

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

Charlene Moro Stefanel

**ASPECTOS DA QUALIDADE DE SEMENTES E DO  
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DE  
CANDOLLE**

Santa Maria, RS  
2016

**Charlene Moro Stefanel**

**ASPECTOS DA QUALIDADE DE SEMENTES E DO ESTABELECIMENTO *IN*  
VITRO DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE**

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

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

Santa Maria, RS  
2016

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

STEFANEL, CHARLENE MORO  
ASPECTOS DA QUALIDADE DE SEMENTES E DO  
ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Eugenia involucrata* DE  
CANDOLLE / CHARLENE MORO STEFANEL.-2016.  
101 f.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger  
Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2016

1. Cerejeira-do-mato 2. Myrtaceae 3. Biotecnologia  
florestal I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II. Muniz,  
Marlove Fátima Brião III. Título.

---

©2016

Todos os direitos autorais reservados a Charlene Moro Stefanel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por do autor.

Endereço eletrônico: [charlenestefanel@yahoo.com.br](mailto:charlenestefanel@yahoo.com.br)

---

**Charlene Moro Stefanel**

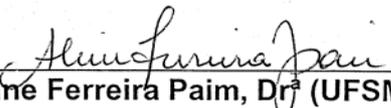
**ASPECTOS DA QUALIDADE DE SEMENTES E DO ESTABELECIMENTO *IN*  
VITRO DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE**

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

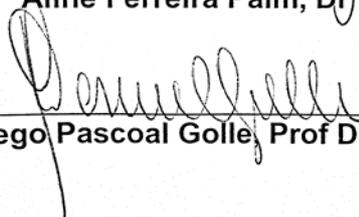
**Aprovado em 19 de fevereiro de 2016:**



**Lia Rejane Silveira Reiniger, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



**Aliné Ferreira Paim, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



**Diego Pascoal Golle, Prof Dr (UNICRUZ)**

Santa Maria, RS  
2016

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

(ANA JÁCOMO)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas, pela proteção e por me dar forças para concluir esse trabalho.

Aos meus pais, Anilze 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 este sonho. Só me resta dizer, obrigada!

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

Ao Jardel, por todo apoio, carinho, ajuda e companheirismo.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela oportunidade, confiança, ensino e dedicação para que fosse possível a conquista de mais esta etapa da minha vida. Muito obrigada!

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

À CAPES pela concessão da bolsa.

Às minhas colegas e amigas Silvia, Karol e Aline obrigada pela amizade, ensinamentos, pela ajuda nos experimentos, pela paciência, risadas e, principalmente, por todos os momentos bons que passamos juntas.

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

Aos meus amigos e colegas de laboratório, muito obrigada pela ajuda, conversas e amizade.

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

Muito obrigada!

## RESUMO

### ASPECTOS DA QUALIDADE DE SEMENTES E DO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE

AUTORA: CHARLENE MORO STEFANEL  
ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

*Eugenia involucrata* DC. é uma espécie florestal nativa do Brasil, além de outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai, apresentando importância econômica, silvicultural e ecológica. A espécie possui frutos comestíveis sendo muito utilizados na culinária e apresenta propriedades medicinais. Suas sementes são recalcitrantes, perdendo a viabilidade e o poder germinativo após a coleta dos frutos, não suportando, assim, longos períodos de armazenamento. Por conta disso, são necessários estudos que permitam conhecer as características da espécie, visando a produção de mudas de qualidade. Desta maneira, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar metodologias que possam contribuir para a propagação vegetativa de *Eugenia involucrata*. Foram avaliados aspectos da qualidade sanitária, física e fisiológica de dois lotes de sementes, além de diferentes agentes desinfestantes para a germinação asséptica *in vitro* de sementes e diferentes substratos, visando à germinação *ex vitro* da espécie. Para o estabelecimento *in vitro*, segmentos nodais de *Eugenia involucrata* foram expostos a diferentes agentes desinfestantes, visando o controle da contaminação microbiana. Além disso, foram testados, também, diferentes valores de pH, sacarose e ágar. Os resultados obtidos indicaram que as sementes de *Eugenia involucrata* apresentam variações quanto aos aspectos biométricos, alto grau de umidade e associação com fungos. O substrato papel filtro não se mostrou eficiente para a germinação das sementes de ambos os lotes avaliados. Os substratos vermiculita e areia:vermiculita na proporção 1:1, proporcionaram as maiores médias de plântulas emergidas. No entanto, as plântulas não se desenvolveram de maneira adequada quando a vermiculita estava disposta sobre as sementes, sugerindo estudos adicionais a esse respeito. Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, os agentes desinfestantes testados diminuíram significativamente a contaminação fúngica nos explantes, recomendando-se a utilização dos agentes desinfestantes  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  a 3,0% (v/v) combinado a  $\text{NaClO}$  a 2,0% (v/v), entretanto, essas concentrações não controlaram de maneira satisfatória a contaminação bacteriana. O pH ajustado para 6,0 mostrou-se mais eficiente ao estabelecimento *in vitro* dos explantes. Pode-se utilizar  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $4\text{g L}^{-1}$  de ágar durante a fase de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

**Palavras-chave:** Cerejeira-do-mato. Myrtaceae. Biotecnologia florestal.

## ABSTRACT

### ASPECTS OF SEED QUALITY AND THE ESTABLISHMENT *IN VITRO* OF *Eugenia involucrata* de Candolle

AUTHOR: CHARLENE MORO STEFANEL  
ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

*Eugenia involucrata* DC. is a native forest species in Brazil, and other countries in South America such as Argentina, Uruguay and Paraguay, with important economic, ecological and silvicultural. The species has edible fruit is widely used in cookery and has medicinal properties. Its seeds are recalcitrant, losing the viability and germination after collecting fruit, not supporting, thus avoiding long periods of storage. Because of this, we need studies to know the characteristics of the species, aiming at the production of quality seedlings. Thus, the overall objective of this study was to evaluate methodologies that can contribute to the propagation of *Eugenia involucrata*. They were evaluated the health quality, physical and physiological two lots of seeds, and different agents disinfectants for aseptic *in vitro* germination of seeds and different substrates, in order to *ex vitro* germination of the species. For *in vitro* establishment of nodal segments *Eugenia involucrata* were exposed to different disinfectants agents for the control of microbial contamination. Moreover, they also tested different pH values, sucrose and agar. The results indicated that *Eugenia involucrata* seeds present variations regarding the biometric features, high humidity and association with fungi. The filter paper substrate was not efficient for the germination of seeds of both lots evaluated. The vermiculite and grit:vermiculite in the ratio 1:1, gave the highest average of emerged seedlings. However, the seedlings did not develop appropriately if the vermiculite was disposed on the seeds, suggesting additional studies in this regard. For the *in vitro* establishment of nodal segments, tested disinfectants agents significantly decreased the fungal contamination in the explants, recommending the use of disinfectants agents  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  3,0% (v/v) combined with  $\text{NaClO}$  2,0% (v/v), however, these concentrations have not managed satisfactorily bacterial contamination. The pH was adjusted to 6,0 proved most efficient establishment of the explants *in vitro*. One can use  $10\text{g L}^{-1}$  sucrose and  $4\text{g L}^{-1}$  agar for the *in vitro* establishment phase nodal segments of *Eugenia involucrata*.

**Keywords:** Cherry. Myrtaceae. Forest Biotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Representação dos locais de ocorrência de <i>Eugenia involucrata</i> DC. no Brasil. ....	15
Figura 2 – Aspectos silviculturais de <i>Eugenia involucrata</i> DC.: a – Árvore matriz; b – Folhas e flores; c – Frutos e sementes; e d – Casca e madeira.....	17
Figura 3 - Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento, largura e espessura de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 1. ....	44
Figura 4 - Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento, largura e espessura de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 2. ....	46
Figura 5 - Emissão de radícula (%) observada em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) germinadas em papel filtro, provenientes de dois lotes diferentes. ....	51
Figura 6 – Sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), aos 42 dias de cultivo, provenientes do lote 2 e germinadas em caixas gerbox contendo papel filtro. ....	52
Figura 7 - Emissão da parte aérea (%) observada em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), provenientes de dois lotes diferentes, germinadas em papel filtro em função do período de avaliação em dias. ....	54
Figura 8 - Contaminação fúngica (%) observada em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), provenientes de dois lotes diferentes, germinadas em papel filtro. ....	55
Figura 9 - Contaminação fúngica (%) observada em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) após os tratamentos de desinfestação superficial durante 20min de agitação, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . ....	56
Figura 10 - Contaminação bacteriana (%) observada em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), após os tratamentos de desinfestação superficial durante 20min de agitação, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . ....	58
Figura 11 - Desenvolvimento de plântulas de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), a partir de sementes provenientes do lote 2, após 100 dias da semeadura. a - Plântulas emergidas em substrato areia, b – Plântulas emergidas em substrato vermiculita. ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento, largura e espessura (mm) de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 1. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.....	43
Tabela 2 - Comprimento, largura e espessura (mm) de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 2.....	45
Tabela 3 - Incidência dos gêneros fúngicos (%) identificados em dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), avaliados aos sete dias. ....	48
Tabela 4 - Contaminação bacteriana (%), emissão de radícula (%) e emissão de parte aérea (%), observadas em sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) independentemente do tratamento de desinfestação superficial com hipoclorito de cálcio ou hipoclorito de sódio (a 0%, 1,5%, 2,5% ou 3,5%) durante 20min de agitação, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . ....	59
Tabela 5 – Médias de emergência de plântulas (%) de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) semeadas em substrato areia e/ou vermiculita, após 100 dias. ....	60
Tabela 6 – Índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) após a semeadura em substrato areia e/ou vermiculita, após 100 dias da semeadura.....	64
Tabela 7 – Sobrevivência (%) e estabelecimento (%) <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo ½MS, em função da imersão sucessiva, por 15 min, em soluções desinfestantes de diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio [Ca(ClO) <sub>2</sub> ] e hipoclorito de sódio (NaClO). ....	75
Tabela 8 – Contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%) de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo ½MS, em função da imersão sucessiva, por 15 min, em soluções desinfestantes de diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio [Ca(ClO) <sub>2</sub> ] e hipoclorito de sódio (NaClO). ....	76
Tabela 9 – Sobrevivência (%), estabelecimento (%) e contaminação fúngica (%) em segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato), após a inoculação em diferentes valores de pH em meio ½MS. ....	78
Tabela 10 – Sobrevivência (%), estabelecimento (%) e contaminação fúngica (%), de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Cerejeira-do-mato) após a inoculação em diferentes concentrações de sacarose em meio ½MS, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . ....	81

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Eugenia involucrata</i> DC. (MYRTACEAE) .....	15
2.2 QUALIDADE DE SEMENTES .....	18
<b>2.2.1 Qualidade sanitária</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.2 Qualidade física</b> .....	<b>20</b>
2.2.2.1 <i>Teste do teor de umidade</i> .....	20
2.2.2.2 <i>Biometria</i> .....	20
2.2.2.3 <i>Peso de mil sementes</i> .....	21
<b>2.2.3 Qualidade fisiológica de sementes</b> .....	<b>21</b>
2.3 INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES .....	22
2.4 BIOTECNOLOGIA VEGETAL: CULTURA DE TECIDOS .....	23
<b>2.4.1 Micropropagação</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.2 Contaminações microbianas</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4.3 Meios nutritivos para o cultivo <i>in vitro</i></b> .....	<b>27</b>
2.4.3.1 <i>Ágar</i> .....	28
2.4.3.2 <i>Sacarose</i> .....	29
2.4.3.3 <i>pH do meio nutritivo</i> .....	29
<b>3 CAPÍTULO I</b> .....	<b>31</b>
<b>SEMENTES DE <i>Eugenia involucrata</i> De Candolle</b> .....	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	32
<b>3.3.1 Obtenção de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	<b>32</b>
3.3.1.1 <i>Determinação do grau de umidade de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	33
3.3.1.2 <i>Determinação do peso de mil sementes de dois lotes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	34
3.3.1.3 <i>Aspecto biométrico de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	34
3.3.1.4 <i>Qualidade sanitária de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	34
<b>3.3.5 Germinação de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3.6 Desinfestação superficial de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3.7 Emergência de plântulas de <i>Eugenia involucrata</i> DC. provenientes de dois lotes de sementes em diferentes substratos</b> .....	<b>38</b>
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	40
3.4.1 <i>Determinação do grau de umidade de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	40
3.4.2 <i>Determinação do peso de mil sementes de dois lotes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	41
3.4.3 <i>Aspecto biométrico de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	42
3.4.4 <i>Qualidade sanitária de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	47
3.4.5 <i>Germinação de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	51
3.4.6 <i>Desinfestação superficial de dois lotes de sementes de <i>Eugenia involucrata</i> DC.</i> .....	55

3.4.7 Emergência de plântulas de <i>Eugenia involucrata</i> DC. provenientes de dois lotes de sementes em diferentes substratos .....	59
3.5 CONCLUSÕES .....	64
<b>4 CAPÍTULO II .....</b>	<b>67</b>
<b>ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES DE <i>Eugenia involucrata</i> De Candolle .....</b>	<b>67</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	67
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	67
4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
4.3.1 Efeito de $[Ca(ClO)_2]$ e de NaClO na desinfestação superficial de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	68
4.3.2 Efeito de diferentes valores de pH no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	69
4.3.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	71
4.3.4 Efeito de diferentes concentrações de ágar no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	72
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	73
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.5.1 Efeito do $[Ca(ClO)_2]$ e NaClO na desinfestação superficial de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	74
4.5.2 Efeito de diferentes valores de pH no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	77
4.5.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	80
4.5.4 Efeito de diferentes concentrações de ágar no desenvolvimento de segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC. ....	82
4.6 CONCLUSÕES .....	83
<b>CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, contendo a maior riqueza de espécies da flora e as maiores áreas de ecossistemas tropicais. No entanto, esta riqueza e o potencial dessas espécies têm sido pouco explorados (LEITE; CORADIN, 2011), como é o caso da família Myrtaceae. Nesta família estão incluídos cerca de 140 gêneros e mais de 3.000 espécies, sendo a América tropical e Austrália os principais centros de dispersão (JOLY, 1993; RIBEIRO, 1999; SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2005). As espécies dessa família possuem inúmeros atributos, uma vez que podem ser utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, por apresentarem frutos amplamente consumidos pela avifauna, auxiliando na dispersão das sementes (LORENZI, 2002), além de apresentarem propriedades antirreumática, diurética, antidiarreica e digestiva, contribuindo para a saúde humana (ROCHA, 2011).

*Eugenia involucrata* DC. pertence à família Myrtaceae. Conhecida popularmente como Cerejeira-do-mato, é de ocorrência natural no Estado do Rio Grande do Sul e em vários Estados brasileiros, além de outros países da América do Sul. Dentre as finalidades da espécie, destaca-se a utilização da sua madeira na construção civil e para produção de ferramentas agrícolas, bem como para produção de lenha e carvão (SANCHOTENE, 1989; MARCUZZO, 1998; BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 2008; CARVALHO, 2008). A espécie necessita de estudos visando o melhoramento genético e o manejo da cultura, uma vez que apresenta elevado potencial econômico e ambiental, apesar de sua difícil propagação seminal, pois suas sementes são consideradas recalcitrantes (DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007).

O melhoramento genético de plantas, aliado às técnicas de biotecnologia, como a cultura de tecidos, tem sido muito utilizado no desenvolvimento de pesquisas com espécies florestais nativas (WATANABE; RAMAN, 1997). Desse modo, a cultura de tecidos constitui-se em uma ferramenta de grande impacto fornecendo alternativas e até mesmo soluções únicas em determinadas situações, como por exemplo, problemas relacionados à propagação por meio de sementes. Fato que já foi verificado para *Eugenia involucrata*, a qual possui sementes que perdem sua viabilidade em poucas semanas após o armazenamento, em consequência do alto teor de umidade que possuem (CARVALHO, 2008).

Assim, devido aos aspectos já mencionados, surge a necessidade de se desenvolver protocolos alternativos de multiplicação para a espécie. Dessa maneira, a cultura de tecidos emerge como uma possibilidade real para obtenção de mudas de qualidade e com melhor padrão fitossanitário (PAIVA et al., 2002).

Embora alguns estudos com a espécie já tenham sido realizados pelo nosso Grupo de Pesquisa (GOLLE, 2010; PAIM, 2011; GOLLE et al., 2012; GOLLE et al., 2013), ainda são escassas as pesquisas relacionadas ao melhoramento genético e à produção de mudas de qualidade para *Eugenia involucrata*. Em decorrência disso, devem ser realizados estudos complementares visando otimizar os resultados já obtidos para, posteriormente, tentar estabelecer um protocolo de micropropagação.

Diante do exposto, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos, a saber:

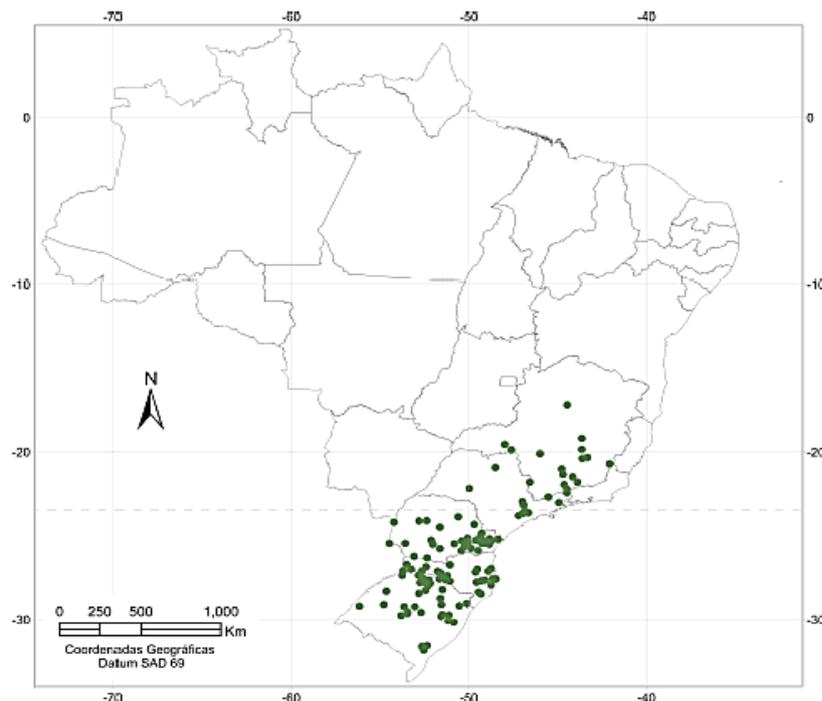
- no capítulo I, foram avaliadas a qualidade fisiológica, física e sanitária de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* e a emergência de plântulas em diferentes substratos;
- no capítulo II, foram testados métodos para a obtenção de cultivos assépticos, bem como a influência de diferentes valores de pH e diferentes concentrações de sacarose e ágar no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE)

*Eugenia involucrata* De Candolle é conhecida popularmente como Cerejeira-do-mato, Cerejeira-do-rio-grande, Cerejeira-da-terra, Pitanga-preta, Araçazeiro ou Cerejeira. A espécie ocorre naturalmente no Brasil, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, nas altitudes de 30m a 1700m acima do nível do mar (CARVALHO, 2008). No Rio Grande do Sul, é uma espécie comumente encontrada na Floresta Estacional Semi-decidual do Planalto e do Alto Uruguai, na Depressão Central e na Floresta Ombrófila Densa do litoral do estado (REITZ; KLEIN; REIS; 1988; BACKES; IRGANG, 2002; SOBRAL, 2003). Também há registros da espécie nas encostas meridional da Serra Geral, Serra do Sudeste, Floresta Pluvial da Mata Atlântica e na bacia do Rio Ibicuí (SOBRAL et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1– Representação dos locais de ocorrência de *Eugenia involucrata* DC. no Brasil.



