguai, tendo também algumas espécies africanas e asiáticas (VAN DER MERWE et al., 2005). No Brasil, é considerado um dos maiores gêneros, abrangendo aproximadamente 384 espécies (SOBRAL et al., 2015).

Eugenia involucrata é nativa de vários estados do Brasil, possui ocorrência natural no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (Figura 1). Sua dispersão abrange, também, em outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2008). Entretanto, a espécie ocorre em baixa densidade em ambientes naturais (HACK et al., 2005), fato que requer estudos acerca de sua biologia reprodutiva, dispersão e, especialmente, obtenção de material propagativo de qualidade e em quantidade satisfatória (GOMES et al., 2016).

É considerada uma espécie secundária tardia (AGUIAR et al., 2001) e, em alguns locais do Brasil, encontra-se associada ao ambiente fluvial ou ripário (CARVALHO, 2008). Possui vasta distribuição nas submatas mais desenvolvidas, em solos úmidos e não muito acidentados (LEGRAND; KLEIN, 1969), adaptando-se bem dos solos graníticos até sedimentares e os aluvionais. Também tolera solos argilosos, mas desenvolve-se melhor em solos férteis, profundos, de textura média e boa umidade (MATTOS, 1985).

Figura 1 - Representação dos locais de ocorrência de *Eugenia involucrata* De Candolle no Brasil.



Fonte: Carvalho (2008).

A espécie, quando encontrada na mata, pode atingir alturas entre 10 a 20m (Figura 2A). Possui crescimento lento, assim como a maioria das demais espécies nativas (LONGHI, 1995). O crescimento é simpodial, a copa é arredondada, tronco ereto e mais ou menos cilíndrico, com 30 a 40cm de diâmetro (BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 2008). O caule é descamante com variações de cor do cinza amarronzado para o verde (Figura 2D). Apresenta madeira de cor branco-pardacenta, de 900 a 940kg/m³ de densidade (BACKES; IRGANG, 2002), moderadamente pesada, compacta, elástica, resistente e de boa durabilidade. Sua madeira pode ser empregada na construção civil, para confecção de cabos de machado, ripas, ferramentas agrícolas em geral, para lenha e carvão de excelente qualidade (BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 2016; CARVALHO, 2008).

As sementes de *Eugenia involucrata* apresentam baixo índice e germinação hipógea, iniciando-se 30-40 dias após a sementeira (LONGHI, 1995). Stefanel (2016) observou que a emissão de radícula iniciou dentro do período compreendido entre 14 e 28 dias após a sementeira, ao avaliar a germinação e diferentes tratamentos de desinfestação superficial de sementes para o estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

Igualmente, possui uma limitada produção de sementes, que pode estar associada com a restrita abundância de matrizes em remanescentes florestais, as quais frutificam de maneira irregular ao longo dos anos e também com o fato de haver um reduzido número de sementes (Figura 2C) por fruto, normalmente, de uma a duas sementes (SILVA et al., 2005). Além disso, as sementes são altamente recalcitrantes, iniciando a perda de seu potencial germinativo após apenas duas semanas de armazenamento (LORENZI, 2016; CARVALHO, 2008), o que também contribui para restringir a produção de mudas de *Eugenia involucrata*.

A dispersão das sementes ocorre principalmente pela forma zoocórica, especialmente através das aves, como o *Turdus rufiventris* (Sabiá-laranjeira), *Pitangus sulfurathus* (Bem-te-vi) e *Euphonia violacea* (Gaturamo) (CARVALHO, 2009). As sementes de *Eugenia involucrata* também possuem propriedades medicinais, sendo indicadas para o combate a cálculos biliares e renais, e ação vermífuga (GOMES et al., 2007).

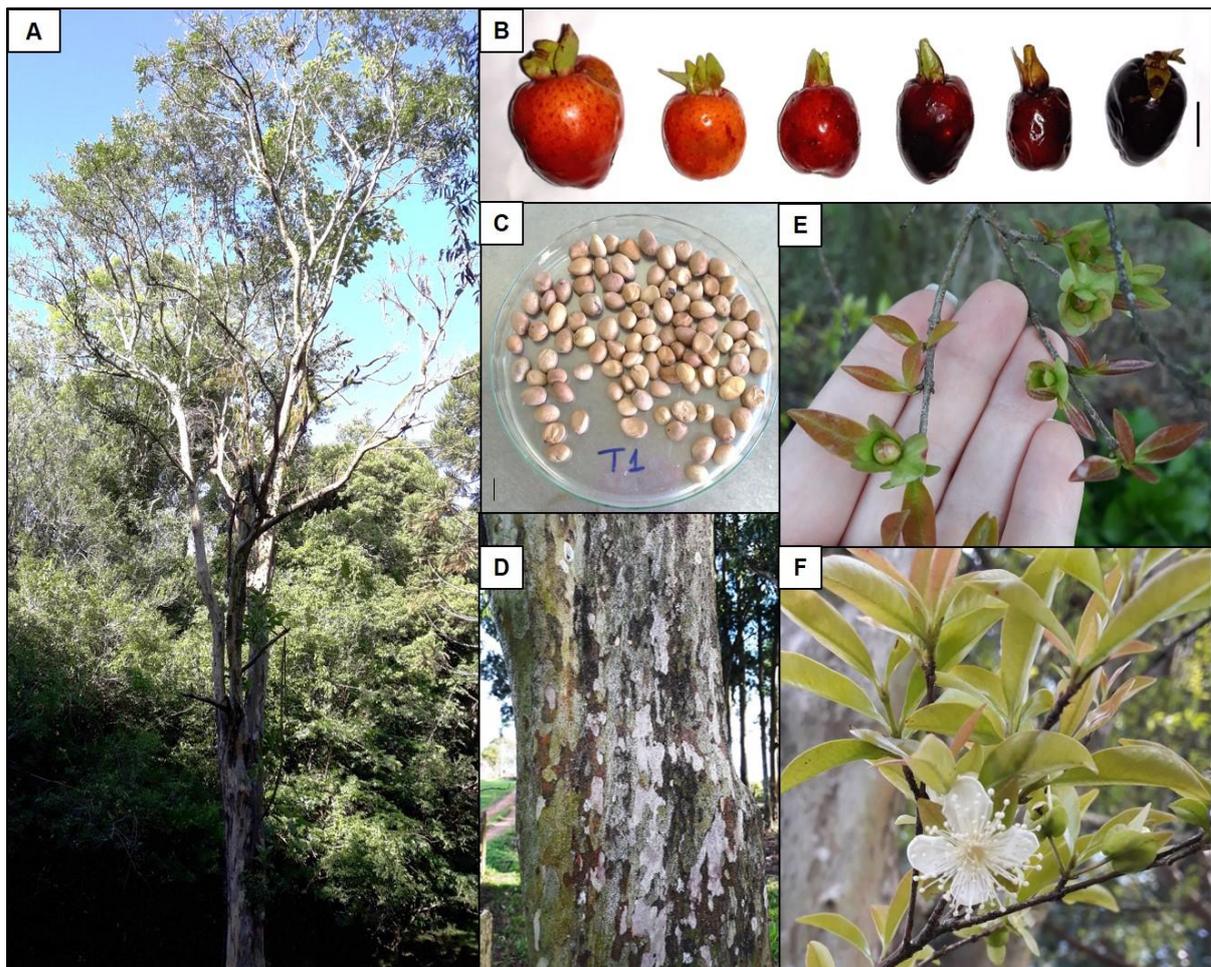
Seus frutos (Figura 2B) são carnosos e de sabor doce ou ácido, os quais são indicados para a produção de doces, geleias, licores, para consumo *in natura* e, também, na alimentação animal, principalmente na de suínos (CARVALHO 2008). Ademais, os frutos da espécie são utilizados no combate à gota, problemas no fígado e à arteriosclerose (GOMES et al., 2007).

Há registros na literatura de que a produção de apenas uma árvore pode ser superior a mil frutos por safra, a qual pode ocorrer por uma extensão de tempo de até 200 anos (DEGENHARDT et al., 2007). Assim, o conjunto de quesitos como atratividade dos frutos, devido à sua coloração, recursos energéticos e elevada produção potencializa a espécie para compor programas de recuperação de áreas degradadas, para utilização no paisagismo e na arborização de áreas urbanas (LORENZI, 2016).

Suas flores são hermafroditas (Figuras 2E e 2F), podem ocorrer isoladas ou em grupos, apresentando cerca de quatro pétalas brancas e entre 60 a 100 estames (DEGENHART et al., 2007), e, em uma mesma inflorescência, podem ser observados diferentes estágios de crescimento. No que diz respeito à reprodução, a espécie é classificada como autógama e, também, é considerada como melífera pela atração que exerce sobre as abelhas (CARVALHO, 2009).

Apresenta folhas simples e opostas (Figura 2F), com face superior verde-escuro e brilhosa (CARVALHO, 2009; SOBRAL et al., 2015b). Esses órgãos também apresentam propriedades medicinais, sendo utilizadas na forma de chás com ação anti-inflamatória e antialérgica (DAMETTO, 2014). Além disso, com as folhas e as cascas podem-se preparar remédios para gripes, dores reumáticas e cólicas (GOMES et al., 2007). Em relação a suas atividades biológicas, o extrato foliar hidroalcoólico possui potencial antitumoral (SILVA et al., 2010), o extrato aquoso apresenta efeito alelopático (HÜLLER; SCHOCK, 2011), o óleo essencial isolado das folhas e dos frutos possui atividade antioxidante (CIARLINI et al., 2017).

Figura 2 - Aspecto do fuste (A), frutos (B), sementes (C), tronco (D), botões florais (E) e flores (F) característicos da espécie *Eugenia involucrata* De Candolle. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Contudo, apesar do seu grande potencial econômico e ambiental, a espécie ainda permanece subutilizada, sendo cultivada somente em pomares domésticos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (PRADO, 2009). O setor frutícola nacional tem direcionado sua produção, em sua maioria, ao cultivo de espécies exóticas mais adaptadas às condições climáticas do país (OLIVEIRA; PIERRE, 2018). Outros entraves na sua produção em larga escala são a falta de informações agrônomicas, ausência de cultivares melhoradas e a necessidade de grande quantidade de mão de obra para colher os frutos, além de sua natureza perecível (CARVALHO, 2008). Além disso, a espécie encontra-se em risco, uma vez que seu principal habitat natural, a Mata Atlântica, está cada vez mais ameaçado pelo desmatamento, reforçando a importância da realização de pesquisas e de atividades de extensão, bem como da criação de políticas públicas para garantir a conservação das espécies nativas brasileiras.

No contexto do presente trabalho, justificam-se, especialmente, a importância da realização de estudos direcionados a técnicas de produção de mudas via propagação vegetativa (DEGENHARDT et al., 2007; SARTORETTO et al., 2008), como a micropropagação e a miniestaquia, que são os mais utilizados em nível comercial (FERRARI et al., 2004), que podem ser extrapoladas para florestais.

A micropropagação é uma técnica da Cultura de Tecidos que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Nessa técnica, entretanto, é essencial o controle da contaminação microbiana (DANTAS et al., 2002), a qual é uma das principais causas de perdas de material vegetal. Em *Eugenia involucrata*, particularmente, esse fato já foi evidenciado (GOLLE et al., 2013; STEFANEL, 2016), sendo registrada uma alta contaminação *in vitro* nas culturas dessa espécie, principalmente por bactérias endógenas.

Soma-se a isso o elevado custo para a obtenção de mudas via micropropagação (ERIG; SCHUCH, 2005b), o que contribui para limitar seu emprego. Em decorrência disso, é importante que, para cada espécie, sejam realizados ajustes em seus protocolos (como a definição do meio nutritivo adequado, a concentração dos sais e vitaminas, a adição ou não de fitorreguladores, o controle do espectro luminoso, dentre outros), a fim de otimizar as condições de cultivo (LEITZKE et al., 2010; SARTOR et al., 2013) e reduzir os custos da micropropagação.

Nesse sentido, os meios nutritivos utilizados na micropropagação possuem como principal função fornecer substâncias essenciais para o crescimento e controlar, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A adição de fitorreguladores ao meio tem como objetivo suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, bem como estimular o alongamento, multiplicação da parte aérea ou o enraizamento (CALDAS; BUSO, 1998). Outro fator de extrema relevância e impacto nos resultados obtidos na micropropagação são o comprimento de onda específico, a densidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo utilizados, pois podem influenciar a morfogênese das plantas cultivadas *in vitro* (LIAN et al., 2002). Há indícios de uma menor eficiência de multiplicação e crescimento na presença de lâmpadas fluorescentes brancas, o que pode ser decorrente do fato destas emitirem diferentes comprimentos de onda entre 350 e 750nm, e somente entre 400 e 700nm são considerados mais importantes para a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além da micropropagação, outra técnica de propagação vegetativa, a miniestaquia, tem-se mostrado como alternativa para certas espécies que apresentam dificuldades no cultivo *in vitro* (XAVIER; WENDLING, 1998), a exemplo da recalcitrância no enraizamento observada em *Eugenia involucrata*. A miniestaquia destaca-se na produção de mudas clonais de *Eucalyptus* sp. (XAVIER; SILVA, 2010), no entanto, em se tratando de espécies florestais nativas, como é o caso da *Eugenia involucrata*, são poucos os estudos realizados até agora (DIAS et al., 2015).

A técnica da miniestaquia consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo método de estaquia convencional em que, inicialmente realiza-se a poda do ápice da brotação da estaca enraizada e, após algum determinado período (que é variável em função da época do ano, da espécie, das condições nutricionais, entre outras), há emissão de novas brotações, que são coletadas e submetidas ao enraizamento. Com isso, a parte basal da brotação da estaca constitui uma minicepa que fornecerá as brotações (miniestacas) para a formação das futuras mudas (FERRARI et al., 2004).

Em síntese, a miniestaquia é uma ferramenta potencial para obtenção de mudas melhoradas, pois, mesmo que não se tenha certeza do genótipo a ser multiplicado, têm-se estimativas de superioridade das plantas matrizes, bem como uma maior uniformidade dos plantios (CALDEIRA et al., 2016). Além disso, a miniestaquia tem diversas vantagens em relação à estaquia convencional na

produção de mudas, como a redução da área necessária para a formação do minijardim clonal, redução dos custos com transporte e coleta das brotações, maior eficiência na propagação de clones recalcitrantes ao enraizamento, além de proporcionar maior percentual de enraizamento, qualidade do sistema radicular e velocidade de emissão das raízes (XAVIER et al., 2013).

Diante disso, apesar da elevada importância econômica e ambiental de *Eugenia involucrata*, a espécie encontra-se sob intensa pressão antrópica, devido à fragmentação de seu habitat natural. Com isso, é fundamental a realização de estudos que forneçam subsídios para a conservação dos recursos florestais, como aqueles relacionados à quantificação da variabilidade genética e à análise da estruturação de suas populações naturais por meio de marcadores de DNA. A utilização da análise molecular têm sido aplicada com êxito em estudos de diversidade genética que visam à conservação e, também, ao melhoramento genético de espécies florestais e comerciais (LORENZONI et al., 2014).

Diante do exposto, justificam-se investigar diferentes metodologias que visem uma produção eficiente de mudas de *Eugenia involucrata*, especialmente por se tratar de uma espécie arbórea nativa do Brasil e que carece de informações a respeito do seu comportamento silvicultural e seu desenvolvimento *in vitro*, na propagação por miniestaquia, bem como quantificar a variabilidade genética e analisar a estruturação genética em populações naturais dessa espécie. Com isso, o presente estudo pretende contribuir com informações relacionadas à propagação vegetativa em *Eugenia involucrata* De Candolle, de maneira a aprimorar, quantitativa e qualitativamente, a produção de mudas dessa espécie florestal nativa brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com informações relacionadas à propagação vegetativa e a estruturação genética em *Eugenia involucrata* De Candolle, de maneira a aprimorar, quantitativa e qualitativamente, a produção de mudas dessa espécie florestal nativa brasileira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e selecionar metodologias de controle da contaminação bacteriana em culturas *in vitro*.
- Avaliar o efeito de antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais.
- Analisar processos de alongamento *in vitro* de explantes.
- Avaliar o efeito da iluminação por Diodos Emissores de Luz (LEDs) no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais.
- Estudar metodologias adequadas para a multiplicação de cultivos *in vitro*.
- Avaliar a sobrevivência, a oxidação fenólica e o enraizamento de miniestacas.
- Quantificar a variabilidade genética e analisar a estruturação genética em três fragmentos naturais de *Eugenia involucrata* localizados na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, por meio de marcadores microssatélites.

3. CAPÍTULO I

ARTIGO 1 - USO DE ANTIBIÓTICO NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eugenia involucrata*

Esse artigo encontra-se formatado conforme as diretrizes para autores da **Revista Investigación Agraria**.

USO DE ANTIBIÓTICO NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eugenia involucrata*

RESUMO: A descontaminação dos explantes é requisito para a eficiência da micropropagação. O trabalho teve como objetivo avaliar o modo de utilização do sulfato de estreptomicina (SE) no controle de bactérias endógenas em segmentos nodais. Os tratamentos consistiram da utilização de explantes que continham ou não contaminação bacteriana prévia e que foram inoculados em meio nutritivo com ou sem SE ou imersos em solução contendo SE. A menor média de contaminação (16,67%) foi observada em explantes que não apresentavam bactérias e que foram inoculados em meio nutritivo contendo SE. A inoculação de explantes sem contaminação prévia controla a proliferação de bactérias endógenas.

Palavras-chave: cultura de tecidos, micropropagação, sulfato de estreptomicina.

*USE OF ANTIBIOTIC TO THE CONTROL IN VITRO CONTAMINATION OF NODAL SEGMENTS OF *Eugenia involucrata**

ABSTRACT: The decontamination of explants is a requirement for micropropagation efficiency. The aim of this study was to evaluate the efficiency of streptomycin sulphate (SE) on the control of endogenous bacteria in nodal segments. The treatments consisted in the use of explants containing or not previous bacterial contamination and that were inoculated in a nutrient medium with or without SE or immersed in a solution containing SE. The lowest mean (16.67%) of contamination was observed when the explants without bacteria contamination were inoculated in a nutrient medium containing SE. Inoculation of explants without previous contamination controls the proliferation of endogenous bacteria.

Keywords: tissue culture, micropropagation, streptomycin sulphate.

INTRODUÇÃO

Eugenia involucrata De Candolle pertence à família Myrtaceae sendo conhecida popularmente como Cerejeira-do-mato. Essa espécie ocorre naturalmente em vários estados brasileiros, além de países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (LORENZI, 2016). Possui frutos que são altamente consumidos

tanto na alimentação animal como na alimentação humana. Além disso, há potencialidade de usos de sua madeira na construção civil, na produção de ferramentas agrícolas e na produção de lenha e carvão, e suas árvores podem integrar projetos de recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2008).

Diante do seu elevado potencial econômico e ambiental, justificam-se estudos relacionados à produção de mudas via propagação vegetativa, em particular a realizada por meio da cultura de tecidos, uma vez que a *Eugenia involucrata* possui sementes recalcitrantes, não suportando longos períodos de armazenamento (CARVALHO, 2008), o que compromete sua propagação pela via seminal. Na cultura de tecidos, é essencial o controle da contaminação microbiana, pois o meio nutritivo proporciona um ambiente favorável para o crescimento de micro-organismos, como bactérias e fungos (COSTA et al., 2010a), sendo uma das principais causas de perdas de material vegetal.

Golle et al. (2013) relataram que o maior potencial para o estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* se dá por meio da inoculação de segmentos nodais em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentração dos sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS). Porém, simultaneamente, Paim (2011), Golle et al. (2013) e, após, Stefanel (2016) relataram uma alta contaminação nas culturas dessa espécie, principalmente por bactérias endógenas.

As bactérias endógenas, introduzidas sistemicamente com os explantes, impõem consideráveis limitações na fase de estabelecimento *in vitro* de plantas (PALÚ et al., 2011), ocasionando perda de tempo, de recursos financeiros e de material vegetal. Do ponto de vista prático, a melhor solução consiste em realizar a autoclavagem e o subsequente descarte do material contaminado, e quando existir o interesse na manutenção de clones específicos, torna-se necessário efetuar o controle dessas bactérias com o uso de antibióticos específicos (PEREIRA et al., 2014). Os antibióticos utilizados no controle de bactérias podem possuir ação bacteriostática, e não bactericida, sendo fitotóxicos para plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), sendo necessário, portanto, testar a eficiência de seu modo de utilização, seja na imersão dos explantes em soluções contendo o(s) antibiótico(s), como na inoculação em meio nutritivo, além da pulverização das plantas matrizes usadas como doadoras de explantes (PEREIRA et al., 2003). Diante do exposto, este trabalho teve por

objetivo avaliar o efeito do modo de utilização do antibiótico sulfato de estreptomicina no controle *in vitro* de bactérias endógenas em brotações de *Eugenia involucrata*.

MATERIAL E MÉTODOS

As brotações utilizadas para a realização do experimento, provieram de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, os quais foram previamente submetidos à desinfestação superficial durante 1 min em etanol a 70% (v/v), seguida da imersão durante 15 min em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% (v/v), e, após 15 min, em solução de hipoclorito de cálcio (CaClO) a 2,5% (p/v). Na sequência, os segmentos nodais foram enxaguados três vezes com água destilada estéril. Os segmentos nodais desinfestados foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), contendo 10 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 4 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 6,0, conforme metodologia de Stefanel (2016). O meio nutritivo, anteriormente à inoculação dos explantes, foi autoclavado a 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 min. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, as brotações originadas foram utilizadas para a realização do presente experimento.

