

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E
MORFOGÊNESE DE PORONGO (*Lagenaria siceraria*
(Mol.) Standl.) E MOGANGO (*Cucurbita pepo* L.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

André Luís Lopes da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E
MORFOGÊNESE DE PORONGO (*Lagenaria siceraria*
(Mol.) Standl.) E MOGANGO (*Cucurbita pepo* L.)**

por

André Luís Lopes da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A comissão Examidora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E MORFOGÊNESE DE
PORONGO (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) E MOGANGO
(*Cucurbita pepo* L.)**

Elaborada por
André Luís Lopes da Silva

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:


**Dilson Antônio Bisognin, Ph.D. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**


Cassandro V. T. do Amarante, Ph.D. (UDESC)


Elci Terezinha Henz Franco, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 04 de março de 2005.

**BIBLIOTECA
SETORIAL
C C R**

Dedico a Estela Fehn Reetz, por ter feito parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria que têm sido a minha casa nos últimos anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, que permitiu a continuação das minhas pesquisas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ào Professor Dilson Antônio Bisognin, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia.

Aos meus pais que acreditaram em mim e que me apoiaram em tempo integral.

À Estela Fehn Reetz, por ter me influenciado indiretamente em minhas pesquisas.

Aos estagiários, Cícero João Barriquello, Cristian de Sales Dambros, Micheli Angélica Horbach, Júnior Giroto, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Juline Marta Walter, Carlos Evandro Leite Ritter, Maurício Guerra Bandinelli, Douglas Renato Müller e Marcos Vicente Rampelotto, pela confiança e dedicação em todas as pesquisas realizadas.

À Cristiane Luisa Jast, pelo auxílio nas análises de volumetria de oxi-redução.

À Krishna, A Suprema Personalidade de Deus, pela oportunidade de realizar o progresso através de mais uma reencarnação.

À todas as divindades e aos meus mentores espirituais pelo auxílio e superação nos momentos mais difíceis.

**“Existem muitas auroras que ainda não brilharam”
(Rig Veda)**

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E MORFOGÊNESE DE PORONGO (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) E MOGANGO (*Cucurbita pepo* L.)

Autor: André Luís Lopes da Silva

Orientador: Dilson Antônio Bisognin

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 04 de março de 2005.

O estabelecimento e a germinação *in vitro* suprem explantes em grande quantidade para a organização de experimentos em morfogênese, a qual apresenta muitas aplicações, tais como a indução de flores *in vitro*, a obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides, a propagação clonal em massa, a embriogênese somática, entre tantas outras. O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos que permitam o estabelecimento e a germinação *in vitro* das espécies de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) e mogango (*Cucurbita pepo* L.) para subsidiar pesquisas em morfogênese. Foram realizados testes com álcool 70% e NaOCl (Hipoclorito de sódio) para a desinfestação de sementes e investigados vários fatores envolvidos na germinação *in vitro*, tais como pressão osmótica, fotoblastismo, presença do tegumento, adição de auxinas, tempo de embebição e escarificação. Explantes cotiledonares foram utilizados para a indução de organogênese direta. Ápices caulinares e segmentos nodais foram cultivados em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento. Nenhum dos tratamentos utilizados foi eficiente para permitir a germinação de sementes inteiras de porongo em meio de cultura, porém houve germinação em papel germitest umidecido com 7,5 vezes a massa do papel. Não foi verificado fotoblastismo para o porongo. A redução da pressão osmótica não aumentou o percentual de germinação de porongo e mogango. Ápices caulinares e segmentos nodais de porongo regeneram sem a adição de reguladores de crescimento. Explantes cotiledonares podem ser utilizados para a indução de brotações adventícias, em porongo e mogango, porém a taxa de proliferação é baixa.

Palavras-chaves: cotilédones, organogênese direta, morfogênese, cultivo *in vitro*.

GENERAL ABSTRACT

Master Thesis
Graduate Program of Agronomy
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

***IN VITRO* SEEDS GERMINATION AND MORPHOGENESIS OF BOTTLE GOURD (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) AND SQUASH (*Cucurbita pepo* L.)**

Author: André Luís Lopes da Silva

Advisor: Dilson Antônio Bisognin

Date and place of defense: Santa Maria, march 4th, 2005.

The establishment and germination *in vitro* can supply a high amount of explants to develop morphogenesis protocols necessary for flowering induction *in vitro*, haploid and double-haploid plant production, clonal propagation, somatic embryogenesis among other applications. The objective was to develop protocols for the establishment and germination *in vitro* of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) and squash (*Cucurbita pepo* L.) species to effort morphogenesis studies. Seed disinfection treatments were done with ethanol 70% and NaOCl. Seed germination *in vitro* was evaluated changing medium-osmotic pressure, light availability, tegument and auxin presence, imbibition's time and scarification methods. Cotyledonary explants were used to induce direct organogenesis. Apical and nodal segments were grown in MS medium without growth regulators. Bottle gourd seeds did not germinate in culture medium, but it occurred on four layers of germitest paper and distilled water in the proportion of 1:7.5 (w/w). Light is not necessary for bottle gourd seed germination. Osmotic pressure reduction did not increase bottle gourd and squash germination. Bottle gourd apical and nodal segments regenerate in culture medium without growth regulators. Cotyledonary explants of bottle gourd and squash induce aerial growth, but in a low proliferation rate.

KeyWords: cotyledons, direct organogenesis, morphogenesis, *in vitro* culture.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Tratamentos empregados em explantes cotiledonares de porongo	10
TABELA 2 – Percentagem de desinfestação e de germinação <i>in vitro</i> de sementes de porongo em meio de cultura	12
TABELA 3 – Regeneração de ápices caulinares e segmentos nodais de porongo após 13 dias de cultivo <i>in vitro</i>	21
TABELA 4 – Regeneração de ápices caulinares e segmentos nodais de porongo após 20 dias cultivadas <i>in vitro</i> com suplementação de vitaminas Fuji	22
TABELA 5 – Indução de brotações laterais em explantes cotiledonares de porongo após 13 dias de cultivo <i>in vitro</i>	24
TABELA 6 – Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de mogango cv. Enrugado Verde após 10 dias da sementeira	32
TABELA 7 – Germinação e vigor, medidos pela estimativa do dia médio de germinação (EDMG), energia germinativa de Baldwin (EGB) e índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV), em sementes de mogango cv. Enrugado Verde <i>in vitro</i> em diferentes potenciais osmóticos	35
TABELA 8 – Multiplicação e regeneração de ápices caulinares e segmentos nodais de mogango cv. Enrugado Verde após 19 dias cultivados <i>in vitro</i>	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Escarificação de sementes de porongo por picotes	13
FIGURA 2 - Percentagem de germinação <i>in vitro</i> de sementes inteiras de porongo sobre quatro camadas de papel germitest umedecido com diferentes proporções de água	18
FIGURA 3 – Influência do ácido naftalenoacético (ANA) na percentagem de germinação <i>in vitro</i> de sementes sem tegumento de porongo após 22 dias de cultivo	18
FIGURA 4 – Influência do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) na percentagem de germinação <i>in vitro</i> de sementes sem tegumento de porongo após 22 dias de cultivo	19
FIGURA 5 – Influência do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) na percentagem de plântulas completas de porongo germinadas <i>in vitro</i>	19
FIGURA 6 – Indução de calogênese em hipocótilos de plântulas de porongo após 50 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D)	21
FIGURA 7 - Clonagem de plântulas oriundas de sementes de porongo germinadas <i>in vitro</i> , (A) a partir de ápice caulinar, (B) a partir de segmento nodal	23
FIGURA 8 - Segmento nodal de porongo após 20 dias de cultivado <i>in vitro</i> em meio MS com adição de vitaminas Fuji para a indução de calogênese	25
FIGURA 9 – Indução de calogênese e de brotações laterais em explante cotiledonar de porongo cultivado em meio MS com a adição de 3,0mg L ⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 0,05mg L ⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) aos 16 dias de cultivo (Explante cotiledonar oriundo de plântulas que cresceram em presença de 0,5mg L ⁻¹ de ANA)	27

FIGURA 10 – Plântula completa de mogango, formada na região basal de um explante cotiledonar em presença de 6-benzilaminopurina (BAP)	38
FIGURA 11 – Percentagens de enraizamento e de brotações adventícias em diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) em explantes cotiledonáres de mogango	40
FIGURA 12 – Percentagem de enraizamento <i>in vitro</i> , de explantes de ápices caulinares de mogango de diferentes tamanhos	40
FIGURA 13 – Percentagem de enraizamento <i>in vitro</i> de explantes de segmentos nodais de mogango de diferentes tamanhos	35

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	6-Benzilaminopurina
KIN	6-Furfurilaminopurina
AIB	Ácido indolbutírico
AIA	Ácido indolacético
2,4 D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftalenoacético
MS	Meio de Murashige & Skoog (1962)
pH	Potencial de hidrogênio
GA ₃	Ácido giberélico
NaOCl	Hipoclorito de sódio

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1.0. INTRODUÇÃO GERAL	01
2.0. CAPÍTULO I - GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE PORONGO	3
2.1. Introdução	3
2.2. Material e métodos	5
2.2.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes	5
2.2.1.1. Desinfestação de sementes inteiras e sem tegumento	5
2.2.1.2. Determinação de fotoblastimo	6
2.2.1.3. Efeitos da escarificação por picotes na germinação <i>in vitro</i> de sementes inteiras	6
2.2.1.4. Efeitos da redução da pressão osmótica na germinação <i>in vitro</i> de sementes	7
2.2.1.5. Efeitos da embebição na germinação <i>in vitro</i> de sementes	7
2.2.1.6. Germinação de sementes inteiras <i>in vitro</i> sobre papel germitest umedecido	7
2.2.2. Influência das auxinas na germinação <i>in vitro</i>	8
2.2.3. Propagação <i>in vitro</i>	8
2.2.3.1. Cultura de ápices caulinares e segmentos nodais	8
2.2.3.2. Efeitos das vitaminas Fuji na cultura de ápices caulinares e segmentos	

nodais	9
2.2.4. Organogênese direta em explantes cotiledonáres	9
2.2.5. Análise estatística	10
2.3. Resultados e discussão	10
2.3.1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes	10
2.3.2. Influência das auxinas na germinação <i>in vitro</i>	14
2.3.3. Propagação <i>in vitro</i>	20
2.3.4. Organogênese direta em explantes cotiledonáres	23
2.4. Conclusões	26
3.0. CAPÍTULO II – GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE MOGANGO	27
3.1. Introdução	27
3.2. Material e métodos	28
3.2.1. Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes	28
3.2.2. Efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação <i>in vitro</i>	29
3.2.3. Indução de brotações laterais em explantes cotiledonáres	30
3.2.4. Multiplicação de ápices caulinares e segmentos nodais originados dos explantes cotiledonáres	31
3.2.5. Condições de cultivo e análise estatística	31
3.3. Resultados e discussão	31
3.3.1. Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes	31
3.3.2. Efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação <i>in vitro</i>	32
3.3.3. Indução de brotações laterais em explantes cotiledonáres	35
3.3.4. Multiplicação de ápices caulinares e segmentos nodais originados dos explantes cotiledonáres	38
3.4. Conclusões	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1.0. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies, *Lagenaria siceraria* e *Cucurbita pepo* pertencem a família Cucurbitaceae. Esta família consiste de 118 gêneros e 825 espécies (JEFFREY, 1990) e está entre as mais importantes famílias de plantas, por produzir suprimento de produtos comestíveis e fibras úteis. Espécies de cucurbitáceas são cultivadas tanto no velho quanto no novo mundo (BISOGNIN, 2002).

A espécie *Lagenaria siceraria* é denominada nas regiões sulinas do país como porongo. A maior importância esta relacionada com a produção de cuias, recipiente para a infusão da erva-mate (*Ilex paraquariensis* St. Hill.) ou chimarrão, que é uma bebida típica da região sul do Brasil, principalmente do estado do Rio Grande do Sul. O chimarrão também é muito apreciado nos outros países do Mercosul. A produção de porongo para a indústria de cuias representa uma atividade de renda para pequenos agricultores. O porongo é uma planta bastante rústica, o que reduz os custos para a implantação de uma lavoura (BISOGNIN & MARCHEZAN, 1988).

O porongo apresenta uma grande variabilidade genética, tanto intrapopulacional quanto interpopulacional, o que não descarta a erosão genética que está ocorrendo de forma muito acentuada (ESQUINAS-ALCAZAR & GULICK, 1983). A principal causa da erosão genética é o exodo rural, onde os pequenos agricultores abandonam as atividades rurais, vendem as propriedades e migram para os centros urbanos. Até o presente não existem programas de melhoramento genético para o porongo, por ser uma cultura de pouco impacto a nível de país, porém de grande importância para a agricultura familiar.

O mogango pertence a espécie *Cucurbita pepo*, que apresenta muita divergência genética, tanto que o gênero *Cucurbita* encerra a maior variabilidade morfológica existente em todo o reino vegetal. O mogango é uma importante fonte de vitaminas, sais minerais e fibras. A cultura do mogango também está envolvida com a melhoria de renda em pequenas propriedades rurais. Esta cultura apresenta tolerância a baixas temperaturas (ESQUINAS-ALCAZAR & GULICK, 1983).