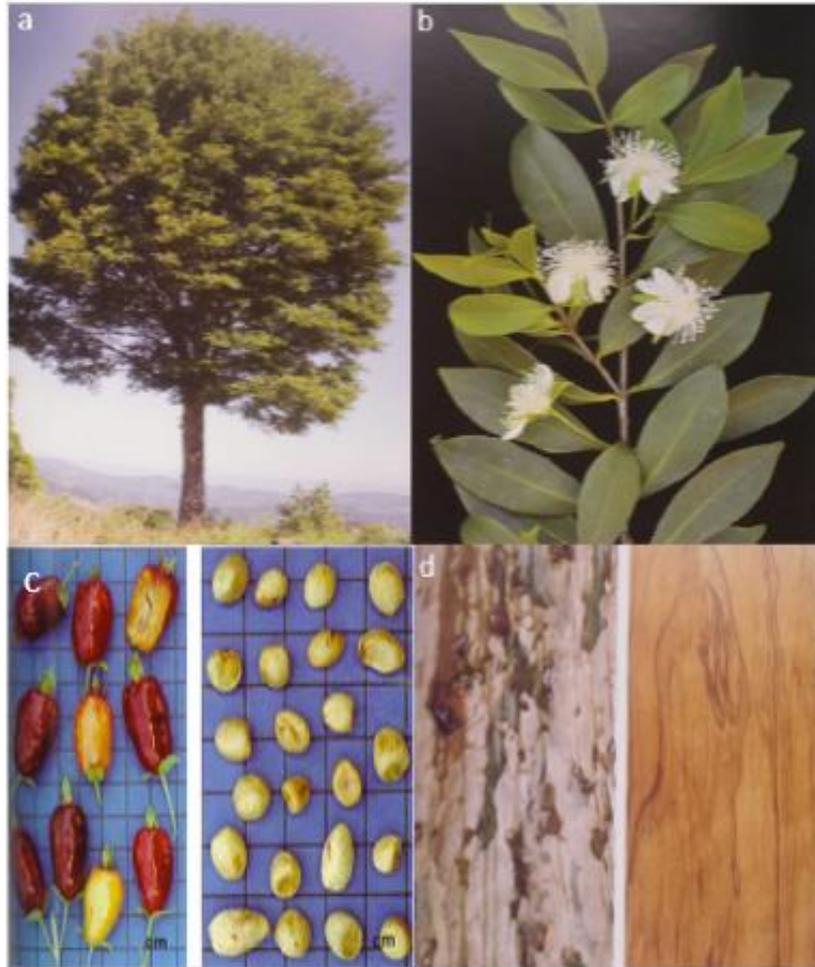
Fonte: Adaptação de Carvalho (2008).

Em regiões altas do norte do Rio Grande do Sul e Planalto de Santa Catarina, esta espécie suporta temperaturas abaixo de zero, porém, quando cultivada em lugares frios, demora mais a frutificar (MATTOS, 1985). Sua dispersão ocorre, também, em outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2008).

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), adapta-se bem aos solos graníticos até os eruptivos, sedimentares e os aluvionais. A espécie tolera solos argilosos, mas prefere os férteis, profundos, de textura média e boa umidade (MATTOS, 1985).

*Eugenia involucrata* pode ser encontrada na mata com altura entre 10 a 15m, podendo alcançar até 20m. Seu crescimento é simpodial, a copa é arredondada, tronco ereto e relativamente cilíndrico, com 30 a 40cm de diâmetro (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 2008). Sua madeira é de cor branco-pardacenta, de 900 a 940Kg m<sup>-3</sup> de densidade (BACKES; IRGANG, 2002), moderadamente pesada, compacta, elástica, resistente e de boa durabilidade. Pode ser empregada na construção civil, para confecção de cabos de machado, ripas, ferramentas agrícolas, e, também, para produção de lenha e carvão de excelente qualidade (SANCHOTENE, 1989; MARCUZZO, 1998; BACKES; IRGANG, 2002; LORENZI, 2008; CARVALHO, 2008) (Figura 2).

Figura 2 – Aspectos silviculturais de *Eugenia involucrata* DC.: a – Árvore matriz; b – Folhas e flores; c – Frutos e sementes; e d – Casca e madeira.



Fonte: Adaptação de Lorenzi (2008).

No que diz respeito à reprodução, *Eugenia involucrata* é considerada predominantemente autógama e só atinge a idade reprodutiva entre 6 e 7 anos de idade (CARVALHO, 2008). As flores ocorrem isoladas ou em grupos de duas a quatro, nas axilas foliares (FRANZON, 2004), apresenta quatro pétalas brancas, de 60 a 100 estames (DEGENHARDT et al., 2007). Os frutos são classificados como drupa piriforme, glabra e brilhante, de tamanhos variáveis, amadurecendo rapidamente e assumindo uma cor vermelha-roxeada quando se inicia a maturação, chegando de vinácea-escura a negra. O tamanho da drupa varia entre 13x15 a 19x13mm (SANCHOTENE, 1989; LONGHI, 1995; BACKES; IRGANG, 2002; SOBRAL, 2003; LORENZI et al., 2006; CARVALHO, 2008).

No que se refere às sementes de *Eugenia involucrata*, são classificadas como recalcitrantes, o que pode comprometer sua propagação (CARVALHO, 2008). Sementes recalcitrantes apresentam elevado teor de água na maturidade fisiológica e são, aparentemente, incapazes de desenvolver mecanismos de proteção à desidratação e aos processos metabólicos dela decorrentes (PAMMENTER; BERJAK, 2000). Sementes dessa classe fisiológica, quando maduras, não sobrevivem se atingirem o equilíbrio higroscópico em, aproximadamente, 90% de umidade relativa do ar (BLACK; PRITCHARD, 2002). Considerando a longevidade relativamente pequena de sementes classificadas como recalcitrantes, variando de poucos dias a poucos meses, dependendo da espécie, essas sementes, também, podem ser consideradas microbióticas ou de vida curta (FONSECA; FREIRE, 2003). Conforme estudos já realizados, a estimativa é que, após duas semanas o potencial germinativo dessas sementes já sofrem reduções significativas (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008). Adicionalmente, conforme relatos, as sementes que caem das árvores não germinam ao redor da planta mãe (REITZ et al., 1988).

## 2.2 QUALIDADE DE SEMENTES

A qualidade de sementes é constituída por vários aspectos, dentre os quais àqueles relacionados à sanidade, aos atributos físicos, à fisiologia e à genética (CHEROBINI, 2006). A qualidade sanitária das sementes é uma característica que deve ser avaliada, uma vez que a associação de patógenos às sementes pode implicar na redução do rendimento e comprometimento da qualidade das mudas (MACHADO, 1988). A análise da qualidade física e fisiológica tem por objetivo fornecer informações prévias a respeito da sementeira e do armazenamento das sementes (FIGLIOLIA et al., 2007). O estudo das relações genéticas para os caracteres relacionados à qualidade fisiológica, visa dar suporte a estratégias de seleção para melhoria da qualidade fisiológica de sementes (CARDOSO et al, 2009).

A avaliação da qualidade de um lote de sementes é, também, de grande importância para se obter resultados satisfatórios na produção de mudas, permitindo o estabelecimento de uma população de plantas adaptadas às condições de campo (OLIVEIRA, 2012). A metodologia para essas análises é baseada nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), porém, as recomendações são limitadas, quase em sua totalidade, às espécies agrícolas. Menos de 0,1% da RAS

estava voltada para espécies florestais nativas em 1980 (OLIVEIRA; PIÑA-RODRIGUES; FIGLIOLIA, 1989), por isso, muitas vezes, a metodologia deve ser adaptada para essas espécies. Entretanto, atualmente, a RAS tem incluído Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (BRASIL, 2013).

### **2.2.1 Qualidade sanitária**

A avaliação da qualidade sanitária baseia-se na análise das sementes para detecção de pragas que possam estar associadas. A sanidade destes propágulos refere-se à presença ou ausência de agentes patogênicos, como fungos, bactérias, vírus, nematoides e insetos. Informações sobre o estado sanitário de uma amostra de sementes e, conseqüentemente, do lote que representa, podem ser usadas para diferentes finalidades, tais como comparar a qualidade de diferentes lotes de sementes ou determinar a sua utilização comercial (BRASIL, 2009).

Entretanto, na avaliação da sanidade é dada ênfase especial à associação com fungos. A importância da identificação de fungos em sementes é decorrente da fácil disseminação desses micro-organismos, que podem ser introduzidos em novas áreas, podendo infectar a planta em desenvolvimento após a semeadura, causando doenças já na fase inicial da cultura (CHEROBINI, 2006). Adicionalmente, o estudo da associação de fungos em espécies florestais pode fornecer subsídios para a elaboração de modelos epidemiológicos, que incluem desde o armazenamento das sementes até a produção de mudas (SANTOS et al., 2001).

Os fungos presentes nas sementes armazenadas são, basicamente, divididos em dois grupos: de campo e de armazenamento. Os fungos de campo invadem as sementes ainda no campo, e requerem uma umidade relativa em torno de 90 a 95% para sobreviver. O tempo de sobrevivência desses fungos está diretamente relacionado às condições ambientais de armazenamento das sementes (LAL; KAPOOR, 1979; BERJAK, 1987; MERONUCK, 1987).

Já os fungos de armazenamento encontram-se, geralmente, em porcentagens muito baixas em sementes recém-colhidas. São capazes de sobreviver em ambientes com baixa umidade, proliferando-se em sucessão aos fungos de campo e podendo causar a deterioração das sementes (BERJAK, 1987; WETZEL, 1987; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Na literatura, várias espécies de fungos já foram encontradas associadas às sementes florestais (MITTAR, 1986), dentre os gêneros

mais comumente relatados estão: *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. (CARVALHO; MUCHOVEJ, 1991; BOOTH, 1971).

## **2.2.2 Qualidade física**

A qualidade física das sementes pode ser avaliada, entre outros, pelo teste do teor de umidade, pela biometria e peso de mil sementes (BRASIL, 2009), a seguir descritos.

### *2.2.2.1 Teste do teor de umidade*

O teste do teor de umidade em sementes é de fundamental importância após a maturação fisiológica, seja na colheita, secagem, armazenamento ou comercialização. Na colheita, a importância se dá para evitar o armazenamento prolongado a campo onde as sementes ficam expostas a condições climáticas geralmente adversas, bem como ao ataque de insetos, roedores e micro-organismos. Na secagem, para determinar a umidade inicial e final do produto, podendo-se estimar, com isto, o tempo de secagem das sementes. No armazenamento, para determinar a umidade de conservação da semente, a qual varia em função da espécie e do período de armazenamento. E, por fim, na comercialização, pois o valor do lote está em função da umidade, desta forma, erros na determinação da umidade irão acarretar prejuízos econômicos (DA LUZ et al., 1993).

Neste teste, é extraído ao máximo o líquido contido nas sementes, pela aplicação do calor em condições controladas, utilizando-se, nesse caso, uma estufa. Assim, é reduzida a oxidação, a decomposição e a perda de substâncias voláteis (BRASIL, 2009).

### *2.2.2.2 Biometria*

O tamanho das sementes é de grande importância para o estudo de uma espécie, sendo um parâmetro básico para entender a dispersão e o estabelecimento de plântulas (FENNER, 1993). Também, é utilizado para diferenciar espécies

pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais (BASKIN e BASKIN, 1998). Durante a maturação, as sementes crescem em tamanho até atingirem o valor característico para a espécie (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Aspectos relativos à biometria das sementes, incluindo-se o peso de mil sementes, contribuem para um melhor conhecimento dos processos produtivos das espécies. Além disso, características relacionadas às sementes são informações seguras para a identificação de família, gênero e, até mesmo, da espécie (OLIVEIRA, 2012).

#### *2.2.2.3 Peso de mil sementes*

O peso de mil sementes é utilizado para calcular a densidade de semeadura e o peso da amostra de trabalho para a realização da análise de pureza. É um dado que está diretamente relacionado com o estado de maturidade e sanidade das sementes, além de ser fortemente influenciado pelo teor de água presente na semente (BRASIL, 2009).

É uma medida que apresenta forte controle genético, mas também é afetado pelas condições de temperatura, de luminosidade e de umidade durante a fase de maturação das sementes. Por meio do teste, é possível o controle de qualidade para avaliação de lotes (BRUNING et al., 2011). O peso de mil sementes é influenciado de maneira significativa, pelo grau de umidade (BRASIL, 2009).

#### **2.2.3 Qualidade fisiológica de sementes**

A análise da qualidade fisiológica das sementes constitui-se na observação de características como germinação, vigor e longevidade, os quais indicam a capacidade da semente em desempenhar funções vitais (FIGLIOLIA, 1995; OLIVEIRA, 2012), onde são avaliados pelo teste de germinação, primeira contagem, teste frio, envelhecimento acelerado, entre outros. A semente atinge a máxima qualidade fisiológica quando consegue atingir o ponto máximo de poder germinativo e vigor, sendo este considerado o ponto de maturidade fisiológica. Assim, a germinação e a emergência das plântulas são consideradas respostas da qualidade fisiológica da semente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

É comum as sementes de um lote apresentarem variações no que diz respeito à qualidade fisiológica. Em função da existência de maior variação entre as sementes, lotes com menor vigor, geralmente, apresentam maior desuniformidade e menor velocidade na emergência das plântulas (SILVA et al, 2013). O baixo vigor das sementes aumenta o tempo médio necessário para a protrusão das radículas e reduz o número médio de radículas emitidas por dia. A maior velocidade na emergência e a produção de plântulas com maior tamanho proporciona às plantas provenientes das sementes vigorosas, vantagens no aproveitamento de água, luz e nutrientes (SCHUCH et al., 1999).

De maneira geral, a análise de sementes é fundamental para fornecer parâmetros que possam indicar a qualidade física e fisiológica de lotes de sementes, para fins de semeadura e armazenamento (FIGLIOLIA et al., 1993). As vantagens do uso de sementes com elevado potencial fisiológico incluem germinação rápida e com maior uniformidade, obtenção de plântulas mais tolerantes às adversidades ambientais e maturidade mais uniforme da cultura, o que resulta em aumento na produtividade (BENNETT, 2001).

As espécies florestais de biomas brasileiros não estão incluídas nas Regras para Análise de Sementes, por não terem sido desenvolvidos testes padronizados. Dentre os aspectos a serem estudados no que diz respeito a testes padrão de germinação, por exemplo, está incluído o tipo de substrato mais adequado, tema abordado a seguir.

### 2.3 INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

O conhecimento das condições ótimas para a germinação de sementes, principalmente a influência do substrato, é de fundamental importância, pois isso é variável entre as sementes de diferentes espécies (ALBUQUERQUE et al., 1998). A qualidade dos substratos utilizados é um fator relevante para o bom desenvolvimento das mudas, influenciando na germinação das sementes e no seu crescimento, favorecendo, assim, sua produção em curto período de tempo e a custos mais reduzidos (DUTRA et al., 2012). Além disso, a arquitetura do sistema radicular e o estado nutricional das plantas também são influenciados pelo substrato empregado (VALE et al., 2004). Dentre os substratos mais utilizados, em particular nas espécies florestais (PIÑA-RODRIGUES; VIEIRA, 1988; PIÑA-RODRIGUES;

FIGLIOLIA; PEIXOTO, 2004), destaca-se a vermiculita, que possui a capacidade de absorver até cinco vezes o próprio volume em água, além de conter teores de K (Potássio) e Mg (Magnésio) disponíveis (FILGUEIRA, 2000).

Substratos como areia e solo também são muito utilizados para a germinação de sementes (BRASIL, 1992). A areia deve ser uniforme e isenta de partículas muito pequenas ou muito grandes. É recomendada a padronização do tamanho, de modo que a maioria das partículas passe através de uma peneira de orifícios de 0,8mm de malha e fique retida sobre outra de orifício de 0,05mm. A areia deve estar livre de sementes, fungos, bactérias ou substâncias tóxicas, que possam interferir na germinação das sementes em teste, no crescimento e na avaliação das plântulas (BRASIL, 2009).

Um bom substrato deve apresentar nutrientes essenciais, boa textura, capacidade de retenção de água, porosidade e pH adequados, e ausência de patógenos e plantas daninhas, além de ser de fácil aquisição e transporte (SMIDERLE; MINAMI, 2001). Deve apresentar baixa densidade, composições químicas e físicas equilibradas, boa coesão entre as partículas e aderência adequada às raízes, fato importante para o transplante das mudas (RAMOS et al., 2002). Assim, o estudo dos substratos para a propagação de espécies florestais por meio de sementes é extremamente importante para a identificação daquele que possa proporcionar melhores emergência e desenvolvimento inicial de plântulas (NOGUEIRA et al., 2012).

## 2.4 BIOTECNOLOGIA VEGETAL: CULTURA DE TECIDOS

A biotecnologia está dividida em três principais grupos quanto à sua aplicação em espécies florestais: cultura de tecidos, marcadores moleculares e transformação genética. A cultura de tecidos está ancorada na teoria da totipotência celular, a qual define a capacidade que a célula vegetal já diferenciada possui de voltar ao seu estado meristemático e, após, redefinir seu padrão de diferenciação (TERMIGNONI, 2005).

A cultura de tecidos de plantas é um termo que exprime o conceito de que uma ampla gama de tipos de tecidos da planta podem ser cultivados, sob condições assépticas, visando micropropagação, melhoramento, conservação ou limpeza clonal. As técnicas de cultura de tecidos vêm sendo utilizadas de diferentes formas

para o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas (GOLLE et al., 2009), sendo a micropropagação considerada sua aplicação mais prática e, igualmente, àquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). No setor florestal, em particular, a micropropagação está entre as técnicas da biotecnologia vegetal com maior interesse científico e econômico, sendo a mais difundida e com aplicações comprovadas (XAVIER et al., 2007). A micropropagação é um termo usado exclusivamente para referir-se à propagação *in vitro* a partir de alguma parte específica da planta, denominada explante, baseada na capacidade morfogênica e totipotencial das células (VASIL; HILDEBRANDT, 1965).

A propagação *in vitro* de plantas é o método mais indicado para a produção massal de genótipos superiores na cultura de tecidos. Possui a vantagem de produzir em grande escala uma série de clones com características conhecidas, dispondo de um espaço menor e otimizando a escala produtiva. Essa forma de propagação surge como uma possibilidade real para obtenção de mudas mais vigorosas e com melhor padrão fitossanitário (PAIVA et al., 2002).

#### **2.4.1 Micropropagação**

A micropropagação envolve o desenvolvimento *in vitro* de brotos a partir de diversos tipos de explantes (como fragmentos foliares, segmentos nodais e apicais de ramos), em condições controladas de cultivo. Nesta técnica, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas podendo, assim, regenerar e formar novas plantas (REIS et al., 2008).

Por meio da micropropagação, fragmentos de tecidos vegetais vivos, os explantes, são retirados de plantas de interesse e cultivados em meio nutritivo de composição, em geral, definida. Estes fragmentos podem ser compostos por células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI et al., 2001). Os explantes utilizados podem ser provenientes de várias partes da planta, sendo que o explante mais adequado deve ser determinado para cada espécie. Além disso, dificilmente se obtém sucesso a partir de tecidos senis, uma vez que o potencial de regeneração diminui com a idade do explante (TORRES et al., 1998).

Através da propagação *in vitro*, podem ser desenvolvidas, em um ano, milhares de plantas clonais a partir de uma pequena porção de tecido vegetal, possibilitando, também, o intercâmbio de material vegetal sem problemas

fitossanitários. Além disso, permite que esse material seja multiplicado em qualquer época do ano (WANG; HU, 1984). Normalmente, a técnica é utilizada para espécies de difícil propagação por outras vias ou para fixar genótipos de interesse (CANHOTO, 2010). Esta técnica, também, oferece potencial para a rápida multiplicação de linhagens elite em larga escala. Para espécies arbóreas, o uso dessa tecnologia é essencial frente aos longos períodos necessários à multiplicação e à maturação das plantas (JAIN, 1997).

A propagação vegetativa *in vitro* pode ser operacionalizada em uma sequência laboratorial de três estágios, cada qual apresentando objetivos, pressuposições e necessidades específicas em termos de composição dos meios nutritivos, tipo e balanço dos fitorreguladores e condições físicas como luz, temperatura e fotoperíodo. No ambiente laboratorial, cada estágio deve ser identificado e as condições ótimas devem ser estabelecidas (MURASHIGE, 1974; DEBERGH; READ, 1991).

Nos esquemas-padrão da micropropagação, os estágios de desenvolvimento da cultura são constituídos de algumas fases, que incluem desde a seleção do explante e obtenção de uma cultura livre de contaminantes, até a multiplicação dos propágulos vegetativos, enraizamento e aclimatização das mudas produzidas *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Assim, pode-se dividir a micropropagação nas seguintes fases, conforme sugerido por Torres et al. (1998):

*Fase 0:* tratos culturais às plantas matrizes fonte de explantes;

*Fase I:* seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes;

*Fase II:* multiplicação de propágulos, mediante sucessivas subculturas. Nesta fase, pode-se adicionar uma fase de alongamento, visando a obtenção de propágulos alongados mais adequados para serem levados à fase de enraizamento;

*Fase III:* enraizamento das brotações desenvolvidas na fase anterior;

*Fase IV:* aclimatização das plantas obtidas na condição *in vitro* para a condição *ex vitro*.