Os tratamentos foram constituídos da adição ou não do antibiótico sulfato de estreptomicina puríssimo (tratado como SE no texto) ao meio nutritivo ou da imersão dos explantes em solução contendo o antibiótico. Utilizaram-se segmentos apicais caulinares, com aproximadamente 1cm de tamanho, que apresentavam ou não contaminação bacteriana prévia. Os tratamentos foram: T₁ (explantes sem contaminação prévia); T₂ (explantes com contaminação prévia); T₃ (explantes sem contaminação e imersos em solução de SE a 100 mg L⁻¹ durante 5 min); T₄ (explantes com contaminação e imersos em solução de SE a 100 mg L⁻¹ durante 5 min); T₅ (explantes sem contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L⁻¹ de SE); e T₆ (explantes com contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L⁻¹ de SE).

Conforme o tratamento, o antibiótico SE (esterilizado a frio) foi adicionado ao meio nutritivo após a autoclavagem do meio, quando foi atingida a temperatura

ambiente, mas antes da sua solidificação. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, composto por seis tratamentos e dez repetições, contendo três explantes cada uma. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo MS com concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS). Os frascos de vidro utilizados foram autoclavados antes da adição dos meios. Ao meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS foram acrescentados 30 g L^{-1} de sacarose, 50 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar e, na sequência, o meio nutritivo e os frascos de vidro foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm de pressão durante 15 min.

Após a inoculação, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* avaliaram-se as variáveis: sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante) (%), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) (%), contaminação fúngica (presença de micélios fúngicos junto aos explantes) (%) e número de folhas por explante.

Após avaliar a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, 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, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey 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 $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a sobrevivência (média geral de 94,44%) e contaminação fúngica (média geral de 6,94%), não houve efeito significativo dos tratamentos. Houve efeito significativo para as variáveis contaminação bacteriana ($p= 0,0002$) e número de folhas por explante ($p= 0,0150$) (Tabela 1).

“Tabela 1”

Foi observada uma alta sobrevivência dos explantes, indicando que o antibiótico nas condições e concentração testada (100 mg L^{-1}) não foi fitotóxico para as brotações de *Eugenia involucrata*. Esse resultado corrobora os dados obtidos no cultivo *in vitro* da Figueira (*Ficus carica*), em que também houve aproximadamente 100% de sobrevivência dos explantes, indicando não haver efeito fitotóxico dos antibióticos testados e suas concentrações (PALÚ et al., 2011). As condições do meio nutritivo também são favoráveis para o desenvolvimento de contaminantes, assim, estes passam a competir com os explantes por nutrientes e, também, podem excretar substâncias tóxicas no meio, o que compromete a sua multiplicação e desenvolvimento, podendo, inclusive, levá-los à morte (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). Porém, no presente experimento, não se observou a morte dos explantes cujas culturas apresentavam sinais de crescimento de colônias bacterianas no meio, sugerindo que as bactérias presentes são de natureza endógena e não fitopatogênicas.

Houve uma média geral relativamente baixa para a contaminação fúngica (6,94%), provavelmente devido aos explantes serem provenientes de subcultivo livre de contaminantes fúngicos. A contaminação fúngica observada pode ter sido ocasionada na manipulação para a transferência dos explantes para o meio fresco e/ou, também, por contaminantes presentes no próprio meio nutritivo. De maneira semelhante, em *Ficus carica*, a desinfestação superficial realizada nos explantes anteriormente à inoculação, a qual continha, dentre outros agentes, fungicida (methiltiofan) e antibiótico (cloranfenicol), resultou na ausência de contaminação fúngica nos cultivos (PALÚ et al., 2011). Apesar disso, há poucos relatos de trabalhos que confirmem o uso isolado de antibióticos para a redução da contaminação fúngica.

Para a variável contaminação bacteriana, o tratamento 1, o controle negativo de brotações que não estavam visivelmente com bactérias presentes, apresentou

33,33% de contaminação, enquanto que, no tratamento 2, o controle negativo de brotações que tinham contaminação bacteriana prévia, houve uma elevada contaminação (83,33%) (Tabela 1). No controle negativo com brotações que não apresentaram contaminação bacteriana prévia, e que foram apenas transferidas para o meio nutritivo fresco (tratamento 1), houve a proliferação desses micro-organismos. Uma significativa proliferação de bactérias no decorrer do cultivo tem sido frequentemente observada nos trabalhos realizados com essa espécie pelo nosso Grupo de Pesquisa, o que acaba comprometendo a continuidade dos experimentos. Isso também foi registrado no cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), em que a desinfestação superficial realizada foi eficiente no controle de bactérias na fase de estabelecimento, porém, após alguns subcultivos, foi observada a proliferação de bactérias endógenas (SANTOS; WENDLING, 2010).

No controle negativo com brotações que apresentaram contaminação bacteriana prévia, e que foram apenas transferidas para o meio nutritivo fresco (tratamento 2), houve uma elevada contaminação, muito provavelmente decorrente da proliferação bacteriana previamente existente. Isso sugere que não devem ser utilizados, em experimentos ou fases de micropropagação subsequentes, os explantes já contaminados na fase de estabelecimento, pois esses micro-organismos podem ser bastante nocivos, os quais impõe consideráveis limitações para os cultivos (PEREIRA et al., 2014).

Nos tratamentos em que foram testadas a imersão de brotações sem e com contaminação bacteriana respectivamente (tratamento 3 e tratamento 4) (Tabela 1), observou-se, em ambos, uma contaminação de 100% dos explantes, indicando a ineficiência desse modo de utilização no controle de bactérias. A imersão dos explantes em solução contendo antibióticos por um curto período de tempo, ao invés de sua adição ao meio nutritivo, é alternativa utilizada para evitar problemas com a fitotoxicidade, porém pode comprometer a eficiência no controle da contaminação bacteriana (LIMA; MORAES, 2006), o que foi evidenciado no presente trabalho.

No tratamento em que as brotações sem contaminação bacteriana prévia foram inoculadas em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS contendo 100 mg L^{-1} do antibiótico SE (tratamento 5), foi observada a menor média de contaminação (16,67%) do experimento. Esse resultado indica uma maior eficiência desse modo de utilização, que consiste na adição do SE ao meio nutritivo em que os explantes não previamente contaminados

são cultivados, do que naquele em que é realizado seu contato por imersão no antibiótico, por 5 min, antes do cultivo. De maneira semelhante, no cultivo *in vitro* de *Musa* 'Grande Naine' bananeira, a adição de 8 g L⁻¹ de agrimicina® (cujos princípios ativos são o sulfato de estreptomicina e oxitetraciclina) ao meio MS, eliminou completamente a contaminação por bactérias nos explantes (PEREIRA, 2010). Entretanto, na maioria dos experimentos, não é observada a eliminação total da contaminação *in vitro*, já que os tecidos vegetais podem servir como habitat para que esses micro-organismos se transloquem pelos seus tecidos (PEREIRA et al., 2003). Esse fato foi constatado no presente trabalho e, também, em *Acacia mearnsii*, em que a adição de 2 mL L⁻¹ do antibiótico kasumin® no meio nutritivo ¾MS, resultou na proliferação de bactérias em 100% dos explantes (ISHIBASHI et al., 2017).

Apesar da menor contaminação evidenciada no tratamento 5, pode-se sugerir que o antibiótico SE teve um aparente efeito bacteriostático já que o mesmo tratamento em explantes previamente contaminados (tratamento 6) não obteve resultado satisfatório, como será discutido a seguir. O efeito bacteriostático observado é, somente, uma ação paliativa na contaminação *in vitro*, frente ao objetivo principal de eliminação total desses micro-organismos (PEREIRA et al., 2003), portanto, recomenda-se a realização de novos experimentos com outros tipos de antibióticos e diferentes concentrações.

No tratamento em que se utilizaram brotações com contaminação prévia e cujo meio nutritivo continha SE (tratamento 6), foi observada uma média elevada de associação com bactérias. Esse resultado ratificou a observação de que não é adequada a utilização subsequente de explantes de *Eugenia involucrata* já contaminados e o possível efeito bacteriostático do antibiótico SE, relatado anteriormente.

Para a variável número de folhas observou-se que, no tratamento 5 (sem contaminação e com SE inoculado no meio), àquele de menor contaminação bacteriana (16,67%), os explantes formaram o maior número de folhas (3,83). Por outro lado, no tratamento 4 (com contaminação e imersão dos explantes em solução contendo SE), e em que 100% dos explantes foram contaminados após 30 dias de cultivo *in vitro*, não houve a formação de folhas, o que provavelmente foi ocasionado pela elevada contaminação bacteriana. Da mesma maneira, no cultivo *in vitro* de

Lippia alba, os tratamentos que apresentaram menor contaminação formaram um maior número de folhas (LUZ et al., 2014).

Em todos os tratamentos que apresentaram médias elevadas de contaminação bacteriana, a formação de folhas foi prejudicada, evidenciando, mais uma vez, a necessidade de descarte de explantes e/ou frascos contaminados, haja vista a ineficiência de controle por meio da imersão em SE, independentemente de haver ou não contaminação prévia dos explantes, e, também, por meio da inoculação no meio daqueles já contaminados. Além disso, a não formação de folhas ocasionada pela contaminação bacteriana nos cultivos de *Eugenia involucrata* é prejudicial à sua multiplicação *in vitro*, visto que, na inserção entre o caule e a folha pode existir a formação de novas gemas, que irão originar brotos e, conseqüentemente, uma nova planta (COSTA et al., 2010b).

CONCLUSÕES

Diante disso, conclui-se que a adição do antibiótico sulfato de estreptomicina no meio nutritivo na ausência de contaminação prévia controla a proliferação das colônias bacterianas, mas não é eficiente em reduzi-las quando os explantes estão contaminados. A imersão dos explantes em solução com antibiótico não controla a proliferação de bactérias, tanto na presença quanto na ausência de contaminação. O número de folhas é influenciado pela contaminação bacteriana dos explantes.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, P. E. (Ed.). **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 2008. v. 3. 593p.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010a. p. 17-59.

COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000084>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

GOLLE, D. P. REINIGER, L. R. S.; BELLE, R. A.; CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000100010>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa - CNPH, 1990. 433 p.

ISHIBASHI, V.; KOGUTA, K. V.; FLÔRES JUNIOR, P. C.; HIGA, A. R. Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 15-20, 2017. Disponível em: <<http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/104/55>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 36, n. 3, p. 181-186, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/pat.v36i3.2045>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

LORENZI, H. (Ed). **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2016. 384 p.

LUZ, J. M. Q. SANTOS, V. A.; RODRIGUES, T. M.; BLANK, M. F. A.; ASMAR, S. A. Estabelecimento *in vitro* e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 444-449, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_140>. Acesso em: 19 nov. 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos**. 2011. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/8683>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

PALÚ, E. G.; CÔRREA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000200031>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000700006>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

PEREIRA, G. A. Controle de contaminantes em explantes de bananeira 'Grande Naine' na micropropagação *in vitro*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 4, n. 2, p. 35-39, 2010.

PEREIRA, G. A.; BOLIANI, A. C.; FURLANI JUNIOR, E. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira 'Thap maeo'. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 3, p. 299-305, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000300001>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446 p.

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

STEFANEL, C. M. **Aspectos da qualidade de sementes e do estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* De Candolle**. 2016. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/8778>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

Tabela 1. Contaminação bacteriana (%) e número de folhas por explante em brotações de *Eugenia involucrata* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), em função da imersão e/ou inoculação no sulfato de estreptomicina (SE).

Tratamentos	Contaminação bacteriana (%)	Número de folhas por explante
T ₁	33,33 a b*	2,00 a b*
T ₂	83,33 b c	0,67 b
T ₃	100,00 c	1,67 ab
T ₄	100,00 c	0,00 b
T ₅	16,67 a	3,83 a
T ₆	83,33 b c	1,67 ab
Média	69,44	1,64
IV	4,41	18,21

Em que: T₁ (sem contaminação prévia); T₂ (com contaminação prévia); T₃ (sem contaminação e imersos em SE a 100 mg L⁻¹ durante 5 min); T₄ (com contaminação e imersos em SE a 100 mg L⁻¹ durante 5 min); T₅ (sem contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L⁻¹ de SE); e T₆ (com contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L⁻¹ de SE).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. IV (Índice de variação) = $CV\sqrt{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

4. CAPÍTULO II

ARTIGO 2 - ANTIOXIDANTE E GIBERELINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE

Esse artigo encontra-se formatado conforme as diretrizes para autores do periódico **Revista de Ciências Agrárias (Lisboa)**.

ANTIOXIDANTE E GIBERELINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE

ANTIOXIDANT AND GIBBERELLIN ON *IN VITRO* CULTIVATION OF *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE

Resumo - *Eugenia involucrata* possui sementes recalcitrantes e é dotada de elevado potencial econômico e ambiental, o que justifica a realização de estudos relacionados à produção de mudas via cultura de tecidos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) e ácido giberélico (GA₃) no cultivo *in vitro*. Testaram-se diferentes concentrações de PVP: 0; 0,5; 1 ou 1,5 g L⁻¹ e, em um segundo experimento, de GA₃: 0; 1; 2 ou 4 μM, em dois períodos de cultivo *in vitro* (30 ou 60 dias). Não houve efeito significativo do PVP, observando-se 83,10% de sobrevivência e 73% de estabelecimento. A oxidação fenólica ocorreu em 16,55% dos explantes. Foi observado efeito significativo do período de cultivo apenas para sobrevivência, já sobre altura média e número de brotos, somente do GA₃. A maior sobrevivência ocorreu aos 30 (88,10%), observando-se decréscimo aos 60 dias (61,45%). Para altura dos brotos, a maior média (0,52 cm) foi obtida a 4 μM de GA₃, já, na sua ausência, ocorreu a menor média (0,12 cm). Para número de brotos, obteve-se maior média (4,5) na ausência da giberelina, enquanto, a 4 μM, ocorreu o menor número (0,15). PVP é dispensável; GA₃ apresenta efeito no alongamento *in vitro*, mas reduz o número de brotos em *E. involucrata*.

Palavras-chave: espécie florestal, PVP, GA₃, micropropagação, alongamento *in vitro*.

Abstract – *Eugenia involucrata* has recalcitrant seeds and is endowed with a high economic and environmental potential, which justifies the realization of studies related to the production of plantlets via tissue culture. The present work aimed to evaluate the effects of distinct concentrations of Polyvinylpyrrolidone (PVP) and giberelic acid (GA₃) on the *in vitro* culture. Different concentrations of PVP were tested: 0; 0.5; 1 or 1.5 g L⁻¹ and, in a second experiment, of GA₃: 0; 1; 2 or 4 μM, in two *in vitro* culture periods (30 or 60 days). There was no significant effect of PVP, with 83.10% of explants survival and 73% of establishment. Phenolic oxidation occurred in 16.55% of explants. Significant effect of the cultivation period was observed just for survival rate,

whereas average height and number of shoots were affected only GA₃ had an effect. The greatest survival occurred at 30 days (88.10%), decreasing at 60 days (61.45%). For shoot height, the highest mean (0.52 cm) was at 4 µM of GA₃, and in the absence, the lowest mean (0.12 cm) occurred. For the number of shoots, a higher mean was obtained (4.5) in its absence, whereas, at 4 µM, the lowest number occurred (0.15). PVP is dispensable; GA₃ has an effect on *in vitro* elongation but reduces the number of shoots in *E. involucrata*.

Keywords: forest species, PVP, GA₃, micropropagation, *in vitro* elongation.

Introdução

A Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* De Candolle) pertence à família *Myrtaceae* e possui ocorrência natural em vários estados brasileiros, distribuindo-se do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, além de outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (Lorenzi, 2016). A espécie apresenta diversas características desejáveis sendo muito utilizada para uso madeireiro, frutícola, paisagístico, ambiental e medicinal. Entretanto, sua propagação pela via seminal é bastante dificultada, pois suas sementes são consideradas recalcitrantes, isto é, não se mantêm viáveis durante longos períodos de armazenamento (Backes e Irgang, 2002; Carvalho, 2014).

Por apresentar elevado potencial econômico e ambiental, justificam-se estudos relacionados à produção de mudas via propagação vegetativa (Degenhardt *et al.*, 2007; Sartoretto *et al.*, 2008), e, particularmente, pela micropropagação. Esta modalidade da cultura de tecidos é um método muito estudado em diferentes espécies vegetais e que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entretanto, o emprego da micropropagação em escala comercial visando à produção de mudas pode ser limitado, devido, entre outros fatores, ao elevado custo para obtenção da muda (Erig e Schuch, 2005). Em função, cada espécie necessita de ajustes em seus protocolos a fim de otimizar as condições de cultivo das plantas (Sartor *et al.*, 2013), e reduzir custos.

Dentre os fitorreguladores passíveis de utilização na micropropagação, o Ácido giberélico (GA₃), uma das mais importantes giberelinas comerciais (Xavier *et al.*, 2013), pode promover um aumento na divisão celular. Essa giberelina, geralmente,

tem, como efeito fisiológico, a indução ao alongamento dos brotos, favorecendo a propagação *in vitro* (Taiz *et al.*, 2017).

Além dos fitorreguladores, podem ser adicionados ao meio nutritivo, também, aditivos, como é o caso da Polivinilpirrolidona (PVP), que reduzam a toxicidade dos compostos fenólicos produzidos pelos próprios tecidos vegetais. Estes compostos são, geralmente, liberados nas zonas em que os explantes sofrem cortes, dificultando, assim, o desenvolvimento *in vitro* da planta (Bezerra *et al.*, 2014). Altas concentrações de compostos fenólicos podem ocasionar a morte do material vegetal e a abscisão foliar precoce, que é acarretada pelo acúmulo de etileno nos tecidos cultivados *in vitro*, o qual torna o explante mais frágil e reduz o seu desenvolvimento *in vitro* (Kerbauy, 2008). A oxidação fenólica é uma das principais limitações da propagação *in vitro*, especialmente quando se trabalha com espécies lenhosas (Sartor *et al.*, 2013).

O PVP é um antioxidante que tem sido amplamente utilizado nos cultivos *in vitro* e tem como principal vantagem a captação de elétrons das substâncias oxidantes, controlando, assim, a oxidação fenólica (Cid e Teixeira, 2014). Adicionalmente à função antioxidante o PVP pode, também, regular o crescimento *in vitro* das plantas (Xavier *et al.*, 2013).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do antioxidante PVP no meio nutritivo, no controle da oxidação fenólica, e, também, o efeito do GA₃ no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

Material e Métodos

O trabalho, realizado no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, constituiu-se de dois experimentos, independentes um do outro, conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O primeiro, que teve a finalidade de avaliar somente o efeito da Polivinilpirrolidona (PVP), apresentou arranjo unifatorial e foi constituído por concentrações do antioxidante, e o segundo, bifatorial (4x2), somente pelo efeito de combinações de concentrações do Ácido Giberélico (GA₃) e períodos de cultivo no alongamento *in vitro* de explantes de *Eugenia involucrata*.

Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais que não apresentassem tecidos lenhosos, com aproximadamente 1 cm de comprimento e 167 mm de diâmetro, de espécimes de *Eugenia involucrata* cultivados em casa de vegetação com aproximadamente 9 anos de idade. No laboratório, as brotações coletadas foram lavadas com o auxílio de água corrente e detergente comercial e, após, foram enxaguadas duas vezes com água destilada. Na sequência, em câmara de fluxo laminar, foram expostos, por 1 min, à solução de etanol a 70% (v/v), e, a seguir, submetidos à imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 3,0% (v/v) durante 15 min e, após, em solução de hipoclorito de sódio a 2,0% (v/v) por 15 min. Por fim, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada e estéril.

Em ambos experimentos, utilizou-se o meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962), cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), o qual foi acrescido de 10 g L^{-1} de sacarose, 50 mg L^{-1} de mio-inositol, 4 g L^{-1} de ágar e pH, ajustado para 6,0, conforme metodologia de Stefanel (2016). A unidade experimental de ambos os experimentos foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo, e três explantes. O primeiro experimento foi composto por quatro tratamentos e 10 repetições, totalizando 40 unidades experimentais e 120 explantes. O segundo experimento foi composto por oito tratamentos e 10 repetições, totalizando 80 unidades experimentais e 240 explantes.

Anteriormente à inoculação dos explantes e após a adição do ágar, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1 atm durante 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

No primeiro experimento, os tratamentos consistiram das concentrações de PVP (0; 0,5; 1,0 ou $1,5 \text{ g L}^{-1}$), sendo a ausência de PVP no meio nutritivo o tratamento testemunha. Foram avaliadas, após 30 dias de cultivo *in vitro*, as variáveis: sobrevivência *in vitro* (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento *in vitro* (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no explante) e oxidação fenólica (foram contabilizados como oxidados os explantes que se apresentaram totalmente e/ou com pelo menos a metade do seu tamanho na coloração marrom escuro), todas expressas em porcentagem.