Em termos de melhoramento, existem alguns pequenos programas que possibilitaram o lançamento de algumas cultivares de mogango que estão sendo

comercializadas. Mas além disso, a substituição de variedades crioulas por cultivares melhoradas aumenta a erosão genética desta espécie.

As culturas do mogango e do porongo são bastante regionais. Em função disto, não existem muitas pesquisas sobre manejo e variabilidade genética. A construção de bancos de germoplasma é indispensável para a conservação dos recursos genéticos, os quais podem proporcionar, vinculados as pesquisas e ao melhoramento genético, uma melhor exploração das potencialidades produtivas e econômicas destas espécies.

O estabelecimento de uma espécie *in vitro* representa um avanço para o conhecimento e o desenvolvimento de novas pesquisas como, a elaboração de protocolos que permitam a propagação clonal em massa, conservação de germoplasma *in vitro*, floração *in vitro*, produção de plantas homozigotas, produção de híbridos intergenéricos e transformação genética. Tais conhecimentos são indispensáveis para o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético rápido e eficiente. A germinação *in vitro* é uma das condições essenciais para a produção de explantes suficientes para a realização destes estudos.

O objetivo deste trabalho foi produzir conhecimentos sobre a germinação *in vitro* e a morfogênese em porongo e mogango.

2.0. CAPÍTULO I - GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE PORONGO

2.1. Introdução

O porongo (*Lagenaria siceraria*) pertence a família Cucurbitaceae, é cultivado principalmente para a produção de cuias, sendo uma das principais fontes de renda para dezenas de pequenos agricultores do Rio Grande do Sul. A cuia é o recipiente utilizado para o preparo do chimarrão, bebida de origem indígena, que é um costume muito difundido no estado (BISOGNIN & MARCHEZAN, 1988). No entanto, o fruto lenhoso também pode ser utilizado para o artesanato, confecções de utensílios domésticos (bacias, vasos e garrafas) e instrumentos musicais.

O estabelecimento de um protocolo de propagação possibilita a realização de diversos estudos *in vitro*, os quais serviriam de subsídios para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas, com diversas aplicações no melhoramento genético da espécie. O sucesso de pesquisas em cultura de tecidos vegetais depende da produção de um grande número de explantes. Estes explantes geralmente são supridos a partir da germinação de sementes *in vitro*, sendo neste caso, necessário um alto percentual de germinação. As sementes de cucurbitáceas podem apresentar dormência ou germinação muito lenta (CASALI et al., 1982), por outro lado, a fermentação natural em água das sementes pode quebrar esta dormência (BISOGNIN et al., 1997). Uma aplicação do estabelecimento *in vitro* seria a indução de flores masculinas *in vitro* para cultura de anteras, cuja grande vantagem seria a produção de anteras axênicas e com alta viabilidade de grãos de pólen, como demonstrado em *Momordica charantia* (WANG et al., 2001). A cultura de anteras é necessária para a obtenção de plantas haplóides androgenéticas, o que possibilita a produção de linhagens homozigóticas em uma única etapa (ANDRADE, 1998).

A homozigose é de extrema importância para a fixação de características em novas cultivares de porongo, como o formato do fruto, que para a indústria de cuias determina o valor comercial da produção. As populações de polinização aberta de porongo apresentam grande diversidade genética para formato de fruto (BISOGNIN

& MARCHEZAN, 1988; BISOGNIN & STORCK, 2000) e uma baixa percentagem de frutos industrializáveis, sendo que, entre dez populações avaliadas, a maior percentagem foi de apenas 73% (BISOGNIN & MARCHEZAN, 1988). Desta forma, o desenvolvimento de novas cultivares seria facilitado pela obtenção de plantas homozigotas para este caráter.

Técnicas *in vitro* para a propagação clonal tem apresentado bons resultados em outras espécies de cucurbitáceas como *Cucumis sativus* (HANDLEY & CHAMBLISS, 1979; SAPOUNTZAKIS & TSAFTARIS, 1994), *Cucurbita pepo* (PINK & WALKEY, 1984), *Citrullus lanatus* (BARNES, 1979) e *Cucumis melo* (JAIN & MORE, 1992; SPETSIDIS et al., 1996). Vários explantes de *C. melo* cultivar Pusa Madhuras possuem alta capacidade de diferenciação. Hipocótilos com ápices meristemáticos podem regenerar brotos. Gemas axilares podem apresentar regeneração direta (JAIN & MORE, 1992). No híbrido 'Gália' de *C. melo*, gemas axilares produziram até 2,5 brotos por explante.

Vários protocolos de cultivo *in vitro* foram estabelecidos para diversas espécies da família Cucurbitaceae utilizando explantes cotiledonários. Tais protocolos estabelecidos seguem rotas embriogênicas e/ou organogênicas. A organogênese indireta foi reportada em *Cucumis melo* cv. Pusa Madhuras e em *Benincasa hispida* (THOMAS & SREEJESH, 2004) onde folhas cotilédonares formaram calos, os quais posteriormente regeneraram gemas e brotos (JAIN & MORE, 1992). No entanto, o processo de organogênese direta, onde gemas e brotações são formadas sem um prévio estágio de calo, foi descrita em *Citrullus lanatus* (COMPTON & GRAY, 1994) e *Cucurbita pepo* (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003). A embriogênese indireta foi demonstrada em *Cucumis sativus* (LOU et al., 1996) e em *Cucumis melo* (NAKAGAWA et al., 2001).

O meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) tem sido o mais utilizado em estudos com espécies de cucurbitáceas. Em alguns casos, foi necessária a adição de reguladores de crescimento, como em *Cucumis melo* híbrido Gália, onde níveis de 6-benzilaminopurina (BAP) e de ácido indolacético (AIA) afetaram o número de brotos produzidos em gemas axilares. O alongamento e enraizamento de brotos regenerados deste híbrido foram obtidos sem a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (SPETSIDIS et al., 1996).

As auxinas promovem a biossíntese de giberelinas. As giberelinas estão envolvidas com algumas etapas da germinação das sementes, como a ativação do

crescimento vegetativo do embrião e o enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião, que restringe o crescimento e a mobilização das reservas energéticas do endosperma (TAIZ & ZEIGER, 2004). Também tem se atribuído as auxinas a biossíntese do etileno, o qual possui um efeito de quebrar a dormência de sementes e iniciar a germinação em algumas espécies, como de cereais. Isso justifica o fato de que o etileno aumenta a germinação de sementes de diversas espécies (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de germinação e estabelecimento *in vitro* de porongo e determinar a influência do ácido naftalenoacético (ANA) e do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) na germinação, indução de calogênese e enraizamento *in vitro* de sementes.

2.2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Vegetal do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Todos os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h., sob intensidade luminosa de aproximadamente $20\mu\text{M m}^{-2} \text{S}^{-1}$, obtidas por lâmpadas brancas fluorescentes.

2.2.1. Germinação *in vitro* de sementes

As sementes utilizadas para os experimentos foram fermentadas à 25°C por 72h, na proporção de uma parte de semente e placenta para cinco partes de água (BISOGNIN et al., 1997). Foram realizados estudos com sementes inteiras e desprovidas de tegumento. Para os estudos de germinação *in vitro* foram utilizadas sementes da população Casco Fino Caciquense (SILVA et al., 2002).

2.2.1.1. Desinfestação de sementes inteiras e sem tegumento

A desinfestação das sementes inteiras foi feita por imersão em uma solução de 70% de álcool durante 3min, seguido de três lavagens com água destilada e

autoclavada. As sementes foram então imersas em uma solução de 2,5% de NaOCl por 10, 20, 30 ou 40min, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada. A desinfestação de sementes sem tegumento foi feita por imersão em uma solução de 70% de álcool durante 1min, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada. Após a desinfestação inicial, o tegumento foi removido com o auxílio de pinças e as sementes sem tegumento imersas em uma solução de 70% de álcool durante 1min, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada. As sementes sem tegumento foram então imersas em uma solução de 2,5% de NaOCl por 3, 6, 12 ou 24min, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada. Tanto as sementes inteiras quanto sem tegumento foram inoculadas em meio contendo água destilada, 30g L⁻¹ de sacarose e 7g L⁻¹ de agar. As avaliações foram realizadas após 15 dias de cultivo *in vitro*.

Para todos os demais experimentos a desinfestação das sementes inteiras foi realizada da mesma forma como citada no parágrafo acima, porém o tempo determinado de imersão em solução de 2,5% de NaOCl foi 40min e para a desinfestação de sementes sem tegumento foi 6min.

2.2.1.2. Determinação de fotoblastismo

Para verificar a ocorrência de fotoblastismo, foram cultivados um lote de sementes sem tegumento em meio de cultura sob condições de luminosidade (câmara de crescimento com fotoperíodo) e outro lote no escuro, foram utilizadas sementes sem tegumento. As avaliações foram realizadas após 15 dias de cultivo *in vitro*.

2.2.1.3. Efeitos da escarificação por picotes na germinação *in vitro* de sementes inteiras

Para induzir a germinação *in vitro* de sementes inteiras foram verificados os efeitos da escarificação das mesmas com quatro tipos de picotes, (1) um picote realizado na região proximal da radícula, (2) um picote realizado na região proximal da radícula e outro na distal, (3) dois picotes realizados na região distal da radícula e (4) um picote realizado na região distal da radícula (Figura 1). O meio de cultura foi

constituído de água destilada, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de agar. As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo *in vitro*.



Figura 1. Escarificação de sementes de porongo por picotes (as barras representam onde os picotes foram realizados). Santa Maria, RS, 2004.

2.2.1.4. Efeitos da redução da pressão osmótica na germinação *in vitro* de sementes inteiras

Também foram verificados os efeitos de meio de cultura de reduzidas pressões osmóticas, constituídos de água destilada solidificada com 1, 2, 3, 4 e 6g L⁻¹ de agar. Para a manipulação da pressão osmótica foi utilizado a adição de agar como soluto em água destilada, pois quanto maior a concentração de soluto (agar), maior será a pressão osmótica.

2.2.1.5. Efeitos da embebição na germinação *in vitro* de sementes

Foram verificados os efeitos da embebição das sementes inteiras com água por 9, 12, 15 ou 18 horas antes da inoculação em meio contendo 4g L⁻¹ de agar. As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo *in vitro*.

2.2.1.6. Germinação de sementes inteiras *in vitro* sobre papel germitest umedecido

Sementes inteiras também foram cultivadas *in vitro* sobre quatro camadas de papel germitest umedecidos com 2,5, 5,0, 7,5 e 10 vezes a massa do papel. O percentual de germinação foi avaliado após 13 e 30 dias de cultivo.

2.2.2. Influência das auxinas na germinação *in vitro*

A desinfestação das sementes inteiras foi realizada da mesma forma como citada em item anterior, porém o tempo de imersão em solução de NaOCl 2,5% foi 40min e para a desinfestação de sementes sem tegumento foi 6min. Foram testadas sementes inteiras e sem tegumento. O meio de cultura utilizado foi o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado para 5,7. Os tratamentos consistiram de concentrações de 0; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0mg L⁻¹ de ANA ou de 2,4 D adicionados ao meio de cultura. Foram avaliadas a percentagem de sementes germinadas, a percentagem de calogênese formada em sementes que não germinaram e a percentagem de indução de calogênese em tecidos de plântulas germinadas. A avaliação da percentagem de germinação foi realizada após 22 dias e a de calogênese após 60 dias de cultivo *in vitro*.

2.2.3. Propagação *in vitro*

2.2.3.1. Cultura de ápices caulinares e segmentos nodais

Plântulas originadas de sementes sem tegumento germinadas em meio constituído de água destilada, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de agar foram utilizadas como fonte de ápices caulinares e segmentos nodais, os quais foram utilizados como explantes. Ápices caulinares e segmentos nodais da população casco fino caciquense (SILVA et al., 2002) e da população 5 (BISOGNIN & MARCHEZAN, 1988) foram cultivados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose e 7g L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado para 5,7. Foram avaliados o número de folhas e brotos, comprimento das plântulas e percentagem de enraizamento após 13 dias de cultivo.

2.2.3.2. Efeitos das vitaminas Fuji na cultura de ápices caulinares e segmentos nodais

Também foi testada a adição de 2ml L^{-1} de vitaminas Fuji ao meio MS para o cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais. As vitaminas Fuji são constituídas de $2,5\text{g L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $2,5\text{g L}^{-1}$ de cloridrato de piridoxina, $0,5\text{g L}^{-1}$ de tiamina.HCl, 50g L^{-1} de mio-inositol e 1g L^{-1} de glicina. Foram avaliados o número de folhas e brotos e a percentagem de calogênese e enraizamento após 20 dias de cultivo.

2.2.4. Organogênese direta em explantes cotiledonáres

As sementes germinadas aos 13 dias de cultivo *in vitro* foram utilizadas como fonte de cotilédones para os experimentos. O meio de cultura basal para a realização dos experimentos com explantes cotiledonares foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30g L^{-1} de sacarose e solidificado com 7g L^{-1} de agar. Foram utilizados cotilédones inteiras com uma pequena porção do hipocótilo.