Dessa maneira, mesmo sendo uma prática onerosa em termos de mão-de-obra, de laboratório e de equipamentos, a micropropagação oferece uma melhor relação custo-benefício, pois permite produzir um material uniforme e selecionado, bem como realizar pesquisas de apoio às diferentes áreas como a genética, a fitopatologia e a fisiologia vegetal, tornando-se uma alternativa para a regeneração

de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural e, também, nas quais os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE et al., 1991).

Uma das etapas fundamentais na micropropagação é a avaliação e seleção de meios nutritivos mais eficientes para cada uma das etapas que compõem essa técnica. Também é importante analisar outros aspectos relacionados aos fatores químicos dos meios nutritivos como as concentrações de ágar e sacarose, e o valor de pH, assuntos abordados na sequência.

#### **2.4.2 Contaminações microbianas**

Contaminações microbianas são um dos mais sérios problemas associados à cultura de tecidos de plantas. A fase de assepsia apresenta a dificuldade de ajustar um ponto de equilíbrio entre o ponto ideal de descontaminação do tecido sem conduzi-lo à morte quando isolado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Contaminações podem ocorrer durante o estabelecimento *in vitro* da cultura, provavelmente causadas por ineficientes desinfestações superficiais do material vegetal. Após o estabelecimento, as contaminações podem ser causadas por micro-organismos endógenos ou que foram introduzidos durante a inoculação e/ou subcultivos, posterior a um longo período de armazenamento pós-esterilização. É possível, também, a introdução de contaminantes durante as manipulações no laboratório e/ou por vetores (LEIFERT et al., 1991a).

As plantas, em especial as lenhosas, apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, devido à contaminação microbiana (ERIG; SCHUCH, 2003). A assepsia realizada nos explantes não expõe os micro-organismos endógenos, por isso, sugere-se iniciar o controle asséptico das culturas com a aplicação de tratamentos fitossanitários e nutricionais nas plantas matrizes previamente à coleta de explantes, o qual é caracterizado por um trabalho dispendioso e, muitas vezes, intenso, quando a planta se encontra em campo (XAVIER et al., 2013).

Os tratamentos fitossanitários dado às plantas matrizes visam manter os agentes microbianos endofíticos em níveis mais baixos possíveis, enquanto os externos devem ser totalmente eliminados. Soluções antimicrobianas de ação sistêmica e de contato são pulverizadas nas plantas doadoras de explantes na

tentativa de controlar agentes microbianos endofíticos e exógenos (WENDLING et al., 2006).

A retirada dos explantes deve ser feita, preferencialmente, a partir de brotações jovens, que são formadas durante a fase ativa de crescimento de plantas bem nutridas, mantidas em casa de vegetação mediante a aplicação de fungicida, bactericida e protegida de intempéries (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O cultivo e a manutenção das matrizes fornecedoras dos explantes devem ser realizados nas melhores condições de sanidade e fertilidade possíveis (TEIXEIRA, 2001).

Várias substâncias podem ser usadas para fazer a desinfestação dos explantes, como o etanol e os compostos à base de cloro (hipoclorito de sódio e de cálcio). No entanto, as combinações e concentrações dos princípios ativos desinfestantes variam muito, sendo necessária a adequação à espécie e à sensibilidade do tecido a ser desinfestado (MONTARROYOS, 2000). Alguns autores relatam que o hipoclorito de cálcio é menos tóxico aos tecidos vegetais do que o hipoclorito de sódio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A concentração do agente desinfestante, o tempo de exposição do explante a este agente e a espécie estudada são aspectos determinantes para o estabelecimento de protocolo de desinfestação eficiente (MORAES et al., 2007).

### **2.4.3 Meios nutritivos para o cultivo *in vitro***

Os meios constituem um fator relevante na micropropagação, pois possuem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, controlam o padrão de desenvolvimento e a resposta morfogênica *in vitro* (CALDAS; BUSO, 1998), influenciando, assim, as respostas morfofisiológicas dos explantes (ALMEIDA et al., 2012). As exigências nutricionais exigidas para o crescimento e desenvolvimento dos explantes cultivados *in vitro* variam de espécie para espécie, dentre as cultivares e até mesmo dentro da própria planta (GREENWAY et al., 2012). Isso demonstra a necessidade de serem testados diferentes meios nutritivos para cada fase específica do cultivo *in vitro* (GUIMARÃES et al., 1999; NAGAO et al., 1994). Assim, definir um meio nutritivo que possa sustentar o crescimento e desenvolvimento dos explantes é fundamental para o sucesso do cultivo *in vitro*, e isto requer, muitas vezes, testar estes meios nutritivos de maneira empírica (HU; FERREIRA, 1990).

Os meios, de forma geral, constituem-se de água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, aditivos diversos, agentes solidificantes, reguladores de crescimento e reguladores de pH (DODDS; ROBERTS, 1995). Existem várias formulações de meios nutritivos, entre os quais destacam-se: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), B5 (GAMBORG et al., 1968) e SP (BARRUETO CID, 2005). A escolha de um desses meios, em geral, é baseada na literatura, na experiência com cada espécie vegetal ou por tentativa e erro. Ademais, quando se tratar de requerimentos nutricionais específicos, vai depender da espécie ou do tipo de explante que será utilizado.

O meio nutritivo MS foi uma das primeiras formulações usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio. Na maioria dos casos os meios nutritivos mais usados são o MS e o WPM – “*Wood Plant Medium*”, o qual foi desenvolvido especialmente para espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998, GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para a espécie *Eugenia involucrata* os meios nutritivos mais adequados para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais são o MS com a concentração dos sais reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS) e o WPM, no entanto, recomenda-se o meio  $\frac{1}{2}$ MS pela economia de reagentes e praticidade no preparo (GOLLE, 2010; GOLLE et al., 2012).

#### 2.4.3.1 Ágar

As culturas podem ser inoculadas em meio semi-sólido ou em meio líquido. Em meio semi-sólido utiliza-se um agente gelificante (por exemplo, ágar) que, além de solidificar o meio, forma um complexo coloidal liberando os íons (CANHOTO, 2010). No mercado há várias marcas comerciais de ágar que são utilizadas, geralmente, em concentrações que variam de 0,4 a 1,0% (CALDAS et al., 1998).

No entanto, é recomendado minimizar ou otimizar a quantidade utilizada no preparo do meio nutritivo, pelo fato do ágar ser considerado um dos componentes de maior custo adicionado ao meio (SINGHA, 1984; GEORGE, 1993; PEIXOTO; PASQUAL, 1995). Também é necessário considerar a utilização de concentrações de ágar muito elevadas, pois podem limitar a difusão de nutrientes até o explante (ROMBERGER; TABOR, 1971). Uma maior absorção de água pelos tecidos dos explantes é observada quando são cultivados em meio mais aquoso (WILLIAMS; LEOPOLD, 1989), porém deve-se salientar a ocorrência de problemas como a

hiperhidricidade dos explantes, normalmente ocasionados nesse meio líquido, o qual pode comprometer o seu desenvolvimento (PIATCZAK et al., 2005).

#### 2.4.3.2 Sacarose

Para os cultivos *in vitro*, a principal fonte de carboidratos e, conseqüentemente, de energia para o crescimento e processos biossintéticos é a sacarose (FERREIRA et al., 2011). Uma quantidade elevada de açúcar no meio nutritivo pode, em alguns casos, estar relacionada à redução no crescimento, baixa atividade fotossintética, mau funcionamento de estômatos e menor desenvolvimento de cutícula (JO et al., 2009).

Além disso, com o aumento na concentração de açúcares adicionados ao meio nutritivo há uma diminuição na absorção de sais minerais e água, o que pode interferir no crescimento da planta (FRÁGUAS et al., 2003; BESSON et al., 2010). O mesmo é verificado na ausência de sacarose no meio nutritivo, a qual pode ocasionar o atrofiamento e até a morte dos explantes em determinadas espécies (RODRIGUES et al., 2006).

#### 2.4.3.3 pH do meio nutritivo

Os elementos minerais são absorvidos pelas diferentes culturas de acordo com as respectivas exigências nutricionais. Todavia, a acidez ou a basicidade, quando bem ajustadas, podem promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Um valor baixo de pH conduz à competição do  $H^+$  com os nutrientes catiônicos ( $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ ) pelas células dos tecidos radiculares e, em valores mais elevados de pH, diminui a absorção de nutrientes aniônicos como o  $NO_3^-$ ,  $H_2PO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  e  $MoO_4^{2-}$  (TORRES; CALDAS, 1990).

O controle do pH se torna essencial, pois influencia diretamente a solubilidade dos sais, a absorção de nutrientes e fitorreguladores, além de afetar a eficiência do agente gelificante. Para um crescimento adequado para a maioria das espécies, o melhor ajuste de pH se dá na faixa de 5,0 a 6,5 (PIERIK, 1987). Para as culturas *in vitro* de plantas, o pH em torno de 5,7 tem sido o mais utilizado (XAVIER et al., 2009). Na micropropagação de *Eugenia involucrata*, o pH que tem sido adotado é de 5,7 (GOLLE, 2010).

De maneira geral, valores de pH abaixo de 4,5 e acima de 7,0 resultam na paralisação do crescimento e desenvolvimento vegetal, além disso, a solidificação do ágar também não é satisfatória, pois torna-se demasiado fluido ou demasiado duro (CHAWLA, 2009). Adicionalmente, o processo de autoclavagem e a estocagem do meio nutritivo também podem promover a sua acidificação (SKIRVIN et al., 1986). Após a autoclavagem do meio, o pH, geralmente, baixa entre 0,3 a 0,5 unidades de pH (CHAWLA, 2009). A medição do pH deve ser realizada antes da adição do agente gelificante ao meio nutritivo, sendo ajustado, geralmente, com soluções de hidróxido de potássio - KOH ou ácido clorídrico - HCl (0,1-1,0 N) para elevar ou diminuir o pH respectivamente (TRIGIANO; GRAY, 2011).

### 3 CAPÍTULO I

#### SEMENTES DE *Eugenia involucrata* De Candolle

##### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* De Candolle em relação à qualidade sanitária, fisiológica e física, bem como analisar e selecionar agentes desinfestantes para a germinação *in vitro* e substratos para a germinação e emergência *ex vitro*.

##### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e comparar dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* em relação a aspectos da qualidade sanitária, física e fisiológica.
- Avaliar e selecionar o agente desinfestante mais eficiente para a germinação *in vitro* de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar e selecionar o substrato mais eficiente para a germinação *ex vitro* de sementes e emergência de plântulas provenientes de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata*.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Obtenção de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

As sementes utilizadas para as análises de qualidade foram provenientes de dois lotes. As sementes do primeiro lote, denominado lote 1, foram coletadas de, aproximadamente, seis árvores no município de Silveira Martins, RS, sendo os frutos maduros coletados nas árvores ou recolhidos do chão, logo após sua queda espontânea. Na ocasião da coleta, realizada em 26 outubro de 2014, os frutos possuíam coloração vermelha a vinácea-escura. Este lote foi composto por, aproximadamente, 700 sementes, o que justifica o número reduzido de repetições utilizadas nos experimentos relatados a seguir.

Logo após a coleta, os frutos foram macerados manualmente e lavados em água corrente, com o auxílio de peneiras para separar as sementes. Em seguida, as sementes foram colocadas sobre folhas de papel toalha para a retirada do excesso de umidade superficial, onde permaneceram por 12h secando à sombra. Após, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), as sementes ficaram acondicionadas em saco plástico, em geladeira com temperatura aproximada de 8°C, até o início dos experimentos, em outubro de 2014.

As sementes do segundo lote, denominado lote 2, foram adquiridas por intermédio do Viveiro Florestal da UFSM, tendo sido coletadas no município de Santa Cruz do Sul, RS, em 25 de outubro de 2014. Contudo, as sementes foram recebidas apenas em 1º de dezembro de 2014, tendo sido armazenadas, neste período, em saco plástico, em câmara fria úmida com temperatura de, aproximadamente, 8°C, no Viveiro Florestal. No Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia na UFSM, ficaram acondicionadas em saco plástico, em refrigerador à 8°C, até o início dos experimentos, que ocorreram em dezembro de 2014.

### 3.3.1.1 Determinação do grau de umidade de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

O teste do grau de umidade, para o lote 1, foi realizado 10 dias após a coleta dos frutos e beneficiamento das sementes (novembro de 2014). O grau de umidade foi determinado conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) com algumas modificações devido ao número reduzido de sementes obtido. Foi empregado o método da estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24h. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições de 1,0g de sementes. Como recipiente foi utilizado papel alumínio, medindo 7cm x 5cm e com massa de 0,288g.

O teste do grau de umidade, para o lote 2, foi realizado aos 51 dias após a coleta das sementes (dezembro de 2014) e, novamente, aos seis meses após a coleta dos frutos e beneficiamento das sementes (abril de 2015). Para a determinação do grau de umidade, foi empregado a mesma metodologia usada para o lote 1. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três repetições de 1,0g de sementes. Como recipiente foi utilizado papel alumínio, medindo 5cm x 5cm e com massa de 0,235g.

A porcentagem de umidade, para os dois lotes, foi calculada aplicando-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Umidade } (U) = \frac{100 (P - p)}{P - t}$$

Em que:

$P$  = massa inicial, constituída pela massa do recipiente mais a massa da semente úmida;

$p$  = massa final, constituída pela massa do recipiente mais a massa da semente seca;

$t$  = tara, massa do recipiente.

Os resultados foram expressos em porcentagem, com base na massa das sementes úmidas.

### 3.3.1.2 Determinação do peso de mil sementes de dois lotes de *Eugenia involucrata* DC.

O peso de mil sementes foi determinado conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) com algumas modificações. Foram utilizadas três repetições de 100 sementes, totalizando 300 sementes para cada lote. O peso de mil sementes, para os dois lotes, foi calculado aplicando-se a seguinte expressão:

$$PMS = \frac{\text{peso da amostra} \times 1000}{\text{número total de sementes}}$$

Em que:

*PMS* = Peso de mil sementes.

Foram estimadas a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores obtidos nas pesagens.

### 3.3.1.3 Aspecto biométrico de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

Com a finalidade de caracterizar a morfologia externa, 100 sementes de cada lote foram medidas com paquímetro digital com precisão de 0,01mm, em relação ao comprimento, espessura (tomada do centro da semente) e largura, todas expressas em milímetros (mm). Os dados foram analisados em planilha eletrônica Excel, sendo que, para cada dimensão, foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Os dados foram classificados por meio de distribuição de frequência e plotados em histogramas, de acordo com procedimento relatado por Valadares et al. (2009).

### 3.3.1.4 Qualidade sanitária de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

O ensaio visando à caracterização da qualidade sanitária de sementes de *Eugenia involucrata* foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM.

Para a avaliação da sanidade das sementes foi utilizado o método “blotter test”, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes de cada lote, as quais foram distribuídas e analisadas em delineamento inteiramente casualizado. Para o experimento, foram usadas caixas plásticas do tipo “gerbox”, com dimensões de 11cm x 11cm x 3cm, previamente desinfestadas usando-se algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v).

Posteriormente, as sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada, até atingirem três vezes a massa seca do papel. A inoculação das sementes foi efetuada com o auxílio de pinças, previamente autoclavadas e desinfestadas em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, as caixas foram fechadas e inseridas em sacos plásticos, para evitar a perda de umidade, e na sequência, foram acondicionadas em sala de cultivo com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $20\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A avaliação da sanidade foi realizada aos sete dias, identificando-se os gêneros fúngicos por meio da observação das sementes individualmente. Esses dados foram utilizados para determinar a porcentagem de incidência dos gêneros fúngicos em cada caixa “gerbox”, os quais foram identificados por meio da visualização em microscópio estereoscópio, com base na observação e posterior comparação com a literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

### **3.3.5 Germinação de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.**

Para o experimento, conduzido em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada lote. O ensaio foi realizado seguindo as recomendações das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

Inicialmente, foi efetuada a desinfestação das caixas plásticas tipo “gerbox”, com o auxílio de algodão embebido em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, foram colocadas duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada. Posteriormente, foi realizada a desinfestação superficial das sementes, por meio da imersão em etanol a 70% (v/v)

durante 30s, logo após as sementes foram imersas em solução de NaClO a 2% (p/v) por 10min e, na sequência, passaram por um triplo enxague em água destilada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas com o auxílio de pinças desinfestadas com algodão embebido em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Posteriormente à inoculação das sementes, as caixas plásticas foram fechadas e inseridas em sacos plásticos para evitar a perda de umidade. Na sequência, as caixas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16h 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 sete, 14, 28, 35 e 42 dias foi realizada a avaliação, observando-se as variáveis: emissão de radícula, emissão de parte aérea e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto às sementes), todas expressas em porcentagem. Considerou-se como germinadas, aquelas sementes que emitiram radícula.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função  $\sqrt{x + 0,5}$ , sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi realizado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para os tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial, para os quantitativos. 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).

### **3.3.6 Desinfestação superficial de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.**

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram expostas por 1min à solução de etanol a 70% (v/v), seguido de um enxágue com água destilada e autoclavada. Posteriormente, foram imersas em diferentes concentrações de solução de NaClO ou hipoclorito de cálcio  $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$ , os quais constituíram os tratamentos:

T1: testemunha;

T2: 1,5% NaClO;

T3: 2,5% NaClO;

T4: 3,5% NaClO;

T5: 1,5% [Ca(ClO)<sub>2</sub>];

T6: 2,5% [Ca(ClO)<sub>2</sub>];

T7: 3,5% [Ca(ClO)<sub>2</sub>].

Conduziu-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo trifatorial 2x2x4, em que o fator “A” correspondeu aos dois lotes de sementes, o fator “B”, aos dois agentes desinfestantes (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio) e o fator “C”, às quatro concentrações testadas dos hipocloritos (0; 1,5; 2,5 ou 3,5% (v/v)), totalizando 16 tratamentos e seis repetições cada, totalizando 96 unidades experimentais e 192 sementes inoculadas. A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150mL, contendo 30mL de meio ágar-água a 0,7% (p/v) e duas sementes em cada frasco.

Cada tratamento, exceto a testemunha, permaneceu durante 20min em contato com o agente desinfestante sob agitação constante. A seguir, foi realizado um triplo enxágue com água destilada e autoclavada e as sementes foram inoculadas em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, observando-se as variáveis: contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes), emissão de radícula e emissão de parte aérea, todas expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função  $\sqrt{x + 0,5}$ , sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi realizado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para os tratamentos qualitativos e análise de regressão polinomial, para os quantitativos. 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).

### **3.3.7 Emergência de plântulas de *Eugenia involucrata* DC. provenientes de dois lotes de sementes em diferentes substratos**

Inicialmente, foi efetuada a desinfestação das caixas plásticas com perfurações nas tampas, com o auxílio de algodão embebido em solução de NaClO a 1% (v/v) e, após, em solução de etanol a 70% (v/v). Em seguida, as sementes foram semeadas nos respectivos tratamentos, os quais consistiram de diferentes disposições das sementes nos substratos areia e/ou vermiculita:

T1: sementes entre duas camadas de areia;

T2: sementes entre duas camadas de areia e vermiculita, sendo a areia disposta acima das sementes;

T3: sementes entre duas camadas de vermiculita e areia, sendo a vermiculita disposta acima das sementes;

T4: sementes entre duas camadas de vermiculita.

Conduziu-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 2x4, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos dois lotes utilizados e os níveis do fator “B”, às quatro disposições dos substratos totalizando oito tratamentos. Foram utilizadas 25 sementes de cada lote para cada tratamento. Utilizaram-se dois tipos de substratos dispostos de maneira intercalada, areia e vermiculita, na proporção 1:1, com camadas de 1cm. Os substratos foram previamente autoclavados a 121°C e 1atm de pressão durante 40min. Na sequência, as caixas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Aos 100 dias da semeadura foi realizada a avaliação, sendo analisadas as variáveis porcentagem de sementes emergidas e índice de velocidade de emergência (IVE). Para a avaliação do IVE foi utilizada a expressão proposta por Popingis (1977):

$$IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$$

Em que:

IVE = índice velocidade de emergência;

$E_1, E_2, \dots, E_n$  = número de plântulas emergidas a cada avaliação;

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias decorridos de semeadura à primeira e última contagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função  $\sqrt{x + 0,5}$ , sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, 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).