Já no segundo experimento, os tratamentos consistiram da combinação das concentrações de GA₃ (0; 1; 2 ou 4 µM), sendo a ausência de GA₃ no meio nutritivo, o tratamento testemunha, com os dois períodos de cultivo *in vitro* (30 e 60 dias). Foram avaliadas as variáveis: sobrevivência *in vitro* (indicada pela coloração verde do explante) expressa em porcentagem, altura média dos brotos (cm) e número de brotos. A variável altura de brotos foi mensurada, com o uso de uma régua, avaliando-se todas as brotações por explante para cada tratamento e repetição.

Após avaliar a normalidade dos erros pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, os dados foram transformados pela função $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, médias de tratamentos qualitativos foram submetidos à comparação de médias por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (Ferreira, 2014) para a análise estatística dos dados. Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o Índice de Variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (Pimentel-Gomes, 2009).

Resultados e Discussão

No primeiro experimento, em que se testaram diferentes concentrações de PVP, não houve efeito significativo dos tratamentos para as variáveis sobrevivência ($p= 0,4033$), estabelecimento *in vitro* ($p= 0,2731$) e oxidação fenólica ($p= 0,6688$) (Tabela 1). Observou-se uma média geral alta para a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro* dos explantes (83,10% e 73% respectivamente) e uma média geral relativamente baixa para a variável oxidação fenólica (16,55%).

Tabela 1 - Sobrevivência (%), estabelecimento *in vitro* (%) e oxidação fenólica (%), observadas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, após a inoculação em meio ½MS contendo diferentes concentrações de PVP, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

PVP (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)	Oxidação fenólica (%)
Testemunha	66,40 a*	53,00 a	20,00 a
0,5	93,20 a	73,00 a	13,20 a
1,0	86,40 a	79,60 a	26,40 a
1,5	86,40 a	86,40 a	6,60 a
Média	83,10	73,00	16,55
IV	3,44	3,77	5,65

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente 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.

A alta sobrevivência e estabelecimento observadas, corroboram com outro estudo realizado com a espécie em que, da mesma maneira que no presente trabalho (Figura 1), a presença de oxidação fenólica não inviabilizou o estabelecimento nem, tampouco, o desenvolvimento dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata* (Golle *et al.*, 2012). Ademais, nas avaliações do ensaio, observou-se que, geralmente, a região oxidada desprendia-se facilmente do explante e, abaixo dessa região, existiam novos tecidos. A descamação é uma característica comum da espécie durante o seu crescimento, o que pode ter sido o motivo que desencadeou a oxidação observada. Por isso, pode-se justificar que, por ser uma característica comum da espécie (Golle, 2010), a oxidação fenólica presente nos explantes não tenha prejudicado sua sobrevivência e estabelecimento *in vitro*.

De maneira contrária ao obtido, no cultivo *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus* foi observada uma maior sobrevivência dos segmentos nodais da espécie quando inoculados em meio ½WPM (Lloyd e McCown, 1980) contendo 1g L⁻¹ de PVP (Rabaiolli, 2014) sugerindo, com isso, que a presença ou não de PVP no meio nutritivo é relativo de cada espécie estudada.



Figura 1 - Oxidação fenólica em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, inoculados em meio nutritivo MS com a concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS) contendo $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de PVP, após 30 dias de cultivo *in vitro*, cuja oxidação não prejudicou o desenvolvimento das gemas axilares pré-existent. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

A presença do antioxidante, independentemente da concentração utilizada ($0,5$; $1,0$ ou $1,5 \text{ g L}^{-1}$), não proporcionou eficiência no controle da oxidação fenólica dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata*. Isso pode ter acontecido, provavelmente, em função de que a espécie é lenhosa, necessitando, assim, de elevadas concentrações do antioxidante para diminuir os compostos fenólicos.

Corroborando em parte, para *Dalbergia nigra*, a presença de 1 g L^{-1} de PVP, tanto no meio nutritivo MS quanto no WPM, ocasionou as maiores média de oxidação dos explantes (Sartor et al., 2013). Entretanto, o contrário foi observado em *Theobroma grandiflorum*, em que a presença de somente $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de PVP no meio DKW (McGranahan et al., 1987) foi eficiente no controle da oxidação fenólica dos explantes (Almeida et al., 2010). Estes resultados sugerem, novamente, que a resposta à concentração de PVP é muito dependente da espécie.

No segundo experimento, em que foram testadas diferentes concentrações de GA_3 , foi observado efeito significativo somente do fator principal período de cultivo para a variável sobrevivência *in vitro* ($p=0,0073$) (Tabela 2). Já para altura média dos brotos ($p=0,0275$) e número de brotos ($p=0,0004$), observaram-se efeito significativo somente do fator principal GA_3 . Para a altura média dos brotos, a equação estimada que resultou no melhor ajuste foi a linear crescente (Figura 2), ao passo que, para o número de brotos, foi uma equação linear decrescente (Figura 3).

Em relação ao período de cultivo, a maior média de sobrevivência ocorreu aos 30 dias (88,10%), observando-se um decréscimo significativo aos 60 dias (61,45%) (Tabela 2), o que pode ter sido ocasionado pela menor quantidade de nutrientes disponíveis aos explantes, devido ao maior tempo de permanência no mesmo meio nutritivo. Isso também foi observado em outro estudo com a mesma espécie, em que foi obtida, aos 30 dias de cultivo, 71,12% de sobrevivência dos explantes enquanto aos 60 dias foi observado um decréscimo significativo, com apenas 52,48% dos explantes vivos (Stefanel, 2016). Isso pode sugerir que a queda na sobrevivência de *Eugenia involucrata* aos 60 dias de cultivo pode ser considerada uma característica comum do comportamento *in vitro* dessa espécie.

Tabela 2 - Sobrevivência (%) observada em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, após a inoculação em meio ½MS contendo diferentes concentrações de GA₃.

Dias	Sobrevivência (%)
30	88,10 a*
60	61,45 b
Média	74,77
IV	4,30

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente 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.

Para a variável altura média dos brotos obteve-se a maior média (0,52 cm) na presença da maior concentração da giberelina (4 µM), ao passo que, quando se diminuiu a concentração de GA₃ no meio nutritivo, a altura dos brotos também reduziu, sendo que, na ausência da giberelina obteve-se a menor média (0,12 cm) (Figura 2). O resultado obtido era esperado, visto que o GA₃ é uma substância conhecida por possuir efeito no alongamento celular das plantas (Taiz *et al.*, 2017).

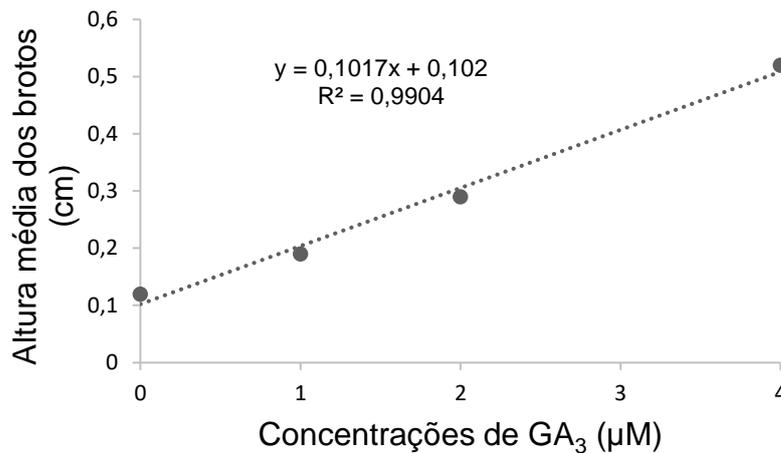


Figura 2 – Altura média dos brotos (cm) obtidos a partir de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em função das concentrações de GA₃ (0; 1; 2 ou 4 µM) adicionadas ao meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Os resultados obtidos corroboram e parte com o verificado em *Maclura tinctoria*, em que as concentrações de 10,97 µM e 16,46 µM de GA₃ no meio nutritivo WPM induziram o crescimento dos brotos (Gomes *et al.*, 2010). Da mesma maneira, para o cultivo *in vitro* de *Cattleya tigrina* a adição de GA₃ no meio nutritivo se fez necessária para a obtenção de brotações mais alongadas (Fritsche, 2012). Porém, o contrário foi observado em diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden, em que a presença do ácido giberélico no meio nutritivo ½MS não foi favorável ao alongamento dos explantes, além disso, a giberelina proporcionou menor tamanho das brotações e formação de estruturas calogênicas (Navroski *et al.*, 2013), o que pode ter sido decorrente de um possível efeito inibitório da giberelina sobre o alongamento celular da espécie.

Para a variável número de brotos obteve-se a maior média na ausência da giberelina no meio nutritivo (4,5), ao passo que na presença da sua maior concentração (4 µM de GA₃) observou-se o menor número de brotos (0,15) (Figura 3). Esses resultados sugerem um efeito inibitório do GA₃ sobre o número de brotos em *Eugenia involucrata* à medida em que se aumentou a concentração da giberelina no meio nutritivo até 4 µM (Figura 4). Esse comportamento é reforçado pelos resultados

de alguns estudos que relataram que o uso de GA₃ pode inibir a proliferação de partes aéreas em plantas (Grattapaglia e Machado, 1998).

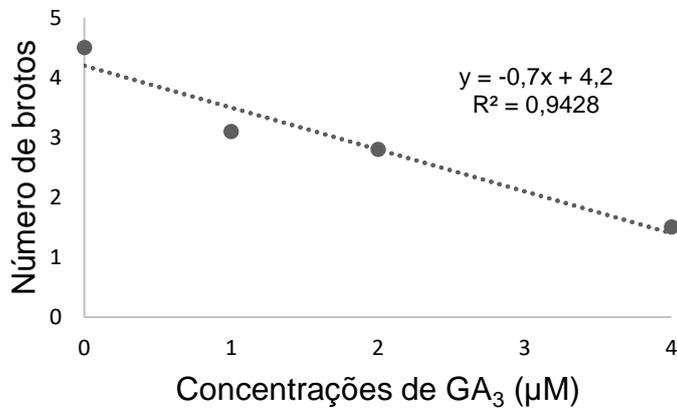


Figura 3 – Número de brotos obtidos a partir de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em função das concentrações de GA₃ (0; 1; 2 ou 4 µM) adicionadas ao meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

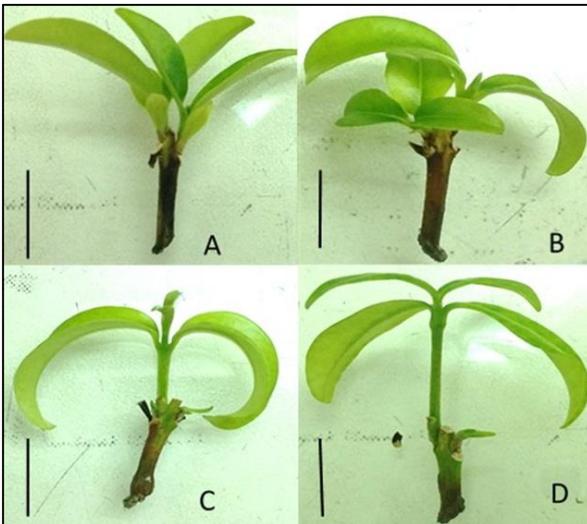


Figura 4 – Representação ilustrativa das brotações de *Eugenia involucrata* cultivadas *in vitro*, em função de diferentes concentrações de GA₃ adicionadas ao meio nutritivo ½MS, independentemente do período de cultivo *in vitro*. Observa-se em “A” brotações na ausência do fitorregulador; “B” brotações na presença de 1 µM de GA₃; “C” brotações na presença de 2 µM de GA₃; e “D” brotações na presença de 4 µM de GA₃. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

Comportamento similar foi observado em outro estudo com *Eugenia involucrata*, em que, na ausência da giberelina, foi obtido o maior número de brotos, já, na presença de 20 μM a 40 μM , os brotos entraram em senescência e acabaram se inviabilizando, o que conforme Golle (2010) teria sido devido à toxidez causada pelas concentrações elevadas dessa giberelina. Também, na espécie *Mentha x Piperita*, o maior número de brotos por explantes foi observado na presença de 0,15 μM de GA₃ associado à auxina 6-benzilaminopurina (BAP) a aproximadamente 2 μM , sendo obtidos até 6,08 brotos/explante (Morais *et al.*, 2014).

Em contrapartida, em explantes juvenis de *Carica papaya*, a aplicação de aproximadamente 0,3 μM de GA₃ em meio MS, além de contribuir para o maior tamanho em altura das plantas, proporcionou um maior número de brotações por explante (1,84), principalmente quando a giberelina foi associada a aproximadamente 0,5 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) (Vidal *et al.*, 2013). Isso pode ter ocorrido devido a um sinergismo entre a citocinina e o ácido giberélico, indicando que associação desses fitorreguladores podem estimular a multibrotação dos explantes.

De uma maneira geral, concentrações superiores a 2 μM de GA₃ prejudicam a multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*, pois, apesar de alongar os brotos, acabam reduzindo o número de brotos por explantes, o que não é desejável na micropropagação, pois acaba reduzindo a taxa de multiplicação da espécie.

Conclusões

É dispensável a utilização de PVP no meio nutritivo no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

O ácido giberélico (GA₃) apresenta efeito positivo no alongamento *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

Na presença de concentrações superiores a 2 μM de GA₃ em meio nutritivo ½MS, há uma redução no número de brotos por explante.

Referências bibliográficas

Almeida, C.F.; Rodrigues, S.M. & Lemos, O.F. (2010) - Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçu. In: *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso*. In: Seminário de iniciação científica, 14°. Belém, Embrapa Amazônia Oriental.

Backes, A. & Irgang, B. (2002) - *Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico*. Porto Alegre: Pallotti. 326 p.

Bezerra, R.M.F; Aloufa, M.A.I.; Freire, F.A.M. & Santos, D.D. (2014) - Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). *Revista Árvore*, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 771-778.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48832704001>

Carvalho, P.E. (2014) - *Espécies arbóreas brasileiras*. v.5. Brasília: Embrapa Informação Tecnológicas; Colombo: Embrapa Florestas. 634 p.

Cid, L.P.B.; Teixeira, J.B. (2014) - Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, L.P.B. *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília: EMBRAPA, 325 p.

Degenhardt, J.; Franzon, R.C. & Costa, R.R. (2007) - Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*). Pelotas: Embrapa clima temperado (Documentos, n. 211). 24 p.

Erig, A.C. & Schuch, M.W. (2005) - Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, vol. 35, n. 4, p. 961-965. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>

Ferreira, D. F. (2014) - Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

Fritsche, Y. (2012) - *Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas*. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 138 p.

Golle, D.P. (2010) - *Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de Eugenia involucrata DC*. Tese de Doutorado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 161 p.

Golle, D.P.; Reiniger, L.R.S.; Curti, A.R. & León, E.A.B. (2012) - Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. *Ciência Florestal*, v. 22, n. 1, p. 207-214. <http://dx.doi.org/10.5902/198050985092>

Gomes, G.A.C.; Paiva, R.; Herrera, R.C. & Paiva, P.D.D.O. (2010) - Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. *Revista Árvore*, vol. 34, n. 1, p. 25-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622010000100003>

Grattapaglia, D. & Machado, M.A. (1998) - Micropropagação. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (Org.) - *Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas*. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 133-145.

Kerbauy, G.B. (2008) - *Fisiologia vegetal*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452 p.

Lloyd, G.; McCown, B. (1980) - Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, v.15, n.3, p.416-420.

Lorenzi, H. (2016) - *Árvores brasileiras: manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. v. 1, 7 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum. 384 p.

McGranahan, G.H.; Driver, J.A. & Tulecke, W (1987). Tissue culture of Juglans. In: Bonga, J.M.; Durzan, D.J. (eds.). *Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, v.3, p. 261-271.

Morais, T.P.; Asmar, S.A. & Luz, J.M.Q. (2014) - Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 16, n. 2, p. 350-355. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_017

Murashige, T. & Skoog, F. (1962) - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p.473-497.

Navroski, M.C.; Reiniger, L.R.S.; Pereira, M.O.P.; Curti, A.R. & Paim, A.F. (2013) - Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Cerne*, v. 19, n. 4, p. 545-550. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000400003>

Pimentel-Gomes, F. (2009) - *Curso de estatística experimental*. 15 ed. Piracicaba, FEALQ, 451 p.

Rabaiolli, S.M. dos S. (2014) - *Sementes e miniestaquia em Nectandra megapota mica (Spreng.) Mez. e sementes e micropropagação em Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) J. Mattos*. Dissertação de Mestrado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 100 p.

Sartor, F.R.; Zanotti, R.F.; Pôssa, K.F.; Pilon, A.M. & Fukushima, C.H. (2013) - Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. *Bioscience Journal*, vol. 29, n. 2, p. 408-411. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14109/12283>

Sartoretto, L.M.; Saldanha, C.W. & Corder, M.P.M. (2008) - Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, v. 38, n. 3, p. 861-871. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300046>

Stefanel, C.M. (2016) - *Aspectos da qualidade e sementes e do estabelecimento in vitro de Eugenia involucrata de Candolle*. Dissertação de Mestrado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 101 p.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Muller, I. M.; Murphy, A. (2017) - *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 858p.

Vidal, F.R.; Diniz, J.D.N. & Silva, F.P. (2013) - Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 43, n. 1, p. 64-70. <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632013000100010>

Xavier, A.; Wendling, I. & Silva, R.L. (2013) - *Silvicultura Clonal: princípios e Técnicas*. Viçosa, Ed. UFV, 272 p.

5. CAPÍTULO III

ARTIGO 3 - DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata*

Esse artigo encontra-se formatado conforme as diretrizes para autores do periódico **Pesquisa Florestal Brasileira**.

Diodos emissores de luz (LEDs) no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*

Resumo - *Eugenia involucrata* é uma espécie florestal com elevado potencial ambiental e econômico. O trabalho objetivou avaliar o efeito do tipo de luz no cultivo *in vitro* da espécie. Os tratamentos consistiram do cultivo sob LEDs de cor vermelho, azul, verde ou branco e lâmpadas fluorescentes. Nos cultivos sob LEDs branco e azul foram observadas as maiores médias de estabelecimento; sob o azul e lâmpadas fluorescentes, o maior número de folhas; sob o azul, o maior número de brotos; sob o branco, menor contaminação bacteriana; e sob o verde foram obtidos os piores resultados. LEDs azul, vermelho, branco e lâmpadas fluorescentes influenciam favoravelmente a propagação *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

Termos para indexação: Biotecnologia; Cultura de tecidos; Cerejeira-do-mato.

Light emitting diodes (LEDs) in the *in vitro* culture of *Eugenia involucrata*

Abstract - *Eugenia involucrata* is an important forest species with high environmental and economic potential. The objective of this work was to evaluate the effect of light type on the *in vitro* culture of the specie. The treatments consisted of cultivation under LEDs of different color spectra and fluorescent lamps. In the cultures under white and blue LEDs, the highest establishment means were observed; under the blue and fluorescent lamps, the largest number of leaves; under the blue, the largest number of shoots; under white, less bacterial contamination; and under green the worst results were obtained. Blue, red and white LEDs and fluorescent lamps favorably influence the *in vitro* propagation of *Eugenia involucrata*.

Index terms: Biotechnology; Tissue culture; Wild cherry.

Eugenia involucrata De Candolle, popularmente conhecida como Cerejeira-do-mato, é uma espécie frutífera nativa pertencente à família Myrtaceae, com ocorrência de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, podendo, ainda, ser encontrada em países vizinhos, como Argentina, Paraguai e Uruguai. A espécie possui características que tornam-na ornamental e de útil aplicação em parques, jardins e na arborização de ruas (Lorenzi, 2016). Ademais, devido a alta densidade de sua madeira, é utilizada, também, para a confecção de pequenas ferramentas agrícolas, para lenha e carvão (Carvalho, 2009; Lorenzi, 2016).

Apesar da potencialidade de uso da espécie, sua disseminação pela via seminal é comprometida, uma vez que possui sementes recalcitrantes, as quais necessitam manter um teor de água relativamente elevado para que a sua germinação não seja prejudicada (Carvalho, 2009). Diante da limitação da sua propagação pela via seminal, uma das alternativas mais promissoras para a multiplicação da espécie é a utilização das técnicas de propagação vegetativa, em especial a micropropagação, que têm se destacado como uma ferramenta de grande impacto, tanto no âmbito científico quanto no econômico (Golle et al., 2013).

Entretanto, o emprego da micropropagação pode ser limitado, devido, entre outros, ao elevado custo para a obtenção de mudas (Erig & Schuch, 2005). Com isso, exige-se que para cada espécie sejam realizados ajustes em seus protocolos (como o comprimento de onda utilizado), a fim de otimizar as condições de cultivo (Sartor et al., 2013) e reduzir custos. O comprimento de onda específico, a densidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo utilizados, podem influenciar a morfogênese das plantas cultivadas *in vitro* (Lian et al., 2002). Há indícios de uma menor eficiência de multiplicação e crescimento na presença de lâmpadas fluorescentes brancas, o que pode ser decorrente do fato destas emitirem diferentes comprimentos de onda entre 350 e 750 nm, e somente entre 400 e 700 nm são considerados mais importantes para a fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2013).