Como tratamentos foram utilizadas as concentrações de 2,0; 2,5; 3,0; $3,5\text{mg L}^{-1}$ de BAP, estes tratamentos foram adicionados de $0,2\text{mg L}^{-1}$ de ANA. Foram utilizados também dois tratamentos com as concentrações de $3,0\text{mg L}^{-1}$ de BAP e $0,05\text{mg L}^{-1}$ de ANA, sendo a diferença entre estes dois tratamentos a fonte de explantes cotiledonáres, pois um foi realizado com cotilédones originados de plântulas germinadas em meio MS suplementado com 30g L^{-1} de sacarose, 7g L^{-1} de agar e $0,5\text{mg L}^{-1}$ de ANA e o outro com cotilédones originados de plântulas germinadas em meio contendo água destilada, 30g L^{-1} de sacarose e 7g L^{-1} de agar (Tabela 1).

Foram avaliadas a percentagem de cotilédones que formaram brotações, a percentagem de calogênese e de enraizamento dos cotilédones e o número de brotos formados por cotilédone aos 12 dias de cultivo.

Tabela 1. Tratamentos empregados em explantes cotiledonares de porongo.

Tratamentos		
BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Meio de germinação das sementes (fonte de explantes)
2,0	0,20	Água destilada, 30g L ⁻¹ de sacarose e 7g L ⁻¹ de agar
2,5	0,20	Água destilada, 30g L ⁻¹ de sacarose e 7g L ⁻¹ de agar
3,0	0,20	Água destilada, 30g L ⁻¹ de sacarose e 7g L ⁻¹ de agar
3,5	0,20	Água destilada, 30g L ⁻¹ de sacarose e 7g L ⁻¹ de agar
3,0	0,05	Água destilada, 30g L ⁻¹ de sacarose e 7g L ⁻¹ de agar
3,0	0,05	MS, 30g L ⁻¹ de sacarose, 7g L ⁻¹ de agar e 0,5mg L ⁻¹ de ANA

2.2.5. Análise estatística

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 10 explantes ou sementes. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os dados de contagem foram transformados para raiz de $X+1,0$ e de percentagem para arcosen raiz de $X/100$. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Germinação *in vitro* de sementes

O tempo de imersão em solução de 2,5% de NaOCl por 40min foi o que apresentou a melhor desinfestação das sementes inteiras, as quais não germinaram em meio de cultura (Tabela 2). A escarificação por picotes, em nenhuma das formas realizadas, possibilitou a germinação das sementes inteiras de porongo em meio de cultura (Dados não apresentados). As sementes de porongo germinaram tanto em condições de luminosidade quanto em condições de escuro (dados não apresentados), indicando que esta espécie possui fotoblastismo neutro, ao contrário

de sementes de melancia que devem ser cultivadas no escuro (COMPTON, 2000). A embebição das sementes nos intervalos utilizados nesse experimento também não permitiram a germinação das sementes inteiras em meio de cultura (Dados não apresentados). Para a germinação *in vitro* de melancia foi utilizada uma embebição de 6h., seguida pela retirada do tegumento e sementeada *in vitro* (COMPTON, 2000). Neste caso, a embebição auxiliou o processo de remoção mecânica do tegumento. Para as sementes sem tegumento, o melhor tempo de imersão foi de 6min, o qual possibilitou a melhor percentagem de germinação, acima de 6min foi observada uma drástica redução no percentual de germinação devido a inibição pelo cloro (Tabela 2). Como as sementes inteiras não germinaram em meio de cultura, a remoção do tegumento é necessária para a germinação.

A redução da pressão osmótica não foi suficiente para possibilitar a germinação de sementes inteiras de porongo em meio de cultura (Dados não apresentados). Foi sugerido que o tegumento poderia ser um componente adicional para o aumento da pressão osmótica, pois a semente de porongo com tegumento necessita de 43,4% de umidade para germinar (BISOGNIN et al., 1991) e sem o tegumento somente 30,0% de umidade (BISOGNIN & SILVA, 2004). Sementes de *Dyckia distachya* Hassler cultivadas em meio MS contendo 100% dos sais apresentaram 40,8%, a metade dos sais apresentaram 49,1% e um terço dos sais apresentaram 55,8% de germinação (POMPELLI, 2002). Estes resultados sugerem que o tamanho da semente pode influenciar a absorção de água do meio de cultura, sendo sementes pequenas, como as de *D. distachya* (3mm de comprimento) afetadas pela redução da pressão osmótica e sementes maiores, como as de porongo (16mm de comprimento) não são afetadas pela redução da pressão osmótica. Reduzidas pressões osmóticas podem suprir com água mas não permitem a oxigenação, conseqüentemente pressões osmóticas muito altas podem limitar a absorção de água (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Tabela 2. Percentagem de desinfestação e de germinação *in vitro* de sementes de porongo em meio de cultura. Santa Maria, RS, 2004.

Tempo de imersão ¹	Assepsia (%)	Germinação (%)
Sementes inteiras		
10 min	57,5 ± 5,00 ²	0 ± 0,0
20 min	60,0 ± 14,14	0 ± 0,0
30 min	62,5 ± 9,57	0 ± 0,0
40 min	70,0 ± 8,16	0 ± 0,0
Sementes sem tegumento		
3 min	80,0 ± 8,16 ²	46,6 ± 4,71
6 min	90,0 ± 8,16	60,0 ± 8,16
12 min	90,0 ± 8,16	10,0 ± 0,00
24 min	93,3 ± 4,71	6,6 ± 4,71

¹Tempo de imersão em solução de NaOCl (2,5% de cloro ativo).

²Valores apresentados pelo desvio padrão da média.

O papel germitest umedecido foi substrato que possibilitou a germinação *in vitro* de sementes inteiras de porongo (Figura 2). Estes resultados foram obtidos após 13 dias de cultivo *in vitro*, considerado bem maior do tempo estabelecido para a avaliação de testes de vigor e germinação de sementes de porongo, que é de oito dias (BISOGNIN et al., 1991). Para o teste padrão de germinação, o umedecimento recomendado é de 2,5 vezes a massa de papel germitest (BISOGNIN et al., 1991).

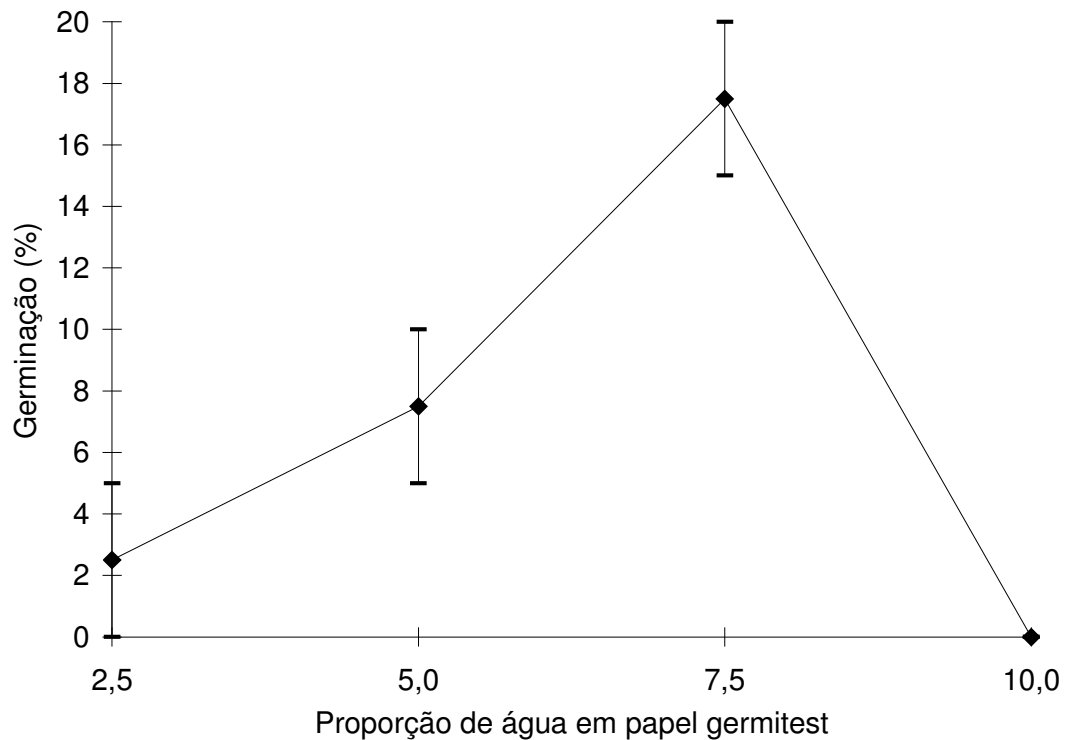


Figura 2. Percentagem de germinação *in vitro* de sementes inteiras de porongo sobre quatro camadas de papel germitest umedecido com diferentes proporções de água após 13 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2004.

Na germinação *in vitro*, as sementes ficaram sobre camadas de papel germitest e não entre camadas, o que permitiu menor disponibilidade de água *in vitro*. Além disso, foi observado grande parte da umidade permaneceu aderida as paredes do vidro ao invés de estar disponível para a embebição e germinação das sementes, o que resultou em uma baixa percentagem de germinação *in vitro* sobre proporção de 2,5 vezes a massa de papel germitest. Após 25 dias de cultivo *in vitro*, foi verificado a mesma percentagem de germinação para as sementes que receberam os tratamentos na proporção de 7,5 vezes e de 10,0 vezes a massa do substrato, atingindo 25% de germinação (Dados não apresentados), sendo que, na proporção de 10 vezes, ocorreu um atraso na germinação. Resultados semelhantes foram verificados no teste padrão de germinação, indicando que uma maior umidade reduz a velocidade de germinação das sementes (BISOGNIN et al., 1991).

2.3.2. Influência das auxinas na germinação *in vitro*

Sementes inteiras não germinaram em presença de 2,4 D e nem de ANA (Dados não apresentados). A falta de germinação das sementes inteiras *in vitro* de porongo pode estar relacionada a persistência de uma dormência residual, a qual não é totalmente eliminada durante o processo de fermentação em água por 72 horas. Esta dormência pode ser devido a presença de substâncias inibidoras da germinação, presentes no tegumento. Tais substâncias podem permanecer associadas ao tegumento e não ser difundidas no meio de cultura sólido proporcionando um estágio de dormência. Substâncias inibidoras do crescimento associadas ao tegumento podem ser moléculas orgânicas relativamente simples e de baixo peso molecular, como aldeídos, ácidos fenólicos, alcalóides e ácidos orgânicos (KETRING, 1973). A oxidação de compostos fenólicos geralmente limitam a disponibilidade de oxigênio para o embrião (BEWLEY & BLACK, 1994). Sementes de *Didymopanax morototoni* possuem parte da dormência relacionada a presença de substâncias inibidoras da germinação. Tais substâncias foram removidas por lavagens em água destilada e álcool (1:1) por 45min, aumentando a germinação das sementes *in vitro* (FRANCO & FERREIRA, 2002). Estas lavagens são semelhantes ao processo de fermentação em água, o que possibilita a quebra da dormência parcial de sementes de porongo, pois permite que tais substâncias sejam removidas do tegumento, ou seja, difundidas para a água. No entanto, possivelmente nem todas as substâncias são removidas durante o processo de fermentação das sementes, pelo fato de que nem todas as substâncias são solúveis em água.

Outra possibilidade associada a causa de não haver germinação de sementes inteiras de porongo em meio de cultura pode ser o balanço hormonal, o qual afeta tanto direto quanto indiretamente o processo de germinação. Neste caso, a adição de auxinas poderia permitir a germinação, por estarem associadas a biossíntese de ácido giberélico e de etileno (TAIZ & ZEIGER, 2004). A adição de ANA ou 2,4 D ao meio de cultura não favoreceu a germinação de sementes inteiras de porongo. Por outro lado, em *Didymopanax morototoni* a adição de cinetina (KIN) e de ácido giberélico (GA₃) promoveu o aumento do percentual de germinação *in vitro* de 40 para 70% (FRANCO & FERREIRA, 2002).

A presença de ANA favoreceu a percentagem de germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de porongo (Figura 3). A maior percentagem de germinação foi na concentração de $0,5\text{mg L}^{-1}$ de ANA, atingindo 27% após 22 dias de cultivo *in vitro*. Resultados semelhantes foram encontrados em *Carica papaya* L., onde a maior percentagem de germinação (80%) ocorreu com a concentração de $5\mu\text{M}$ de ANA (BHATTACHARYA & KHUSPE, 2001). O ANA pode induzir a expressão de lipoxigenases (LOXs), algumas destas enzimas produzem oxilipinas que parecem ser importantes moléculas sinalizadoras, as quais induzem respostas a estresses, tais como as provocadas por ataque de insetos, infecções de fungos ou bactérias e ferimentos causados por danos mecânicos. As oxilipinas podem influenciar a biossíntese do ácido jasmônico, o qual aumenta a habilidade da planta de responder a situações de estresse (WANG et al., 1999). A remoção mecânica do tegumento da semente de porongo frequentemente causa ferimentos nos tecidos, gerando um estresse, que pode ser responsável pelo baixo percentual de germinação *in vitro*. O aumento da germinação *in vitro* pela suplementação do meio de cultura com ANA sustenta a hipótese de que a planta aumenta a capacidade de responder a esse tipo de estresse.