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.4.1 Determinação do grau de umidade de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

As sementes de *Eugenia involucrata* do lote 1, apresentaram grau médio de umidade de 48,70%, após 10 dias de armazenamento. Esse teor de umidade apresentado é considerado elevado, confirmando tratar-se de uma espécie com sementes recalcitrantes, as quais apresentam alto teor de umidade e baixa tolerância à secagem e ao congelamento. Da mesma maneira, Wielewicki et al. (2006) observaram um valor médio de umidade de 48,80%, e propuseram um padrão de 45% para o limite de aceitação de lotes de sementes de *Eugenia involucrata*. Igualmente, os resultados obtidos por Delgado e Barbedo (2007), que observaram um teor de umidade de 58,2%, levaram-lhes a indicar um limite de aceitação de 45 a 50% de umidade das sementes de um lote dessa mesma espécie. Sementes recalcitrantes não suportam o armazenamento em baixos teores de umidade sem perder sua viabilidade, de modo que, o período de armazenamento é reduzido e variável entre as espécies (FONSECA; FREIRE, 2003). Os resultados verificados para a espécie, no presente estudo, também estão de acordo com aqueles obtidos para outra espécie da família Myrtaceae, *Campomanesia pubescens* (Guabiroba), em que foi registrado um elevado teor de umidade (53,50%) (PERIOTTO, 2008).

Para o lote 2, as sementes apresentaram grau médio de umidade de 41,64%, 51 dias após a coleta, diferença de 7,06% em relação ao lote 1, possivelmente ocasionada pelo maior período de armazenamento das sementes. Após 6 meses de armazenamento, o teste foi repetido para o lote 2, e suas sementes apresentaram grau médio de umidade de 40,24%, diferença de apenas 1,4% em relação ao primeiro teste realizado (aos 51 dias de armazenamento). Conforme os resultados obtidos aos seis meses, notou-se que o grau de umidade das sementes se manteve praticamente estável. Este resultado pode ser considerado positivo devido ao fato das sementes de *Eugenia involucrata* serem recalcitrantes, necessitando um grau de umidade elevado para que se mantenham viáveis por maior período de armazenamento.

Estudos realizados com outras espécies do gênero *Eugenia* demonstraram que o elevado teor de água é comum entre elas; *Eugenia uniflora* (Pitangueira): 52,0%, *Eugenia brasiliensis* (Grumixameira): 49,6%, *Eugenia umbelliflora* (Baguaçu): 42,5%, *Eugenia cerasiflora* (Mamona): 62,8% (DELGADO; BARBEDO, 2007). O grau de umidade é um parâmetro diretamente associado a todos os aspectos relativos à qualidade fisiológica das sementes, sendo um dos indicadores para o período ideal de colheita (ANDRADE et al., 2001).

### **3.4.2 Determinação do peso de mil sementes de dois lotes de *Eugenia involucrata* DC.**

O peso médio de mil sementes (PMS) de *Eugenia involucrata* do lote 1 foi de 453,90g, correspondendo a 2.203 sementes  $\text{kg}^{-1}$ , valor que corrobora com os dados obtidos em outro estudo, o qual indica que a espécie possui entre 1.190 a 7.500 sementes  $\text{kg}^{-1}$  (BRASIL, 2013). O valor observado indica que as sementes dessa espécie são consideradas grandes, visto que possuem peso médio de mil sementes superior a 200g e menos de 5.000 sementes  $\text{kg}^{-1}$  (BRASIL, 2009; ISTA, 2004). O desvio-padrão para o lote foi de 16,87 e o coeficiente de variação (CV) de 3,72%, confirmando a confiabilidade dos dados e a pequena variação existente entre as sementes, o que pode ser atribuído ao fato de que estas foram provenientes de um mesmo lote e, possivelmente, coletadas de matrizes próximas (VALADARES et al., 2009). O peso de mil sementes, juntamente com o teor de umidade, auxiliam no entendimento da porcentagem de germinação das sementes (BRÜNING et al., 2011). Em outro estudo efetuado com *Eugenia involucrata* foi observada uma média de 306,18g para mil sementes, equivalendo a 3.266 sementes  $\text{kg}^{-1}$ , valor inferior ao observado no presente trabalho, porém com CV superior (13,79%) àquele obtido no presente estudo (PRADO, 2009).

O peso médio de mil sementes do lote 2 foi de 498,60g, o qual corresponde a 2.006 sementes  $\text{kg}^{-1}$ , o desvio-padrão foi de 31,16 e o CV de 6,45%. Essa diferença entre os dois lotes pode ter sido ocasionada pelo teor de água nas sementes, como descrito no item 3.4.1, em que o lote 2 apresentou menor grau médio de umidade em relação às sementes advindas do lote 1. O teor de água presente na semente está diretamente relacionado com o PMS, pois dependendo da umidade da

semente, a quantidade de propágulos de um lote é influenciada, bem como sua densidade (MARCOS FILHO, 2005).

Ambos os lotes apresentaram valor superior ao encontrado em outro estudo com a espécie, em que o PMS foi de 352,56g (BRÜNING et al., 2011). As sementes de *Eugenia involucrata* apresentam elevada quantidade de água no seu interior, o que as torna mais densas e pesadas podendo explicar o alto peso de mil sementes apresentado. Várias espécies brasileiras de *Eugenia* apresentam elevado teor de água (entre 40 e 70%), o que influencia nas avaliações de peso das sementes (BARBEDO et al., 1998).

Para *Eugenia pyriformis* (Uvaia) foram obtidos valores de PMS de 1.093 sementes kg<sup>-1</sup> (ORO et al., 2012). Em estudo com sementes de *Psidium rufum* (Araçá-roxo), foi obtida uma média de 12.935 sementes kg<sup>-1</sup> com teor de umidade de 16% (SOARES, 2015). Já para a espécie *Campomanesia pubescens* (Gabirola), outra espécie da família Myrtaceae, foi relatado o valor de 22.184 sementes kg<sup>-1</sup> (PERIOTTO, 2008). Contudo, deve-se considerar que o tamanho e o peso das sementes são características extremamente plásticas, podendo alterar-se de local para local, de ano para ano e entre e dentro de indivíduos (PIÑA-RODRIGUES; AGUIAR, 1993).

### **3.4.3 Aspecto biométrico de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.**

O lote 1 de sementes de *Eugenia involucrata* avaliado apresentou grande variação no que diz respeito ao tamanho, conforme pode ser observado na Tabela 1, em que estão apresentados os valores de comprimento, largura e espessura das sementes. O comprimento médio foi de  $9,99 \pm 1,39$ mm, a largura  $8,70 \pm 1,07$ mm, e a espessura  $5,77 \pm 1,11$ mm. Em outro estudo com *Eugenia involucrata* foram obtidos valores próximos aos observados no presente trabalho, sendo que as sementes apresentaram comprimento de  $7,63 \pm 1,88$ mm e espessura de  $4,98 \pm 1,18$ mm (PRADO, 2009). Sementes de *Eugenia involucrata* apresentam formato oval e cores variando entre ocre e sépia, caracterizando-se por apresentar vários tamanhos e não exibir sinal do eixo hipocótilo-radícula (BARROSO et al., 1999).

A biometria de sementes está relacionada às características de dispersão, estabelecimento de plântulas (FENNER, 1993) e diferenciação de espécies em florestas tropicais (BASKIN; BASKIN, 1998). Durante sua maturação, as sementes

crecem até alcançar o valor médio característico para a espécie (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012), sendo que as sementes de maior tamanho foram aquelas que obtiveram maior quantidade de nutrientes durante o seu desenvolvimento, possuindo embrião bem formado e com maior quantidade de substâncias de reserva e sendo, portanto, consideradas as mais vigorosas, as quais poderão ser empregadas na propagação de diferentes espécies vegetais (ALVES et al., 2005).

Tabela 1 - Comprimento, largura e espessura (mm) de sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 1. Santa Maria, RS, UFSM, 2015.

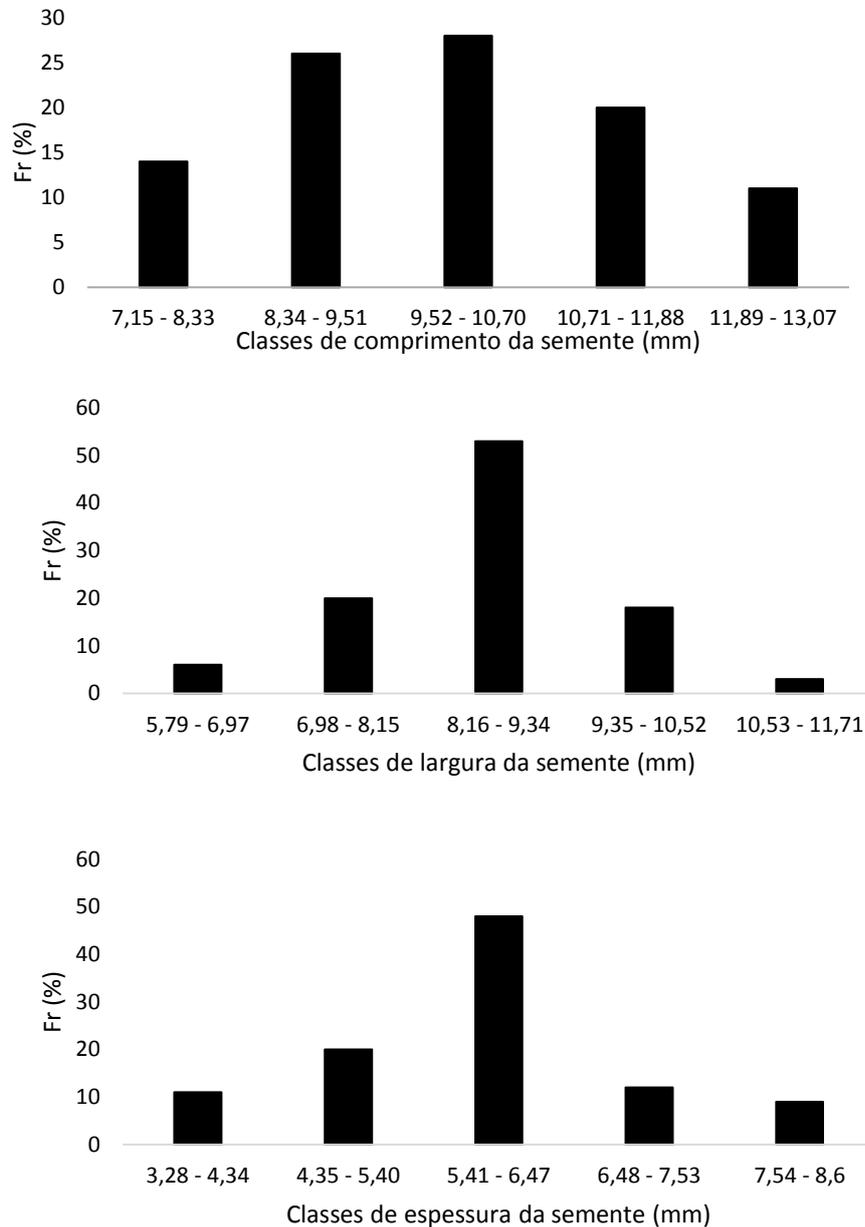
Parâmetro	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
Mínimo	7,15	5,79	3,28
Máximo	13,07	11,71	8,60
Média	9,99	8,70	5,77
Desvio Padrão	1,39	1,07	1,11
<b>IV</b>	<b>1,39</b>	<b>1,23</b>	<b>1,92</b>

IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.  
Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Na Figura 3, são apresentados histogramas de frequência para comprimento, largura e espessura, em cinco classes formadas a partir da amplitude de variação individual desses caracteres. É possível observar uma distribuição simétrica para as classes de frequência relativa do comprimento, largura e espessura das sementes do lote 1, própria de características quantitativas ou métricas.

A separação por classe de tamanho, para a determinação dos fatores de qualidade fisiológica e germinação, tem sido utilizada visando encontrar a classe ideal para multiplicação das diferentes espécies vegetais. Porém, os resultados podem ser bastante divergentes, mesmo em se tratando de sementes da mesma espécie (FRAZÃO et al., 1983), haja vista a influência que o ambiente exerce sobre o caráter em questão.

Figura 3 - Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento, largura e espessura de sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 1.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Adicionalmente, a análise biométrica de sementes florestais é importante para a diferenciação entre espécies de uma mesma família. A exemplo disso podem-se citar as espécies *Psidium cattleianum* (Araçá-amarelo) e *Psidium rufum* (Araçá-

roxo), da família Myrtaceae, cujas dimensões das sementes são úteis para a distinção entre as duas espécies. *Psidium cattleianum* possui valores médios de comprimento de 3,34mm e largura da semente de 3,04mm, diferentemente de *Psidium rufum*, que apresenta valores superiores para os mesmos parâmetros (5,49mm de comprimento e 5,60mm de largura da semente) (SOARES, 2015). Além disso, aspectos biométricos de sementes constituem-se em uma importante ferramenta para detectar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie, bem como as relações existentes entre esta variabilidade e os fatores ambientais (GONÇALVES et al., 2013).

O lote 2 de sementes de *Eugenia involucrata* avaliado, também apresentou grande variação no que diz respeito ao tamanho (Tabela 2). O comprimento médio de sementes para a espécie foi de  $11,67 \pm 1,35$ mm, a largura  $9,15 \pm 0,91$ mm e a espessura  $7,20 \pm 1,16$ mm. Os valores observados no presente lote foram superiores quando comparados àqueles obtidos com o lote 1. Tratando-se de lotes diferentes de sementes, a expectativa seria de que ocorressem variações no tamanho e no peso de sementes, o que pode estar correlacionado a fatores ambientais, como por exemplo, a disponibilidade de água, que é essencial para o desenvolvimento adequado dos frutos (TABARELLI et al., 2003).

Tabela 2 - Comprimento, largura e espessura (mm) de sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 2.

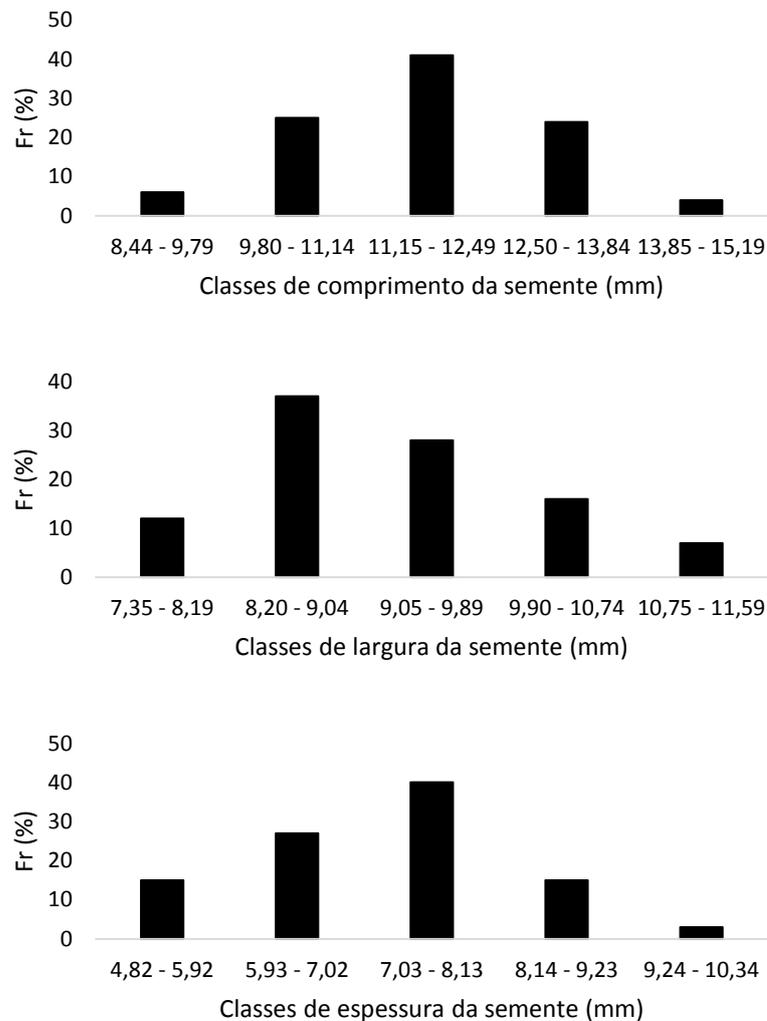
Parâmetro	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
Mínimo	8,44	7,35	4,82
Máximo	15,19	11,59	10,34
Média	11,67	9,15	7,20
Desvio Padrão	1,35	0,91	1,16
<b>IV</b>	<b>1,16</b>	<b>0,99</b>	<b>1,61</b>

IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Na Figura 4, estão representados histogramas de frequência para comprimento, largura e espessura das sementes de *Eugenia involucrata* provenientes do lote 2. Assim como observado para o lote 1, para o presente lote, também, foi verificada a formação de cinco classes a partir da amplitude de variação individual dos caracteres. Em relação ao histograma de frequência para o comprimento das sementes, notou-se comportamento simétrico, enquanto que para a largura e espessura, constatou-se uma ligeira assimetria negativa dos dados.

Figura 4 - Distribuição da frequência relativa (Fr) do comprimento, largura e espessura de sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) provenientes do lote 2.



Sementes de *Poecilanthe parviflora* (Canela-do-brejo), da família Fabaceae, apresentaram, em média, 15,8mm de comprimento, 14,13mm de largura e 3,19 mm de espessura (VALADARES et al., 2009). Já para sementes da espécie *Hymenaea courbaril* (Jatobá), a qual pertence à família Caesalpiniaceae, a média observada foi de 32,95mm de comprimento e 16,99mm de diâmetro (ANDRADE et al., 2010).

Os estudos citados anteriormente, assim como os resultados obtidos no presente estudo, demonstram a grande variação que existe para os parâmetros biométricos de espécies florestais. No entanto, ainda são escassas as informações referentes à biometria das sementes de espécies arbóreas, as quais poderiam contribuir para o reconhecimento de diferentes espécies em levantamentos florísticos (ARAÚJO et al., 2004).

#### **3.4.4 Qualidade sanitária de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.**

Houve diferença significativa entre os lotes de sementes de *Eugenia involucrata* para a incidência dos seguintes gêneros fúngicos: *Rhizoctonia* sp. ( $p=0,0006$ ), *Phoma* sp. ( $p=0,0141$ ) e *Curvularia* sp. ( $p=0,0498$ ) (Tabela 3). Já para *Fusarium* sp. (80,50%), *Penicillium* sp. (28,50%), *Alternaria* sp. (16,75%), *Botrytis* sp. (15,00%), *Epicoccum* sp. (14,00%), *Aspergillus* sp. (7,50%) e *Cladosporium* sp. (5,25%) não houve efeito significativo nos lotes testados.

Observou-se a incidência do gênero fúngico *Rhizoctonia* sp. nos dois lotes de sementes avaliados, sendo observada maior média no lote 2 (82%), já, no lote 1, 21% das sementes estavam sendo colonizadas por esse fungo. De maneira semelhante, o gênero fúngico *Phoma* sp. esteve presente nos dois lotes de sementes avaliados, com menor incidência no lote 1, enquanto que *Curvularia* sp. ocorreu apenas nas sementes do lote 2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Incidência dos gêneros fúngicos (%) identificados em dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), avaliados aos sete dias.

Lote	-----Gênero fúngico-----			
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
L1	100,00 a*	21,00 a	39,00 a	11,00 a
L2	61,00 a	82,00 b	18,00 a	22,50 a
<b>IV</b>	<b>6,80</b>	<b>3,39</b>	<b>6,38</b>	<b>4,39</b>
<b>Média</b>	<b>80,50</b>	<b>51,50</b>	<b>28,50</b>	<b>16,75</b>

Lote	-----Gênero fúngico-----		
	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
L1	6,00 a	20,00 a	12,00 a
L2	24,00 a	8,00 a	3,00 a
<b>IV</b>	<b>4,04</b>	<b>3,07</b>	<b>3,46</b>
<b>Média</b>	<b>15,00</b>	<b>14,00</b>	<b>7,50</b>

Lote	-----Gênero fúngico-----		
	<i>Phoma</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
L1	2,00 a	2,50 a	0,00 a
L2	13,00 b	8,00 a	4,00 b
<b>IV</b>	<b>1,91</b>	<b>2,04</b>	<b>1,09</b>
<b>Média</b>	<b>7,50</b>	<b>5,25</b>	<b>2,00</b>

\*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) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.  
 Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Houve maior ocorrência de gêneros fúngicos associados às sementes de *Eugenia involucrata* no lote 2, sendo observada a presença de 10 gêneros fúngicos diferentes. No lote 1 foi observada a presença de nove gêneros fúngicos, sendo verificada a incidência dos mesmos gêneros que estavam associados às sementes

pertencentes ao lote 2, com exceção de *Curvularia* sp., que não ocorreu nas sementes do lote 1.