Os diodos emissores de luz (LEDs) são considerados uma opção bastante promissora por apresentar características importantes em relação às lâmpadas fluorescentes, que são convencionalmente usadas em laboratórios de micropropagação. Os LEDs possuem alta eficiência na geração de luz com baixa emissão de calor, podem ter sua intensidade e composição espectral controladas e, principalmente, são mais econômicos (Rocha et al., 2017; Lazzarini et al., 2017). Além disso, estudos mostraram que o uso de LEDs incrementa a taxa de multiplicação dos explantes e é capaz de proporcionar maior comprimento e número de brotações, devido à melhoria na qualidade de luz (Rocha et al., 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tipo de luz no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (5 x 2), em que os níveis do fator A referem-se aos diferentes tipos de luz utilizados, e os níveis do fator B, referem-se ao período de cultivo, sendo 30 ou

60 dias, totalizando 10 tratamentos. Os tratamentos consistiram do cultivo em fotoperíodo de 16 h sob iluminação por diferentes espectros de cor (branco, azul, verde ou vermelho) fornecidos por lâmpadas LED tipo PAR 20/C ou lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (testemunha). As prateleiras que continham os tratamentos foram isoladas com papel preto a fim de evitar a interferência de outros espectros luminosos. Os tratamentos com iluminação LED continham 6 lâmpadas cada, distantes 15 cm uma da outra.

A unidade experimental foi composta por 10 frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog, 1962) e dois explantes em cada frasco. Foram utilizadas no total 100 unidades experimentais e 200 unidades amostrais.

O meio nutritivo utilizado foi o $\frac{1}{2}$ MS composto pela diluição do meio MS à metade de sua concentração normal de sais e vitaminas, acrescido de 10 g L^{-1} de sacarose, 50 mg L^{-1} de mio-inositol e 4 g L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 6, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm de pressão durante 15 min.

Como explantes, foram utilizados segmentos nodais oriundos de matrizes em casa de vegetação, com aproximadamente 1 cm de comprimento, previamente desinfestados com etanol a 70% (v/v) durante 30 s, hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) durante 10 min e hipoclorito de cálcio a 2% (v/v) por 10 min. Em seguida, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada. Após a inoculação dos explantes em meio nutritivo, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$. Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* foram realizadas as avaliações, observando-se as variáveis: estabelecimento (%) (explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), número de folhas, número de brotos (considerando-se como broto qualquer desenvolvimento das gemas do explante), contaminação bacteriana (%) (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e número de gemas (considerando-se gemas adventícias, oriundas da organogênese dos tecidos e não gemas já pré-existentes, comuns em segmentos nodais).

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov- Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram

transformadas, sempre que necessário, 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, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) versão 5.6 (Ferreira, 2014). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (Pimentel-Gomes, 2009).

Para as variáveis estabelecimento ($p= 0,0142$), número de folhas ($p= 0,0048$), número de brotos ($p= 0,0062$) e contaminação bacteriana ($p= 0,0436$), foi observado efeito significativo somente do fator principal tipo de luz, não sendo observado efeito significativo do fator principal período de cultivo, tampouco de sua interação (Tabela 1). Entretanto, para a variável número de gemas ($p= 0,0108$), foi observado efeito significativo somente do fator principal período de cultivo *in vitro*.

Tabela 1. Estabelecimento (%), número de folhas, número de brotos e contaminação bacteriana (%) em explantes de *Eugenia involucrata*, em função de diferentes tipos de luz, cultivados em meio nutritivo MS, com a concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*.

Table 1. Establishment (%), number of leaves, number of shoots and bacterial contamination (%) in explants of *Eugenia involucrata*, according to different types of light, grown in nutrient medium MS, with the concentration of salts reduced to half ($\frac{1}{2}$ MS), regardless of the *in vitro* culture period.

Tipos de luz	Estabelecimento (%)	Número de folhas	Número de brotos	Contaminação bacteriana (%)
LED branco	41,17 a*	3,39 ab*	1,67 ab*	17,61 a*
LED azul	42,39 a	4,00 a	2,00 a	59,22 b
LED verde	7,33 b	0,39 b	0,28 b	62,78 b
LED vermelho	23,83 ab	1,44 ab	0,72 ab	51,78 b
Lâmpadas fluorescentes	38,72 ab	3,89 a	1,05 ab	64,55 b
Média	30,69	2,62	1,14	51,19
IV	7,48	19,19	14,47	7,47

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. IV (Índice de variação) = $CV\sqrt{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições. Fonte: Autor (2019).

Para a variável estabelecimento, observaram-se as maiores médias no cultivo sob os LEDs azuis ou LEDs brancos, em torno de 40%, diferindo estatisticamente dos LEDs verdes, em cuja presença houve as menores médias. Já no cultivo sob LEDs vermelhos e lâmpadas fluorescentes, não foram observadas médias de estabelecimento significativamente diferentes daquelas registradas nem com LEDs azuis e brancos, nem com verdes (Tabela 1).

Em relação à variável número de folhas, obteve-se a maior média sob os LEDs azuis e lâmpadas fluorescentes (4,00 e 3,89 respectivamente), os quais, porém, não diferiram estatisticamente dos LEDs branco e vermelho, mas diferiram dos LEDs verdes, no qual foi observada a menor média de emissão de folhas do experimento (0,39) (Tabela 1). Para o número de brotos, as maiores médias foram obtidas no cultivo sob LEDs azuis (2,00) e as menores, sob os verdes (0,28) (Tabela 1).

Para a variável contaminação bacteriana, observou-se a menor média sob os LEDs brancos (abaixo de 20%), que diferiu estatisticamente dos demais tipos de luz testados (acima de 50%) (Tabela 1). Quanto ao número de gemas, não houve efeito significativo do tipo de luz sobre essa variável. Obteve-se o maior número de gemas (0,93) aos 30 dias de cultivo *in vitro* do que aos 60 dias (0,27).

As maiores médias de estabelecimento foram observadas no cultivo sob os LEDs azuis ou LEDs brancos, enquanto que, as menores foram obtidas sob os LEDs verdes. O maior número de explantes estabelecidos nesses espectros pode ser explicado pelo fato de que a luz azul possui papel fundamental nas relações hídricas e trocas gasosas (Cosgrove, 1981) e, conseqüentemente, no crescimento e produção vegetal, o que pode explicar os bons resultados obtidos nessa cor de luz empregada no experimento. A utilização de LED branco proporciona maior crescimento das plantas, pois permite que a luz penetre mais facilmente nas folhas para ser utilizada na fotossíntese, como foi observado em *Lactuca sativa* hidropônica (Lin et al., 2013), o que pode explicar os resultados obtidos com *Eugenia involucrata* no presente ensaio. Por outro lado, o reduzido estabelecimento observado com o emprego do LED verde pode ser explicado pelo fato que, de maneira geral, esse tipo de luz promove a redução fotossintética em plantas cultivadas *in vitro* (Taiz & Zeiger, 2013).

De maneira semelhante à variável estabelecimento, para o número de folhas obteve-se a maior média sob os LEDs azuis e lâmpadas fluorescentes e as menores, sob os LEDs verdes. Os resultados obtidos em relação à proliferação de folhas de *Eugenia involucrata* podem ser decorrentes da resposta das culturas à luz azul, que desempenha uma série de funções morfogenéticas, além de regular processos metabólicos, influenciar a produção e o crescimento vegetal, influenciar positivamente o desenvolvimento de cloroplastos e a biossíntese de moléculas de clorofila (Taiz & Zeiger, 2013; Lazzarini et al., 2017). Igualmente, os resultados observados no presente trabalho corroboram com aqueles verificados no cultivo *in vitro* da espécie *Platycodon grandiflorum*, em que também foi obtido o maior número de folhas sob os LEDs azuis (Liu et al., 2014).

Da mesma maneira, para o número de brotos, as maiores médias foram obtidas no cultivo sob LEDs azuis e as menores, sob os verdes. Esse comportamento desfavorável do espectro na faixa de verde, conforme mencionado anteriormente, pode ser justificado pelo fato de que esse comprimento de luz promove redução

fotossintética. Entretanto, a média obtida sob os LEDs azuis é igual à média registrada em outro estudo com *Eugenia involucrata*, em que foram utilizados os fitorreguladores Ácido α -Naftaleno Acético (ANA) a 0,5 μM e Thidiazuron (TDZ) a 32 μM , em cultivo sob lâmpadas fluorescentes (Golle et al., 2017), o que é um resultado muito satisfatório, uma vez que com a utilização somente de lâmpadas LED obteve-se média igual àquela que necessitou o emprego de dois fitorreguladores (ANA e TDZ). Com isso, haveria uma significativa redução de custos para a formação de mudas da espécie, visto que não seria necessária a adição de fitorreguladores no meio nutritivo, além de que a utilização de lâmpadas LEDs na técnica da micropropagação proporciona efetiva economia de energia elétrica (Rocha et al., 2015).

O número de brotos observados nos cultivos sob LEDs brancos ou vermelhos ou lâmpadas fluorescentes não diferiram daquelas obtidos com o emprego de LEDs verdes, o que indica que, talvez, não sejam adequados para a fase de multiplicação da micropropagação de *Eugenia involucrata*. Contrariamente, em *Saccharum officinarum* L. foi identificado um elevado potencial do uso de LEDs brancos na fase de multiplicação dessa espécie, uma vez que promoveu o desenvolvimento de maior número de brotações por explante (Ferreira et al., 2016). Pode-se inferir, a partir dos resultados obtidos, que o tipo de luz utilizado durante o cultivo *in vitro*, mais precisamente o comprimento de onda, exerce influência no número de brotações em *Eugenia involucrata*.

Para a variável contaminação bacteriana, a menor média observada no ensaio ocorreu na presença dos LEDs brancos. A contaminação bacteriana, geralmente de origem endógena, é frequentemente observada em cultivos *in vitro* de *Eugenia involucrata* (Golle et al., 2013), porém, no presente estudo, constatou-se uma grande redução desses contaminantes quando os explantes receberam iluminação por meio de LEDs brancos. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que a luz branca promove incremento na fotossíntese por influenciar o balanço hormonal natural das plantas (Lin et al., 2013), sendo assim, a qualidade da luz utilizada pode proporcionar a indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas (Morini & Muleo, 2003), desfavorecendo, simultaneamente, a proliferação desses contaminantes nesse espectro de luz específico.

Em relação ao número de gemas, obteve-se um maior número de gemas aos 30 dias em comparação aos 60 dias de cultivo *in vitro*, isso se deve, provavelmente,

ao seu desenvolvimento em brotos. Entretanto, estudos realizados com *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* demonstraram que a utilização da luz branca convencional (fluorescente) associado a aproximadamente 0,15 µM de BAP proporcionou maior número de gemas por explantes (20,2), aos 60 dias de cultivo *in vitro* (Brondani et al., 2009), média muito superior à registrada no presente trabalho. Esse fato pode ser explicado pela adição do fitorregulador BAP ao meio nutritivo, o qual possui eficiência no processo de multiplicação pelo desenvolvimento de gemas axilares preexistentes ou, também, indução de gemas adventícias (Taiz & Zeiger, 2013).

Diante disso, conclui-se que os LEDs azul, vermelho e branco, bem como as lâmpadas fluorescentes, de maneira geral, influenciam favoravelmente o desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata*. No cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* sob LED branco há uma menor contaminação bacteriana.

Referências

- Brondani, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009. DOI: 10.1590/S0100-67622009000100002.
- Carvalho, P. E. R. **Cerejeira *Eugenia involucrata***. Colombo, PR: Comunicado Técnico, 2009.
- Cosgrove, D. J. Rapid suppression of growth by blue light occurrence, time course, and general characteristics. **Plant Physiology**, v. 67, n. 3, p. 584-590, 1981.
- Erig, A. C. & Schuch, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005. DOI:10.1590/S0103-84782005000400039.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI:10.1590/S1413-70542014000200001.
- Ferreira, L. T. et al. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* da cana de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 2, p. 46-52, 2016.
- <http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/93>.

- Golle, D. P. et al. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Revista Árvore**, v. 41, n. 5, e410509, 2017. DOI:10.1590/1806-90882017000500009.
- 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**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2013. DOI:10.5902/198050985092.
- Lazzarini, L. E. S. et al. Uso de Diodos Emissores de Luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas – revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017. DOI:10.18188/1983-1471/sap.v16n1p137-144.
- Lian, M. L. et al. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 3-4, p. 365-370, 2002. DOI:10.1016/S0304-4238(01)00385-5.
- Lin, K. H. et al. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). **Scientia Horticulturae**, v. 150, n. 1, p. 86-91, 2013. DOI:10.1016/j.scienta.2012.10.002.
- Liu, M. et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. **Scientia Horticulturae**, v. 174, n. 1, p. 112-118, 2014. DOI:10.1016/j.scienta.2014.05.006.
- Lorenzi, H. (Ed). **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2016. 384 p.
- Morini, S. & Muleo, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: Jain, S. M., Ishi, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic; 2003. p.3-35.
- Murashige, T. & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Pimentel-Gomes, F. (Ed.). **Curso de estatística experimental**. 15 ed. Piracicaba: FEALQ, 2009, 451 p.
- Rocha, P. S. G. et al. New light sources for *in vitro* potato micropropagation. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 5, p. 1312-1318, 2015.

Rocha, P. S. G. et al. Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 11, n. 2, p. 247-252, 2017. DOI:10.17584/rcch.2017v11i2.6666.

Sartor, F. R. et al. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14109/12283>

Taiz, L. & Zeiger, E. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 820 p.

6. CAPÍTULO IV

ARTIGO 4 – 6-BENZYLAMINOPURINE AND 3-INDOLBUTYRIC ACID ON THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Eugenia involucrata*

Esse artigo encontra-se formatado conforme as diretrizes para autores da Revista CERES.

6-Benzylaminopurine and 3-Indolebutyric acid on the *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata*

ABSTRACT – *Eugenia involucrata* is an important Brazilian forest species which can be used for timber and non-timber purposes. In view of the limitations of its seminal reproduction, vegetative propagation particularly by micropropagation becomes an alternative for plantlets production. In this study we evaluated the effect of the phytohormones benzylaminopurine and indolebutyric acid on the *in vitro* multiplication stage from nodal segments. 6-benzylaminopurine had not significant effect, however, the use of indolebutyric acid alone stimulated the callogenesis, but it affected leaves and shoots formation. A moderate multiplication rate was obtained when considering *in vitro* bud formation. 6-Benzylaminopurine and 3-indolebutyric acid are dispensable in *in vitro* multiplication of *E. involucrata*.

KEY WORDS: micropropagation; phytohormones; multiplication rate.

INTRODUCTION

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae) is a forest tree species native to Brazil and it has natural occurrence in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo and Minas Gerais. Its dispersion was recorded in other southern American countries such as Argentina, Uruguay and Paraguay (Carvalho, 2009). The timber is used to make small agricultural tools, for firewood and charcoal (Carvalho, 2009; Lorenzi, 2016), as well as for landscape, environmental, culinary and medicinal purposes. The seeds are recalcitrant, which makes the sexual propagation difficult, considering that they need to maintain a relatively high water content so that germination is not jeopardized (Carvalho, 2009).

In view of the limitations of seminal reproduction of certain native forest species, such as *E. involucrata*, vegetative propagation is an alternative for plant production for commercial use and conservation of genetic resources (Oliveira *et al.*, 2013). Among the techniques of vegetative propagation, micropropagation stands out as a tool of great impact, providing alternatives and even unique solutions in certain cases, like the production of seedlings from recalcitrant seeds. In addition, this technique enables to obtain plantlets with better phytosanitary pattern (Paiva *et al.*, 2002), being extremely relevant for the propagation of native forest tree species.

In this way and once for the complete plant development through *in vitro* propagation, hormonal balances between cytokinins and auxins influence many aspects of plant cell growth and differentiation, it is important to adjust the appropriate concentrations of plant hormones to propagate a particular species (Victório *et al.*, 2012). Studies about the effects of phyto regulators on the *in vitro* propagation of *E. involucrata* are still incipient. Our research group observed that the phyto regulators α -naphthaleneacetic acid (NAA) and Thidiazuron (TDZ) are dispensable on the *in vitro* propagation of these species (Golle *et al.*, 2017). In this work we aimed to evaluate the effect of 6-Benzylaminopurine (BA) and 3-Indolebutyric Acid (IBA) on the *in vitro* multiplication stage of *E. involucrata* micropropagation.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out at Universidade Federal de Santa Maria, from May to July 2017, in a completely randomized design, in a 3 x 4 factorial array, with six replicates, each one constituted of six 150 mL capacity glass bottles containing 30 mL of nutritive medium and two explants, totaling 72 experimental units. The main factors were BA (0; 0.1 or 0.2 μM) and IBA (0; 10; 20 or 30 μM).

The nutritive medium used was $\frac{1}{2}$ MS (Murashige & Skoog, 1962) composed by the dilution of MS medium in half of the normal concentration of its salts and vitamins, plus sucrose (30 g L⁻¹), myo-inositol (50 mg L⁻¹) and agar (7 g L⁻¹), with pH adjusted to 5.8. The explants were nodal segments of seminal origin which were obtained from previous *in vitro* culture for 60 days in a medium of the same composition. The *in vitro* cultures were maintained in a growth room at 25 \pm 2 °C, with 12 h photoperiod and 20 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance obtained from cold white daylight fluorescent lamps.

Evaluations were carried out 60 days after *in vitro* inoculation. The following variables were measured: number of buds, number of shoots, number of leaves and number of calluses per explant. The average multiplication rate was estimated by counting the number of buds formed, except the apical bud (Pereira & Fortes, 2004).

After testing the normality of the errors by the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances by the Bartlett test, the variables were transformed, when necessary, by the function $\sqrt{x + 0,5}$, where x is the observed value. Analysis of variance (ANOVA) and polynomial regression analysis were performed using Sisvar software (Ferreira, 2014) version 5.6 at 0.05 significance level. The precision of the tests was

estimated by the variation index (IV), calculated by $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, where IV equals to coefficient of variation (CV) divided by the square root of the number of repetitions (N) (Pimentel-Gomes, 2009). Charts were plotted in Microsoft Office Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

For the number of buds per explant no significant effect of any main factor was observed, nor of its interaction. In turn, for the number of shoots ($p = 0.0447$) (Figure 1A), number of leaves ($p = 0.0166$) (Figure 1B) and callus formation ($p = 0.0470$) (Figure 1C), there was significant effect for AIB concentrations, but no significant effect for BA or the interaction between the factors was observed.

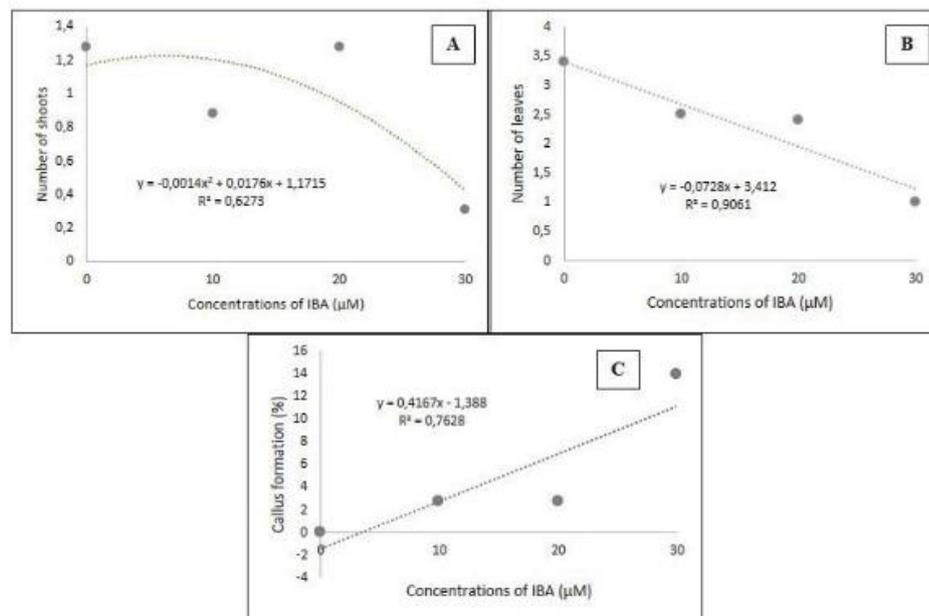


Figure 1 – Number of shoots (A), number of leaves (B) and number of calluses per explant (%) (C) in *E. involucrata* nodal segments on different 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations, regardless 6-benzylaminopurine (BA) concentrations, after 60 days of *in vitro* culture on $\frac{1}{2}$ MS nutritive medium.

Regarding the number of buds, a satisfactory mean of 1.04 was obtained, which can be explained by the endogenous balance of phytohormones favorable to the increase of this variable in *E. involucrata* cultures. BAP is the most used cytokinin in the micropropagation of forest species due to its effectiveness on promoting cell multiplication and, thus, the induction of adventitious buds *in vitro* (Botin & Carvalho,

2015), however, in the present study, there was no effect of this phytohormone for bud proliferation in *Eugenia involucrata*.

For the number of shoots, the model with the best fit was square (Figure 1A). Auxin supplementation with low concentrations caused an increase in the number of shoots until 9 μM in which was observed a decrease. Shoot formation in the absence of phytohormones may indicate the presence of endogenous cytokinins in *E. involucrata* (Figures 2A and 2B). It is a good finding as seedlings of this species can be micropropagated at reduced costs. However, this value (1.28 shoots per explant) is still low and further studies to optimize this finding are required. Similar results were found in other study with *E. involucrata* in which 1.96 shoots per explant were obtained in the absence of phytohormones and, when combined with 0.5 μM Naphthaleneacetic acid (NAA) and 32 μM Thidiazuron (TDZ), no significant alteration was obtained (Golle *et al.*, 2017). Dissimilar result, however, was observed in *Cyrtopodium saintlegerianum*, where the concentration of approximately 1 μM IBA or 1 μM NAA increased the number of shoots (Silva *et al.*, 2013).