Nem todas as plântulas foram completas, porém em todos os tratamentos com ANA foram observadas aproximadamente 50% de plântulas completas e as demais não apresentaram raízes. A não formação de raízes pode estar associada ao fato de que a auxina induz a biossíntese do etileno, que é um inibidor do crescimento de raízes (TAIZ & ZEIGER, 2004). O 2,4 D é uma auxina sintética extremamente eficiente, pois não é tão rapidamente metabolizada pela planta quanto é o AIA (TAIZ & ZEIGER, 2004). O 2,4 D produziu um efeito semelhante ao ANA sobre a percentagem de germinação *in vitro* das sementes de porongo, proporcionando um aumento na percentagem de germinação das sementes sem tegumento (Figura 4). As sementes germinadas em presença de 2,4 D não produziram 100% de plantas completas, com exceção das plântulas cultivadas na concentração de $0,5\text{mg L}^{-1}$ de 2,4 D (Figura 5).

Após 50 dias de cultivo foi observada a formação de calogênese nos hipocótilos das plântulas originadas das sementes sem tegumento cultivadas tanto em presença de ANA quanto de 2,4 D (Figura 6). Este fato representa uma grande contribuição para a produção de calos em hipocótilos, podendo abrir perspectivas para o uso potencial desta espécie em estudos de morfogênese *in vitro*. Há uma

grande dificuldade de produzir hipocótilos como explantes, pois a velocidade de germinação não é homogênea, e o tamanho dos hipocótilos varia muito. Isto associado a um baixo percentual de germinação de sementes *in vitro* dificultam a organização de experimentos em cultura de tecidos, devido ao número reduzido de unidades experimentais.

A germinação e o vigor atingem o ponto máximo quando a semente está em maturidade fisiológica. Após este ponto, a deterioração da semente se move inexoravelmente em direção à morte. Não há maneira de reverter ou eliminar a deterioração da semente, uma vez que a maturação fisiológica tenha ocorrido (DELOUCHE, 1968 apud GOEDERT, 1988). Porém, mesmo que a semente não seja viável, em virtude desta deterioração constante e irreversível, muitas células e alguns tecidos ainda permanecem vivos, até que a semente esteja completamente senescente. A teoria da totipotência sugere que qualquer célula possa ser reprogramada epigeneticamente, por mais diferenciada ou indiferenciada que seja. Desta forma, uma semente com baixo potencial de germinação e de vigor, a qual possua ainda alguma célula ou tecido vivo, se cultivada em meio de cultura contendo reguladores de crescimento na concentração adequada, pode induzir morfogênese direta ou indireta, podendo regenerar novas plantas por embriogênese ou organogênese. A presença de ANA ou de 2,4 D no meio de cultura não produziram nenhuma resposta de diferenciação ou desdiferenciação nos tecidos das sementes desprovidas de tegumento que não germinaram após 60 dias de cultivado *in vitro*, não havendo a indução de calos e não ocorrendo embriogênese somática. Em *Carica papaya*, concentrações de 1 a 20 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4 D favoreceram o desenvolvimento de calos em embriões desprovidos de tegumento (BHATTACHARYA & KHUSPE, 2001). A presença do endosperma junto ao embrião zigótico de porongo pode ter impedido a formação de embriogênese somática nos embriões zigóticos sem tegumento, tanto que, em *Anacardium occidentale*, o fato do endosperma ter sido removido, favoreceu o processo de embriogênese somática, pois os embriões zigóticos, sem reservas, podem alterar as rotas metabólicas em busca da sobrevivência. Além disso, em *Anacardium occidentale* as sementes eram imaturas e foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 13,3 μM de BAP (6-benzilaminopurina) combinado com 271,5 μM de adenina sulfato e 2,7 μM de ANA, onde induziram diretamente um alto número de

embriões somáticos, sendo uma média de 3,3 embriões por semente. A adenina sulfato foi uma condição para a indução de embriões somáticos (MARTIN, 2003).

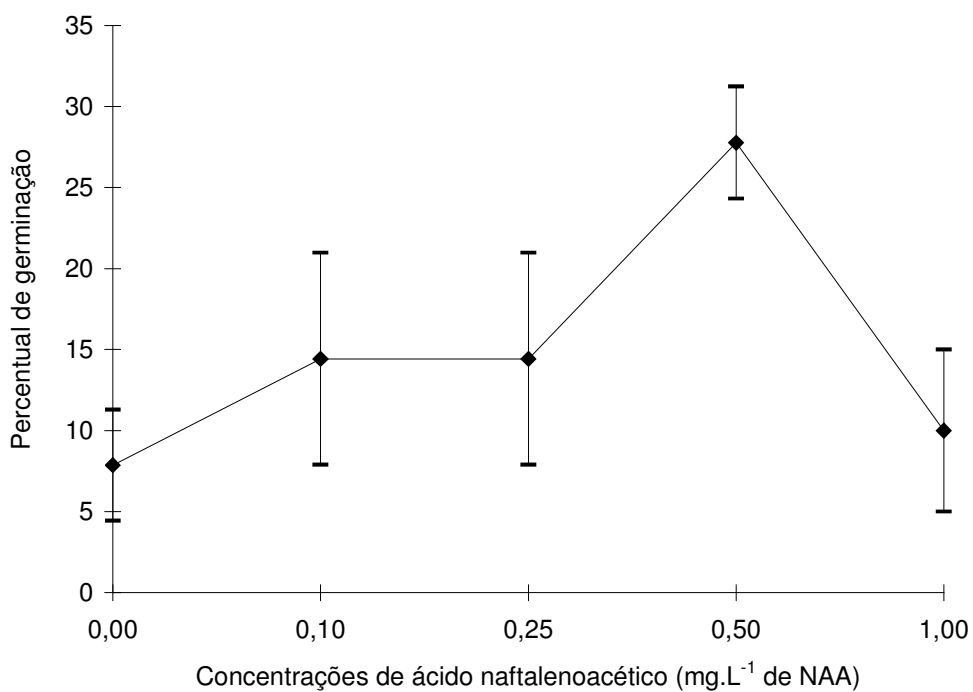


Figura 3. Influência do ácido naftalenoacético (ANA) na percentagem de germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de porongo após 22 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2004.

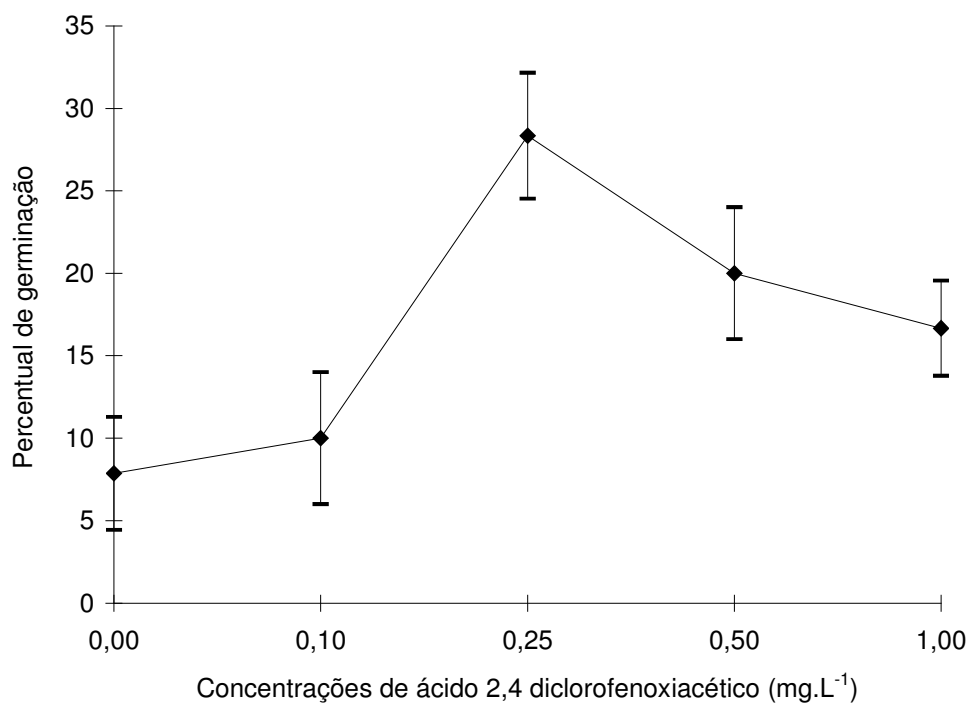


Figura 4. Influência do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) na percentagem de germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de porongo após 22 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2004.

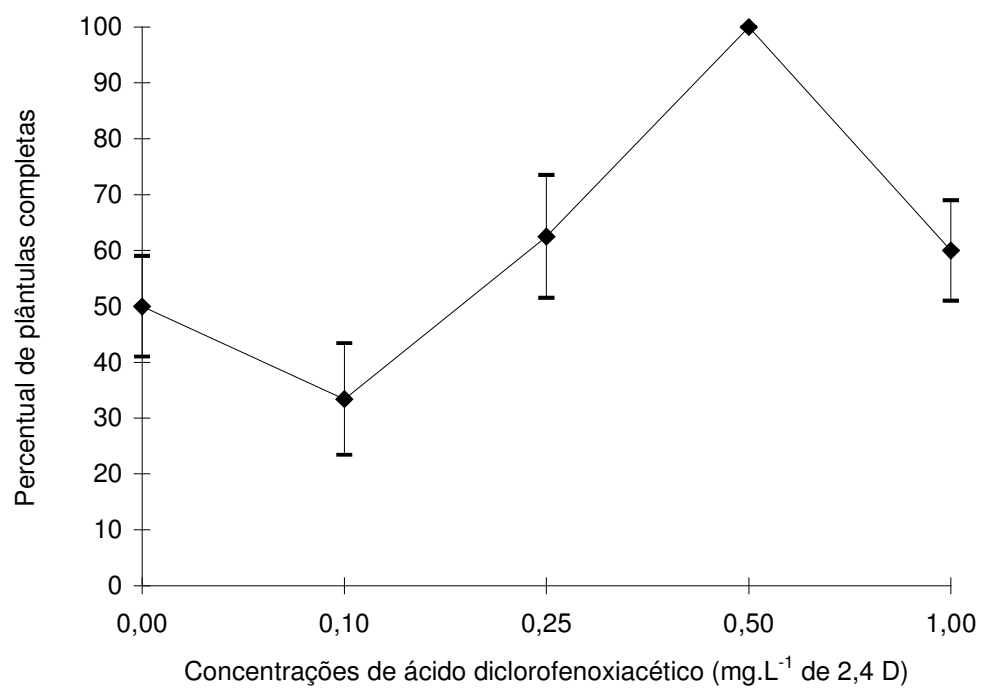


Figura 5. Influência do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) na percentagem de plântulas completas de porongo germinadas *in vitro*. Santa Maria, RS, 2004.



Figura 6. Indução de calogênese em hipocótilos de plântulas de porongo após 50 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D). Santa Maria, RS, 2004.

2.3.3. Propagação *in vitro*

Ápices caulinares e segmentos nodais de porongo sem a presença de reguladores de crescimento regeneraram plântulas completas (Figura 7). Os ápices caulinares apresentaram maior crescimento do que os segmentos nodais, com base no número de folhas e brotos, percentagem de enraizamento e comprimento das plântulas para as duas populações avaliadas, sem diferenças significativas entre populações (Tabela 3). O maior desenvolvimento dos ápices em relação aos segmentos nodais pode estar associado a morfologia do explante inoculado, sendo que os ápices caulinares cultivados, possuíam uma gema axilar e uma gema apical protegida por uma folha, além da presença de primórdios foliares. Conseqüentemente, os segmentos nodais possuíam apenas uma folha e a gema axilar. Deste modo, a presença de uma gema adicional possibilitou maior crescimento. Deve se considerar ainda que o nível endógeno de auxinas presente em ápices caulinares é muito mais elevado do que em segmentos nodais, pois a biossíntese de AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e de crescimento, especialmente nas partes aéreas, embora quase todos os tecidos sejam capazes de produzir baixos níveis de AIA. A auxina está associada ao alongamento celular, promovendo o crescimento de caules. Além disso, a auxina regula a dominância apical, o que caracteriza que o crescimento da gema apical inibe o desenvolvimento das gemas axilares. A remoção do ápice caulinar geralmente resulta na quebra da dominância apical, possibilitando o desenvolvimento de uma ou mais gemas axilares (TAIZ & ZEIGER, 2004).