De maneira geral, os dois lotes avaliados foram afetados por diversos gêneros fúngicos, o que pode influenciar a qualidade fisiológica das sementes (RABAIOLLI, 2014). A presença de fungos associados às sementes pode ser explicada pelas características dos frutos que abrigam as sementes, e, principalmente, pela forma como foram coletadas, beneficiadas e armazenadas (FERREIRA, 1989).

Os dados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos resultados observados em outro trabalho com sementes de *Eugenia involucrata*, em que houve incidência de vários gêneros fúngicos como *Fusarium* sp. (100%), *Penicillium* sp. (48%), *Alternaria* sp. (9%) e *Aspergillus* sp. (1%) (STEFANEL, 2013). Em estudo realizado com sementes de *Eugenia uniflora* (Pitangueira) (Myrtaceae), foi observada a predominância de *Cladosporium* sp. (73%), seguido por *Alternaria* sp. (50%) (AVILA et al., 2009). Já em sementes de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-vermelha) (Anacardiaceae), foi observada a presença dos gêneros *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp., sendo este último o de maior ocorrência (66%) nas sementes dessa espécie (STRAPASSON et al., 2002).

A contaminação de sementes florestais se dá principalmente no solo, onde os frutos e sementes podem ser infestados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitas facultativos, os quais podem estar presentes no solo ou na matéria orgânica. Alguns gêneros fúngicos que possuem esse comportamento são: *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp. e *Cylindrocladium* sp., dentre outros (FERREIRA, 1989).

Além disso, deve-se esclarecer que os fungos associados às sementes podem ser classificados em duas categorias: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os fungos de campo podem invadir as sementes ainda na planta-mãe. No presente estudo, foram observados os gêneros *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. e *Curvularia* sp., que são considerados fungos de campo (LAL; KAPOOR, 1979). Já os fungos de armazenamento são xerofíticos, ou seja, podem crescer em umidade relativa (UR) superior a 70%. Um dos gêneros de grande importância dentro desta classificação é o *Aspergillus* sp. (DHINGRA, 1985) e o *Penicillium* sp., que são fungos cosmopolitas e generalistas (SOARES et al., 2010).

A associação dos fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. em sementes pode ser altamente prejudicial durante o armazenamento, podendo ocasionar a redução na qualidade fisiológica das sementes, descoloração, apodrecimento e aumento na deterioração das sementes devido ao aumento na sua taxa respiratória. Esses fungos podem causar alterações na constituição das reservas, além de produzir micotoxinas, inibidoras da síntese de proteínas e ácidos nucléicos (MACHADO, 1988; MARCOS FILHO, 2005).

Entretanto, apesar de o gênero *Penicillium* sp. ter ocorrido em 28,50% e *Aspergillus* sp. em 7,50% das sementes de *Eugenia involucrata*, o somatório da incidência desses fungos de armazenamento, de maneira geral, foi reduzido (20,25%). Tal fato pode estar relacionado ao curto período de armazenamento das sementes até a realização do experimento.

Em sementes de *Acca sellowiana* (Goiaba-serrana) (Myrtaceae) foi observada a ocorrência de *Penicillium* sp. em 34% das sementes avaliadas, contudo, quando foram submetidas a uma assepsia superficial, a incidência desse gênero fúngico foi reduzida à metade (FANTINEL, 2014). Porém, em sementes de *Schizolobium amazonicum* (Paricá) (Magnoliaceae), o gênero *Penicillium* sp. manifestou-se tanto em sementes desinfestadas quanto naquelas que não receberam tratamento de desinfestação superficial (OLIVEIRA, 2012). Os gêneros fúngicos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Curvularia* sp. foram detectados associados a sementes de *Leucaena leucocephala* (Leucena) (Fabaceae), quando armazenadas por dois, 28 e 48 meses (MENDES et al., 2011). Entretanto, no presente estudo, os contaminantes fúngicos mais abundantes encontrados associados às sementes de *Eugenia involucrata* pertencem à categoria de fungos de campo, o que pode ser explicado devido às sementes de ambos os lotes terem permanecido armazenadas por apenas dois meses, o que, possivelmente, reduziu a incidência desses micro-organismos.

A ocorrência dos diversos gêneros fúngicos nas sementes de ambos os lotes de *Eugenia involucrata* avaliados no presente estudo, pode ter sido beneficiada pelo alto teor de umidade presente, entre 41,64 a 48,70%, pois quanto maior o teor de umidade das sementes, maior é a atividade dos fungos patogênicos (KRAMER; KOZLOWSKI, 1972). A condição sanitária no controle da qualidade de sementes é extremamente importante considerando que as sementes são veículos de agentes fitopatogênicos, que nelas podem se alojar e com elas serem levados ao campo,

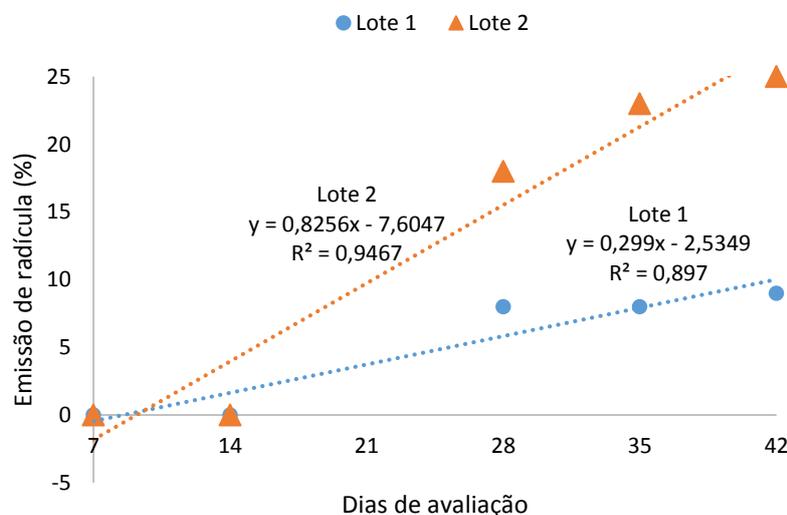
provocando redução na germinação e vigor e originando focos primários de infecção de doenças (GOULART, 1997).

### 3.4.5 Germinação de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

Para a variável emissão de radícula foi verificada interação significativa entre ambos os fatores principais (lote e dias de avaliação) ( $p= 0,0000$ ) (Figura 5), em que a equação estimada para ambos os lotes ajustou-se a um modelo linear. Foi observado, nos dois lotes de sementes avaliados, que a emissão de radícula iniciou-se quando decorriam mais de 14 dias após o início do teste.

O experimento para o lote 1 foi implantado após 2 dias da coleta dos frutos e posterior beneficiamento das sementes, enquanto para o lote 2 o experimento foi realizado após 39 dias. Entretanto, este lote obteve maiores percentuais de sementes germinadas quando comparado ao lote 1. Haja vista serem sementes recalcitrantes, esperava-se o oposto, e o resultado observado pode estar relacionado, à diferença de maturação das sementes dos lotes ou, ainda, à melhor qualidade fisiológica das sementes pertencentes ao lote 2.

Figura 5 - Emissão de radícula (%) observadas em sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) germinadas em papel filtro, provenientes de dois lotes diferentes.



O lote 1 apresentou média de emissão de radícula de 9% aos 42 dias de cultivo, enquanto que o lote 2, apresentou média de 25% no mesmo período de avaliação. Inobstante, ambos os lotes obtiveram reduzida porcentagem de germinação aos 42 dias (Figura 6).

Figura 6 – Sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), aos 42 dias de cultivo, provenientes do lote 2 e germinadas em caixas gerbox contendo papel filtro.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016. Barra = 1cm.

Há relatos que a utilização do papel filtro para a germinação de sementes não tem sido considerada satisfatória para algumas espécies florestais (FIGLIOLIA; PIÑA-RODRIGUES, 1995), aspecto que também pode ser observado, no presente estudo, para *Eugenia involucrata*. Este fato pode estar relacionado com as possíveis diferenças que ocorrem dentro dos grupos ecológicos, os quais requerem determinadas condições de temperatura, luz e umidade para o seu bom desenvolvimento. Além disso, essas alterações podem interferir no crescimento de plantas oriundas de sementes, podendo se manifestar em características como a dormência de sementes (FIGLIOLIA; PIÑA-RODRIGUES, 1995).

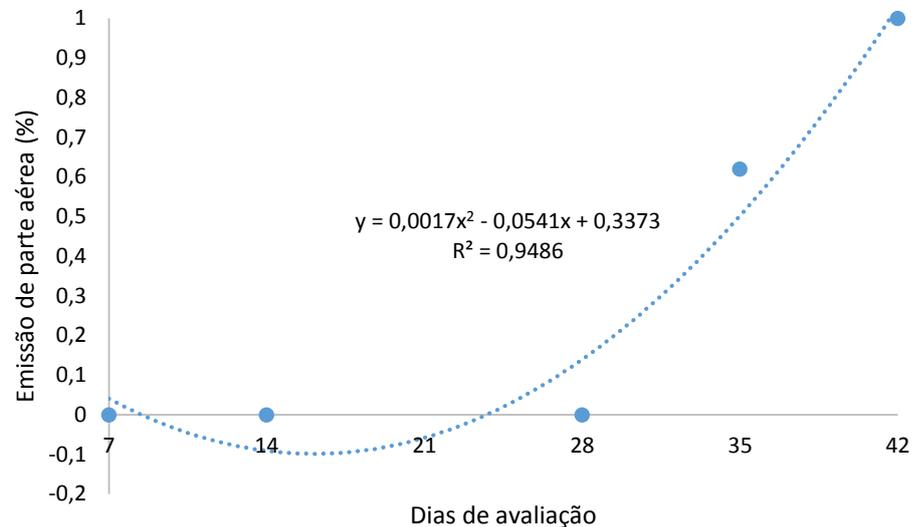
Ao contrário do que ocorre para *Eugenia involucrata*, um dos melhores substratos para serem utilizados em testes de germinação em sementes de *Acacia mangium* (Acácia-australiana) (Mimosaceae) foi o papel filtro (SILVA; AGUIAR, 2004). O papel filtro também proporcionou as maiores médias de porcentagem e velocidade de germinação em sementes de *Anadenanthera macrocarpa* (Angico-branco) (Fabaceae) (OLIVEIRA et al., 2012).

Para a utilização do substrato de papel deve-se verificar se há a presença de substâncias químicas tóxicas, prejudiciais às sementes (WILLAN, 1991). O papel filtro é de fácil manuseio, resistente, prático, esterilizável e ocupa pouco espaço, no entanto, é necessário o seu umedecimento periódico. Este tipo de substrato não é indicado para sementes redondas devido à possibilidade de ocorrer deslocamento durante o seu manuseio (FIGLIOLIA; PIÑA-RODRIGUES, 1995). Além disso, é importante que o substrato não apresente barreiras físicas ao crescimento das plântulas e seja inerte (PIÑA-RODRIGUES; VIEIRA, 1988). Entre os substratos mais utilizados, descritos nas Regras de Análise de Sementes (RAS), está o papel filtro (BRASIL, 2009).

Para a variável emissão de parte aérea, houve efeito significativo somente do fator principal dias de avaliação ( $p= 0,0028$ ) (Figura 7), em que a equação estimada ajustou-se a um modelo quadrático ( $MET= 1,73$ ). Não foi observado efeito significativo para o fator principal lote ( $p= 0,2658$ ) e nem para a interação entre os fatores lote e dias de avaliação ( $p= 0,2977$ ). Observou-se, de maneira geral, que a emissão de parte aérea foi maior ao final do período de avaliação, 42 dias, mas, mesmo assim, apresentou uma porcentagem muito reduzida (1%).

A baixa emissão da parte aérea pode estar relacionada ao ataque de fungos identificados associados às sementes, como dos gêneros *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp., evidenciado no experimento anterior. Esses gêneros quando associados às sementes, podem causar grandes prejuízos na sua formação, influenciando a qualidade fisiológica. Além disso, *Alternaria* sp. tem causado a redução na germinação em sementes florestais (ROTEM, 1995).

Figura 7 - Emissão da parte aérea (%) observada em sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), provenientes de dois lotes diferentes, germinadas em papel filtro em função do período de avaliação em dias.

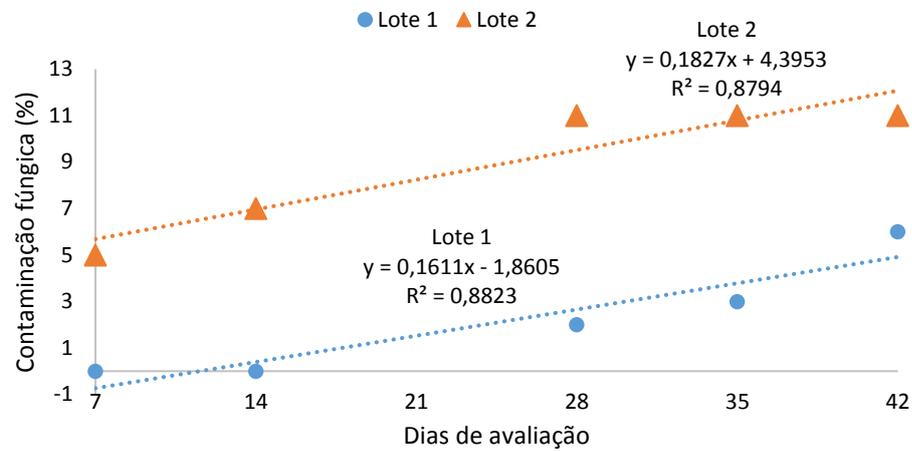


Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Para a variável contaminação fúngica, foi observada interação significativa entre os fatores principais (lotes e dias de avaliação) ( $p= 0,0000$ ) (Figura 8), em que a equação estimada ajustou-se a um modelo linear para ambos os lotes. Observou-se que o lote 2 apresentou maior porcentagem de contaminantes fúngicos em relação ao lote 1.

Observou-se, também, que conforme progredia os dias de avaliação houve uma maior proliferação dos micélios fúngicos, em ambos os lotes. Porém, ocorreu uma estabilização da contaminação após 35 dias de avaliação para o lote 2, obtendo-se 11% de sementes infestadas já, para o lote 1, obteve-se 6% de sementes com contaminantes fúngicos ao final do período de avaliação.

Figura 8 - Contaminação fúngica (%) observada em sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), provenientes de dois lotes diferentes, germinadas em papel filtro.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

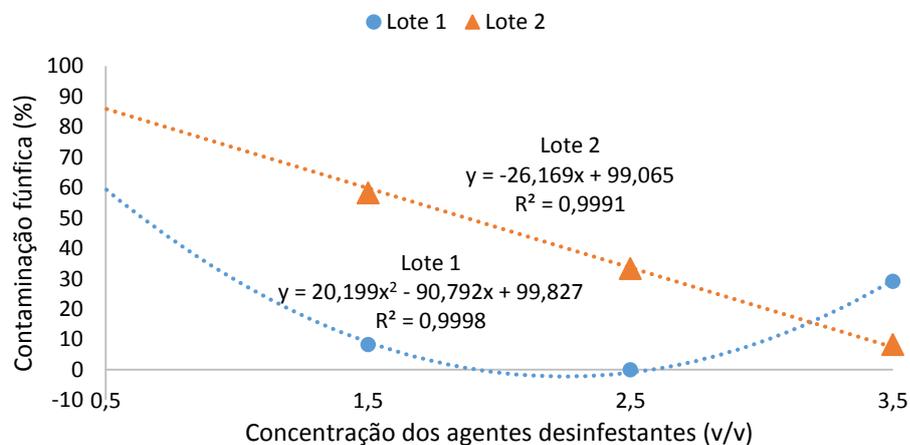
O potencial germinativo das sementes pode ser afetado pela presença de micro-organismos (FERRAZ; CALVI, 2010), uma vez que o experimento é conduzido em ambiente e condições ideais ao desenvolvimento não apenas das sementes, mas também de fungos ocasionando, muitas vezes, que lotes sejam eliminados por não atingirem índices satisfatórios de germinação (DE OLIVEIRA et al., 2012). De maneira geral, foram observadas porcentagens reduzidas de contaminação fúngica, o que pode ser atribuído ao tratamento de desinfestação superficial das sementes e, também, de assepsia das caixas gerbox e papel filtro. Igualmente, pode-se supor que o ambiente em que foi conduzido o teste pode não ter sido propício à proliferação dos micélios fúngicos.

#### 3.4.6 Desinfestação superficial de dois lotes de sementes de *Eugenia involucrata* DC.

Houve interação significativa apenas entre os fatores principais lote e concentração dos agentes desinfestantes para a variável contaminação fúngica ( $p=$

0,0020), em que a equação estimada ajustou-se em um modelo quadrático para o lote 1 (MET= 2,25) e em um modelo linear para o lote 2, conforme exposto na Figura 9. De maneira geral, a desinfestação foi mais eficiente no lote 1 quando comparado ao lote 2, o que está de acordo com a relativamente melhor sanidade observada neste lote. No lote 2, os melhores controles foram observados com o emprego da maior concentração testada (3,5%), ao contrário do observado para o lote 1. Os resultados obtidos indicam que a sanidade do lote de sementes está diretamente relacionada à eficiência do tratamento de desinfestação superficial aplicado. Em sementes de *Myrciaria* spp (Jabuticabeira) (Myrtaceae), a concentração 5% de NaClO na assepsia foi mais eficiente que 2,5%, sendo observadas médias de contaminação de 2 e 12% respectivamente (PICOLOTTO et al., 2007).

Figura 9 - Contaminação fúngica (%) observada em sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após os tratamentos de desinfestação superficial durante 20min de agitação, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Vários produtos são utilizados para a desinfestação de sementes, entre eles, destaca-se o NaClO, que é comumente utilizado para eliminação de contaminantes superficiais de material vegetal, assim como no controle de organismos patogênicos (COUTINHO et al., 2000). O mecanismo de ação do cloro não é bem conhecido,

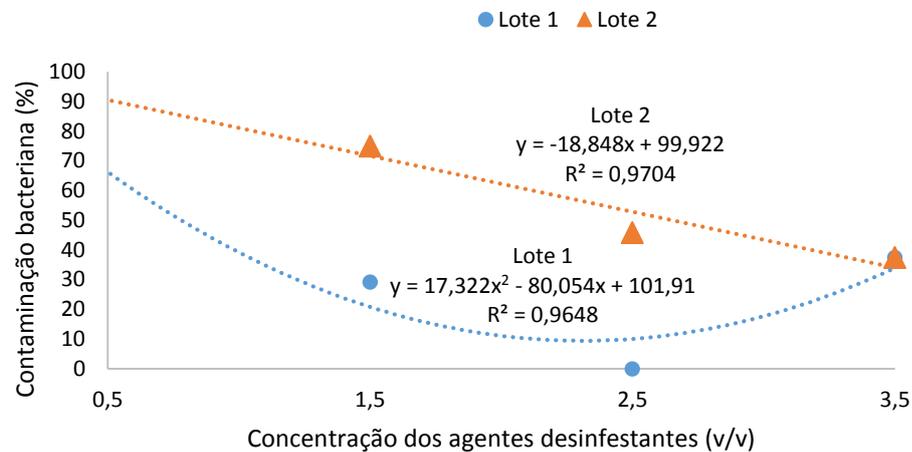
embora algumas hipóteses sugiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos micro-organismos, assim formando compostos tóxicos e levando à inibição das enzimas essenciais (DONINI et al., 2005). Tanto NaClO quanto  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ , têm se mostrado eficazes na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, e assim, aumentando o número de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas (NASCIMENTO et al., 2007).

De maneira semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, sementes de *Parapiptadenia rigida* (Angico-vermelho) (Fabaceae) apresentaram 100% de contaminação fúngica quando não foram submetidas ao tratamento de desinfestação com NaClO (COUTO et al., 2004). Em outro estudo com essa mesma espécie, o emprego do agente desinfestante NaClO a 2,5 e 5,0% durante 30 e 15min, respectivamente, resultou nas maiores porcentagens de germinação para essas sementes (85% e 80% respectivamente) e proporcionou as menores porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana (40% e 50% respectivamente) (NASCIMENTO et al., 2007).

A assepsia das sementes realizada com NaClO diminui a incidência de fungos associados às sementes das espécies florestais (MUNIZ et al., 2007). A concentração e o tempo de exposição das sementes ao NaClO são fatores importantes para promover germinação *in vitro* livre de agentes patógenos prejudiciais às sementes (BEVILACQUA et al., 2011).