Figure 2 - Aspects of *E. involucrata* explants in the MS nutritive medium, in the absence of phytohormones, after 60 days of *in vitro* culture. It is observed, in 'A', the emission of several shoots (highlighted by the arrows) and, in 'B', the aspect of bud formation (arrow 1) and the development of adventitious bud (arrow 2). Bar = 1 cm.

Regarding the number of leaves, the model with the better fit was linear (Figure 1B). The highest mean value (3.39 leaves per explant) was observed in the absence

of IBA, decreasing with the increase of auxin concentration in the nutritive medium (Figures 3A and 3B). The observed response is probably due to the endogenous hormonal balance adequate for morphogenesis, such that the auxin supplementation has impaired leaf formation. This finding supports the recognized action of auxins on plant rhizogenesis as well as on stimulating the formation of leaves, axillary or apical buds, embryos and calluses (Cid & Teixeira, 2010). Leaf production at the multiplication stage is crucial for shoot production from new shoots rise from buds formed at the insertion point of leaves on the stem, consequently, increasing seedling production (Costa *et al.*, 2010). Similar results were obtained with *Epidendrum ibaguense* in which the highest number of leaves was obtained in the absence of phytohormones (Santos *et al.*, 2010), and in *Cyrtopodium saintlegerianum*, in which the use of IBA in the nutritive medium promoted a decrease in number of leaves (Silva *et al.*, 2013).



Figure 3 – Leaf emission in *E. involucrata* explants after 60 days of *in vitro* culture on the $\frac{1}{2}$ MS nutritive medium as a function of different 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations, regardless 6-benzylaminopurine (BA) concentrations. A. Several leaves emitted in the absence of phytohormones. B. The aspect of leaf formation in the presence of IBA (30 μ M) (highlighted by the arrows). Bar = 1 cm.

For callus formation, the model with the best fit was linear (Figure 1C), being observed an increase in callogenesis as IBA concentration increased. It is important to mention that callus formation did not hinder the explant development, instead, allowed

simultaneous emission of shoots and adventitious buds (Figures 4A and 4B). Callus formation may be promoted by the balance of endogenous cytokinins and the supplemented IBA auxin in the nutrient medium. Auxins may stimulate various physiological responses in plants, such as callus induction (Cid & Teixeira, 2010), as observed in the present study, where the higher concentrations of auxin combined with low concentrations of cytokine might have resulted in a balance favoring callogenesis. Similar results were observed by Fermino-Júnior & Scherwinski-Pereira (2012) in *Amburana acreana* explants, in which the use of 1 and 2 mg L⁻¹ of IBA promoted callus formation whereas its absence and 0.5 mg L⁻¹ did not promote.

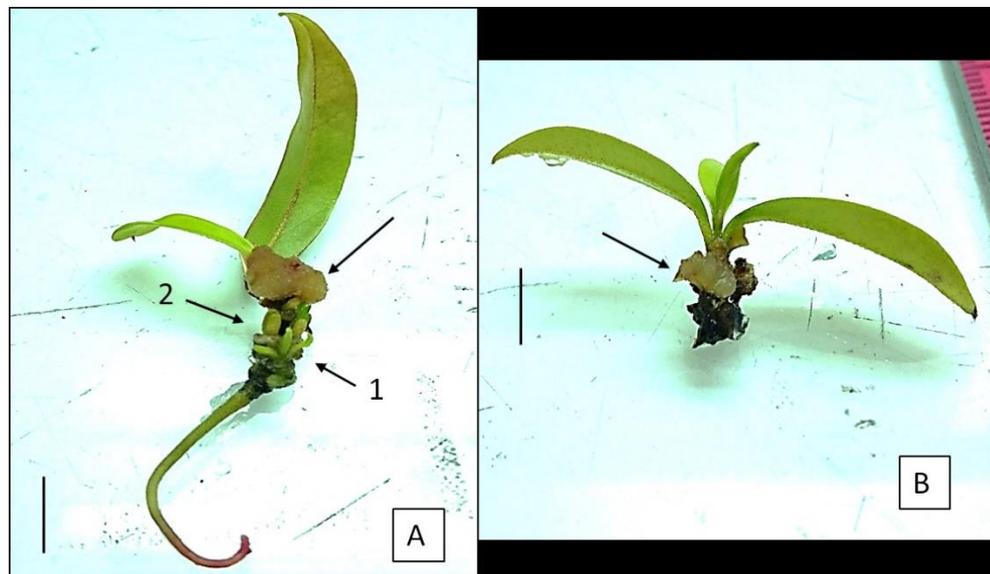


Figure 4 – Callus formation in *E. involucrata* after 60 days of *in vitro* culture on the $\frac{1}{2}$ MS nutritive medium as a function of different 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations, regardless 6-benzylaminopurine (BA) concentrations. A. Callus formation in the presence of IBA (20 μ M) (highlighted by the arrow), shoot emission (arrow 1) and adventitious bud formation (arrow 2). B. The aspect of callus formation in the presence of IBA (30 μ M) (highlighted by the arrow). Bar = 1 cm.

Regarding the multiplication rate, 65 new buds were formed at the end of the cultivation period. Multiplication rate estimates the growth and development capacity of plant material, being an important variable to evaluate the performance of micropropagation, mainly when it comes to native forest species which most studies do not evaluate this variable (Santiago, 2011).

Additionally, it should be considered that the multiplication rate may also provide evidence on the genetic stability of *in vitro* cultures, with high values suggesting the occurrence of a unique and, generally, undesirable micropropagation phenomenon, called somaclonal variation (Larkin & Scowcroft, 1981). Somaclonal variation comprises any change caused by genetic or epigenetic variation, which may be reflected in regenerated plant phenotypes, which are somatic and often meiotically inheritable (Rhee *et al.*, 2010). Illustrating this association, in a study with *Handroanthus chrysotrichus* a multiplication rate of 794 was obtained during the initial cultivation of stem apical segments after 30 days (Paim, 2014). This value is considered high and suggests the occurrence of somaclonal variation in the explants, contrarily to the observed in the present study. On the other hand, in 'Thap Maeo' banana micropropagation, BAP cytokine provided the highest multiplication rates (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

In view of the above, we conclude that BA and IBA are dispensable for *in vitro* multiplication of *E. involucrata*, and IBA alone favours the callogenesis, negatively affects leaves and shoots formation.

A moderate multiplication rate was obtained when considering *in vitro* bud formation.

The findings in this work will contribute to successful and economic propagation of *E. involucrata* through tissue culture.

REFERENCES

- Botin AA & Carvalho A (2015) Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. *Revista de Ciências Agroambientais*, 13: 83-96.
- Carvalho PER (2009) Cerejeira *Eugenia involucrata*. Colombo, Embrapa. 8 pág. (Comunicado Técnico, 224).
- Cid LPB & Teixeira JB (2010) Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, LPB. *Cultivo in vitro de Plantas*. Brasília: Embrapa, p.15-49.
- Costa GM, Nepomuceno CF & Santana RF (2010) Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, 40: 1090-1096.

- Fermino-Júnior PCP & Scherwinski-Pereira JE (2012) Germinação e propagação *in vitro* de Cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). *Ciência Florestal*, 22:1-9.
- Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, 38:109-112.
- Golle DP, Reiniger LRS, Stefanel CM, Muniz MFB & Silva KB (2017) Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. *Revista Árvore*, 41:e410509.
- Larkin PJ & Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60:197-214.
- Lorenzi H (2016) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 384p.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Oliveira LS, Dias PC & Brondani GE (2013) Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa florestal brasileira*, 33:439-453.
- Paim AF (2014) Micropropagação e análise da anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 188p.
- Paiva R, Gomes GAC, Santana JRF, Paiva PDO, Dombroski JLD & Santos BR (2002) Espécies frutíferas com potencial econômico: avanços no processo de propagação. *Informe Agropecuário*, 23:78-84.
- Pereira JES & Fortes GRL (2004) Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. *Horticultura Brasileira*, 22:197-201.
- Pimentel-Gomes F (2009) Curso de estatística experimental. 15ª ed. Piracicaba: FEALQ. 451p.
- Rhee Y, Sekhon RS, Chopra S & Kaeppler S (2010) Tissue Culture-Induced Novel Epialleles of a Myb Transcription Factor Encoded by pericarp color1 in Maize. *Genetics*, 186: 843-855.

Santiago G (2011) Variação somaclonal nas cultivares de batata Asterix e Atlantic por marcadores morfológicos e microssatélites. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 167p.

Santos MRA, Ferreira MGR & Marques MG (2010) BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* KUNTH. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 6:90-98.

Scherwinski-Pereira JE, Costa FHS & Oliveira JP (2009) Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. In: Gonçalves RC & Oliveira LC. Embrapa: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do sudoeste da Amazônia. Rio Branco: Embrapa Acre. p.253-290.

Silva DM, Carneiro LL, Mendes DJ & Sibov ST (2013) Efeito das auxinas ácido naftaleno acético e ácido indolbutírico no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f. (Orchidaceae). *Enciclopédia Biosfera*, 9:852-860.

Victório CP, Lage CLS & Sato A (2012) Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. *Revista Ciência Agronômica*, 43: 539-545.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

We have no conflict of interest to declare.

7. CAPÍTULO V

ARTIGO 5 - ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E CINETINA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata*

Esse artigo encontra-se formatado conforme as diretrizes para autores do periódico **Pesquisa Florestal Brasileira**.

Ácido Naftalenoacético e Cinetina na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*

Resumo: *Eugenia involucrata* é uma espécie florestal nativa do Brasil com grande potencial para uso madeireiro, frutícola e medicinal. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de Ácido α -naftalenoacético (ANA) e Cinetina (CIN) na sua multiplicação *in vitro*. Foram testadas diferentes combinações de ANA e CIN. Após 90 dias de cultivo *in vitro* foi observada uma média geral de 1,19 gemas por explante, sendo que o maior número de brotos (1,33) e folhas (3,38) foram obtidos a 2 μ M de ANA. Essa concentração de ANA é importante na multiplicação *in vitro* de *E. involucrata*, sendo dispensável sua associação com cinetina.

Termos para indexação: Micropropagação; Fitorreguladores; Recurso genético.

Naphthaleneacetic acid and Kinetin in the *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata*

Abstract: *Eugenia involucrata* is a native Brazilian forest species with great potential for timber, fruit and medicinal purposes. The objective of this work was to evaluate the effect of α -naphthalenoacetic acid (NAA) and kinetin (KIN) on its *in vitro* multiplication. Combinations different of NAA and KIN were tested. After 90 days of *in vitro* culture, a general average of 1.19 buds per explant was observed, and the largest number of shoots (1.33) and leafs (3.38) was obtained at 2 μ M NAA. This concentration of NAA is important in the *in vitro* multiplication of *E. involucrata*, and its association with kinetin is not necessary.

Keywords: Micropropagation; Phyto regulators; Genetic resource.

Eugenia involucrata De Candolle é conhecida popularmente como Cerejeira, Cerejeira-do-mato, Cerejeira-do-rio-grande, dentre outros. É uma Myrtaceae de ocorrência natural em vários estados brasileiros, entre eles o Rio Grande do Sul (Carvalho, 2009). Apresenta diversas características de interesse, como madeira de excelente qualidade e durabilidade; além de recursos não madeiráveis, as folhas, que apresentam propriedades medicinais, sendo utilizadas na forma de chás com ação antialérgica, antioxidante e anti-inflamatória (Dametto, 2014) e os frutos que são muito apreciados para consumo humano e animal (Lorenzi, 2016).

Seus frutos apresentam poucas sementes, normalmente uma ou duas (Silva et al., 2005), as quais são recalcitrantes, iniciando a perda do potencial germinativo após duas semanas de armazenamento (Lorenzi, 2016; Carvalho, 2009). Esse fato, aliado à densidade de ocorrência de árvores adultas e índice de sincronia na floração e na frutificação dos indivíduos (Tonetto et al., 2013) reduzidos dificultam a obtenção de sementes em grande quantidade para a produção de mudas em larga escala (Silva et al., 2005) e se configuram nos principais obstáculos para a instalação de povoamentos de *Eugenia involucrata*.

Diante dessa limitação de reprodução pela via seminal, a propagação vegetativa torna-se uma alternativa para a multiplicação da espécie (Oliveira et al., 2013). Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a micropropagação tem se destacado como uma ferramenta de grande impacto (Xavier et al., 2009), sendo de extrema relevância para a propagação das espécies florestais nativas.

O sucesso da micropropagação, geralmente, está relacionado com suplementação de fitorreguladores de maneira isolada ou combinada (Vidal et al., 2013) ao meio nutritivo, sendo que as respostas morfogênicas observadas são controladas, principalmente, pelo balanço hormonal que se estabelece entre auxinas e citocininas. As auxinas atuam na expansão e alongamento celular auxiliando, também, na divisão celular, destacando-se, para tal finalidade, o Ácido α -naftalenoacético (ANA) (Taiz & Zeiger, 2013). Por sua vez, as citocininas estão envolvidas nos processos associados com o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo a Cinetina (CIN) um dos fitorreguladores mais utilizados na micropropagação (Asmar et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos fitorreguladores ANA e CIN na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (3x4), em que os níveis do fator A referem-se às concentrações de Ácido α -naftalenoacético (ANA) (ausência, 2 μ M ou 4 μ M), e os níveis do fator B referem-se às diferentes concentrações de Cinetina (CIN) (ausência, 4 μ M, 8 μ M ou 16 μ M), totalizando 12 tratamentos com 10 repetições. Cada repetição foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS) (Murashige & Skoog, 1962) e três explantes por frasco.

Os explantes utilizados foram isolados a partir da germinação *in vitro* de sementes de *Eugenia involucrata*, as quais passaram por um procedimento de desinfestação superficial previamente a sua inoculação em meio nutritivo. Na desinfestação superficial, realizada na mesa de fluxo laminar, as sementes foram submersas durante 1min em etanol a 70 % (v/v), seguida de imersão por 15 min em hipoclorito de cálcio a 3 % (v/v), e igual período em hipoclorito de sódio a 3 % (v/v). Por último, as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada.

Na sequência, as sementes foram inoculadas com o auxílio de pinças em meio ágar-água, o qual havia sido anteriormente autoclavado a 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 min. Concluída a inoculação, os frascos foram fechados com papel alumínio e alocados na sala de crescimento com temperatura controlada de 25 °C±2, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia, onde permaneceram por 80 dias. Obtida a germinação *in vitro*, isolaram-se os segmentos apicais caulinares, os quais foram usados como explantes no experimento.

Após 90 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas as variáveis número de gemas, número de brotos e número de folhas. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. A seguir, os dados foram submetidos à transformação pela função $\sqrt{x+0,5}$ sempre que necessário, e à análise de variância. Quando significativas, as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Foi utilizado o pacote estatístico Sistema para Análise de Variância (Sisvar) para Windows® versão 5.6 (Ferreira, 2014). A precisão dos ensaios foi estimada pelo Índice de Variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (Pimentel-Gomes, 2009).

Para o número de gemas (Figura 1A) não houve efeito significativo de nenhum fator principal, tampouco da interação entre eles. Já para as variáveis número de brotos ($p= 0,0065$) e número de folhas ($p= 0,0488$) foi observado efeito significativo somente do fator principal ANA (Tabela 1), não sendo observado efeito significativo de CIN, tampouco de sua interação.

Em relação ao número de gemas, mesmo que as diferentes combinações de fitorreguladores avaliadas no presente trabalho não tenham influenciado significativamente essa variável, foi observada uma média que pode ser considerada alta (1,19) comparativamente ao que foi registrado para a espécie em trabalho anterior de multiplicação *in vitro* (0,67) (Golle et al., 2017). O resultado obtido pode ser explicado pelo nível endógeno de citocinina nos explantes, o qual foi suficiente para induzir a proliferação de gemas axilares. Esse resultado pode ser benéfico, uma vez que a utilização de fitorreguladores no meio nutritivo aumenta o custo da técnica da micropropagação. Além disso, na fase de multiplicação, é fundamental a obtenção de explantes que apresentem maior número de gemas, visto que estes irão produzir novas plantas e, com isso, proporcionam uma maior taxa de multiplicação (Torres et al., 1999). Contrariamente ao obtido, na espécie herbácea aromática *Mentha piperita*, uma média bastante superior (13,12) de gemas foi registrada na ausência de ANA e presença da citocinina Benzilaminopurina (BAP) a 4,4 μM (Beduhn et al., 2016).

Tabela 1: Número médios de brotos e folhas aos 90 dias de multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*, em meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS) em função de Ácido α -naftalenoacético (ANA) independentemente de Cinetina (CIN). Santa Maria, RS, UFSM, 2019.

Table 1: Average number of shoots and leafs at 90 days of *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* in MS nutrient medium, whose salt concentration was halved ($\frac{1}{2}$ MS) as a function of α -Naphthaleneacetic Acid (NAA) independently of Kinetin (KIN). Santa Maria, RS, UFSM, 2019.

Concentração de ANA (μM)	Número de brotos	Número de folhas
0	0,67 b	2,38 ab
2	1,33 a	3,38 a
4	0,50 b	1,17 b
Média	0,83	2,31
IV**	4,35	6,95

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. IV** (Índice de variação) = $CV\sqrt{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Já a maior média de número de brotos (1,33) foi obtida com o emprego de 2 μM de ANA, a qual diferiu significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1) (Figura 1B). Isso pode ser explicado pelo balanço hormonal favorável à indução de brotações que se estabeleceu com a suplementação da concentração intermediária da auxina. Já, na concentração mais elevada (4 μM), assim como na ausência de fitorreguladores no meio nutritivo, o balanço entre auxina e citocinina não foi adequado para a emissão de um maior número de brotações.

Contrariamente, em outro estudo realizado com *E. involucrata*, foram obtidos 2 brotos por explante quando foram combinados 0,5 μM de ANA e uma concentração bastante elevada (32 μM) de Thidiazuron (TDZ) (Golle et al., 2017). Diferentemente, na micropropagação de *Rosa* sp., a utilização somente da citocinina cinetina foi responsável pelos resultados mais satisfatórios, com proliferação de até 46% de brotações (Kumud et al., 2015). Por sua vez, em *Hancornia speciosa* a ausência de ambos os fitorregulares BAP e ANA no meio nutritivo MS foi que aumentou significativamente o número de brotações (Oliveira et al., 2016). Da mesma maneira, em estudos com *Caesalpinia pyramidalis*, foi obtido um aumento no número de brotações na ausência de fitorreguladores no meio nutritivo (Silva et al., 2014), o que sugere que nessas espécies não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina ou auxina para estimular as brotações, diferentemente do que foi observado em *Eugenia involucrata* no presente estudo.

Figura 1: Aspectos da indução de gemas, brotações e folhas em *Eugenia involucrata* na presença de 2 μM de Ácido α -naftalenoacético (ANA) no meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}\text{MS}$), após 90 dias de cultivo *in vitro*. Observa-se em 'A' aspecto da formação de gemas (setas); em 'B' emissão de brotações (destacadas pelas setas); e em 'C' emissão de diversas folhas no explante (setas). Barra = 1 cm.

Figure 1: Aspects of bud, shoots and leaf induction in *Eugenia involucrata* in the presence of 2 μM α -naphthalenoacetic Acid (NAA) in the nutritive medium MS, whose salt concentration was halved ($\frac{1}{2}\text{MS}$) after 90 days of *in vitro* cultivation. It is observed in 'A' aspect of bud formation (arrows); in 'B' the emission of shoots (highlighted by the arrows); and in 'C' emission of several leaves in the explant (arrows). Bar = 1 cm.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2019.

Para a variável número de folhas, a média obtida com 2 μM de ANA foi superior àquela observada com o emprego da maior concentração da auxina, porém nenhuma das duas diferiu do tratamento testemunha (Tabela 1) (Figura 1C). O resultado observado provavelmente é decorrente do balanço hormonal não favorável à formação de folhas que é promovido pela suplementação com auxina. Na etapa de multiplicação *in vitro*, um maior número de folhas por explante é bastante favorável,

visto que na inserção entre o caule e a folha pode existir a produção de gemas, que irão originar um novo broto e, conseqüentemente, uma nova muda (Costa et al., 2010).

Por sua vez, em outro estudo realizado com a espécie *E. involucrata*, foram observadas as maiores médias de formação de folhas na ausência de fitorregulador (2,22) e na presença de 32µM de TDZ (2,05) (Golle et al., 2017), médias inferiores ao obtido no presente experimento. Porém, em *Campomanesia adamantium*, a adição de ANA (a 1 µM) combinado a TDZ (5 µM) no meio nutritivo MS reduziu o número de folhas nos explantes (Goelzer et al., 2019). Contrariamente, em *Peltophorum dubium*, o número de folhas foi aumentando de acordo com o incremento na concentração de citocininas (BAP, CIN, 2IP ou TDZ), até a concentração 20,2 µM, a partir da qual houve redução (Curti, 2011).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Conclusões

A utilização de 2 µM de ANA aumenta o número de brotações e folhas, sendo importante para a multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*. É dispensável o emprego de CIN.