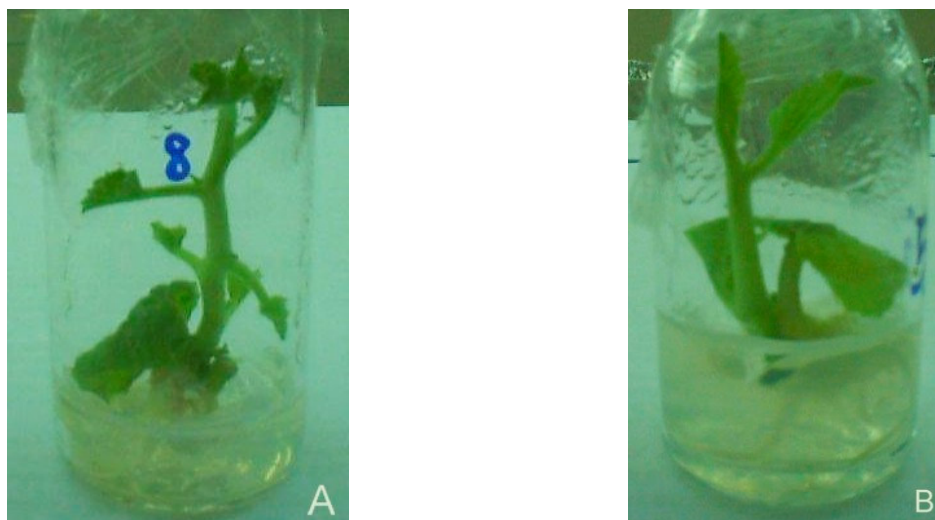


Figura 7. Clonagem de plântulas oriundas de sementes de porongo germinadas *in vitro*, (A) a partir de ápice caulinar (B) e segmento nodal. Santa Maria, RS, 2004.

Tabela 3. Regeneração de ápices caulinares e segmentos nodais de porongo após 13 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, 2004.

Tipo de explante	Número de folhas	Número de brotos	Comprimento (cm)	Enraizamento (%)
População Casco-fino Caciquense				
Ápice caulinar	5,30aA*	1,60aA	2,17aA	100,0aA
Segmento nodal	1,88bA	0,44aA	1,34bA	90,0bA
Média	3,59	1,02	1,75	95,0
População 5				
Ápice caulinar	3,76aA	2,29aA	1,64aA	81,21aA
Segmento nodal	1,30bA	0,90bA	1,13bA	40,0bA
Média	2,53	1,59	1,38	61,15
Média geral	3,06	1,30	1,56	78,07

¹ Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra, minúscula dentro e maiúscula entre populações, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro (Experimento bifatorial (2X2) com fator A = tipo de explante e fator D = População).

A suplementação com as vitaminas Fuji induziu a formação de calos, tanto de ápices caulinares quanto de segmentos nodais (Tabela 4). A indução de calo foi mais acentuada em segmentos nodais, porém reduziu a percentagem de enraizamento (Figura 8). As vitaminas Fuji possuem mio-inositol, o qual promoveu a formação de calos em *Nicotiana tabacum* (LINSMAIER & SKOOG, 1967). Em *Dyckia maritima* as vitaminas Fuji auxiliaram no desenvolvimento de aglomerados de gemas laterais sem promover a formação de calos (FRANCO et al., 2003). Apesar de ter sido utilizada para maximizar o desenvolvimento vegetativo dos explantes, as vitaminas Fuji, de forma inesperada, induziram calogênese. A formação de calo indica que as vitaminas Fuji, principalmente com explantes de segmentos nodais, podem ser utilizados para desenvolver protocolos de organogênese indireta ou embriogênese indireta em porongo.

Tabela 4. Regeneração de ápices caulinares e segmentos nodais de porongo após 20 dias cultivadas *in vitro* com suplementação de vitaminas. Santa Maria, RS, 2004.

Tipo de explante	Número de folhas	Número de brotos	Calogênese (%)	Enraizamento (%)
Ápice caulinar	2,22 a ¹	1,55 a	22,2 b	55,5 a
Segmento nodal	1,10 a	0,7 a	70,0 a	10,0 b
Média	1,66	1,12	46,1	32,75

¹ Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

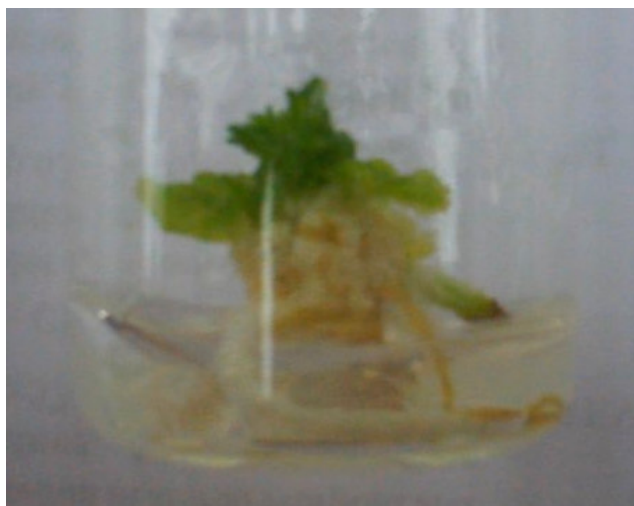


Figura 8. Segmento nodal de porongo após 20 dias de cultivado *in vitro* em meio MS com adição de vitaminas Fuji para a indução de calogênese. Santa Maria, RS, 2004.

2.3.4. Organogênese direta em explantes cotiledonários

As concentrações de 2,0-3,5mg L⁻¹ de BAP associado a 0,2mg L⁻¹ de ANA não promoveram aumentos das brotações laterais, do número de brotos e de enraizamento (Tabela 5). A percentagem de brotações laterais foi aumentada com a redução da concentração de ANA de 0,2 para 0,05mg L⁻¹, passando de 10% para 60 e 75%. O número de brotos também foi aumentado de 1,0 para 1,5 e 2,0. O percentual de enraizamento alcançou 100% em explantes cotiledonários originados de plântulas germinadas em 0,5mg L⁻¹ de ANA, e foi de apenas 60% nos cotilédones originados de plântulas germinadas na ausência de ANA. Brotações laterais e calos formaram-se a partir da região basal do cotilédone (Figura 9) possivelmente em função do nível endógeno de ANA do cultivo anterior. Resultados semelhantes foram encontrados em três cultivares de *Cucurbita pepo* (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003), com exceção da formação de calos. O local da origem das brotações laterais parece ser a junção entre o segmento do hipocótilo com o cotilédone. Não foram observadas brotações adventícias na região distal do cotilédone, o que também concorda com os resultados de ANANTHAKRISHNAN et al. (2003).

O número de brotos não foi alterado pela origem do explante, porém o percentual de enraizamento foi maior em explantes cotiledonáres de plântulas originadas em meio com ANA (Tabela 5). Os calos produzidos na base dos cotilédones podem ser utilizados em novos estudos morfogênicos, na tentativa de promover uma rota embriogênica ou organogênica para propagação clonal da espécie. O processo de morfogênese é controlado pelo balanço hormonal entre auxinas e citocininas. Quando o nível de auxinas é mais elevada em relação ao de citocininas, ocorre a indução de embriogênese e o inverso induz a organogênese (SKOOG & MILLER, 1957). Este balanço hormonal é muito peculiar e está influenciado por vários fatores, como espécie, tipo de explante e o meio de cultura.

O uso de cotilédones de sementes maduras como fonte de explantes apresentou bons resultados na indução da embriogênese somática em *Cucumis melo* (TABELI et al., 1991; GRAY et al., 1993; GUIZ et al., 1997). Tais explantes apresentam grande dificuldade de serem produzidos em quantidade suficiente para a realização dos experimentos (NAKAGAWA et al., 2001), sendo necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes para a germinação *in vitro* de sementes. Os cotilédones imaturos são uma fonte independente de explantes para a produção de um grande número de plântulas de porongo *in vitro*.

Tabela 5. Indução de brotações laterais em explantes cotiledonáres de porongo após 13 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS.

Tratamentos		Calogênese	Brotações	Número de	Enraizamento (%)
BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	(%)	laterais (%)	brotos	
2,0	0,20	0,0 b ²	10 b	1,0 b	75,0 ab
2,5	0,20	0,0 b	10 b	1,0 b	95,0 a
3,0	0,20	0,0 b	10 b	1,0 b	75,0 a
3,5	0,20	0,0 b	10 b	1,0 b	80,0 a
3,0	0,05	0,0 ² b	60,0 a	2,0 a	60,0 b
3,0 ¹	0,05	90,0 a	75,0 a	1,5 ab	100,0 a

¹ Tratamento com cotilédones originados de plântulas cultivadas em meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA.

² Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

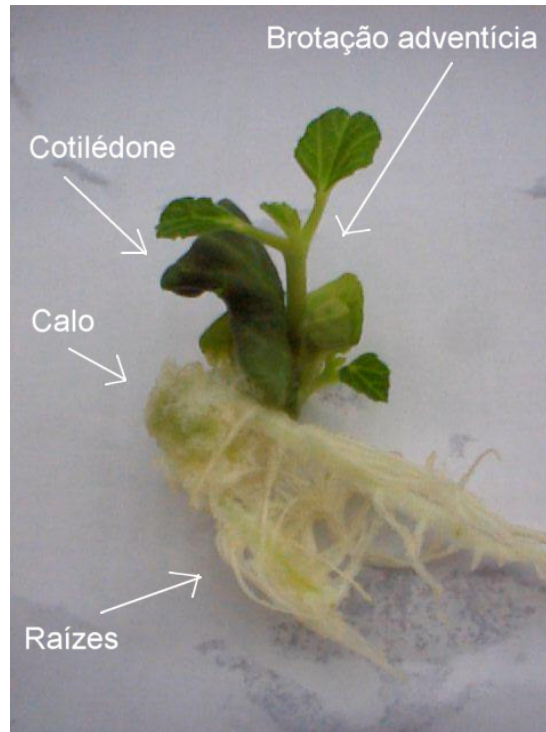


Figura 9. Indução de calogênese e de brotações laterais em explante cotiledonar de porongo cultivado em meio MS com a adição de $3,0\text{mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e $0,05\text{mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA) aos 16 dias de cultivo (Explante cotiledonar oriundo de plântulas que cresceram em presença de $0,5\text{mg L}^{-1}$ de ANA). Santa Maria, RS, 2004.

2.4. Conclusões

- O melhor tempo de desinfestação de sementes inteiras de porongo é 40 min. em imersão em solução de NaOCl (2,5% de cloro ativo) e para sementes sem tegumento é de 6 min;
- Sementes inteiras germinam *in vitro* sobre papel germitest umedecido com água destilada e autoclavada na proporção de 7,5 vezes a massa do papel;
- O porongo pode ser estabelecidos *in vitro* a partir de explantes cotiledonários;
- O porongo pode ser propagado *in vitro* sem a presença de reguladores de crescimento a partir de ápices caulinares e segmentos nodais;
- Cotilédones originados de sementes de porongo germinadas em meio MS suplementado com 0,5mg L⁻¹ de ANA, quando cultivados em meio MS adicionado com 3,0mg L⁻¹ de BAP e 0,05mg L⁻¹ de ANA, além de permitir a formação de brotações adventícias, também permitem a formação de calos na região basal do cotilédone;
- A suplementação do meio MS com 2mL L⁻¹ de vitaminas Fuji (2,5g L⁻¹ de ácido nicotínico, 2,5g L⁻¹ de cloridrato de piridoxina, 0,5g L⁻¹ de tiamina.HCl, 50g L⁻¹ de mio-inositol e 1g L⁻¹ de glicina) induz a formação de calos em segmentos nodais de porongo;
- O ácido naftalenoacético e o ácido 2,4 diclorofenoxiacético na escala de 0-1,0mg L⁻¹ não permitem a germinação *in vitro* de sementes de porongo em meio de cultura;
- O ácido naftalenoacético na concentração de 0,5mg L⁻¹ proporciona um aumento no percentual de germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de porongo;
- O ácido 2,4 diclorofenoxiacético na concentração de 0,25mg L⁻¹ proporciona um aumento no percentual de germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de porongo;
- A presença de ANA ou 2,4 D em meio MS, para a germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de porongo promove a formação de calos em hipocótilos de porongo;
- A redução do pressão osmótica não permite a germinação *in vitro* de sementes inteiras de porongo.

3.0. CAPÍTULO II - GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MOGANGO

3.1. Introdução

O gênero *Cucurbita* representa a maior variabilidade morfológica dentro de todo o reino vegetal (ROBINSON et al., 1976). A espécie *Cucurbita pepo* apresenta grande variabilidade genética, sendo representada por diversas variedades, tais como, a abobrinha de tronco caserta, a abobrinha de tronco branco e o mogango. O mogango é uma ótima fonte alimentar, rica em fibras, vitaminas e sais minerais.