Para a contaminação bacteriana foi observado efeito significativo para a interação entre os fatores principais (lote e concentração dos agentes desinfestantes) ( $p=0,0491$ ) (Figura 10), em que a equação ajustou-se em um modelo quadrático para o lote 1 (MET= 2,25) e em um modelo linear para o lote 2. Observou-se que os agentes desinfestantes, não foram eficientes no controle da contaminação das sementes; contudo seu emprego reduziu a incidência desses micro-organismos quando comparados à testemunha (Figura 10).

Figura 10 - Contaminação bacteriana (%) observada em sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após os tratamentos de desinfestação superficial durante 20min de agitação, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Sementes de *Calendula officinalis* (Calêndula) (Asteraceae), que foram submetidas a solução de NaClO a 2,5%, apresentaram uma significativa redução na contaminação por fungos (média de contaminação de 15%) e bactérias (10%) (BEVILACQUA et al., 2011), de maneira semelhante ao que foi observado no presente trabalho. Em sementes de *Swietenia macrophylla* (Mogno) (Meliaceae) os tratamentos que proporcionaram as menores médias de contaminação por bactéria (9,52%) foram aqueles em que as sementes foram desinfestadas com 2,5% de NaClO, durante 10 ou 30min (COUTO et al., 2004).

Ainda em relação à contaminação bacteriana, foi observada uma menor incidência de bactérias no lote 1 (33,33%), diferindo estatisticamente do lote 2 (59,52%) (Tabela 4), corroborando os resultados observados em relação à associação com fungos. Mesmo na presença de fungos e/ou bactérias, as sementes de *Parapiptadenia rigida* (Angico-vermelho) (Fabaceae) germinaram, indicando que esses micro-organismos não limitaram o processo de germinação (NASCIMENTO et al., 2007), o que pode ser igualmente verificado no presente estudo.

Tabela 4 - Contaminação bacteriana (%), emissão de radícula (%) e emissão de parte aérea (%), observadas em sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) independentemente do tratamento de desinfestação superficial com hipoclorito de cálcio ou hipoclorito de sódio (a 0%, 1,5%, 2,5% ou 3,5%) durante 20min de agitação, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

<b>Lote</b>	<b>Contaminação bacteriana (%)</b>	<b>Emissão de radícula (%)</b>	<b>Emissão de parte aérea (%)</b>
1	33,33 a*	53,57 a	16,67 a
2	59,52 b	27,38 b	4,67 b
<b>Média</b>	<b>46,43</b>	<b>40,48</b>	<b>10,71</b>
<b>IV</b>	<b>8,03</b>	<b>7,92</b>	<b>7,56</b>

\*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.

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Para a emissão de radícula ( $p= 0,0009$ ) e emissão de parte aérea ( $p= 0,0433$ ) houve efeito significativo apenas do fator principal lote de sementes (Tabela 4). Para essas duas variáveis, assim como verificado para a contaminação bacteriana, foi observado que o lote 1 apresentou as médias mais satisfatórias, as quais diferiram estatisticamente daquelas observadas para o lote 2. Este resultado pode estar relacionado ao menor tempo de armazenamento das sementes e/ou à melhor qualidade sanitária do lote 1. A germinação de sementes de Louro-pardo (*Cordia trichotoma*) oscilou entre lotes, o que pode ser devido a variação de cada árvore matriz e seu micro-habitat (FELIPPI et al., 2012), o que pode ser observado para a espécie em estudo.

### 3.4.7 Emergência de plântulas de *Eugenia involucrata* DC. provenientes de dois lotes de sementes em diferentes substratos

Houve interação significativa entre os fatores principais lote e substrato para a emergência de plântulas ( $p= 0,0000$ ) (Tabela 5) e para o índice de velocidade de emergência (IVE) ( $p= 0,0000$ ) (Tabela 6). Observou-se, para a emergência de plântulas, que os lotes apresentaram respostas divergentes em relação aos

diferentes substratos e suas combinações. A maior porcentagem média de emergência (96%) foi observada, no lote 1, quando o substrato utilizado foi entre vermiculita (tratamento 4), a qual diferiu significativamente das demais médias observadas para este lote e, também, da média correspondente a este tratamento (80%), quando foi avaliado o lote 2 (Tabela 5). Embora as sementes dos lotes avaliados tenham apresentado altas porcentagens médias de emergência de plântulas quando cultivadas entre vermiculita, de maneira geral, foi na presença de areia que as plântulas obtiveram desenvolvimento mais promissor (Figura 11).

Tabela 5 – Médias de emergência de plântulas (%) de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) semeadas em substrato areia e/ou vermiculita, após 100 dias.

Tratamentos	Lote		
	Lote 1	Lote 2	Média
1 (areia:areia)	0,00 Bd*	68,00 Ab	<b>34,00</b>
2 (areia:vermiculita)	56,00 Bc	80,00 Aa	<b>68,00</b>
3 (vermiculita:areia)	84,00 Ab	64,00 Bb	<b>74,00</b>
4 (vermiculita:vermiculita)	96,00 Aa	80,00 Ba	<b>88,00</b>
<b>Média</b>	<b>59,00</b>	<b>73,00</b>	<b>66,00</b>
<b>IV</b>	<b>1,54</b>		

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

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Durante a avaliação do experimento, foi observado que os tratamentos que continham areia na camada superior necessitavam de regas em maiores quantidades, provavelmente, isso se deve a uma maior evaporação da água neste caso. Diante desta observação, colocou-se uma folha de papel alumínio sobre a tampa das caixas do lote 1 aos 36 dias após a semeadura, afim de evitar uma evaporação excessiva. Essa alta evaporação pode ter prejudicado a emergência das plântulas do lote 1, visto que sementes recalcitrantes são incapazes de desenvolver mecanismos de proteção à desidratação (PAMMENTER; BERJAK, 2000),

desencadeando, assim, processos deterioráveis, como a desnaturação de proteínas, alterações na atividade das enzimas peroxidases e danos no sistema de membranas, resultando na completa perda de viabilidade das sementes (NAUTIYAL; PUROHIT, 1985). Já, para o lote 2, as folhas de papel alumínio foram colocadas sobre as tampas logo no início do experimento, o que pode justificar a emergência das plântulas nesse tratamento.

O mesmo foi verificado quando foi utilizada areia para a germinação de sementes de *Adenantha pavonina* (Olho-de-dragão), em que foram verificadas dificuldades para manter a umidade do substrato, havendo desuniformidade na capacidade de retenção e distribuição da água (FANTI; PEREZ, 1999). A reposição da umidade deve-se ao fato deste substrato drenar a água, fazendo que a parte superior fique ressecada (FIGLIOLIA et al., 1993). É provável que a capacidade de retenção de água de cada substrato, aliada às características intrínsecas que regulam o fluxo de água para as sementes possam ter influenciado nesses resultados. Muitas vezes, a variação na disponibilidade de água dos substratos pode causar prejuízos à germinação das sementes, provocando diferenças entre as médias (PETERSON; COOPER, 1979).

A areia é muito utilizada como substrato para a germinação de sementes. Sua utilização é recomendada em testes de germinação, devido à minimização do ataque de fungos (BRASIL, 1992). A escolha do substrato deve ser realizada de acordo com sua eficiência, considerando características como o tamanho da semente, necessidades de água e luz, facilidade de contagem e avaliação das plântulas (POPINIGIS, 1977).

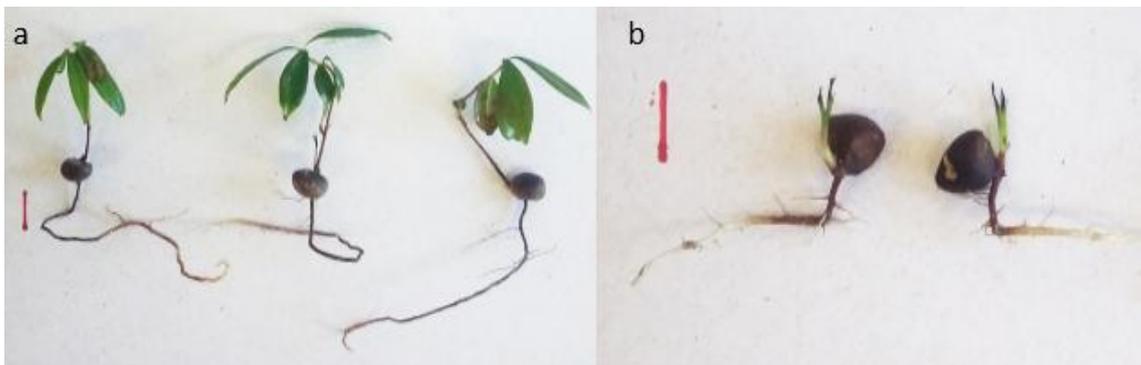
As características físicas, químicas e biológicas do substrato utilizado, devem proporcionar condições favoráveis para a germinação e o desenvolvimento de mudas (MINAMI; PUCHALA, 2000). Além disso, as diferenças nas características dos substratos como estrutura, aeração, pH, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos podem favorecer ou prejudicar a germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas (BARBOSA; BARBOSA, 1985; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; SILVA et al., 2001).

Para a espécie *Handroanthus chrysotrichus* (Ipê-amarelo) (Bignoniaceae), o substrato areia foi o mais favorável para a germinação e o crescimento das plântulas (MARTINS et al., 2008), assim como para sementes de *Mimosa regnellii* (Juquiri) (Fabaceae), em que a areia proporcionou boas taxas germinativas (FOWLER;

CARPANEZZI, 1997). Para *Caesalpinia pyramidalis* (Catingueira) (Caesalpinaceae), o substrato areia juntamente com a vermiculita, proporcionaram as condições adequadas para a germinação das sementes (LIMA et al., 2011).

Conforme já mencionado anteriormente, ao observar a emergência das plântulas entre os dois substratos empregados no experimento, notou-se que as plântulas não se desenvolveram de maneira eficiente quando a vermiculita estava disposta acima das sementes, ao contrário do observado com o substrato areia (Figura 11). O substrato vermiculita apresenta potássio (K) e magnésio (Mg) disponíveis em sua composição (FILGUEIRA, 2000), os quais podem ter prejudicado o desenvolvimento das folhas e o crescimento adequado das mesmas. Desse modo, sugere-se a realização de estudos visando elucidar esse possível efeito dos teores de K e Mg do substrato vermiculita no desenvolvimento de plântulas de *Eugenia involucrata*.

Figura 11 - Desenvolvimento de plântulas de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), a partir de sementes provenientes do lote 2, após 100 dias da semeadura. a - Plântulas emergidas em substrato areia, b – Plântulas emergidas em substrato vermiculita.



Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016. Barra = 1cm.

De maneira geral, a utilização de vermiculita tem sido recomendada para espécies florestais, sendo mais eficiente quando disposta sobre ou entre sementes (FIGLIOLIA; PIÑA-RODRIGUES, 1995). Já a areia é considerada um constituinte inerte, que não contém nutrientes nem apresenta propriedades coloidais (BEZERRA et al., 2002), o que pode ter beneficiado a emergência das plântulas.

Sementes de *Erythrina velutina* (Corticeira) (Fabaceae) colocadas para germinar no substrato vermiculita, apresentaram média de emergência de 98% (ALVES et al., 2008). Sementes de *Zeyhera tuberculosa* (Ipê-felpudo) (Bignoniaceae) (RAMOS et al., 2003) e *Hymenaea intermedia* (Jatobá) (Leguminosae) (MELO et al., 2004), também exibiram maior eficiência na germinação e emergência de plântulas em presença de vermiculita. Por outro lado, esse substrato não foi recomendado para testes de vigor de sementes e avaliação das plântulas de *Phoenix roebelenii* (Palmeira-fênix) (Arecaceae) (IOSSI et al., 2003).

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), assim como para emergência de plântulas, foi verificado que as sementes semeadas entre vermiculita (tratamento 4), apresentaram maior média (0,23) no lote 1, as quais diferiram significativamente das demais (Tabela 6). Já para o lote 2 observou-se que tanto entre vermiculita (tratamento 4) quanto entre areia e vermiculita (tratamento 2) resultaram médias superiores e que não diferiram significativamente entre si. De maneira semelhante, em sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* (Sansão-do-campo) (Mimosaceae) o substrato vermiculita também promoveu resultados mais satisfatórios na emergência e no desenvolvimento inicial de plântulas (NOGUEIRA et al., 2012). Igualmente para *Dipteryx alata* (Baruzeiro) (Fabaceae), este substrato proporcionou maior índice de velocidade de emergência e, também, maior porcentagem de emergência das plântulas (OLIVEIRA et al., 2014).

Tabela 6 – Índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-xmato) após a semeadura em substrato areia e/ou vermiculita, após 100 dias da semeadura.

Tratamentos	IVE		
	Lote 1	Lote 2	Média
1 (areia:areia)	0,00 Bd*	0,17 Ab	<b>0,08</b>
2 (areia:vermiculita)	0,14 Bc	0,19 Aa	<b>0,16</b>
3 (vermiculita:areia)	0,20 Ab	0,16 Bc	<b>0,18</b>
4 (vermiculita:vermiculita)	0,23 Aa	0,19 Aa	<b>0,21</b>
<b>Média</b>	<b>0,14</b>	<b>0,18</b>	<b>0,15</b>
<b>IV</b>	<b>0,98</b>		

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

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

A escolha do substrato adequado é um dos fatores mais complexos em se tratando de germinação de sementes de espécies florestais, sendo que a escolha errada pode ocasionar a nulidade ou irregularidade no processo germinativo, má formação de mudas e o surgimento de doenças (BRAUWERS; CAMARGO, 2000). Por isso, é fundamental a realização de pesquisas acerca dos substratos mais apropriados para cada espécie vegetal, permitindo que esse forneça condições básicas para o bom desenvolvimento das plântulas, e conseqüentemente, refletindo na produção de mudas de alta qualidade.

### 3.5 CONCLUSÕES

Os principais gêneros fúngicos associados às sementes de *Eugenia involucrata*, nos lotes avaliados, são *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Penicillium* sp., além de outros de menor incidência, como *Alternaria* sp., *Botrytis* sp., *Epicoccum* sp., *Aspergillus* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp. e *Curvularia* sp.

O lote 2 apresenta significativamente menor qualidade sanitária que o lote 1 em relação aos gêneros *Rhizoctonia* sp., *Phoma* sp. e *Curvularia* sp.

Nos dois lotes de sementes avaliados a emissão de radícula inicia-se dentro do período compreendido entre 14 e 28 dias após a semeadura.

A germinação de sementes de *Eugenia involucrata* aos 42 dias, em substrato papel, resulta em baixa média de emissão de radícula e parte aérea.

O lote 2, quando avaliado em substrato papel, apresenta relativamente maior qualidade fisiológica mesmo após tendo sido armazenado por maior período.

A sanidade, sob o ponto de vista quali-quantitativo, do lote de sementes de *Eugenia involucrata* está diretamente relacionada à eficiência do tratamento de desinfestação superficial aplicado no que diz respeito à contaminação fúngica.

A contaminação bacteriana em sementes de *Eugenia involucrata* é controlada pela imersão durante 20 min em hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio (soluções a 1,5, 2,5 ou 3,5%), mas não é eficiente.

O lote 1 apresenta melhor desempenho na germinação *in vitro* em relação à contaminação microbiana, emissão de radícula e formação de parte aérea.

Os lotes apresentam desempenho diferenciado no que diz respeito à emergência de plântulas aos 100 dias após a semeadura, sendo que, para o lote 1, as maiores médias são obtidas entre vermiculita (96%) enquanto para o lote 2, os substratos entre areia e vermiculita (80%) e entre vermiculita (80%) não diferem significativamente entre si. Contudo somente há desenvolvimento da parte aérea quando as plântulas de *Eugenia involucrata* são semeadas com uma camada de areia disposta sobre as sementes.

O grau de umidade de sementes de *Eugenia involucrata* do lote 1 é de 48,70% decorridos 10 dias da coleta e para o lote 2 é de 41,64% decorridos 51 dias da coleta. Após seis meses de armazenamento, as sementes do lote 2 apresentaram 40,24% de umidade.

O peso médio de mil sementes de *Eugenia involucrata* do lote 1, avaliado 10 dias após a coleta, é de 453,90g, correspondendo a 2.203 sementes kg<sup>-1</sup>; enquanto para o lote 2, avaliado 51 dias após a coleta, é de 498,60g, correspondendo a 2.006 sementes kg<sup>-1</sup>.

O comprimento médio de sementes de *Eugenia involucrata* do lote 1, avaliado aos 20 dias após a coleta, é de 9,99 ± 1,39 mm, largura média de 8,70 ± 1,07 mm e espessura média de 5,77 ± 1,11 mm; enquanto do lote 2, avaliado 60 dias após a coleta, é de 11,67 ± 1,35 mm, 9,15 ± 0,91 mm e 7,20 ± 1,16 mm respectivamente.

As sementes do lote 2 são maiores, em decorrência disso apresentam maior peso médio de mil sementes e, em consequência do maior período de armazenamento apresentam menor teor umidade.

## 4 CAPÍTULO II

### ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *Eugenia involucrata* De Candolle

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar aspectos da desinfestação superficial e fatores químicos do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e selecionar a concentração mais eficiente de agentes desinfestantes para o controle da contaminação microbiana de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar a influência de diferentes valores de pH no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ágar no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos foram utilizados, como doadores de explantes, espécimes de *Eugenia involucrata* cultivados em casa de vegetação com aproximadamente 8 anos de idade. Além de irrigações diárias, as plantas receberam, semanalmente, 400mL de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N P-K: 5-20-20) a  $1,5\text{g L}^{-1}$  e, quinzenalmente, 400mL de solução a  $1\text{g L}^{-1}$  de nitrogênio (ureia). Semanalmente, e no dia anterior à coleta dos explantes, pulverizaram-se as plantas até seu encharcamento total com solução à base de Orthocide500PM<sup>®</sup> (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide) a  $1,5\text{g L}^{-1}$  e Sulfato de Estreptomicina a  $0,1\text{g L}^{-1}$ , este processo teve como objetivo um pré-tratamento, auxiliando na posterior desinfestação dos explantes.

Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais que não fossem extremamente lenhosos e o segmento apical caulinar do ramo foi excluído, para reduzir a variação entre os explantes, Durante a coleta, as brotações foram imersas em água destilada contendo  $1,5\text{g L}^{-1}$  do fungicida Orthocide500PM<sup>®</sup>,  $0,1\text{g L}^{-1}$  de Sulfato de Estreptomicina, visando realizar uma pré-desinfestação das brotações, e, também,  $1\text{g L}^{-1}$  de ácido ascórbico, para diminuir a ocorrência de oxidação fenólica nos explantes, conforme metodologia de Golle (2013). No laboratório, as brotações foram lavadas com o auxílio de água corrente e detergente comercial e, após, foram enxaguadas duas vezes com água destilada.

#### **4.3.1 Efeito de $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$ e de $\text{NaClO}$ na desinfestação superficial de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.**

Os tratamentos avaliados neste experimento consistiram na imersão de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* em solução de hipoclorito de cálcio  $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$  (0; 2,0; 2,5 ou 3,0%) seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ) (0; 2,0; 2,5 ou 3,0%), durante 15min. Os tratamentos receberam uma codificação e consistiram da imersão subsequente em soluções de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  e  $\text{NaClO}$  respectivamente:

T1: testemunha (ausência de agente desinfestante)

T2: 2,0% e 2,0%

T3: 2,0% e 2,5%

T4: 2,0% e 3,0%

T5: 2,5% e 2,0%

T6: 2,5% e 2,5%

T7: 2,5% e 3,0%

T8: 3,0% e 2,0%

T9: 3,0% e 2,5%

T10: 3,0% e 3,0%

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, com oito repetições contendo dois explantes cada, totalizando 80 frascos e 160 explantes. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram expostos, por 1min, à solução de etanol a 70% (v/v). Posteriormente, estes foram submetidos à imersão nas respectivas concentrações dos agentes desinfestantes e, após, foram enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada.

O meio nutritivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,05g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7g L<sup>-1</sup> de ágar e 1g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP). O pH foi ajustado para 5,7, anteriormente à solidificação com ágar, e após, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm, durante 15min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas as variáveis: sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no explante), contaminação fúngica (presença de micélios fúngicos junto aos explantes e/ou no meio nutritivo) e contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), todas expressas em porcentagem.