Referências

- Asmar, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, especial, p. 533-538, 2011.
- Beduhn, F. A. et al. Propagação *in vitro* e aclimatização de *Mentha piperita* L. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, p. 928-938, 2016.
- Carvalho, P. E. **Cerejeira – Eugenia involucrata**. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 8p. (Comunicado técnico).
- Costa, G. M. et al. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010005000084.

- Curti, A. R. **Contribuições para a micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.
- Dametto, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, 2014.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. DOI: 10.1590/S1413-70542014000200001.
- Goelzer, A. et al. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.
- Golle, D.P. et al. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Revista Árvore**, v. 41, n. 5, e410509, 2017. DOI: 10.1590/1806-90882017000500009.
- Kumud, S. et al. Micropropagation of rose cultivars: Biotechnological application to floriculture. **Journal of Environmental Research and Development**, v. 10, n. 1, p. 40, 2015.
- Lorenzi, H. (Ed). **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2016. 384 p.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p.473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Oliveira, K. S. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa*. **Revista Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335-342, 2016. DOI: 10.5380/rf.v46i3.43993.
- Oliveira, L. S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. DOI: 10.4336/2013.pfb.33.76.481.
- Pimentel-Gomes, F. **Curso de estatística experimental**. 15 ed., Piracicaba: FEALQ, 451p. 2009.

- Silva, C. V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.27, n.1, p.86-92, 2005. DOI: 10.1590/S0101-31222005000100011.
- Silva, T. dos S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2014. DOI: 10.13102/scb320.
- Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.
- Tonetto, T. S. et al. Dinâmica Populacional e Produção de Sementes de *Eugenia involucrata* na Floresta Estacional Subtropical. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.20, n.1, p.62-69, 2013. DOI: 10.4322/floram.2012.072.
- Torres, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa; 1999. v.2. 517 p.
- Vidal, F. R. et al. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 64-70, 2013. DOI: 10.1590/S1983-40632013000100010.
- Xavier, A. et al. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009.

8. CAPÍTULO VI

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA - MINIESTAQUIA DE *Eugenia involucrata*

Ensaio publicado nos Anais da “Jornada Acadêmica Integrada (JAI)” da Universidade Federal de Santa Maria. (Apêndice A)

MINIESTAQUIA DE *Eugenia involucrata*

1 OBJETIVO

Avaliar a sobrevivência, a oxidação fenólica e o enraizamento de miniestacas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANTIOXIDANTES PREVIAMENTE AO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Eugenia involucrata*

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (10x2), em que os níveis do fator A referem-se às concentrações de Ácido ascórbico ou Polivinilpirrolidona (PVP), sendo testados, separadamente, as concentrações 0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4g L⁻¹ de um dos dois antioxidantes, e os níveis do fator B, referem-se ao período de cultivo, sendo 30 ou 60 dias, totalizando 20 tratamentos com oito repetições (miniestacas).

As miniestacas foram confeccionadas a partir da porção apical de espécimes mantidas em casa de vegetação, contendo de 7 a 10cm de tamanho e 1 a 2 pares de folhas cortadas ao meio. Durante a coleta, em Outubro de 2016, as miniestacas foram acondicionadas em caixa de isopor contendo água destilada para evitar a perda de umidade.

As bases das miniestacas permaneceram imersas durante 15s nas soluções contendo o antioxidante. Após a imersão nas soluções, as miniestacas foram colocadas em copos plásticos de 300mL, contendo o substrato McPlant Misto[®] e vermiculita na proporção 1:1 (v/v).

As miniestacas foram, a seguir, mantidas em casa de vegetação com nebulização controlada (UR 80%). Após 30 e 60 dias de cultivo, foram realizadas as avaliações do experimento, observando-se as variáveis sobrevivência (%), oxidação fenólica (%), número de folhas por estaca e a formação de raízes (%) e raízes secundárias (%) das miniestacas de *Eugenia involucrata*.

2.2 ÁCIDO 3-INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Eugenia involucrata*

Após a análise estatística dos dados do experimento anterior, foi realizado o presente ensaio, que teve por objetivo analisar a sobrevivência, oxidação, número de folhas e o enraizamento de miniestacas de *Eugenia involucrata* submetidas a diferentes concentrações de Ácido 3-indolbutírico (AIB) associadas à concentração do antioxidante que obteve o melhor resultado. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (7x3), em que os níveis do fator A referem-se às concentrações de AIB utilizadas (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10000mg L⁻¹) e, os níveis do fator B, referem-se ao período de cultivo, sendo 30, 60 ou 90 dias, totalizando 21 tratamentos com 10 repetições (miniestacas).

As miniestacas foram confeccionadas a partir da porção apical de espécimes mantidas em casa de vegetação, contendo de 7 a 10cm e 1 a 2 pares de folhas inteiras. Durante a coleta, em Janeiro de 2017, as miniestacas foram acondicionadas em caixa de isopor contendo água destilada para evitar a perda de umidade.

As bases das miniestacas permaneceram imersas durante 15s nas soluções contendo a auxina e, após, mais 15s em solução contendo 0,5g L⁻¹ de ácido ascórbico. Após a imersão na solução, as miniestacas foram colocadas em sementeiras, contendo o substrato McPlant Misto® e vermiculita na proporção 1:1 (v/v). Após, as miniestacas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização controlada (UR 80%) durante todo o experimento. Após o período de cultivo, foram realizadas as avaliações do experimento, observando-se as variáveis sobrevivência (%), oxidação fenólica (%), número de folhas por estaca, formação de raiz (%) e formação de raízes secundárias (%) em miniestacas de *Eugenia involucrata*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANTIOXIDANTES PREVIAMENTE AO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Eugenia involucrata*

Em relação à variável sobrevivência (média geral de 20,83%) (Figura 1) não foi observado efeito significativo dos fatores principais, tampouco de sua interação. A baixa sobrevivência pode ter sido ocasionada pelo baixo enraizamento obtido no presente experimento (discutido na sequência), o qual acarreta em maiores índices de mortalidade. No presente ensaio não se utilizaram auxinas, o que pode, também, ter comprometido o enraizamento e, conseqüentemente, a sobrevivência das miniestacas. Nesse sentido, em *Eucalyptus grandis*, a utilização de 1000 a 2000 mg L⁻¹ de AIB proporcionou as maiores médias de sobrevivência e enraizamento das miniestacas (TITON et al., 2003).

O contrário, porém, foi observado em estudos com *Eugenia uniflora*, em que foram obtidos 45% de sobrevivência em miniestacas adultas não tratadas com AIB, porém, quando foi aumentada a concentração dessa auxina, diminuiu ainda mais o índice de sobrevivência (LATTUADA, 2010). Corroborando com o observado, em *Ilex paraguariensis* (WENDLING; SOUZA JÚNIOR, 2003) e *Swietenia macrophylla* (SANTOS, 2002) a ausência de AIB na base das miniestacas promoveu uma maior sobrevivência (75% e 82,5% respectivamente). Também, se evidenciou o contrário em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, em que uma das maiores médias de sobrevivência (85,9%) foi evidenciada nas miniestacas que não receberam tratamento com auxinas, mas que foram acondicionadas na posição vertical em substrato vermiculita e aplicados 1000mg L⁻¹ de PVP (GOULART; XAVIER, 2010).

Figura 1 - Miniestacas de *Eugenia involucrata* tratadas com diferentes concentrações de dois antioxidantes – ácido ascórbico ou PVP - (0; 0,5; 1,0 ou 1,5g L⁻¹), aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação, dotada apenas de nebulização controlada (UR 80%). Em 'A' miniestacas dispostas em bandeja. Em 'B' detalhe de uma miniestaca de *E. involucrata*. Barra = 1cm.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Para a oxidação fenólica (média geral de 11,81%) não foi observado efeito significativo dos fatores principais, tampouco de sua interação. Essa baixa média de oxidação das miniestacas, obtidas no presente experimento, pode ter ocorrido em função da presença dos antioxidantes que, até certo ponto, controlaram a oxidação, mas, talvez, as concentrações testadas não impediram totalmente sua ocorrência e não foram, tampouco, eficientes de maneira a manifestar efeito significativo do tratamento em relação ao controle. Contudo, em experimentos anteriores de miniestaquia realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa a oxidação fenólica foi sempre muito elevada, o que estaria, provavelmente, até o presente momento, comprometendo a rizogênese na espécie (dados não publicados). No presente experimento, os resultados observados são de reduzida oxidação, mas, também, de baixa rizogênese, o que evidencia que os dois processos, aparentemente, não estão relacionados.

A oxidação fenólica das miniestacas constitui um dos principais problemas que dificultam o enraizamento (WENDLING et al., 2002), fenômeno que é frequentemente presenciado em espécies da família Myrtaceae (FACHINELLO et al., 2005), da qual a

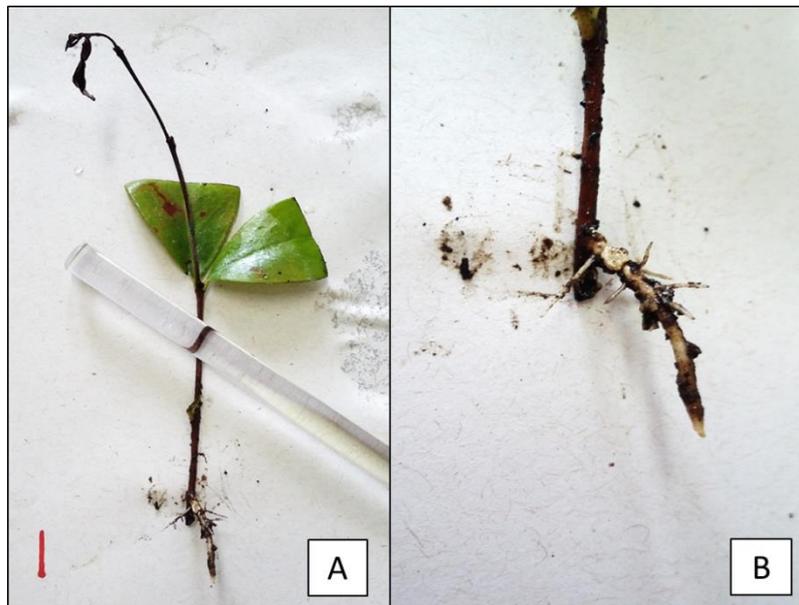
espécie em estudo no presente experimento, *Eugenia involucrata*, é membro. Corroborando com a afirmação anterior, em estudos com *Anadenanthera macrocarpa*, foi obtido percentual de enraizamento (60%), segundo o qual, os autores sugeriram ser em função da produção de compostos fenólicos que ocasionaram oxidação na base das miniestacas (SANTOS, 2002).

Quanto ao número de folhas (média geral de 0,51) não foi observado efeito significativo dos fatores principais, tampouco de sua interação. Essa média geral muito baixa pode ter sido decorrente da baixa sobrevivência das miniestacas e, também, devido à presença de compostos fenólicos que podem ocasionar, além da oxidação, a abscisão foliar precoce (KERBAUY, 2004). A presença de folhas nas miniestacas é extremamente importante, pois favorecem o enraizamento, sendo fontes de fotoassimilados e de substâncias promotoras do enraizamento (auxinas) (HARTMANN et al., 2011), o que pode, simultaneamente, ter prejudicado o enraizamento das miniestacas de *Eugenia involucrata*. A afirmação corrobora com os resultados obtidos com *Erythrina falcata*, em que as estacas sem folhas apresentaram elevada mortalidade e ausência de enraizamento. Já, quando possuíam dois folíolos laterais reduzidos à metade e sofreram aplicação de 3000mg L⁻¹ de AIB, foi observado um percentual médio de enraizamento de 35,4% (BETANIN; NIENOW, 2010).

Em relação às variáveis formação de raiz e raízes secundárias (média geral de 1,39% em ambas) não foi observado efeito significativo dos fatores principais, tampouco de sua interação, porém, a rizogênese somente ocorreu no tratamento em que se utilizou o antioxidante ácido ascórbico à 0,5g L⁻¹. A hipótese de trabalho inicial foi de que a aplicação dos antioxidantes ácido ascórbico ou PVP na base das miniestacas de *Eugenia involucrata*, além de inibir a oxidação fenólica das miniestacas, promovesse o enraizamento na espécie, o que foi confirmado no presente experimento, porém, isso ocorreu somente na presença do ácido ascórbico, mesmo na ausência de AIB. Contudo, a única miniestaca que enraizou (Figura 2) apresentou-se oxidada aos 90 dias de cultivo, e, a seguir, morreu. Isso pode ter duas explicações: ou a iniciação à rizogênese ocorreu em um período anterior quando a miniestaca não estava oxidada (pela ação do antioxidante aplicado na base da miniestaca no início do ensaio) ou, então, que a oxidação fenólica não afeta o enraizamento em *Eugenia involucrata*.

De maneira similar, em um clone específico de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, a presença do ácido ascórbico associado a 40mg L^{-1} de AIB aumentou o seu índice de sobrevivência e enraizamento (GOULART et al., 2010) e, também, em estudos com *Piptocarpha angustifolia*, em que a imersão da base das miniestacas em solução aquosa com 1% de ácido ascórbico, igualmente na ausência de auxina, favoreceu a sobrevivência e o processo de enraizamento adventício da espécie (FERRIANI et al., 2011).

Figura 2 - Miniestaca de *Eugenia involucrata* aos 90 dias de cultivo em casa de vegetação, dotada apenas de nebulização controlada (UR 80%). Em 'A' miniestaca enraizada com a utilização de $0,5\text{g L}^{-1}$ de ácido ascórbico. Em 'B' detalhe da raiz originada em miniestaca de *E. involucrata*. Barra = 1cm.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

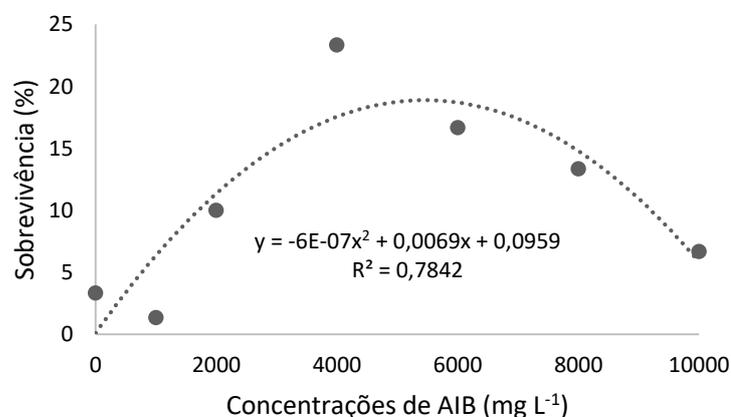
O contrário, entretanto, foi observado em *Vaccinium asheireade*, em que não foi observado efeito para o ácido ascórbico no enraizamento de estacas (HOFFMANN et al., 1995). Já, para *Eucalyptus grandis*, houve efeito benéfico na aplicação de PVP sobre o enraizamento adventício de miniestacas de dois clones da espécie (WENDLING et al., 2001).

3.2 ÁCIDO 3-INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Eugenia involucrata*

Para as variáveis sobrevivência ($p= 0,0443$) e oxidação fenólica ($p= 0,0002$) foi observado efeito significativo do fator principal concentração de AIB, cuja equação estimada, que resultou no melhor ajuste, foi a quadrática (Figuras 3 e 4 respectivamente). Para a variável sobrevivência, também, foi observado efeito significativo do fator principal período de cultivo ($p= 0,0028$), assim como para a variável número de folhas ($p= 0,0001$). Já para as variáveis formação de raiz e formação de raízes secundárias (média geral de 1,11% em ambas) não foi observado efeito significativo de nenhum dos fatores principais, tampouco de sua interação.

Para a sobrevivência, a maior média (23,33%) foi observada na presença de 4000mg L^{-1} da auxina (Figura 3) e, de acordo com o cálculo da máxima eficiência técnica (MET), seria obtida a maior média a 3750mg L^{-1} de AIB. De uma maneira geral, a ausência da auxina e as concentrações inferiores e superiores a 4000mg L^{-1} de AIB foram prejudiciais à sobrevivência das miniestacas, resultando, inclusive, em médias inferiores à média geral observada no experimento anterior, em que houve 20,83% de sobrevivência.

Figura 3 - Sobrevivência média (%) de miniestacas de *Eugenia involucrata* em função das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB ($0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000$ ou 10000mg L^{-1}) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s, independentemente do período de cultivo.



As miniestacas utilizadas no presente estudo, foram confeccionadas a partir da porção apical dos ramos, que apresenta baixa quantidade de reservas acumuladas, o que pode explicar, em parte, a baixa sobrevivência das miniestacas de *Eugenia involucrata* (FRANZON et al., 2004). De maneira contrária, em outro estudo realizado com *Eugenia involucrata* a maior média de sobrevivência foi observada na ausência de AIB e utilizando estacas das porções mediana e basal (50 e 55,5 % respectivamente) (LOPES, 2009).

Em miniestacas de *Nectandra megapotamica* foi evidenciada sobrevivência de 100% tanto na ausência quanto na presença de 1000mg L⁻¹ de AIB (RABAIOLLI, 2015), ao contrário do evidenciado no presente trabalho, em que as menores médias foram obtidas exatamente nessas concentrações. Porém, quando as miniestacas de *Nectandra megapotamica* foram imersas na concentração de 4000mg L⁻¹ de AIB, houve uma redução da sobrevivência, entretanto, essa média ainda foi elevada (80,55%) (RABAIOLLI, 2015), todavia, em comparação, a média obtida no presente experimento (23,33%), nessa concentração (que resultou em maior sobrevivência), foi bastante inferior. O contrário também foi observado em *Peltophorum dubium*, em que a maior sobrevivência das miniestacas (100%) foi observada na ausência de AIB, decrescendo à medida que aumentaram suas concentrações (CURTI, 2014; MANTOVANI et al., 2017).

Em relação ao período de cultivo, obteve-se um decréscimo significativo na sobrevivência das miniestacas de *Eugenia involucrata* com o passar do período (Tabela 1), indicando que um maior tempo de cultivo acarreta em maior mortalidade das miniestacas, muito provavelmente pela falta de raízes formadas (o que será discutido a seguir). Isso corrobora com os resultados obtidos em *Cordia trichotoma*, em que foram obtidos 100% de mortalidade das miniestacas após 80 dias de permanência em casa de vegetação com a utilização das concentrações 0 ou 8000mg L⁻¹ de AIB (HERBERLE, 2010). O contrário, porém, foi observado em *Ilex paraguariensis*, em que, aos 120 dias de cultivo houve 75% de sobrevivência das miniestacas (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003).

Tabela 1 - Sobrevivência (%) e número de folhas em miniestacas de *Eugenia involucrata* em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias) independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Período de cultivo	Sobrevivência (%)	Número de folhas
30	23,33 a*	0,87 a
60	10,00 ab	0,10 b
90	3,33 b	0,10 b
Média	12,22	0,36
IV	6,80	14,04

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. IV (Índice de variação) = $CV\sqrt{N}$, em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

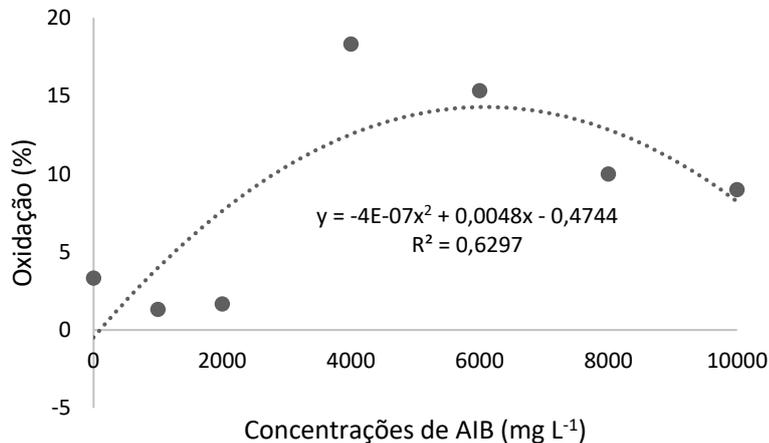
Além do efeito dos fatores principais, discutidos anteriormente, deve-se considerar, adicionalmente, que, no presente experimento, as miniestacas foram mantidas com um par de folhas inteiras, haja vista que a redução de cada folha à metade, como empregado no experimento anterior (item 3.1) e avaliada em uma série de ensaios (dados não apresentados), acarreta na redução da sobrevivência e desenvolvimento das miniestacas. De fato, observou-se um incremento na sobrevivência, mesmo que pequeno, indicando que é possível que a manutenção do par de folhas inteiras pode ter influência direta na sobrevivência, o que deve ser, eventualmente, melhor investigado. Nesse sentido, em *Peltophorum dubium*, a manutenção de uma folha na miniestaca promoveu o aumento no número de brotos (3,39), enquanto que a conservação de um par de folhas promoveu maior comprimento dos brotos (12,41 cm), e, ainda, de três folhas os brotos originados apresentaram maior diâmetro (MANTOVANI et al., 2017), indicando um possível efeito benéfico no desenvolvimento das miniestacas em decorrência da manutenção das folhas iniciais, como observado previamente em *Eugenia involucrata*. Por outro lado, em relação à sobrevivência das miniestacas de *Peltophorum dubium*, foi obtida média de 100% independentemente do número de folhas mantidas nas miniestacas

(MANTOVANI et al., 2017), o que sugere que o comportamento em relação às folhas que são mantidas nas miniestacas é dependente da espécie.