As sementes de cucurbitáceas diferem quanto a forma de germinação *in vitro*. Nesta família de plantas existem espécies que germinam com a presença de tegumento, como *Cucumis sativus* (LOU et al., 1996) e *Cucumis melo* (JAAGRATI & MORE, 1992) e aquelas que necessitam da remoção do tegumento como são os casos de *Momordica charantia* (WANG et al., 2001) e *Citrullus lanatus* (COMPTON, 2000). Em virtude da maior necessidade de água para a germinação (BISOGNIN et al., 1991), as sementes inteiras de porongo poderiam germinar em meio de cultura, desde que a pressão osmótica fosse suficientemente reduzida para permitir um maior estado de energia livre da água, pois o aumento da concentração de solutos aumenta proporcionalmente a pressão osmótica e reduz o estado de energia livre da água. Desta forma, quanto maior a pressão osmótica menor será a disponibilidade de água para a embebição das sementes (TAIZ & ZEIGER, 2004). Numa menor pressão osmótica, as sementes poderiam absorver maiores quantidades de água necessárias para a germinação, sem que fosse necessário retirar o tegumento, o qual funcionaria como uma barreira para a absorção de água pela amêndoa. Plântulas originadas de sementes fornecem tecidos pouco diferenciados, o que as caracteriza como explantes competentes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Vários estudos morfogênicos *in vitro* já foram realizados com a espécie *Cucurbita pepo*. Protocolos de micropropagação já foram estabelecidos com o uso de segmentos nodais (JURETIC & KATAVIC, 1989) e ápices caulinares (PINK & WALKEY, 1984). Protocolos visando a embriogênese somática também já foram estabelecidos, sendo que foi obtido a regeneração *in vitro* destes embrióides (CHEE, 1991), e estudos mais aprofundados visando a iniciação e a maturação de embriões

somáticos já foram conduzidos (CHEE, 1992). Fontes nitrogenadas, tais como o cloreto de amônia (NH₄Cl) foram utilizados em estudos de controle do desenvolvimento de embriões somáticos (LELJAK-LAVANI et al., 2004) e plântulas haplóides já foram obtidas através da cultura de anteras (METWALLY et al., 1998).

Explantos cotiledonários têm apresentado respostas positivas na indução de morfogênese em várias espécies de cucurbitáceas, tanto em rotas organogênicas diretas quanto indiretas, e o sucesso destes explantes também foi verificado em rotas embriogênicas, tanto diretas quanto indiretas. Em melão cv. Pusa Madhuras, folhas cotiledonárias formaram calos, posteriormente regeneraram gemas e brotações axilares, ocorreu também o enraizamento das folhas cotilédones (JAIN & MORE, 1992). Cotilédones de quatro linhagens tetraplóides de melancia produziram organogênese direta, ocorrendo a produção de brotações adventícias diretamente na região basal do cotilédone expandido (COMPTON & GRAY, 1994). Em pepino foram produzidos embriões somáticos a partir de explantes cotiledonários com uso do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) ou de AIA combinado com altas concentrações de sacarose (LOU et al., 1996).

Os objetivos deste trabalho foram estabelecer um protocolo de germinação *in vitro* de sementes de mogango e estudar o processo de organogênese direta em explantes cotiledonários.

3.2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Vegetal do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. As sementes utilizadas neste trabalho foram da cultivar Enrugado Verde.

3.2.1. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes

As sementes foram imersas em álcool 70% durante 3 min e após lavadas três vezes com água destilada e autoclavada, imersas novamente numa solução de NaOCl 2,5% durante 10, 20, 30 ou 40 min e lavadas três vezes em água destilada

autoclavada. O meio de cultura utilizado para a germinação das sementes foi constituído de água destilada e 30g L⁻¹ de sacarose, sendo solidificado com 7g L⁻¹ de agar. Foram utilizados frascos com 1,8 cm de largura e 4,2 cm de comprimento com um volume de meio de cultura de 3,5 mL. O pH foi ajustado para 5,7. Foram avaliadas as percentagens de desinfestação e germinação das sementes após 10 dias da sementeira.

O teor de cloro (percentagem em massa) foi obtido pelo uso de volumetria de oxi-redução. A temperatura da amostra foi controlada para 20°C. Foram colocados 200 mL da amostra em um erlenmeyer de 250 mL, e adicionado alguns cristais de iodeto de potássio, 1 mL de ácido acético concentrado e 1 mL da solução de amido a 1%. Foi realizado a titulação com uma solução de tiosulfato de sódio 0,001 N até que a cor azul desaparece (ADAD, 1982). O cloro residual é dado pela seguintes expressão: Cloro residual (p.p.m.) = $N_2S_2O_3 \cdot 0,1773$. Onde $N_2S_2O_3$ é o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio 0,001 N. Para obter o percentual em massa (τ) basta multiplicar o valor de Cloro Residual (p.p.m) por 100.

3.2.2. Efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação *in vitro*

O meio de cultura utilizado para avaliar os efeitos da pressão osmótica sobre a germinação das sementes foi constituído de água destilada, solidificado com 7g L⁻¹ de agar e o pH ajustado para 5,7. O meio foi suplementado com 0, 10, 20 ou 30g L⁻¹ de sacarose, que consistiram os tratamentos. Foram avaliadas duas soluções comerciais de NaOCl (Cruzado[®] e Lavex[®]) contendo de 2 a 2,5% de cloro ativo. Foram avaliadas a percentagem de germinação, a estimativa do dia médio de germinação (EDMG), a energia germinativa de Baldwin (EGB) e o índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV) (BONOW, 1984).

A EDMG foi calculada pela seguinte fórmula:

$$EDMG = \sum Ni.(1 / \sum Ni / Di)$$

Onde: N é o total de plântulas normais.

Para a energia germinativa de Baldwin (EGB), considera-se o valor máximo (VM), o qual é a germinação cumulativa dividida pelo número de dias desde o início do teste, ou seja a razão de $\sum Ni / Di$, onde o período de energia de Baldwin é a mais alta percentagem de germinação em relação ao tempo decorrido desde o início do experimento.

O índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV) é calculado pela seguinte fórmula:

$$IVGSV = 100 \cdot \left(\frac{\sum Ni}{Di} \cdot \frac{1}{\sum N} \right)$$

Onde: $\sum Ni$ é o somatório do número de plântulas no dia i ; Di é o dia de avaliação das plântulas, i varia de 1 até n .

Foram consideradas germinadas as sementes com o hipocótilo visível e de coloração verde e plântulas aquelas que expandiram os cotilédones. Cada experimento foi considerado concluído quando não ocorreu mais germinação em nenhum dos tratamentos.

3.2.3. Indução de brotações adventícias em explantes cotiledonáres

Foram utilizados cotilédones inteiros provenientes de plântulas de mogango com 20 dias após a semeadura. O meio basal utilizado foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com as seguintes modificações: ausência de glicina e mio-inositol e suplementado com 30g L^{-1} de sacarose e 7g L^{-1} de agar. O pH também foi ajustado para 5,7. Os tratamentos consistiram das concentrações de 0 (testemunha); 0,5; 1,0 e $2,0\text{mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). As avaliações foram realizadas após 12 dias de cultivo, como a indução de brotações adventícias, o número de brotos formados e a percentagem de enraizamento e de sobrevivência.

3.2.4. Multiplicação de ápices caulinares e segmentos nodais originados dos explantes cotiledonáres

As brotações adventícias produzidas nos cotilédones durante o experimento do item anterior, foram repicadas em ápices caulinares e segmentos nodais, estes explantes foram cultivados em meio MS adicionado de 30g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de agar. As características avaliadas foram: percentagem de enraizamento e de sobrevivência, comprimento das plântulas e o número de folhas e de brotos.

3.2.5. Condições de cultivo e análise estatística

Os testes foram mantidos em sala de crescimento com a temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de aproximadamente 20 μM M⁻² S⁻¹ obtidas por lâmpadas fluorescentes brancas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado consistindo de 4 repetições de 10 explantes. Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo efetuado procedimentos de análise de regressão para os dados quantitativos e testes de comparação múltipla de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para os dados qualitativos. Os dados originados de percentagens foram transformados para arco seno de raiz quadrada de x/100 e os dados de contagem foram transformados para √X. Para a análise dos dados foi utilizado o SoftWare GENES (CRUZ, 2001).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes

A melhor desinfestação associada a alta percentagem de germinação de sementes de mogango foi 20 min de imersão em NaOCl 2,5% de cloro ativo (Tabela 6). Os tempos de imersão de 30 e 40 min aumentaram a assepsia das sementes, porém provocaram uma drástica redução da germinação, respectivamente para 20%

e 8%. O tempo de imersão de 10 min apresentou maior assepsia das sementes (85%) do que a imersão por 20 min (75%). Estes resultados contrariam a expectativa de que o aumento do tempo de imersão aumenta a assepsia das sementes. No entanto, a maior assepsia do tratamento por 10 min afetou mais a germinação (23% de germinação) do que o tratamento de 20 min (35% de germinação). É possível que a maior percentagem de germinação tenha sido obtida devido a embebição das sementes, necessária para iniciar os processos de germinação. A menor germinação com o aumento do tempo de imersão pode estar associado ao efeito fitotóxico do cloro presente na solução, devido a absorção de maiores quantidades de água juntamente com o cloro. O aumento do índice de germinação, seguido de uma redução da percentagem de germinação *in vitro* em função do aumento do tempo de imersão em solução de 2,5% de NaOCl também foi observado em porongo, conforme relatado neste trabalho.

TABELA 6. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogango cv. Enrugado Verde após 10 dias da semeadura. Santa Maria, RS, 2004.

Imersão em NaOCl 2,5% (min)	Desinfestação (%)	Germinação (%)
10	85,0 ± 0,05 ¹	23,0 ± 0,05
20	75,0 ± 0,05	35,0 ± 0,10
30	87,0 ± 0,09	20,0 ± 0,18
40	95,0 ± 0,05	8,0 ± 0,09

¹ Valores apresentados pelo desvio padrão da média.

3.3.2. Efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação *in vitro*

As soluções comerciais Lavex[®] e Cruzado[®] produziram resultados diferentes sobre a germinação *in vitro*, apesar de ambas as soluções possuírem uma faixa de cloro ativo entre 2,0 a 2,5% (Tabela 7). As análises volumétricas das soluções utilizadas mostraram que o Cruzado[®] possui maior percentagem de cloro ativo (3,1%) do que o Lavex[®] (2,5%) o que justifica os efeitos mais drásticos sobre a germinação das sementes tratadas com a solução Cruzado[®]. Esta consideração é

importante, pois na maioria dos protocolos de desinfestação de sementes, são citadas apenas a extensão da percentagem de cloro ativo e não fazem nenhuma referência quanto ao produto comercial, o que implica numa dificuldade para conseguir repetir os resultados. As concentrações de cloro ativo encontradas em água sanitária comercial variam de uma marca para outra e até na mesma marca (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Os procedimentos mais adequados nestes casos são quantificar o teor de cloro ativo da solução comercial de NaOCl ou usar produtos com grau reagente.

A redução da pressão osmótica pela diminuição da concentração de sacarose não foi eficaz para proporcionar altos índices de germinação das sementes como preconizado. A redução da pressão osmótica para as concentrações de 0 e 10g L⁻¹ de sacarose diminuiu a percentagem de germinação (Tabela 7). A fonte de cloro Cruzado[®] nas concentrações de 0 e 10g L⁻¹ de sacarose inibiu a germinação das sementes em função da redução da pressão osmótica. Isto pode ter ocorrido devido ao maior suprimento de água e, concomitantemente, de cloro, pois esta solução apresenta maior teor de cloro ativo (3,1%). No caso da fonte de cloro Lavex[®] não houve inibição da germinação, porém ocorreu uma redução significativa da germinação comparado com as concentrações mais elevadas de sacarose (20 e 30 g L⁻¹). A solução Lavex[®] apresentou 2,5 % de cloro ativo, dentro do teor especificado pelo fabricante. O cloro apesar de ser requerido pela planta para as reações fotossintéticas que envolvem a evolução de O₂ (TAIZ & ZEIGER, 2004), além de ser muito solúvel, possui uma ação que inativa enzimas e age como oxidante (TRABULSI, 1991). Possivelmente o tegumento de mogango possui substâncias inibidoras da germinação. Tais substâncias são freqüentemente compostos fenólicos, que ao se oxidarem geralmente limitam a disponibilidade de oxigênio para o embrião (BEWLEY & BLACK, 1994) inibindo a germinação.

As concentrações de sacarose de 20 e 30g L⁻¹ proporcionaram as mesmas percentagens de germinação *in vitro* de sementes de mogango, independente da fonte de cloro ativo. Quanto ao vigor das sementes, a redução da pressão osmótica não afetou a estimativa do dia médio de germinação e o índice de velocidade de germinação de sementes viáveis quando foi usado como fonte de cloro ativo o Lavex[®] (Tabela 7). Entretanto, a energia germinativa de Baldwin mostrou uma redução significativa do vigor nas concentrações de sacarose de 0 e 10g L⁻¹ quando

foi usado o Cruzado[®] como fonte de cloro ativo. As sementes não germinam nas concentrações de sacarose de 0 e 10g L⁻¹.

Sementes de porongo com tegumento colocadas em meio de cultura com reduzida pressão osmótica (constituído de água destilada e solidificado com 1g L⁻¹ de agar) não germinaram após 30 dias de cultivo. Em mogango foi verificado efeito semelhante, pois houve uma redução da percentagem de germinação. Por outro lado, sementes de *Dyckia distachya* cultivadas em três concentrações de sais do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), apresentaram 40,8% de germinação em meio contendo 100% dos sais, 49,1% em meio contendo a metade dos sais e 55,8% de germinação em meio contendo um terço dos sais, ou seja, a redução da pressão osmótica promoveu um aumento da percentagem de germinação das sementes (POMPELLI, 2002). Essas diferenças de comportamento entre cucurbitáceas e bromeliáceas podem ser explicadas pelo tamanho das sementes, pois sementes grandes necessitam de maiores quantidades de água comparado com sementes pequenas. Neste caso, a pressão osmótica do meio de cultura possui uma limitada capacidade de aumentar a disponibilidade de água, podendo aumentar a taxa da germinação de sementes pequenas e ser desprezível para sementes grandes. As sementes de porongo apresentam 16 mm e as de mogango 17 mm de comprimento, comparadas com as de *D. distachya* que apresentam apenas 3 mm de comprimento.