#### **4.3.2 Efeito de diferentes valores de pH no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 6x2, em que o fator “A” correspondeu à valores de pH e o fator “B”,

aos períodos de cultivo. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e três explantes, sendo utilizadas 10 repetições, totalizando 60 unidades experimentais e 180 explantes. Foram acrescentados ao meio nutritivo: 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 50mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1g L<sup>-1</sup> de PVP e 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado conforme o tratamento, a saber:

T1: 4,0;

T2: 4,5;

T3: 5,0;

T4: 5,7;

T5: 6,0;

T6: 6,5.

O pH, conforme o tratamento, foi ajustado anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min. Anteriormente à inoculação em meio nutritivo, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram expostos, por 1min, à solução de etanol a 70% (v/v), seguido de um enxágue com água destilada e autoclavada. Após, os explantes foram imersos em solução de NaClO a 2,0% por 15min e, em seguida, em solução de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] a 3,0% durante 15min. Posteriormente, os explantes passaram por três enxágues com água destilada e autoclavada. Na sequência, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Aos 30 e aos 60 dias de cultivo *in vitro* foram realizadas avaliações, observando-se as seguintes variáveis: sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no explante), contaminação fúngica (presença de micélios fúngicos junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo) e oxidação fenólica (escurecimento dos explantes), todas expressas em porcentagem.

#### 4.3.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.

Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, com seis tratamentos e seis repetições cada, com um total de 36 unidades experimentais e 72 explantes. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e dois explantes. Foram acrescentados ao meio nutritivo: 50mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1g L<sup>-1</sup> de PVP e 7g L<sup>-1</sup> de ágar. Os tratamentos consistiram na suplementação de diferentes concentrações de sacarose ao meio nutritivo, a saber:

- T1: 0g L<sup>-1</sup>;
- T2: 10g L<sup>-1</sup>;
- T3: 20g L<sup>-1</sup>;
- T4: 30g L<sup>-1</sup>;
- T5: 40g L<sup>-1</sup>;
- T6: 50g L<sup>-1</sup>.

O pH foi ajustado para 6,0, conforme resultado obtido no experimento anterior, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min. Previamente à inoculação, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram expostos por 1min à solução de etanol a 70% (v/v), seguido de um enxágue com água destilada autoclavada. Após, foram imersos em solução de NaClO a 2,0% por 15min e, em seguida, em solução de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] a 3,0% durante 15min. Posteriormente, os explantes passaram por três enxágues com água destilada e autoclavada. Em seguida, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, observando-se as variáveis: sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no explante), contaminação fúngica (presença de micélios fúngicos junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas

junto aos explantes e/ou no meio nutritivo) e oxidação fenólica (escurecimento dos explantes), todas expressas em porcentagem.

#### **4.3.4 Efeito de diferentes concentrações de ágar no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, com sete tratamentos e seis repetições cada, totalizando 42 unidades experimentais e 84 explantes. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150mL, contendo 30mL de meio nutritivo MS, com concentração de sais reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), e dois explantes. Foram acrescentados ao meio nutritivo: 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 50mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 1g L<sup>-1</sup> de PVP. Os tratamentos consistiram na suplementação de diferentes concentrações de ágar ao meio nutritivo, a saber:

- T1: 4g L<sup>-1</sup>;
- T2: 5g L<sup>-1</sup>;
- T3: 6g L<sup>-1</sup>;
- T4: 7g L<sup>-1</sup>;
- T5: 8g L<sup>-1</sup>;
- T6: 9g L<sup>-1</sup>;
- T7: 10g L<sup>-1</sup>.

O pH foi ajustado para 6,0, anteriormente à solidificação com ágar, e na sequência, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão durante 15min. Previamente à inoculação, na câmara de fluxo laminar, os explantes foram expostos durante 1min à solução de etanol a 70% (v/v). Após, foram imersos em solução de NaClO a 2,0% por 15min e, em seguida, em solução de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] a 3,0% durante 15min. Posteriormente, os explantes passaram por três enxágues em água destilada e autoclavada. Em seguida, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foi realizada a avaliação, observando-se as variáveis: sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no

explante), contaminação fúngica (presença de micélios fúngicos junto aos explantes e/ou no meio nutritivo), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes e/ou no meio nutritivo) e oxidação fenólica (escurecimento dos explantes), todas expressas em porcentagem.

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram transformadas, pela função  $\sqrt{x + 0,5}$ , sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ou Skott-Knott 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).

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Efeito do $[Ca(ClO)_2]$ e NaClO na desinfestação superficial de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.

Houve efeito significativo dos tratamentos para as variáveis sobrevivência ( $p=0,0454$ ), estabelecimento ( $p=0,0000$ ), contaminação fúngica ( $p=0,0002$ ) e contaminação bacteriana ( $p=0,0000$ ). De maneira geral, foram observadas elevadas médias de sobrevivência *in vitro* dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata* submetidos aos tratamentos de desinfestação, exceto na presença de 2,5% de  $[Ca(ClO)_2]$  e 2,0% de NaClO, que, juntamente com a testemunha, proporcionaram as menores médias (54,12% e 62,25% respectivamente), as quais não diferiram entre si (Tabela 7). Esse resultado é de difícil explicação, haja vista que concentrações dos agentes desinfestantes, tanto inferiores quanto superiores a essas, resultaram mais eficientes, e implica na necessidade de repetição do experimento para dirimir dúvidas em relação a sua veracidade.

Para a variável estabelecimento (Tabela 7), os tratamentos que empregaram imersão em solução a 3,0% de  $[Ca(ClO)_2]$  e 2,0 ou 2,5% de NaClO foram os mais eficientes (78,87% e 79,00% respectivamente), os quais não diferiram significativamente entre si. Já o emprego de 3,0% de NaClO após a imersão em 3,0% de  $[Ca(ClO)_2]$  reduziu significativamente o estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais, possivelmente em função de efeito tóxico.

Os valores observados, no presente estudo, para as variáveis sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* ratificam a afirmação de que uma alta sobrevivência dos explantes nem sempre pode ser usada como indicativo de que haverá similar grau de estabelecimento de plantas a partir destes fragmentos (ERIG; SCHUCH, 2003).

Tabela 7 – Sobrevivência (%) e estabelecimento (%) *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½MS, em função da imersão sucessiva, por 15 min, em soluções desinfestantes de diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e hipoclorito de sódio (NaClO).

<b>Tratamento de desinfestação</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>	<b>Estabelecimento (%)</b>
1 (testemunha)	62,25 b*	33,12 b
2 (2,0%:2,0%)**	78,87 a	24,75 b
3 (2,0%:2,5%)	95,75 a	16,50 b
4 (2,0%:3,0%)	74,75 a	33,00 b
5 (2,5%:2,0%)	54,12 b	8,25 b
6 (2,5%:2,5%)	91,62 a	45,50 b
7 (2,5%:3,0%)	83,00 a	37,25 b
8 (3,0%:2,0%)	95,75 a	78,87 a
9 (3,0%:2,5%)	87,37 a	79,00 a
10 (3,0%:3,0%)	87,25 a	8,25 b
<b>Média</b>	<b>81,07</b>	<b>36,45</b>
<b>IV</b>	<b>4,15</b>	<b>6,07</b>

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. \*\* O primeiro percentual corresponde à concentração de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e o segundo, à de NaClO. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Quanto à variável contaminação fúngica, todos os tratamentos foram eficientes e resultaram em médias que diferiram significativamente da testemunha (Tabela 8). Já para a contaminação bacteriana (Tabela 8) foi eficiente apenas o tratamento que utilizou as concentrações mais elevadas dos dois agentes desinfestantes, o qual, simultaneamente, promoveu uma redução significativa do estabelecimento *in vitro*. Entretanto, deve-se salientar que, na maioria das vezes, a presença de colônias bacterianas junto aos explantes, embora indesejadas, não inviabilizou o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, ratificando as observações de Golle et al. (2013). Contudo, há que se considerar que, muitas vezes, a presença de contaminantes microbianos implica no descarte

das culturas infectadas, o que reduz a produtividade do trabalho e aumenta custos de produção de mudas (GOLLE et al., 2013).

Tabela 8 – Contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%) de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½MS, em função da imersão sucessiva, por 15 min, em soluções desinfestantes de diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e hipoclorito de sódio (NaClO).

<b>Tratamento de desinfestação</b>	<b>Contaminação fúngica (%)</b>	<b>Contaminação bacteriana (%)</b>
1 (testemunha)	74,75 b	83,25 c
2 (2,0%:2,0%)**	16,62 a*	91,62 c
3 (2,0%:2,5%)	4,12 a	91,62 c
4 (2,0%:3,0%)	20,62 a	79,00 c
5 (2,5%:2,0%)	25,00 a	95,75 c
6 (2,5%:2,5%)	12,50 a	87,25 c
7 (2,5%:3,0%)	0,00 a	87,25 c
8 (3,0%:2,0%)	20,62 a	37,37 b
9 (3,0%:2,5%)	12,50 a	58,12 c
10 (3,0%:3,0%)	0,00 a	4,12 a
<b>Média</b>	<b>18,67</b>	<b>71,54</b>
<b>IV</b>	<b>6,84</b>	<b>4,37</b>

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. \*\* O primeiro percentual corresponde à concentração de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e o segundo, à de NaClO. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) =  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Em testes de estabelecimento *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. (Pêra), foi avaliado o emprego de etanol a 70% e hipoclorito de sódio a 2%, a média de contaminação bacteriana obtida foi de 45,70% em gemas e 18,80% em meristemas dessa espécie cultivados *in vitro* (ERIG; FORTES, 2002). Em outro trabalho realizado com segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, o efeito de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] (a 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ou 2,5%), aplicado de maneira isolada, não foi eficiente em controlar a contaminação microbiana (STEFANEL, 2013). Scheurer et al. (2015)

testaram a combinação desses agentes desinfestantes (NaClO e  $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$ ) em menores concentrações (0, 0,5 ou 1,5%) em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, porém nenhum dos tratamentos foi eficiente no controle da contaminação bacteriana, tendo efeito, somente, sobre a contaminação fúngica.

Da mesma forma, NaClO, analisando-se seu efeito de maneira isolada, não apresentou resultados satisfatórios no controle da contaminação em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, sendo eficiente sua ação somente quando associado ao bicloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) a 0,05% (p/v) por 10min (GOLLE, et al., 2013).

O bicloreto de mercúrio tem sido utilizado, na sua forma orgânica, como inseticida, bactericida e fungicida (BUENO, 1990), porém, é considerado extremamente tóxico, tanto para o ser humano, quanto para a biota, podendo entrar na corrente sanguínea e causar danos irreparáveis ao sistema nervoso central (CANELA, 1995). Considerado o exposto, no presente estudo, optou-se por testar o uso sucessivo dos dois agentes desinfestantes ( $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$  e NaClO), com a finalidade de, eventualmente, eliminar o emprego de  $\text{HgCl}_2$  nessa etapa do cultivo *in vitro*. No presente estudo, e também em estudos já realizados anteriormente (GOLLE, 2010; GOLLE et al., 2013; PAIM, 2011; STEFANEL, 2013), a dificuldade em controlar a contaminação microbiana de segmentos nodais tem sido uma barreira para o cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

#### **4.5.2 Efeito de diferentes valores de pH no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.**

Para a sobrevivência foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, período de avaliação ( $p=0,0130$ ) e valores de pH ( $p=0,0341$ ), não sendo observada interação significativa entre eles. Já para as variáveis contaminação bacteriana (média geral de 62,70%) e oxidação fenólica (média geral de 82,60%), não houve efeito significativo para nenhum fator principal. Em relação ao período de avaliação, a maior média de sobrevivência ocorreu aos 30 dias de cultivo (71,12%), observando-se um decréscimo significativo aos 60 dias de cultivo *in vitro* (52,48%), o que pode ter sido ocasionado pela menor quantidade de nutrientes disponíveis aos explantes, devido ao maior tempo de permanência no mesmo meio nutritivo.

Quanto aos valores de pH, a menor porcentagem média de sobrevivência *in vitro* foi observada a 5,7 (38,20%), a qual, no entanto, não diferiu significativamente

das demais, exceto quando o pH foi ajustado para 6,0 (73,20%) (Tabela 9). Entretanto, a média de sobrevivência observada nas brotações cultivadas em pH 6,0 não diferiu daquelas obtidas nos demais valores.

Tabela 9 – Sobrevivência (%), estabelecimento (%) e contaminação fúngica (%) em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato), após a inoculação em diferentes valores de pH em meio ½MS.

Valores de pH	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Contaminação fúngica (%)
4,5	64,80 ab*	44,75 ab	10,00 a
5,0	66,20 ab	59,60 a	6,60 a
5,7	38,20 b	21,55 b	44,95 b
6,0	73,20 a	69,90 a	10,00 a
6,5	66,60 ab	49,90 ab	29,95 ab
<b>Média</b>	<b>61,80</b>	<b>49,14</b>	<b>20,30</b>
<b>IV</b>	<b>5,69</b>	<b>6,34</b>	<b>7,28</b>

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

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Os valores de pH normalmente utilizados nos cultivos *in vitro* são em torno de 5,6 a 5,8, pois nesses valores todos os íons estão em solução e são facilmente disponibilizados para as células. Além disso, esses valores são próximos daquele que, em condições naturais, envolvem as células vegetais (CANHOTO, 2010). Para as culturas propagadas *in vitro*, o pH em torno de 5,7 é o mais utilizado (XAVIER et al., 2009), porém, no presente estudo, este valor de pH não foi favorável à sobrevivência *in vitro* dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata*. Diante do resultado obtido, recomenda-se a repetição do experimento afim de dirimir dúvidas em relação a sua veracidade.

Para o estabelecimento *in vitro*, assim como foi observado para a sobrevivência, o valor de pH ajustado para 5,7 proporcionou o pior resultado (média de 21,55%) (Tabela 9). Contudo, novamente da mesma maneira, essa média

somente diferiu daquela que resultou do cultivo em pH 6,0 (69,90%), a qual não diferiu das restantes (Tabela 9).

Explantos de *Drosera intermedia* (Orvalhinha) cultivados *in vitro* em valores de pH 3,7 ou 4,7 produziram plantas de pequeno porte, enquanto que aqueles cultivados em 6,7 ou 7,7 produziram plantas mais espessas e robustas (REJTHAR et al., 2014). Já em *Pfaffia glomerata* (Ginseng-brasileiro), o ajuste do pH para 6,0 proporcionou as melhores condições de crescimento da espécie cultivada *in vitro* quando comparadas aos valores de 3,5, 5,0 ou 7,5 (NICOLOSO et al., 2008).

Nas folhas de alguns brotos caulinares de *Arbutus unedo* (Medonheiro), valores ácidos de pH (4,5 e 5,0) ocasionaram uma redução na área foliar e clorose, sugerindo que essa faixa de pH pode interferir na disponibilidade de nutrientes para a planta ou que limita, de alguma forma, a sua absorção do meio nutritivo (TRIGIANO; GRAY, 2011). De maneira genérica, valores de pH abaixo de 4,5 podem ocasionar redução na polimerização do ágar após a autoclavagem, o que resulta em menor gelificação do meio nutritivo (CALDAS et al., 1990). No presente experimento foi observada essa reação nesse valor de pH (4,5), em que o meio nutritivo não apresentou o estado semi-sólido usual.

Para a contaminação fúngica, os valores de pH 4,5; 5,0 e 6,0, proporcionaram os resultados mais favoráveis (médias de 10%; 6,6% e 10% respectivamente) (Tabela 9), os quais não diferiram entre si. Novamente o pH 5,7 resultou na maior contaminação observada (média de 44,95%), cuja média, entretanto, não diferiu daquela obtida com o ajuste ao pH 6,5, a qual, por sua vez, não diferiu das demais. O valor de pH é importante, pois este é quem pré-determina as condições ideais ou não para o desenvolvimento de micro-organismo. A grande maioria dos fungos desenvolvem-se substancialmente numa faixa de pH superior a 4,5 (SOARES, 1992).

De acordo com Carlile et al. (2001), fatores como valores de pH, temperatura e oxigênio podem influenciar no crescimento fúngico dos cultivos *in vitro*. O pH do meio nutritivo, adequado para os diferentes fungos, varia entre 4,0 a 9,0, enquanto a temperatura ótima para a sua proliferação varia entre 25 e 30°C.

#### **4.5.3 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.**

Houve efeito significativo da concentração de sacarose para as variáveis sobrevivência ( $p=0,0033$ ), estabelecimento *in vitro* ( $p=0,0107$ ) e contaminação fúngica ( $p=0,0331$ ) (Tabela 10). Já para a contaminação bacteriana (média geral de 6,94%) e a oxidação fenólica (média geral de 25,00%), não foi verificado efeito significativo.

Obtiveram-se as maiores médias de sobrevivência dos segmentos nodais quando foram submetidos às concentrações na faixa de 10 a 40g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 10). O resultado mais desfavorável foi observado quando a sacarose não foi adicionada ao meio nutritivo (média de 8,33%), o qual, entretanto, não diferiu daquele registrado na presença de 50g L<sup>-1</sup> do carboidrato, que, por sua vez, não diferiu de nenhuma das médias obtidas. Esse resultado verificado na presença da máxima concentração testada de sacarose pode ter sido ocasionado por uma redução no metabolismo das culturas *in vitro* e/ou pela diminuição na absorção de nutrientes e água, haja vista que uma alta concentração de sacarose pode provocar um excessivo estresse osmótico, o qual pode reduzir a atividade metabólica *in vitro* (JO et al., 2009) e, também, pode provocar a diminuição na absorção de sais minerais e água, interferindo no crescimento da planta (FRÁGUAS et al., 2003; BESSON et al., 2010). De maneira semelhante ao que foi observado no presente estudo, concentrações de 20 ou 40g L<sup>-1</sup> de sacarose em meio nutritivo MS, proporcionaram maior sobrevivência e melhor desenvolvimento de plântulas de *Dendrobium nobile* (orquídea Olho-de-boneca) (KOSX, 2007).

Tabela 10 – Sobrevivência (%), estabelecimento (%) e contaminação fúngica (%), de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-mato) após a inoculação em diferentes concentrações de sacarose em meio ½MS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Concentrações de sacarose	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Contaminação fúngica (%)
0g L <sup>-1</sup>	8,33 b*	8,33 b	0,00 a
10g L <sup>-1</sup>	50,00 a	41,67 ab	8,33 ab
20g L <sup>-1</sup>	41,67 a	41,67 ab	8,33 ab
30g L <sup>-1</sup>	41,67 a	33,33 ab	8,33 ab
40g L <sup>-1</sup>	50,00 a	50,00 a	0,00 a
50g L <sup>-1</sup>	33,33 ab	16,67 b	33,33 b
<b>Média</b>	<b>33,50</b>	<b>31,94</b>	<b>9,72</b>
<b>IV</b>	<b>4,61</b>	<b>5,55</b>	<b>5,59</b>

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

Fonte: Autor. Santa Maria, RS, UFSM, 2016.

Em explantes de *Malus domestica* Borkh cv. Gala (Maçã), a ausência de sacarose provocou a morte ou o atrofiamento (RODRIGUES et al., 2006), corroborando com os dados obtidos no presente estudo. De maneira geral, para a propagação *in vitro*, a principal fonte de carboidratos que fornece energia para o crescimento e processos biossintéticos é a sacarose (FERREIRA et al., 2011). Ressalta-se que, na maioria dos trabalhos de micropropagação tem sido utilizados 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, conforme proposto originalmente por Murashige e Skoog (1962).

Para o estabelecimento *in vitro*, a concentração 40g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou o melhor resultado (Tabela 10), diferindo das médias obtidas com 50g L<sup>-1</sup> e da ausência do carboidrato, as quais, por sua vez, não diferiram das demais. Na maioria das espécies, a sacarose influencia fortemente o potencial morfogênico *in vitro* (AL-KHATEEB, 2008), favorecendo o desenvolvimento das plantas até uma determinada concentração, em que o crescimento e as respostas fisiológicas alteram-se em função do potencial osmótico do meio nutritivo (FLORES et al., 2013).

Outros estudos relataram que a adição de sacarose tem um efeito benéfico no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas (FARIA et al., 2006). Em *Cattleya violacea* (Orquídea), a ausência de sacarose ou a concentração de 40g L<sup>-1</sup> foram prejudiciais ao crescimento da planta, sendo que 27g L<sup>-1</sup> foi a que proporcionou o maior crescimento *in vitro* (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013). Já para o cultivo de *Cattleya loddigesii* (Orquídea), a concentração de 20g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio nutritivo apresentou maior eficiência no desenvolvimento *in vitro* de segmentos apicais e nodais (GALDIANO et al., 2013). Em *Tectona grandis* (Teca) foi verificado que a concentração de 18mg L<sup>-1</sup> de sacarose foi aquela que forneceu os melhores resultados para o cultivo *in vitro* da espécie (FERNANDES et al., 2013).