Para o número de folhas, houve efeito significativo somente do fator principal período de cultivo, sendo observado um decréscimo significativo com o passar do período (Tabela 1), a exemplo do que ocorreu com a sobrevivência. Houve uma baixa formação de folhas mesmo nos 30 dias iniciais, em que foi observada a maior média (0,87), o que pode ter sido ocasionado pela alta mortalidade das miniestacas. A afirmação ratifica os resultados obtidos em *Erythrina falcata*, em que os autores relataram que a presença de folhas é imprescindível para a sobrevivência e, também, para o enraizamento de miniestacas (CUNHA et al., 2003). A afirmação também foi ratificada em estudos com *Cedrela fissilis*, em que houve um melhor desempenho das miniestacas em relação à sobrevivência e ao enraizamento quando foram mantidas as folhas (XAVIER et al., 2003).

Para a variável oxidação, observou-se a maior média na presença de 4000mg L⁻¹ de AIB (18,33%) (Figura 4), sendo essa mesma concentração a que, paradoxalmente, promoveu a maior média de sobrevivência das miniestacas (23,33%), permitindo ratificar afirmação anterior (experimento 3.1) de que a presença de oxidação não é indicativo de que haverá a morte das miniestacas de *Eugenia involucrata*. Já, em experimentos com *Anadenanthera macrocarpa*, foi observada baixa incidência de oxidação das miniestacas com o uso das concentrações 0, 2000, 4000 ou 6000mg L⁻¹ de AIB (DIAS et al., 2012), diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 4 - Oxidação (%) de miniestacas de *Eugenia involucrata* em função das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 100000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s, independentemente do período de cultivo.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Quanto à formação de raiz e raízes secundárias, foi observada uma média geral muito baixa (1,11% em ambas) (Figura 5), indicando que as condições testadas não foram satisfatórias para o sucesso da miniestaquia na espécie. Nesta figura, a miniestaca enraizada, que se apresenta com caule aparentemente totalmente oxidado, aos 90 dias de cultivo, foi, subsequentemente, cultivada em sala de cultivo, com temperatura e luminosidade controladas, e desenvolveu novas folhas, o que demonstra sua vitalidade e sugere ausência de influência da oxidação sobre processos de desenvolvimento na espécie em estudo.

Figura 5 - Miniestaca enraizada de *Eugenia involucrata*, independentemente das concentrações de Ácido 3-Indolbutírico – AIB (0; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 ou 10000mg L⁻¹) das soluções hidroalcoólicas (50% etanol, 50% água destilada, v/v) em que foram previamente imersas por 15s, e do período de cultivo, que se deu em casa de vegetação dotada apenas de nebulização controlada (UR 80%). Em 'A' miniestaca enraizada. Em 'B' detalhe da raiz originada em miniestaca de *E. involucrata*. Barra = 1cm.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2020.

Estudos adicionais de enraizamento serão realizados testando-se concentrações inferiores a 1000mg L⁻¹ e confecção de miniestacas a partir das porções mediana e basal dos ramos de *Eugenia involucrata*, haja vista os resultados satisfatórios observados em outras espécies, conforme se segue. Experimentos com *Allophylus semidentatus* demonstraram sucesso no enraizamento com a utilização de baixas concentrações de AIB, obtendo-se o maior percentual com apenas 250mg L⁻¹ da auxina, sendo o oposto evidenciado com o uso de 1000mg L⁻¹, que resultou na redução do enraizamento da espécie (GUBERT, 2011). Assim como também ocorreu em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, em que a utilização de 40mg L⁻¹ de AIB aumentou o índice de enraizamento (GOULART et al., 2010).

Da mesma maneira, considerando que dentre os fatores, listados anteriormente, que exercem maior influência na propagação vegetativa via estaquia das plantas estão: a juvenildade das estacas utilizadas, a época do ano, o estágio fisiológico, a aplicação de AIB, o genótipo e a maturidade (DIAS et al., 2012), e,

simultaneamente, que são àqueles que têm potencialidade para explicar a grande divergência de resultados observados nos estudos, esses fatores constituirão a fonte de variação de estudos subsequentes que serão realizados com *Eugenia involucrata* com a finalidade de avaliar seus efeitos.

4. CONCLUSÕES

Os antioxidantes PVP e ácido ascórbico controlam a oxidação fenólica, mas isso parece não estar associado diretamente à rizogênese de miniestacas de *Eugenia involucrata*.

Os resultados obtidos implicam na necessidade de se efetuar estudos adicionais testando-se concentrações inferiores a 1000 mg L⁻¹ e avaliar a confecção de miniestacas a partir das porções mediana e basal dos ramos de *Eugenia involucrata*, haja vista os resultados satisfatórios observados em outras espécies florestais com menores concentrações da auxina e com esses tipos de miniestacas.

O AIB demonstrou ter efeito significativo sobre a sobrevivência e a oxidação fenólica, mas não sobre o enraizamento de miniestacas de *Eugenia involucrata*, nas condições avaliadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETANIN, L.; NIENOW, A. A. Propagação vegetativa da corticeira-da-serra (*Erythrina falcata* Benth.) por estaquia caular e foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 871-880, 2010.
- CUNHA, A. C. M. C.; WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Influência da presença ou ausência de folhas no enraizamento de miniestacas de corticeira-do-mato (*Erythrina falcata* Benth) obtidas em sistema hidropônico. **Embrapa Florestas- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.
- CURTI, A. R. **Formação de raízes em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert**. 2014. 130 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- DIAS, P.C.; OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453 - 462, 2012.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.
- FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; HELM, C. V., BOZA, A.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 67, p. 257-264, 2011.
- FRANZON, R.C.; ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. Efeito do AIB e de diferentes tipos de estacas na propagação vegetativa da Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.4, p. 512-518, 2004.
- GOULART, P. B.; XAVIER, A. Influência do modo de acondicionamento de miniestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 407-415, 2010.
- GOULART, P. B.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.34, n.6, p.961-972, 2010.
- GUBERT, C. **Prospecção e propagação de vegetativa de espécies aromáticas da floresta ombrófila densa na região litorânea do Paraná**. 2011. 118f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná. 2011.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900p.

HEBERLE, M. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J. C.; SANTOS, A. M. Propagação de mirtilo (*Vaccinium asheireade*) através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.2, p.231-236, 1995.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

LATTUADA, D. S. **Micropropagação e miniestaquia de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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

MANTOVANI, N.; ROVEDA, M.; TRES, L.; FORTES, F. O.; GRANDO, M. F. Cultivo de Canafístula (*Peltophorum dubium*) em minijardim clonal e propagação por miniestacas. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 1, p. 225-236, 2017.

RABAIOLLI, S.M.S. **Sementes e miniestaquia em *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. e sementes e micropropagação em *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) J. Mattos**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SANTOS, G. A. **Propagação vegetativa de mogno, cedro rosa, jequitibá rosa e angico vermelho por miniestaquia**. 2002. 75 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; REIS, G. G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

WENDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. v.2. 145 p.

WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE. v.3, 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p. 60.

WENDLING, I.; TITON, M.; XAVIER, A.; SANTOS, G.; OLIVEIRA, M. Influência do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus grandis*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL, v.1, 2001, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria, 2001. p.16-29.

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

9. CAPÍTULO VII

ARTIGO 6 - VARIABILIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA EM FRAGMENTOS DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE

Esse artigo encontra-se formatado conforme as diretrizes para autores do periódico **Ciência Rural**.

Variabilidade e estruturação genética em fragmentos de *Eugenia involucrata*

De Candolle

Variability and genetic structure in fragments of *Eugenia involucrata* De

Candolle

RESUMO

Eugenia involucrata DC. é uma espécie florestal com elevado potencial ambiental e econômico. O presente trabalho teve por objetivo quantificar a variabilidade genética e analisar a estruturação genética em três fragmentos naturais de *Eugenia involucrata* localizados na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram usados quatro locos microssatélites desenvolvidos para a espécie congênere *Eugenia uniflora* e usando-se o software GenAlEx 6.5 foram estimados parâmetros de variabilidade genética, para cada loco, e sua partição entre e dentro dos fragmentos. Foram observados altos índices de variabilidade genética (3,67 alelos por loco; $H_o = 0,815$; $H_E = 0,625$; $F_{IS} = -0,294$), com a maior proporção (97%) distribuída dentro dos fragmentos. O fluxo gênico foi elevado entre os fragmentos, (2,35 a 4,56 migrantes por geração), resultando em baixo índice de diferenciação genética (F_{ST} entre 0,052 a 0,096). Os fragmentos de *Eugenia involucrata* apresentam elevada variabilidade genética, a maior parte distribuída dentro dos próprios remanescentes, e baixa diferenciação genética. Os fragmentos classificam-se, em relação ao modo de reprodução, como mistos com predominância de cruzamentos.

Palavras-chave: Cerejeira-do-mato; Fluxo gênico; Microssatélites; Espécie florestal brasileira.

ABSTRACT

Eugenia involucrata DC. is a forest species with high environmental and economic potential. The objective of this study was to quantify the genetic variability and to analyze the genetic structure of three *Eugenia involucrata* natural fragments located in the central region of the Rio Grande do Sul state, Brazil. We used four microsatellite loci developed for the congener species *Eugenia uniflora*. Using the GenAlEx 6.5 software, parameters of genetic variability and its partition among and within fragments were estimated for each locus. We observed high levels of genetic variability (3.67 alleles per locus; $H_o = 0.815$; $H_E = 0.625$; $F_{IS} = -0.294$), most of which

(97%) distributed within the fragments. Gene flow between fragments was high (2.35 to 4.56 migrants per generation), resulting in low genetic differentiation indexes (F_{ST} values ranged from 0.052 to 0.096). The *Eugenia involucrata* fragments showed high genetic variability, distributed within the remnants themselves, and low genetic differentiation. The studied fragments are classified, in regard to the reproductive mode, as mixed with predominance of outcrosses.

Key words: Cherry tree; Gene flow; Microsatellites; Brazilian forest species.

INTRODUÇÃO

A cerejeira (*Eugenia involucrata* De Candolle) é uma espécie arbórea florestal nativa do Brasil que é integrante da família Myrtaceae, com ocorrência natural também na Argentina, no Paraguai e no Uruguai. Produz lenha e carvão de excelente qualidade. Seus frutos são consumidos pela fauna e usados na alimentação humana, *in natura* ou como doces, geleias e licores. Trata-se de uma espécie hermafrodita, classificada, quanto ao modo reprodutivo, como autógama, devido à predominância de autofecundações em suas populações naturais (CARVALHO, 2009).

A perpetuação desse importante recurso florestal encontra-se, entretanto, ameaçada devido à crescente fragmentação a que os ecossistemas em que se insere vêm sofrendo nas últimas décadas devido às atividades antrópicas. Essa conversão de uma área contínua em fragmentos de tamanho reduzido, conduzem ao isolamento espacial de indivíduos e, sob essa circunstância, a atuação de processos genéticos como a endogamia e a deriva podem afetar a viabilidade de populações naturais de plantas e conduzir à sua extinção (MATESANZ et al., 2017).

Desse modo, justifica-se a realização de estudos que forneçam subsídios para a conservação dos recursos florestais, como aqueles relacionados à quantificação da variabilidade genética e à análise da estruturação de suas populações naturais por meio de marcadores de DNA. Os resultados desses estudos permitem a adequada seleção de estratégias de manejo para essas populações (CARVALHO, 2009; FLÔRES et al., 2011; NAGEL et al., 2015; CONSON et al., 2013).

Luehea divaricata (NAGEL et al., 2015; SERROTE et al., 2016), *Eugenia uniflora* (AGUIAR et al., 2013), *Cabralea canjerana* (MELO et al., 2015), *Araucaria angustifolia* (SILVA et al., 2015), *Tectona grandis* (GIUSTINA et al., 2017), entre outras são exemplos de espécies arbóreas para as quais há registro desse tipo de estudos.

Para *Eugenia involucrata*, em particular, foram utilizados marcadores RAPD para acessar a variabilidade genética em coleções *ex situ* e em populações naturais do estado do Rio Grande do Sul (GOLLE, 2010; GUERRA et al., 2016).

Marcadores de DNA do tipo microssatélite são considerados extremamente úteis em estudos sobre a estruturação genética de populações. Dentre suas vantagens são destacadas a elevada reprodutibilidade e herança codominante, os quais tornam-nos bastante efetivos para a estimação de parâmetros genéticos de populações vegetais e para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco (VIEIRA et al., 2016).

No presente trabalho foram avaliados iniciadores microssatélites desenvolvidos para a espécie congênere *Eugenia uniflora* com o objetivo de quantificar a variabilidade genética e analisar a estruturação genética em três fragmentos naturais de *Eugenia involucrata* localizados na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

Foram coletadas amostras foliares de indivíduos adultos de três fragmentos naturais de *Eugenia involucrata* localizados nos municípios de Quevedos (29° 21' 09" S; 54° 04' 18" W) (10 indivíduos), Santa Maria (29° 41' 03" S; 53° 48' 25" W) (seis indivíduos) e Silveira Martins (29° 38' 33" S; 53° 35' 08" W) (oito indivíduos), na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram coletadas com o auxílio de podão e imediatamente armazenadas em sacos de papel pardo, previamente identificados, contendo sílica gel. Após a chegada ao laboratório, o material coletado foi mantido em temperatura ambiente, para secagem natural e subsequente isolamento de DNA, conforme metodologia desenvolvida por COSTA et al. (2016).

Isolamento de DNA genômico

O isolamento de DNA genômico dos 24 indivíduos foi efetuado no Núcleo de Genômica e Ecologia Molecular – NuGEM, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus São Gabriel, utilizando-se o protocolo DOYLE; DOYLE (1990).

Amplificação do DNA de *Eugenia involucrata* por iniciadores microssatélites e revelação dos produtos da PCR

As soluções de DNA foram diluídas obtendo-se uma solução de trabalho a 50 ng μL^{-1} e, posteriormente, amplificadas via reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo sido avaliados, inicialmente, 11 locos microssatélites desenvolvidos por BEISE (2018) para *Eugenia uniflora* (Pit 26, Pit 32, Pit 34, Pit 38, Pit 48, Pit 53, Pit 57, Pit 64, Pit 66, Pit 71 e Pit 72).

As reações de amplificação foram realizadas num termociclador BIO-RAD C1000 Touch® (BioRad Co., Hercules, CA, EUA) em um volume final de 12,5 μL , a qual foi preparada usando um Eppendorf epMotion® 5070 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), contendo 50 ng de DNA, 0,25 μM de tampão, 0,5 μM de MgCl_2 , 1 U de Taq DNA Polymerase, 0,05 μM de cada dNTP, 0,125 μM de iniciador *forward*, 0,125 μM de iniciador *reverse*, e 0,125 μM do iniciador M-13 (50-TGTAAAACGACGGCCAGT-30) marcado com fluorescência AlexaFluor 680 (Invitrogen®).

Utilizou-se o perfil térmico registrado por SARZI et al. (2019) para a maioria das etapas da PCR, porém otimizando-se a temperatura de anelamento. O perfil térmico constituiu-se por: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s; anelamento a 50 (Pit 26, 34, 48 e 57) ou 52 °C (os demais iniciadores), por 30 s; extensão a 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C por 10 min.

Posteriormente, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (p/v) utilizando-se um sequenciador de DNA automático Li-Cor 4300 S® (LiCor Inc., Lincoln, NB, EUA) e analisados pelo SAGAGT Software® (LiCor Inc.).

Análise da variabilidade genética de três fragmentos naturais de *Eugenia involucrata*

A partir dos dados dos géis obtidos foram estimados os parâmetros genéticos populacionais usando-se o software GenAIEx 6.5. Para cada loco, foram estimados o número total de alelos (A), o número efetivo de alelos (A_e), a heterozigosidade observada (H_o), a heterozigosidade esperada (H_e), o índice de fixação populacional (F_{IS}), o índice de diferenciação genética (F_{ST}) e, também, foi testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Visando quantificar a distribuição da variabilidade genética

entre e dentro dos fragmentos, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA).

O fluxo gênico, considerado como o número de migrantes por geração (Nm), para cada par de fragmentos, foi estimado com base na seguinte equação (WRIGHT, 1951):

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

Em que: Nm = número de migrantes por geração; F_{ST} = índice de diferenciação genética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variabilidade genética

As soluções de DNA genômico obtidas apresentaram qualidade e concentração adequadas, permitindo a realização das análises moleculares subsequentes a partir do emprego de iniciadores de amplificação originalmente desenvolvidos para espécie congênere. Esse resultado comprova a eficiência da metodologia utilizada no isolamento de DNA. De maneira semelhante, esse mesmo protocolo, desenvolvido por DOYLE & DOYLE, em 1990, foi eficiente em *E. uniflora* (ALZATE-MARIN et al., 2009).

Dos 11 locos testados, houve amplificação de apenas quatro (Pit26, Pit57, Pit64 e Pit66), a qual foi obtida com as soluções de todos os indivíduos estudados em cada fragmento. Nos locos amplificados foi observado polimorfismo, sendo que Pit57 produziu o maior número de alelos (5) no fragmento localizado em Quevedos enquanto Pit26, Pit57 e Pit66, em Santa Maria, e também Pit64 e Pit66, em Silveira Martins, revelaram o menor número (3 alelos). De maneira similar, foram registrados 3,5 alelos por loco em *E. brasiliensis* (FERREIRA-RAMOS et al., 2014) ao passo que números superiores foram verificados em outras espécies congêneres: 7,6 alelos por loco em *E. dysenterica* (ZUCCHI, 2002), 8 em *E. uniflora*, 7,9 em *E. piriformis* e 8,3 em *E. francavilleana* (FERREIRA-RAMOS et al., 2014).

O número médio de alelos efetivos por loco (A_e) foi inferior ao número médio total de alelos (2,80 versus 3,67; Tabela 1), o que sugere a presença de alelos raros, os quais têm frequência inferior a 0,05, e contribuem relativamente pouco para a

diversidade genética (CHAKRABORTY et al., 2009). Situação similar foi observada em duas populações de *Eugenia uniflora* pertencentes ao bioma Pampa em que foram obtidos 3,91 alelos efetivos de um total de 6,1 alelos, mediante o uso de marcadores microssatélites (SARZI et al., 2019).

Tabela 1

Os locos analisados revelaram heterozigosidade média observada (H_o) que não diferiu significativamente da esperada (H_e) na média dos três fragmentos, obtendo-se valores de 0,815 e 0,625 (Tabela 1), respectivamente, sugerindo que se encontram em EHW. Em consequência disso, o índice de fixação não diferiu de zero ($F_{IS} = -0,294$; Tabela 1). Esse comportamento, observado em três dos quatro locos microssatélites estudados, é o oposto do que se espera em espécies autógamas e, mais ainda, em populações em processo de fragmentação. Constituiu exceção Pit64, cujas estimativas de heterozigosidade indicaram haver deficiência ($H_o = 0,475$ versus $H_e = 0,564$; Tabela 1), sugerindo que esse loco não está em EHW.

Por outro lado, em *Eugenia uniflora* foram verificados valores de H_o e de H_e que não diferem entre si ($H_o = H_e = 0,30$; MARGINS et al., 2002), sugerindo que as três populações estudadas por meio de marcadores AFLP encontram-se em EHW. A grande disparidade entre essas estimativas de heterozigosidade pode ser atribuída à co-dominância dos marcadores SSR, propriedade que os torna capazes de revelar maior polimorfismo.

Quevedos apresentou, de uma maneira geral, os maiores índices de diversidade genética ($A = 4,250$; $A_e = 3,304$; $H_o = 0,850$, $H_e = 0,690$; Tabela 1). Esse fragmento também se sobressaiu em relação aos outros dois por apresentar alelos exclusivos (Tabela 1). Entretanto, foi Santa Maria que apresentou menor endogamia ($F_{IS} = -0,509$; Tabela 1), em decorrência de apresentar, simultaneamente, o maior valor de H_o e o menor de H_e . Entretanto, valores próximos de índices diversidade entre locais foram observados em duas populações de *Eugenia uniflora* do bioma Pampa (SARZI et al., 2019).

Fluxo gênico e diferenciação genética

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior proporção da variabilidade genética está distribuída dentro (93%) dos fragmentos. Esse comportamento sugere que predominam cruzamentos e que há fluxo gênico entre os

remanescentes estudados, contrariando o que é esperado em consequência do processo de fragmentação (aumento na endogamia) e, simultaneamente, o registro da espécie como autógama (CARVALHO, 2008). Corroborando com o que foi observado no presente estudo, GOLLE (2010) registrou que ocorre maior variabilidade dentro das cinco populações e coleções estudadas de *Eugenia involucrata*.

A existência de fluxo gênico entre os fragmentos foi ratificada, adicionalmente, pelas estimativas de número de migrantes superiores a 1,0, as quais são capazes de homogeneizar as frequências alélicas e tornar os remanescentes geneticamente similares (ZUCCHI, 2002). O fluxo gênico estimado foi de 2,35 entre Quevedos e Santa Maria, 3,85 entre Quevedos e Silveira Martins e 4,56 entre o par de fragmentos Silveira Martins e Santa Maria.