TABELA 7. Germinação e vigor, medidos pela estimativa do dia médio de germinação (EDMG), energia germinativa de Baldwin (EGB) e índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV), em sementes de mogango cv. Enrugado Verde *in vitro* em diferentes potenciais osmóticos. Santa Maria, RS, 2004.

Sacarose (g L ⁻¹)	Germinação (%)	EDMG	EGB	IVGSV
Solução comercial de NaOCl (2,5% de cloro ativo) – Lavex [®]				
0	22,5 b*	17,0 a	0,53 b	5,9 a
10	17,5 b	15,0 a	0,47 b	6,7 a
20	30,0 a	16,0 a	0,75 a	6,2 a
30	30,0 a	17,0 a	0,71 a	5,9 a
Solução comercial de NaOCl (3,1% de cloro ativo) – Cruzado [®]				
0	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
10	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
20	30,0 a	18,0 a	0,16 a	5,5 a
30	30,0 a	16,0 a	0,18 a	6,2 a

* Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.3.3. Indução de brotações adventícias em explantes cotiledonáres

A indução de brotações adventícias ocorreu na região basal da folha cotiledonar e seguiu uma regressão linear positiva para a percentagem de brotações adventícias, sugerindo a realização de um novo experimento com concentrações de BAP mais elevadas. A maior percentagem atingida na concentração de 2,0mg L⁻¹ de BAP foi 70% (Figura 11). Resultados semelhantes foram encontrados com a cultivar Ma'yan, onde foi verificado 88% de indução de brotações, porém com adição de 1,0mg L⁻¹ de BAP (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003) e em melão var. *Inodorus*, onde foram obtidos 80% de brotações adventícias em três cultivares, Yellow Queen, Yellow King (SVS) e no híbrido AF-222 (Agroflora), sobre as concentrações de 0,5-1,0mg L⁻¹ de BAP (STIPP et al., 2001). A indução de brotações adventícias ocorreu, mesmo na ausência de reguladores de crescimento, atingindo 20%, numa média de 1 broto por explante cotiledonar. Resultados semelhantes foram obtidos em melancia cv. Sürme (PIRINÇ et al., 2003). Porém em três cultivares de melão, não houve resposta morfogênica na ausência de BAP (STIPP et al., 2001).

A percentagem de enraizamento dos cotilédones seguiu uma regressão linear negativa, demonstrando que o aumento da concentração de BAP reduz a percentagem de enraizamento, sendo que a menor percentagem de enraizamento obtida foi 60% na concentração de 2,0mg L⁻¹ (Figura 11). Plântulas inteiras de mogango foram regeneradas a partir da região basal dos cotilédones (Figura 10). O número médio de brotos por explante cotiledonar foi 1,0±0,5. Altas taxas de regeneração de brotos por explante podem ser alcançadas em genótipos apropriados (GAMBLEY & DODD, 1990; MSIKITA et al., 1990), como foi demonstrado na cultivar Hales Best 36 de melão, onde foi obtido 10 brotos por cotilédone (ABRIE & VAN STADEN, 2001), na cultivar “Sürme” de melancia, onde foram obtidos 5 brotos por explante cotiledonar (PIRINÇ et al., 2003) e na cultivar True French de *Cucurbita pepo*, onde cada explante cotiledonar produziu 4 brotos (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003). No entanto, existem genótipos não responsivos a organogênese direta, como foi verificada na espécie *Cucurbita maxima*, nas cultivares A-line e Chicago e na cultivar Rolet de *Cucurbita pepo*, onde nenhuma brotação foi obtida, mesmo sobre diversas concentrações (0-10mg L⁻¹) das citocininas, BAP, 6-furfurilaminopurina (KIN), isopenteniladenina (iP) e tidiazuron (TDZ), isoladas ou combinadas com (0-1,0mg L⁻¹) de AIA (ABRIE & VAN STADEN, 2001). A influência do genótipo em cucurbitáceas é bem conhecida como fator determinante no sucesso da embriogênese somática (ORIDATE et al., 1992). A importância de desenvolver diferentes tecnologias de regeneração de explantes é o aumento das possibilidades no uso da engenharia genética de diferentes cultivares, sendo extremamente valioso para espécies tais como *Cucurbita pepo*, que apresentam grande diversidade de tipos de frutos (PARIS, 1989).

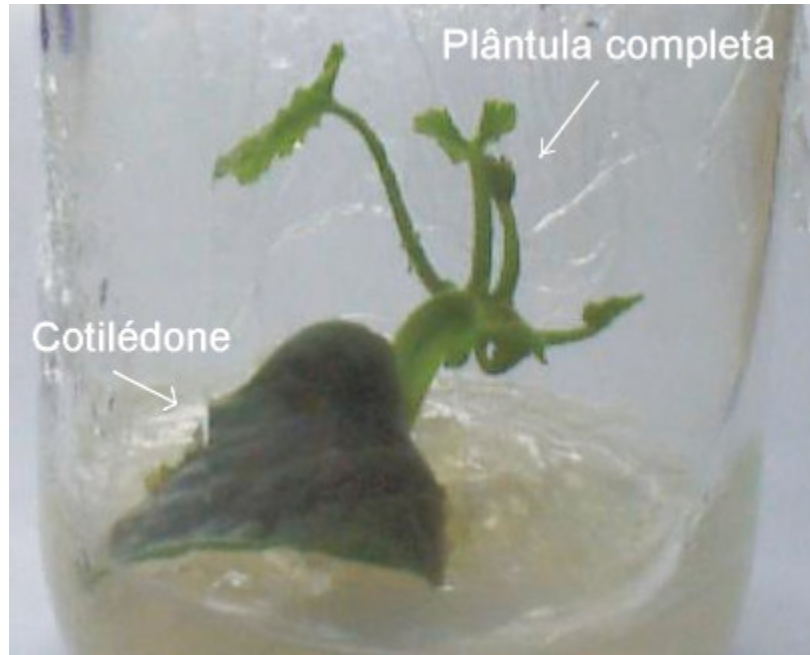


Figura 10. Plântula completa de mogango formada na região basal de um explante cotiledonar em presença de 6-benzilaminopurina (BAP). Santa Maria, RS, 2004.

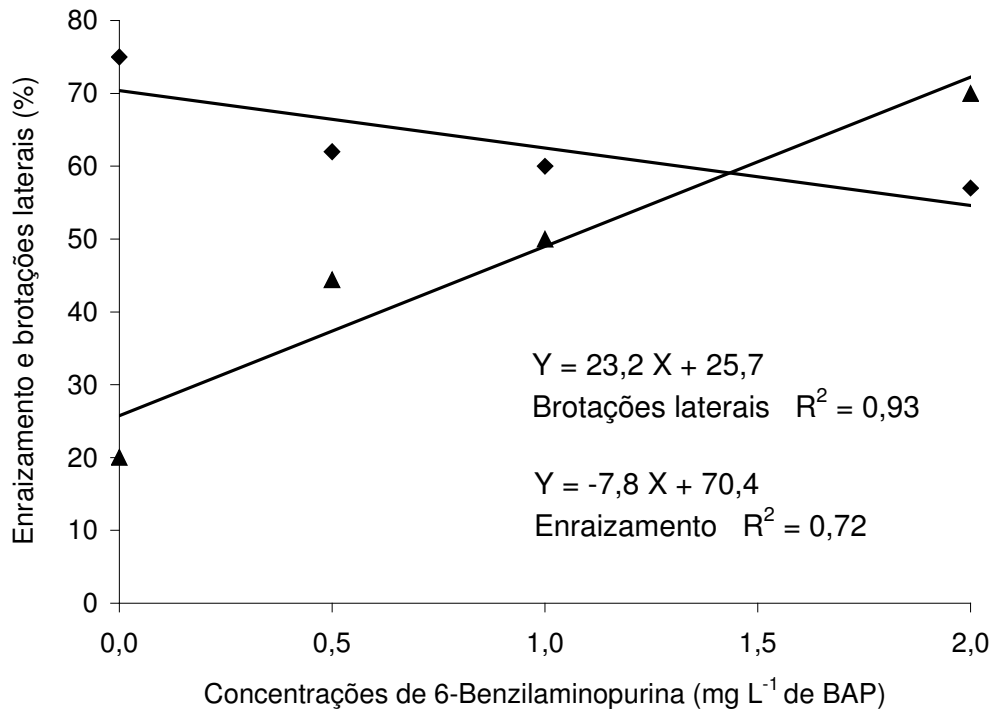


Figura 11. Percentagens de enraizamento e de brotações adventícias em diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) em explantes cotiledonários de mogango. Santa Maria, RS, 2004.

3.3.4. Multiplicação de ápices caulinares e segmentos nodais originados dos explantes cotiledonários

Os ápices caulinares e segmentos nodais retirados das plântulas completas formadas a partir dos cotilédones regeneraram plantas completas (Tabela 8). Porém ocorreu oxidação em várias regiões dos tecidos, sendo que os segmentos nodais apresentaram menor percentagem de oxidação (27,5) em relação aos ápices caulinares (77,7). Em três cultivares de *Cucurbita pepo*, cv. True French, Ma'yan e Goldy, a adição de 0,1mg L⁻¹ de BAP, com ou sem 1,0mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) facilitou o restabelecimento dos explantes (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003). Os segmentos nodais possuem um desenvolvimento mais lento do que os ápices caulinares, possivelmente relacionado ao tipo de explante, pois os ápices caulinares conservam a dominância apical, o que está demonstrado pela maior percentagem de enraizamento dos explantes apicais, com 55,5% de enraizamento com relação a

14,4% de enraizamento dos segmentos nodais. Este fato pode ser explicado, pois os explantes caulinares, além de possuírem uma gema apical, também possuem uma gema lateral juntamente com uma folha, o que possibilita um desenvolvimento mais rápido, conforme discutido em porongo.

Quanto maior os explantes de ápices caulinares ou de segmentos nodais maior foi a percentagem de enraizamento (Figura 12 e 13). Resultados semelhantes foram obtidos em explantes de melancia cv. Sürme, onde foi demonstrado que apenas brotos maiores que 1,6cm foram capazes de promover enraizamento eficiente (PIRINÇ et al., 2003). O percentual de enraizamento também pode ser influenciado pela ação de reguladores de crescimento como visto em cultivares de melancias. A frequência de enraizamento em brotos de melancia foi influenciada pela concentração de ANA (COMPTON & GRAY, 1993). Na cultivar cv. Sürme onde o uso de 1,0mg L⁻¹ de ANA possibilitou o enraizamento de cerca de 70% dos brotos (PIRINÇ et al., 2003). Em *Benincasa hispida*, o ácido indolbutírico (AIB) mostrou-se superior ao ANA no percentual de enraizamento de brotos originados por organogênese indireta, atingindo 90% de enraizamento (THOMAS & SREEJESH, 2004).

Tabela 8. Multiplicação e regeneração de ápices caulinares e segmentos nodais de mogango cv. Enrugado Verde após 19 dias cultivados *in vitro*. Santa Maria, RS, 2004.

Explante	Número de Brotações	Número de folhas	Comprimento (cm)	Enraizamento (%)	Plântulas oxidadas (%)
Ápices caulinar	2,3 ± 1,8 ¹	3,0 ± 2,4	2,1 ± 0,8	55,5 ± 12,8	77,7 ± 6,4
Segmento nodal	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,5	1,5 ± 0,1	14,4 ± 3,8	27,5 ± 10,3

¹ Valores obtidos pelo desvio padrão da média.

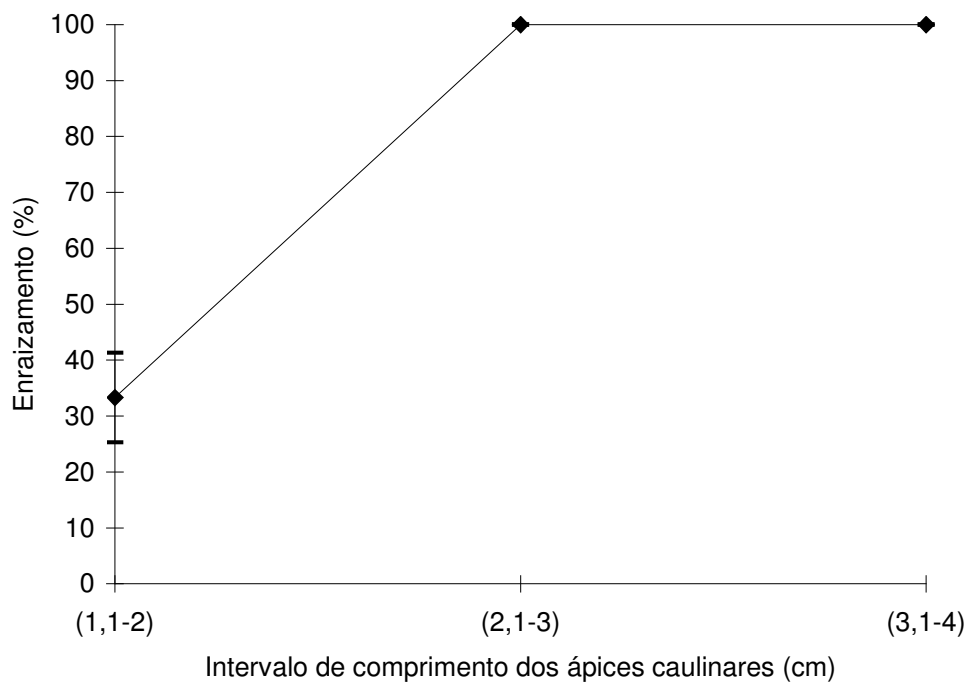


Figura 12. Percentagem de enraizamento *in vitro* de explantes de ápices caulinares de mogango de diferentes tamanhos. Santa Maria, RS, 2004.

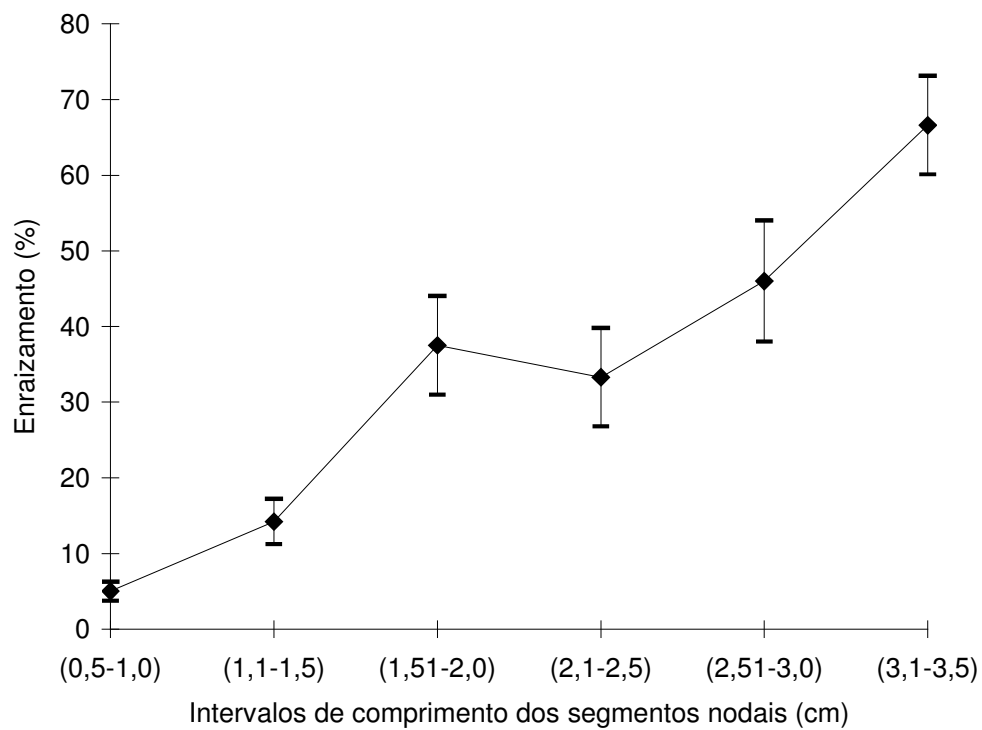


Figura 13. Percentagem de enraizamento *in vitro* de explantes de segmentos nodais de mogango de diferentes tamanhos. Santa Maria, RS, 2004.

3.4. Conclusões

- A redução da pressão osmótica não aumenta o percentual de germinação *in vitro* de sementes de mogango;
- O mogango pode ser estabelecido *in vitro* a partir de explantes cotiledonários;
- O enraizamento *in vitro* de ápices caulinares e segmentos nodais originados das brotações em cotilédones está correlacionado com o tamanho do explante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIE, A. L.; VAN STADEN, J. Development of regeneration for selected cucurbit cultivars. **Plant Growth Regulators**, v. 35, p. 263-267, 2001.

ADAD, J. M. T. **Controle químico de qualidade**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., 1982, 204p.

ANANTHAKRISHNAN, G.; XIA, X.; ELMAN, C. SINGER, S.; PARIS, H. S.; GAL-ON, A.; GABA, V. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 739-746, 2003.

ANDRIOLO, J. L. **Fisiologia das culturas protegidas**. 1. Ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 1999, 142p.

ANDRADE, L. M. C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulture**, v. 91, p. 39-49, 2001.

BARNES, L. R. *In vitro* propagation of watermelon. **Hortscience**, v. 11, p. 223-227, 1979.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. Ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BISOGNIN, D. A.; MARCHEZAN, E. Avaliação de algumas populações de porongo – *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. – cultivadas na região de Santa Maria, RS. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 18, n. 3-4, p.201-207, 1988.

BISOGNIN, D. A.; IRIGON, D. L.; MARTINAZZO, A. A. Teste de germinação em porongo – *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 159-167, 1991.

BISOGNIN, D. A.; MENEZES, N. L.; BELLÉ, R. A. et al. Efeito do tamanho de fruto e do método de extração na qualidade fisiológica de sementes de porongo. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.27, n.1, p.13-19, 1997.

BISOGNIN, D. A.; STORCK, L. Estimativa dos componentes de variância e herdabilidade para formato do fruto em porongo – *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n.4, p. 593-597, 2000.

BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated cucurbits. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 715-723, 2002.

BISOGNIN, D. A.; SILVA, A. L. L. A cultura do porongo. **Informe Técnico**, ed. pelo Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2004.

BONOW, R. N. **Estabelecimento de métodos de análise para a espécie trevo vesiculoso – *Trifolium vesiculosum* Savi**. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia de Sementes – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Pelotas, RS, 1984. 52 p.

CASALI, V. W. D.; SATURNINO, H. M.; PEDROSA, J. F. Botânica e origem das cucurbitáceas. In: EPAMIG. As cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 8, n. 85, p. 22-23, 1982.

CHEE, P. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash (*Cucurbita pepo* L. cv. YC60). **Plant Cell Reports**, v. 9, p.620-622, 1991.

CHEE, P. P. Initiation and maturation of somatic embryos of squash (*Cucurbita pepo* L.). **HortScience**, v. 27, n.1, p.59-60, 1992.

COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. **Journal of American Society Horticultural Science**, v. 118, n. 1, p. 151-157, 1993.

COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. **HortScience**, v. 29, n. 3, p. 211-213, 1994.

COMPTON, M. E. Interaction between explant size and cultivar affects shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. **HortScience**, v. 35, n. 4, p. 749-750, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa genes versão windows: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001

ESQUINAS-ALCAZAR, J. T.; GULICK, P. J. **Genetic resources of cucurbitaceae**. Rome: IBPGR secretariat, 1983, 101 p.

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

FRANCO, E.T.H.; SILVA, A.L.L.; GESING, J.P.A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. In: **IX CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, 2003, Atibaia. Brazilian Journal of Plant Physiology. 2003. v. 15, p. 208.

GAMBLEY, R. L.; DODD, W.A. An *in vitro* technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, p. 177-183, 1990.

GOEDERT, C. O. Conservação de germoplasma-semente. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1^o, 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) – CAMPUS DO JABOTICABAL, 1988.

GRAY, D. J.; MCCOLLEY, D.W.; COMPTON, M.E. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. **Journal of American Society Horticultural Science**, v. 118, p. 425-432, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.

GUIS, M.; LATCHE, A.; PECH, J. C.; ROUSTAN, J. P. An efficient method for production of diploid cantaloup charentais melon (*Cucumis melo* L. var, cantaloupensis) by somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 64, p. 11-20, 1997.

HANDLEY, L. W.; CHAMBLISS, O. L. *In vitro* propagation of *Cucumis sativus* L. **HortScience**, v. 14, p.22-23, 1979.

JAAGRATI, J; MORE, T. A. *In vitro* regeneration in *Cucumis melo* cv. Pusa madhuras, **Cucurbit Genetics Cooperative Reports**, v. 15, p. 62-64, 1992.

JAIN, J.; MORE, T. A. *In vitro* regeneration in *Cucumis melo* cv. Pusa Madhuras. **Cucurbit Genetics Cooperative Reports**, v. 15, p. 62-64, 1992.

JEFFREY, D. Appendix: An outline classification of Cucurbitaceae. In: Bates, D. M.; ROBINSON, R. W.; JEFFREY, C. **Biology and utilization of the cucurbitaceae**. Ithaca and London: Cornell University, 1990. p. 449-463. 485p.

JURETIC, B., V. KATAVIC, et al. *In vitro* clonal multiplication of *Cucurbita pepo* by single-node culture. **Acta Botanica Croatica**, v.48, p. 27-34, 1989.

KETRING, A. L. Germination inhibitors. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 305-324, 1973.

LELJAK-LEVANI, D.; BAUER, N.; MIHALJEVI, S.; JELASKA, S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 2, 229-238, 2004.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirement in relation to cytokinin in 'normal' and 'mutant' strains of tobacco callus. **Planta**, v. 72, p. 146-154, 1967.

LOU, H.; OBARA-OKEYO, P.; TAMAKI, M. KAKI, S. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants, **Journal of Horticultural Science**, v. 71, n. 3, p. 497-502, 1996.

MARTIN, K. P. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulture**, v. 98, p. 299-304, 2003.

METWALLY, E. I.; MOUSTAFA, S. A. EL-SAWY, B. I.; SHALABY, T. A. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 52, p.171-176, 1998.

MSIKITA, W.; SKIRVIN, R. M.; JUVIK, J. A.; SPLITTSTOESSER, W.E.; ALI, N. Regeneration and flowering *in vitro* of Burples Hybrid cucumber cultured from excised seed. **HortScience**, v. 25, p. 474-477, 1990.

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

NAKAGAWA, H.; SAIJYO, T.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M.; KAKO, S.; ITO, A. Effects of sugar and abscisic acid on somatic embryogenesis from *melon* (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. **Scientia Horticulturae**, v. 90, p. 85-92, 2001.

ORIDATE, T.; ATSUMI, H.; ITO, S.; ARAKI, H. genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 18, p. 313-319, 1992.

PARIS, H. S. Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). **Economical Botany**, v. 43, p. 423-443, 1989.

PINK, D. A. C.; WALKEY, D. G. A. Rapid propagation of *Cucurbita pepo* L. by culture of meristem tips. **Hortscience**, v. 24, p. 107-114, 1984.

PIRINÇ, V.; ONAY, A.; YILDIRIM, H.; ADIYAMAN, F.; ISIKALAN, Ç.; BASARAN, D. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid Diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus* cv. "Sürme"). **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 101-105, 2003.

POMPELLI, M. F. **Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachia* Hassler**. 2002, 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROBINSON, R.W.; MUNGER, H.M.; WHITAKER, T.W.; BOHN, G.W. Genes of Cucurbitaceae. **HortScience**, v.11, n.6, p.554-568, 1976.

SAPOUNTZAKIS, G.; TSAFTARIS, A. S. Micropropagation of the cucumber hybrids 'Brunex' and 'Bambina'. **Cucurbit Genetics Cooperative Reports**, v. 17, p. 50-53, 1994.

SILVA, A. L. L.; ZÁCHIA, R. A.; BISOGNIN, D. A.; BUDKE, J. C. Coleta e caracterização morfológica de populações de porongo - *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. - Cucurbitaceae. **Ciência e Natura**, v. 24: 91-100, 2002.

SILVA, A. L. L.; BISOGNIN, D. A.; RITTER, C. E. L.; BANDINELLI, M. G.; MÜLLER, D. R.; RAMPELOTTO, M. V. Propagação *in vitro* de porongo – *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. – Cucurbitaceae. In: 44 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 25-30., 2004, Campo Grande, MS, **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de olericultura, 2004.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SPETSIDIS, G.; SAPOUNTZAKIS, G.; TSAFTARIS, A. S. Micropropagation of the melon hybrid 'Galia'. **Cucurbit Genetics Cooperative Reports**, v. 19, p. 63-65, 1996.

STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE, S. M. D. S.; RODRIGUEZ, A. P. M. *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 81-89, 2001.

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

TABEI, Y.; KANNO, T.; NISHIO, T. Regeneration of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 225-229, 1991.

THOMAS, T. D.; SREEJESH, K. R. Callus induction and plant regeneration from cotyledonary explants of ash gourd (*Benincasa hispida* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 359-367, 2004.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 386p. (Biomédica: Textos para a universidade).

WANG, C.; JÄRLLFORS, U.; HILDEBRAND, D. F. Regulation and subcellular localization of auxin-induced lipooxygenases. **Plant Science**, v. 148, p. 147-153, 1999.

WANG, S.; TANG, L.; CHEN, F. *In vitro* flowering of bitter melon. **Plant Cell Reports**, v. 20, p.393-397, 2001.