Em função dos elevados valores de fluxo gênico foram estimados baixos valores de diferenciação genética, de acordo com a estatística F_{ST} de WRIGHT (1965), entre os fragmentos estudados, os quais variaram de 0,052 a 0,096. Da mesma maneira, foram observados altos valores de fluxo gênico e baixos de diferenciação genética entre populações de *E. uniflora* no sudeste do Brasil (MARGINS et al., 2002). Por sua vez, foi obtida moderada diferenciação genética ($F_{ST} = 0,211$) entre populações dessa mesma espécie (*E. uniflora*) nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil (SALGUEIRO et al., 2004).

O menor valor de F_{ST} foi obtido para o par de fragmentos Silveira Martins e Santa Maria ($F_{ST} = 0,052$) distantes entre si por 35 Km enquanto a maior diferenciação genética foi observada entre Quevedos e Santa Maria ($F_{ST} = 0,096$), que estão aproximadamente a mesma distância (34 Km). Silveira Martins e Quevedos, distantes 64 Km entre si, revelaram um valor intermediário de diferenciação genética ($F_{ST} = 0,061$). Em consequência, não há correlação entre as matrizes de diferenciação genética e distância geográfica ($r = -0,35$, $p > 0,05$), evidenciando a ausência de estruturação espacial nestes fragmentos. Esse resultado contraria a primeira lei da geografia (TOBLER, 1970), que apregoa que populações mais próximas tendem a trocar genes com mais intensidade que populações mais distantes. Igualmente, não foi constatada essa correlação em populações de *Schizolobium parahyba* no estado do Rio de Janeiro (FREIRE et al., 2007). Por outro lado, em populações de *Eugenia dysenterica* no estado de Goiás foi observada forte associação entre as distâncias

genética e geográfica em virtude de intensa estruturação espacial (ZUCCHI et al., 2005).

Mais especificamente, os fragmentos estudados no presente trabalho classificam-se, em relação ao modo de reprodução, como mistos com predominância de cruzamentos (DESTRO & MONTALVÁN, 1999). Esse comportamento, somado aos índices de diversidade genética anteriormente discutidos, sugere que a fragmentação ocasionou a manifestação de algum mecanismo adaptativo que favoreceu os cruzamentos nos remanescentes e, desse modo, contrapondo-se as consequências inerentes àquelas esperadas em populações autógamas, quais sejam, de redução na variabilidade genética e elevada diferenciação genética pelo reduzido fluxo gênico.

CONCLUSÃO

Os fragmentos de *Eugenia involucrata* analisados apresentam elevada variabilidade genética, a maior parte distribuída dentro dos próprios remanescentes, e baixa diferenciação genética. A distância geográfica não apresenta relação com a diferenciação genética. Os fragmentos estudados classificam-se, em relação ao modo de reprodução, como mistos com predominância de cruzamentos. Isso sugere o desencadeamento de mecanismos adaptativos favoráveis à fecundação cruzada e, desse modo, contrapõem-se às conseqüentes reduzida variabilidade e elevada diferenciação genética, inerentes a populações autógamas e/ou em processo de fragmentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, R. V. et al. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Revista Ceres**, v.60, n.2, p.226-233, 2013. Available from: <<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3969/1806>>. Accessed: Oct. 11, 2019.
- ALZATE-MARIN, A.L. et al. An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.5, p.1217-1224, 2009. Available

from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000500020>>. Accessed: Nov. 13, 2019. doi: 10.1590/S1516-89132009000500020.

CARVALHO, P. E. **Espécies arbóreas brasileiras**. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológicas; Colombo: Embrapa Florestas, 2008. v.3, 593p.

CARVALHO, P.E.R. **Cerejeira - *Eugenia involucrata***. Colombo, PR: Comunicado Técnico, 2009.

CHAKRABORTY, N. et al. Mapping and confirmation of a new allele at Rpp1 from soybean PI594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. **Crop Science**, v.49, p.783-790, 2009. Available from:

<<https://doi.org/doi:10.2135/culturasci2008.06.0335>>. Accessed: Dec. 03, 2019. doi: 10.2135/culturasci2008.06.0335.

CONSON, A.R. et al. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v.141, n.4-6, 205-215, 2013. Available from:

<<https://doi.org/10.1007/s10709-013-9719-4>>. Accessed: Nov. 20, 2019. doi: 10.1007/s10709-013-9719-4.

COSTA, L. S. et al. Comparative analysis of five DNA isolation protocols and three drying methods for leaves samples of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Semina: Ciências Agrárias, v. 37, n.3, p. 1177-1187, 2016. Available from:

<<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n3p1177>>. Accessed: Dez. 02, 2019. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n3p1177.

DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: Ed. UEL, 1999.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39-40, 1990.

FERREIRA-RAMOS, R. et al. Genetic diversity assessment for *Eugenia uniflora* L., *E. pyriformis* Cambess., *E. brasiliensis* Lam. and *E. francavilleana* O. Berg neotropical tree species (Myrtaceae) with heterologous SSR markers. **Genetic resources and crop evolution**, v.61, n.1, p.267-272, 2014. Available from:

<<https://doi.org/10.1007/s10722-013-0028-7>>. Accessed: Nov. 10, 2019. doi: 10.1007/s10722-013-0028-7.

FLÔRES, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.5902/198050982760>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.5902/198050982760.

FREIRE, J.M. et al. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, v. 74, n. 9, p. 27-35, 2007.

GIUSTINA, L.D. et al. Genetic variability of teak (*Tectona grandis* Linn. F.) based on ISSR molecular markers and morphological characterization. **Ciência Florestal**, v.27, n.4, p.1311-1324, 2017. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.5902/1980509829894>>. Accessed: Nov. 29, 2019. doi: 10.5902/1980509829894.

GOLLE, D.P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. 161f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria.

GUERRA, D. et al. Genetic and cytological diversity in cherry tree accessions (*Eugenia involucrata* DC) in Rio Grande do Sul. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.16, n.3, p. 219-225, 2016. Available from: <

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332016000300219&script=sci_arttext>. Accessed: Nov. 29,2019. doi: 10.1590/1984-70332016v16n3a33.

MARGIS, R. et al. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, p. 149–163, 2002. Available from:

<<https://doi.org/10.1023/A:1014028026273>>. Accessed: Nov. 12, 2019. doi: 10.1023/A:1014028026273.

MATESANZ, S. et al. Habitat fragmentation differentially affects genetic variation, phenotypic plasticity and survival in populations of a gypsum endemic. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.843, 2017. Available from: <

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00843>>. Accessed: Nov. 18, 2019. doi: 10.3389/fpls.2017.00843.

MELO, A.T.D.O. et al. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica na APA Fernão Dias. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 365-374, 2015. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.1590/0100-67622015000200016>>. Accessed: Nov. 23, 2019.

doi: 10.1590/0100-67622015000200016.

NAGEL, J.C. et al. Historical gene flow within and among populations of *Luehea divaricata* in the Brazilian Pampa. **Genetica**, v.143, n.3, p.317-29, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s10709-015-9830-9>>. Accessed: Nov. 18, 2019. doi: 10.1007/s10709-015-9830-9.

SALGUEIRO, F. et al. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, v. 10, n. 3, p. 201-210, 2004. Available from: <<https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00078.x>>.

Accessed: Nov. 12, 2019. doi: 10.1111/j.1366-9516.2004.00078.x.

SARZI, D.S. et al. Discovery and characterization of SSR markers in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) using low coverage genome sequencing. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.91, n.1, p. 1-8, 2019. Available from:

<<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920180420>>. Accessed: Nov. 02, 2019. doi: 10.1590/0001-3765201920180420.

SERROTE, C.M.L. et al. Simulating the selfing and migration of *Luehea divaricata* populations in the Pampa biome to investigate the conservation potential of their genetic resources. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 2-17, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038410>>. Accessed: Nov. 13, 2019. doi: 10.4238/gmr.15038410.

SILVA, S.S.D. et al. *Cryptocoryneum parvulum*, a new species on *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). **Mycotaxon**, v.130, n.2, p.465-469, 2015. Available from: <<http://dx.doi.org/10.5248/130.465>>. Accessed: Nov. 12, 2019. doi: 10.5248/130.465.

TOBLER, W.R. A computer movie simulating urban growth in the Detroit region. **Economic Geography**, v.46, n.2, p.234-240, 1970.

VIEIRA, M.L.C. et al. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>>. Accessed: Nov. 29, 2019. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann Eugen**, v.15, p. 323-354, 1951.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, ESALQ, Universidade de São Paulo.

ZUCCHI, M.I. et al. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 975-980, 2005. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005001000005>>. Accessed: Oct. 22, 2019. doi: 10.1590/S0100-204X2005001000005.

Tabela 1 – Estimativa de parâmetros genéticos por loco microssatélite e por fragmento de *Eugenia involucrata*. A é o número médio de alelos por loco por fragmento; A_e é o número médio efetivo de alelos por loco por fragmento; H_o é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; F_{IS} é o Índice de Fixação; n é o número de indivíduos analisados; A_t é o número total de alelos; A_{excl} é o número de alelos exclusivos.

Locus	A	A_e	H_o	H_E	F_{IS}
Pit26	3,67	3,09	0,933	0,667	-0,408 ns
Pit57	4,00	3,08	1	0,667	-0,510 ns
Pit64	3,67	2,33	0,475	0,564	0,182 *
Pit66	3,33	2,71	0,850	0,604	-0,440 ns
Média	3,67	2,80	0,815	0,625	-0,294

Parâmetros	Fragmento		
	Quevedos	Santa Maria	Silveira Martins
n	10	6	8
A_t	17	13	14
A	4,25	3,25	3,5
A_e	3,304	2,404	2,701
A_{excl}	0,5	0	0
H_o	0,850	0,875	0,719
H_E	0,690	0,580	0,605
F_{IS}	-0,232	-0,509	-0,188

ns = equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$); * = ausência de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

10. CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários experimentos que integraram trabalhos acadêmicos (GOLLE, 2010; PAIM, 2011; STEFANEL, 2016) foram realizados anteriormente com *Eugenia involucrata* pelo nosso Grupo de Pesquisa, alguns dos quais já foram publicados (GOLLE et al., 2012; GOLLE; REINIGER, 2013; GOLLE et al., 2013; GOLLE et al., 2017), e têm contribuído para a elucidação de vários aspectos da espécie, tanto em relação à propagação *in vitro* quanto sobre a diversidade genética de suas populações naturais. Os estudos realizados até o presente momento forneceram informações de grande relevância para processos relacionados à micropropagação de *Eugenia involucrata* De Candolle (Cerejeira-do-mato), uma vez que geraram resultados promissores em fases geralmente consideradas gargalos na cultura de tecidos de espécies arbóreas florestais nativas de biomas brasileiros.

No presente trabalho, primeiramente, foi observado que a adição do antibiótico sulfato de estreptomicina ao meio nutritivo ½MS na ausência de contaminação prévia nos explantes controla a proliferação das colônias bacterianas, mas não é eficiente para reduzi-las quando a contaminação já é detectável. Por outro lado, a imersão dos explantes no antibiótico não controla a proliferação de bactérias, tanto na presença quanto na ausência de contaminação endofítica prévia. Adicionalmente, foi constatado que o número de folhas é influenciado pela contaminação bacteriana dos explantes, uma vez que uma alta contaminação promove uma redução significativa na emissão de folhas.

Também, ao testar o efeito de PVP para controlar a oxidação fenólica foi observado que é dispensável a sua utilização no meio nutritivo ½MS no cultivo *in vitro* da espécie, o que resulta em economia de reagente e, conseqüentemente, redução de custos. Igualmente, ao estudar o efeito do GA₃ no alongamento *in vitro*, foi evidenciado que a giberelina apresenta efeito positivo, mas verificou-se que, na presença de concentrações superiores a 2µm dessa giberilina, há uma redução no número de brotos por explante, o que deve, então, ser melhor investigado.

Ainda, foi observado que as lâmpadas LED de cor azul, vermelha e branca, bem como as fluorescentes, de uma maneira geral, influenciam favoravelmente o desenvolvimento *in vitro* da espécie. No cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* sob LED branco há uma menor contaminação bacteriana.

Em relação à fase de multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*, foi constatado que a citocinina BAP e a auxina AIB, nas concentrações testadas, são dispensáveis nessa fase, o que contribui para reduzir custos na micropropagação. Também, em relação a essa fase, foi observado que outra citocinina testada (CIN) é dispensável para a multiplicação. Mas, a auxina ANA a 2 μ M é importante na multiplicação *in vitro*, incrementando o número de brotações de *Eugenia involucrata*.

Em relação à propagação da espécie via miniestaquia não se observou efeito dos antioxidantes PVP e ácido ascórbico sobre a oxidação fenólica, a qual, inclusive, teve média reduzida (11,81%) no experimento em questão ao contrário do que havia sido observado em experimentos anteriores com a espécie, o que motivou a realização desse trabalho. Nossa hipótese inicial é de que a rizogênese *in vitro* seria comprometida pela ocorrência de oxidação fenólica, mas essa associação não pode ser avaliada em virtude do quase inexistente enraizamento (1,39%). No experimento subsequente, a oxidação foi baixa (18,33%) e a rizogênese foi igualmente muito reduzida (1,11%) e não foi afetada pelo AIB apesar de serem testadas concentrações altas (até 10.000 mg L⁻¹) da auxina. Ambos os experimentos foram realizados com miniestacas isoladas de plantas provenientes do mesmo lote de sementes. Todavia, os resultados obtidos nesses experimentos de miniestaquia não devem ser interpretados como definitivos em relação à ineficiência dessa técnica de propagação vegetativa em *Eugenia involucrata*, haja vista que é possível que os genótipos amostrados não continham genes favoráveis ao enraizamento adventício.

Em relação à variabilidade e estruturação genética de *Eugenia involucrata*, observou-se que os três fragmentos naturais analisados apresentam elevada variabilidade genética, a maior parte distribuída dentro dos próprios remanescentes, e baixa diferenciação genética. A distância geográfica não apresenta relação com a diferenciação genética. Os fragmentos estudados classificam-se, em relação ao modo de reprodução, como mistos com predominância de cruzamentos ao contrário do registro da literatura indicar que a espécie é autógama. Isso sugere o desencadeamento, nos fragmentos estudados, de mecanismos adaptativos favoráveis à fecundação cruzada, que, desse modo, contrapõem-se às conseqüentes reduzida variabilidade e elevada diferenciação genética, inerentes a populações autógamas e/ou em processo de fragmentação.

Finalmente, considerado o exposto, é recomendável a continuidade dos estudos, os quais devem se basear nas principais respostas obtidas nos experimentos que compõem o presente trabalho, sobretudo para otimizar as técnicas de enraizamento via miniestaquia de *Eugenia involucrata*. De maneira geral, o caráter multidisciplinar da tese apresentada trouxe contribuições relevantes ao estado da arte de *Eugenia involucrata*, demonstrando a potencialidade que esse tipo de abordagem pode fornecer à análise de problemas reais.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, O.T.; PASTORE, J. A.; ROCHA, F. T.; BAITELLO, J. B. Flora fanerogâmica de um trecho da floresta densa secundária no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Cunha/Indaiá – Cunha (SP). **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 1, 2001.

BACKES, A.; IRGANG, B. Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico. Porto Alegre: **Pallotti**, 2002.

CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998.

CALDEIRA, M. V. W.; GONÇALVES, E. O.; WENDLING, I.; MARTINS, R. D. C. C. Produção de Mudas. **Silvicultura do Eucalipto no Brasil**, p. 47, 2016.

CAMLOFSKI, A. M. de O. **Caracterização do Fruto de Cerejeira (*Eugenia involucrata*) visando seu aproveitamento tecnológico**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

CARVALHO, P. E. Espécies arbóreas brasileiras. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: **Embrapa Florestas**, 2008. v. 3.

CARVALHO, P. E. R. **Cerejeira - *Eugenia involucrata***. Embrapa florestas. Comunicado técnico, 2009.

CIARLINI, J. J. S.; MARANGONI, A.; BOLZAN, A. Selectivity of supercritical CO₂ extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucrata* leaves from Southern Brazil. **Food and bioproducts processing**, v. 106, p. 29-34, 2017.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, 2014.

DANTAS, S. OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.10, p. 391-407, 2002.

DEGENHARDT, J.; FRANZON, R.C.; COSTA, R.R. **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)**. Pelotas: Embrapa clima temperado (Documentos, n. 211). 2007.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; CORREIA, A. C. G.; BARBOSA, G. A. Tipo de miniestaca e de substrato na propagação vegetativa de Angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). **Ciência Florestal**, v. 25, n. 4, p. 909-919, 2015.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Embrapa Florestas, 2004.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S. Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução à calogênese em cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.). **Ciência Rural**, v. 43, p. 1759-1762, 2013.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; BELLÉ, R. A.; CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2013.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; MUNIZ, M. F. B.; SILVA, K. B. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Revista Árvore**, v. 41, n. 5, e410509, 2017.

GOMES, G. C.; RODRIGUES, W. F.; GOMES, F. R. C.; BARBIERI, R. L.; GARRASTAZU, M. C. Conservação de frutíferas nativas: localização, fenologia e reprodução. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. M.; FERREIRA, P. I.; BATISTA, F. Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes de Myrtaceae. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p.285-293, 2016.

HACK, C.; LONGHI, S. J.; BOLIGON, A. A.; MURARI, A. B.; PAULESKI, D. T. Análise fitossociológica de um fragmento de floresta estacional decidual no município de Jaguari, RS. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1083-1091, 2005.

HULLER, A.; SCHOCK, A. A. Avaliação do potencial alelopático de três espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) sobre o processo germinativo de *Lactuca sativa* L. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 1, p. 25-37, 2011.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1969.

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

LIAN, M. L.; MURTHY, H. N., PAEK, K. Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**, v.94, p.365-370, 2002.

LONGHI, R. A. Cerejeira. In: LONGHI, R.A. Livro das árvores: árvores e arvoretas do sul. Porto Alegre: **LP&M**, 1995.

LORENZI, H. (Ed). **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2016. 384 p.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de Biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.251-257, 2014. Número Especial.

MATTOS, J. R. **Cerejeira-do-Mato**. Governo do Estado, Secretaria da Agricultura, Diretoria Geral, Departamento de Pesquisas, Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, 1985.

OLIVEIRA, L. B. P.; PIERRE, P. M. O. Índice meiótico e palinologia de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC-Myrtaceae). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.17, n.4, p. 481-490, 2018.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

PRADO, A. P. **Aspectos autoecológicos e silviculturais de *Eugenia involucrata* DC**. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, vol. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SILVA, C. R.; RUIZ, A. L.; CARVALHO, J. E.; REHDER, V. L. G. Estudos químicos de diferentes espécies de Myrtaceae biomonitorados por ensaios de atividade antitumoral e antimicrobiana. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 2010. **Anais...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2010. p. 27.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, 2005.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 10, 2015.

STEFANEL, C. M. **Aspectos da qualidade de sementes e do estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* De Candolle**. 2016. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 820 p.

VAN DER MERWE, M. M.; VAN WYK, A. E.; BOTHA, A. M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 21-34, 2005.

XAVIER, A.; SILVA, R. L. Evolución de la silvicultura clonal de *Eucalyptus* en Brasil. **Agronomia Costarricense**, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa-MG: SIF, 1998. 10 p. (Informativo Técnico SIF, 11).

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. Viçosa, Ed. UFV, 272 p., 2013.

APÊNDICE A – ENSAIO PUBLICADO NOS ANAIS DA XXXIII JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



33ª Jornada Acadêmica Integrada



ANTIOXIDANTES NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE CEREJEIRA-DO-MATO

A Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* De Candolle) pertence à família Myrtaceae e possui ocorrência natural em vários Estados brasileiros. A espécie é muito utilizada para fins madeireiros, frutícolas, paisagísticos, ambientais e medicinais, entretanto, possui sementes recalcitrantes, justificando, assim, a importância de estudos relacionados à produção de mudas via técnicas da propagação vegetativa, como é o caso, no presente trabalho, da miniestaquia. Considerado o exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de dois antioxidantes no enraizamento de miniestacas de Cerejeira-do-mato. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (10x2), em que os níveis do fator A referem-se às concentrações de Ácido Ascórbico ou Polivinilpirrolidona (PVP), sendo testados, separadamente, as concentrações 0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4g L⁻¹ de um dos dois antioxidantes, e os níveis do fator B, referem-se ao período de cultivo, sendo 30 ou 60 dias, totalizando 20 tratamentos com oito repetições (miniestacas). As miniestacas foram confeccionadas a partir da porção apical de espécimes mantidas em casa de vegetação, contendo de 7 a 10cm de tamanho e 1 a 2 pares de folhas cortadas ao meio. As bases das miniestacas permaneceram imersas durante 15s nas soluções contendo o antioxidante. Após a imersão nas soluções, as miniestacas foram colocadas em copos plásticos de 300mL, contendo o substrato McPlant Misto® e vermiculita na proporção 1:1. As miniestacas foram, a seguir, mantidas em casa de vegetação com nebulização e temperatura controlada (UR 80% e 25°C). Não foi observado efeito significativo dos fatores principais, tampouco de sua interação sobre a sobrevivência (média geral de 20,83%), a oxidação fenólica (média geral de 11,81%) e a formação de raiz primária e raízes secundárias (média geral de 1,39% em ambas). A baixa sobrevivência pode ter sido ocasionada pelo baixo enraizamento observado no presente experimento, o qual acarreta em maiores índices de mortalidade. Face aos resultados obtidos, conclui-se que os antioxidantes Ácido Ascórbico e PVP não influenciam a rizogênese de miniestacas de Cerejeira-do-mato.