Para a contaminação fúngica (Tabela 10), a ausência de sacarose no meio nutritivo e a concentração de 40g L<sup>-1</sup> não apresentaram contaminantes fúngicos junto aos explantes. Entretanto, esses resultados não diferiram significativamente dos tratamentos mantidos na presença de 10, 20 ou 30g L<sup>-1</sup>. Por outro lado, a maior concentração testada de sacarose (50g L<sup>-1</sup>) resultou na maior média de contaminação fúngica (33,33%). A contaminação microbiana pode ocasionar significativas perdas de plantas cultivadas *in vitro* (KOZAI; KUBOTA, 2001), a qual pode ser potencializada pela presença da sacarose no meio nutritivo (ERIG; SCHUCH, 2005).

#### **4.5.4 Efeito de diferentes concentrações de ágar no desenvolvimento de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC.**

Não houve efeito significativo das diferentes concentrações de ágar para as variáveis sobrevivência (média geral 71,43%), estabelecimento (média geral 55,95%), contaminação fúngica (média geral 9,52%), contaminação bacteriana (média geral 15,48%) e oxidação fenólica (média geral 23,81%).

De maneira geral, o ágar é o agente gelificante mais comumente utilizado no meio nutritivo durante a fase de estabelecimento *in vitro* de várias espécies, assim como ocorre para *Eugenia involucrata*, sendo, cotidianamente utilizada nos cultivos *in vitro* dessa espécie, a concentração 7g L<sup>-1</sup> (STEFANEL, 2013; GOLLE, 2010). A quantidade de ágar utilizada no meio nutritivo deve ser suficiente para a sustentação dos explantes, tendo em vista que, meios nutritivos muito rígidos podem evitar o contato adequado entre o explante e os nutrientes necessários ao seu

desenvolvimento (BERRIOS et al., 1999). Adicionalmente, elevadas concentrações de ágar no meio nutritivo podem inibir a formação de brotos e reduzir a disponibilidade de água para as culturas *in vitro* (SELBY; HARVEY, 1989). Além disso, esse componente pode ser tóxico para algumas espécies, principalmente, quando apresenta baixo grau de pureza (CALDAS et al., 1990).

Na micropropagação de *Eugenia uniflora* (Pitangueira), a concentração de ágar utilizada é de 6g L<sup>-1</sup> (SOUZA et al., 2008), enquanto que segmentos nodais de *Eugenia pyriformis* (Uvaia) são cultivados *in vitro* contendo 7g L<sup>-1</sup> de ágar no meio nutritivo (NASCIMENTO et al., 2008). Já para *Gypsophila paniculata* (Mosquitinho) é empregada a concentração de 10g L<sup>-1</sup> de ágar no meio de multiplicação, possibilitando a produção de brotos de alta qualidade, sem o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos (RADMANN et al., 2001).

Por outro lado, o meio nutritivo sem ágar possui consistência líquida ou mais espessa quando adicionado em baixas concentrações. Havendo, neste caso, maior absorção de água pelos tecidos dos explantes quando cultivados em meio nutritivo mais líquido (WILLIAMS; LEOPOLD, 1989). Além disso, meios aquosos são mais homogêneos, não estabelecendo um gradiente de nutrientes que, normalmente, ocorre em meios semi-sólidos (PASQUAL et al., 2002). Porém, em meios mais líquidos ocorre, geralmente, a hiperhidricidade dos explantes, característica que surge devido ao excesso de água disponível no meio nutritivo sendo considerado um problema grave para diversas espécies cultivadas *in vitro* (PIATCZAK et al., 2005).

#### 4.6 CONCLUSÕES

A contaminação fúngica é controlada de maneira eficiente em segmentos nodais de *Eugenia involucreta* pela imersão subsequente em soluções de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e NaClO, na faixa de 2,0 a 3,0%.

A contaminação bacteriana é controlada eficientemente pela imersão subsequente em soluções de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e NaClO, ambos a 3,0%.

Elevadas médias de sobrevivência *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucreta* submetidos aos tratamentos de desinfestação são observadas, exceto na presença de 2,5% de [Ca(ClO)<sub>2</sub>] e 2,0% de NaClO e na ausência de agentes desinfestantes.

O estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata* é favorecido pelos tratamentos de desinfestação superficial que empregam imersão em soluções a 3,0% de  $[\text{Ca}(\text{ClO})_2]$  e 2,0% ou 2,5% de  $\text{NaClO}$ .

As menores médias de sobrevivência *in vitro* é observada em pH 5,7 (38,20%), a qual, no entanto, não difere significativamente daquelas observadas com valores de pH 4,5, 5,0 e 6,5, exceto quando o pH é ajustado para 6,0 (73,20%).

A menor média de estabelecimento *in vitro* é observada em pH 5,7 (21,55%), a qual, no entanto, não difere significativamente daquelas observadas com valores de pH 4,5 e 6,5, exceto quando o pH é ajustado para 5,0 (59,60%) e 6,0 (69,90%).

A maior média de contaminação fúngica é observada em pH 5,7 (44,95%), a qual, no entanto, não difere significativamente daquela observada com valor de pH 6,5 (29,95%).

As maiores médias de sobrevivência *in vitro* dos segmentos nodais ocorrem na faixa de 10 a 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose (41,67 a 50%).

Os resultados mais desfavoráveis para o estabelecimento *in vitro* são observados na ausência ou a 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

O resultado mais desfavorável para a contaminação fúngica é observado na presença de 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A contaminação bacteriana e a oxidação fenólica não são afetadas pelo valor de pH nem pela concentração de sacarose do meio nutritivo.

As concentrações de ágar não afetam a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro*, tampouco a contaminação microbiana e a oxidação fenólica de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* cultivados em meio nutritivo MS reduzido à metade da concentração de sais.

## CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho fornece contribuições relevantes sobre a qualidade sanitária, física e fisiológica de lotes de sementes e para a propagação *in vitro* de *Eugenia involucrata* De Candolle a partir de explantes de origem seminal.

Inicialmente, em relação às sementes de *Eugenia involucrata* foi verificado um alto teor de água após 10, 51 e 180 dias da coleta, confirmando, assim, tratar-se de uma espécie recalcitrante. As sementes apresentam variações quanto aos aspectos biométricos, contudo, sugere-se a repetição das análises em um número maior de anos. Observou-se, também, elevada incidência de micro-organismos associados às sementes, com implicações na sua qualidade fisiológica. O papel filtro não se mostrou adequado como substrato para a germinação das sementes da espécie, porém, os substratos entre vermiculita e entre areia e vermiculita proporcionaram elevadas porcentagens médias de emergência de plântulas. Somente o último, porém, propiciou desenvolvimento da parte aérea. Estudos adicionais sobre o possível efeito dos teores de potássio e magnésio presentes na vermiculita são necessários.

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, os agentes desinfestantes testados diminuíram significativamente a contaminação fúngica nos explantes, recomendando-se a utilização de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  a 3,0% combinado a  $\text{NaClO}$  a 2,0%. O pH ajustado para 6,0 é recomendado para o estabelecimento *in vitro* dos explantes, haja vista que o valor de 4,5 dificulta a gelificação do meio nutritivo. Pode-se utilizar  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $4\text{g L}^{-1}$  de ágar durante a fase de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*. Estes resultados demonstram que é possível reduzir consideravelmente o custo de produção *in vitro* de mudas, com a diminuição das concentrações de sacarose e ágar no meio nutritivo.

Face ao exposto, sugere-se a realização de estudos adicionais visando obter resultados ainda mais promissores para a produção *in vitro* de mudas de *Eugenia involucrata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, O.T. et al. 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**, São Paulo, v. 13, n. 1, 2001.
- ALBUQUERQUE, MC de F. et al. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de saguaraji (*Colubrina glandulosa* Perk. - Rhamnaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 346-349, 1998.
- AL-KHATEEB AA. Regulation of *in vitro* bud formation of data palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. **Bioresource technology**, 2008.
- ALMEIDA, M. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, New York, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.
- ALVES, E. U. et al. Influência do tamanho e da procedência de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. sobre a germinação e vigor. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n. 6, p. 877-885, 2005.
- ALVES, E. U. et al. Substratos para testes de emergência de plântulas e vigor de sementes de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 69-82, 2008.
- ANDRADE et al. Aspectos biométricos de frutos e sementes, grau de umidade e superação de dormência de jatobá. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 2, p. 293-299, 2010.
- ANDRADE, A. C. S. et al. Tamanho mínimo e preparo da amostra na determinação do grau de umidade de sementes de *Parkia multijuga* Benth. (Leguminosae – Mimosoideae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 203-207, 2001.
- ARAÚJO, E. C. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 104-109, 2004.
- AVILA et al. Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 61-68, jan.-mar., 2009.
- BACKES, A.; IRGANG, B. Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico. Porto Alegre: **Pallotti**, 2002.
- BARBEDO, C. J. et al. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 184-188, 1998.

- BARBOSA, J.M.; BARBOSA, L.M. Avaliação dos substratos, temperaturas de germinação e potencial de armazenamento de sementes de três frutíferas silvestres. **Ecossistema**, v.10, n.1, p.152-160, 1985.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustred genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.
- BARROSO, G. M. et al. **Frutos e sementes**: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 443 p. 1999.
- BARRUETO CID, L. P. El **cultivo de tejidos**. In: PRIETO, H.; JORDAN, M.; BARRUETO CID, L.P.; CORDEIRO, M.C.R.; DURZAN, D.J. Biotecnologia vegetal. Santiago-Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuária. 2005. p. 35.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. **London: Academic Press**, 1998.
- BENNETT, M.A. Determination and standardization challenges of vigor tests of vegetable seeds. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.11, n.3, p.58-62, 2001.
- BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. Proceedings. Passo Fundo: **EMBRAPA; ABRATES**, 1987.
- BERRIOS, E.F., GENTZBITTEL, L., SERIEYS, H., ALIBERT, G., SARRAFI, A. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 59: 65-69. 1999.
- BESSON, J.C.F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, 8:9-13. 2010.
- BEVILACQUA, C. B. et al. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.761-766, mai, 2011.
- BEZERRA, A.M. et al. Germinação e desenvolvimento de plântulas de melão-de-são-caetano em diferentes ambientes e substratos. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.33, n.1, p.39-44, 2002.
- BLACK, M.; PRITCHARD, H. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Cabi, 2002.
- BOOTH, E. The genus *Fusarium* (Kew). **Commonwealth Mycology Institute**. 1971.
- BRASIL - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: **SNDA/DNDV/CLAV**, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília: SDA/CGAL, 2013. 98p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365p.

BRASIL. Regras Para Análise de Sementes. **Brasília: Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal**, 1996.

BRAUWERS, L. R.; CAMARGO, IP de. Efeito de substratos sobre o desenvolvimento de mudas de paratudo e sucupira preta. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n., 2000.

BRÜNING, F. O. et al. Padrões para germinação, pureza, umidade e peso de mil sementes em análises de sementes de espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 193-202, abr.-jun., 2011.

BUENO, M. I. M. S. Determinação de traços de mercúrio em fluxo contínuo, por emissão atômica em plasma de Hélio em baixa potência. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo. **Tese de Doutorado**, 109p. 1990.

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

CALDAS, L.E. et al. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.E. (ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP-EMBRAPA-CNPH, 1990.

CANELA, M. C. **Determinação de mercúrio**. UNICAMP, 1995.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Univ. de Coimbra, 2010.

CARDOSO, D. L. et al. Diversidade genética e parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de sementes em germoplasma de mamoeiro1. **Ceres**, v. 56, n. 5, 2009.

CARLILE, M. J. et al. The fungi. 2. ed. London: **Academic Press**, 2001.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: Ciência, Tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: **FUNEP**, 2000.

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

CARVALHO, W.L.; MUCHOVEJ, J.J. Fungos associados a sementes de essências florestais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.15, n.2, 1991.

CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. Third edition. Enfield: Science Publishers. 2009.

CHEROBINI, E. A. I. **Avaliação da qualidade de sementes e mudas de espécies florestais nativas**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 2006.

COUTINHO, W.M. et al. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por semente. **Revista Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 552- 555, 2000.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642. 2004.

DA LUZ, C. et al. Comparação de métodos diretos para determinação do teor de água de sementes. **Revista Brasileira de Sementes, Brasília**, v. 15, n. 2, p. 157-163, 1993.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation: technology and application. **Dordrecht: Kluwer Academic Press**, 1991.

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

DELGADO, L. F. **Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia***. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. 106p. 2006.

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

DE OLIVEIRA, J. D., et al. "Métodos para detecção de fungos e asepsia de sementes de *Schizolobium amazonicum* (Caesalpinioideae)= Methods to detection of fungi and asepsis of *Schizolobium amazonicum* (Caesalpinioideae) seeds." **Bioscience Journal** 28.6 (2012).

DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 139-145, 1985.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. Experiment in plant tissue culture. 3rd ed. **New York: Cambridge University Press**, 1995.

DONINI, L.P. et al. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

- DUTRA, T. R. et al. Emergência e crescimento inicial da canafístula em diferentes substratos e métodos de superação de dormência. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 65-71, 2012.
- ERIG, A C.; FORTES, G. R. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 577-582, 2002.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh) cvs. Galaxy, Maxigala, Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**: 221-227. 2003.
- FANTI, S. C.; PEREZ, S. C. J. G. A. Influência do substrato e do envelhecimento acelerado na germinação de olho-de-dragão (*Adenanthera pavonina* L.. Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.2, p.135 141, 1999.
- FANTINEL, V. S. **Fungos associados às sementes de goiaba-serrana: detecção, efeitos na qualidade das sementes, transmissão para plântulas e controle.** 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.
- FARIA G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N.E. Bronw. **Revista brasileira de Fruticultura**, 28: 267-270. 2006.
- FELIPPI M.; MAFFRA C. R. B.; CANTARELLI E. B., ARAÚJO, M. M., LONGH, S. J. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 22, n. 3, p. 631-641, 2012.
- FENNER, M. Seed ecology. London: **Chapman & Hall**, 1993. 151 p.
- FERNANDES, D. A. et al. Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* Lf. **Revista de Agricultura**, v. 88, n. 3, p. 218-228, 2013.
- FERRAZ, I. D. K.; CALVI, D. P. Teste de Germinação. In: LIMA JUNIOR, M. J. V. (Ed.). Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais. Manaus: UFAM, 2010. p. 55-110.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FERREIRA, S.N.A. Efeito do tamanho da semente e do substrato sobre a emergência e vigor das plântulas de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10, 1989, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1989. p.33-40.

FERREIRA, W. D. et al. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 47:420–427. 2011.

FIGLIOLIA, M. B., et al. "Controle de qualidade de sementes florestais: propostas de parâmetros técnicos." PIÑA-RODRIGUES, FCM; FREIRE, JM; LELES, PSS; BREIER, TB **Parâmetros técnicos para a produção de sementes florestais**. Seropédica: UFRRJ: 143-187. 2007.

FIGLIOLIA, M.B. et al. Análise de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PINÃ- RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Eds.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Editora, 1993, p.137-74.

FIGLIOLIA, M.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Considerações práticas sobre o teste de germinação. In: Manual técnico de sementes florestais. **IF Série Registros**, São Paulo, n.14, p. 45-59, 1995.

FILGUEIRA, F. A. R.; Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças. Fernando Antônio Reis Filgueira – Viçosa: **UFV**, 2000. p. 189.

FONSECA, S.; FREIRE, H. Sementes recalcitrantes: problemas na pós colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

FOWLER, J. A. P.; CARPANEZZI, A. A. **Influência do tipo de substratos e de temperaturas na germinação de sementes de juquiri (*Mimosa regnelii* Benth)**. Colombo: Embrapa-CNPf, 1997. p.1-2. (Embrapa-CNPf: Comunicado Técnico, 16).

FLORES, R. et al. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, 2013.

FRÁGUAS, C.B. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Ceres**, 50:719-726. 2003.

FRANZON, R. Frutíferas nativas do sul do Brasil. In: Simpósio nacional nacional do morango, 2; Encontro de pequenas frutas e frutas nativas do mercosul, 1., 2004, Pelotas. Palestras. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. (**Embrapa Clima Temperado**. Documentos, 124) p.251-264.

FRAZÃO, D. A. C et al. Tamanho de semente de guaraná e sua influência na emergência e no vigor. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 81-91, 1983.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, p. 127-134, 2013.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Sucrose concentrations *in vitro* development and acclimatization of *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias (Londrina)**, v. 34, n. 2, p. 583-591, 2013.

GAMBORG, O.L. et al. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, 1968.

GEORGE, E.F. The components of tissue media. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Edington, v.9, p.273-343, 1993.

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

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

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

GOLLE, D.P.; et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, ago, 2009.

GONÇALVES, L. G. V. et al. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, 36(1): 31-40. 2013.

GOULART, A. C. P. **Fungos em Sementes de Soja: Detecção e Importância.** Dourados: EMBRAPA-CPAO, 58p. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 11). 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260. 1998.

GREENWAY, M.B. et al. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.48, n.4, p.403-410. 2012.

GUIMARÃES, P.T.C. et al. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação *in vitro* de samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.309-316. 1999.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. C. **Cultura de embriões.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/Embrapa CNPq, 1990. p. 71-85.

IOSSI, E. et al. Efeitos de substratos e temperaturas na germinação de sementes de tamareira-anã (*Phoenix roebelenii* O'Brien). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 63-69, 2003.

ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Zürich, 2004. 180 p.

JAIN, S. M. Biotechnology of industrially important tree species in developing countries. In: WATANABE, K. N.; PEHU, E. Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity. **Austin, Texas, USA: Academic Press**, 1997.

JO, E. A. et al. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, n. 3, p.307-315, 2009.

JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

KOSX, D. A. **Efeito de diferentes tipos de meio de cultura e concentrações de sacarose no desenvolvimento de um híbrido de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes. 2007.

KOZAI, T. **Micropropagation under photoautotrophic conditions**. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds). Micropropagation-technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.

KRAMER, P, J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.

LAL, S.P.; KAPOOR, J.N. Succession of fungi in wheat and maize during storage. **Indian Phytopathology**, v.32, 1979.

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

LEIFERT, C., J. Y. et al. **Contaminants of plant tissue and cell cultures**. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1991a.

LEITE, L.L.; CORADIN, L. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. Plantas para o futuro – Região Sul. Introdução. Pp. 19-24. In: L. Coradin; A. Siminski, A. Reis. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. Plantas para o futuro – Região Sul. **Biodiversidade 40**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2011.

LIMA et al. Temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* TUL. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 2 p. 216 - 222, 2011.

- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, **Washington**, v. 30, 1981.
- LONGHI, R. A. Cerejeira. In: LONGHI, R.A. Livro das árvores: árvores e arvoretas do sul. Porto Alegre: **LP&M**, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Ltd., São Paulo, Brasil, 2002.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 5 ed, vol. 1, **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2008.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 1992.
- LORENZI, H. et al. *Eugenia involucrata* DC. In: Lorenzi, H. et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. **Nova Odessa: Plantarum**, 2006.
- MACHADO, C. F. et al. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson). **Cerne**, v.8, n.2, p.17-25, 2002.
- MACHADO, J.C. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. **Lavras: ESAL/FAEPE**, 1988. 107p
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MARCUZZO, S. F. Cerejeira-do-mato. In: MARCUZZO, S. F. 30 árvores estratégicas da Mata Atlântica: por um verde mais vivo. **Osório: Prefeitura Municipal de Osório**, 1998.
- MARTINS et al. **Estágio de colheita e substrato para o teste de germinação de sementes de Ipê (*Tabebuia chryso-tricha* (Mart. Ex DC.) Standl.)**. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.32, n.1, p.27-32, 2008.
- 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.
- MELO, M. G. G et al. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.
- MENDES, S. S. et al.. Qualidade sanitária de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit armazenadas em câmara fria. **Natural Resources**, Aquidabã, v.1, n.1, p.15-22, 2011.

MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v.71, 1987.

MINAMI, K.; PUCHALA, B. Produção de mudas de hortaliças de alta qualidade. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p. 162- 163, 2000.

MITTAR, R.K. Studies on the mycoflora and its control on the seeds of some forests trees: III Eucalyptus hybrid. **Malaysian Forester**, v. 49, 1986.

MONTARROYOS, A.V.V. **Contaminação in vitro**. ABCTP Notícias, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

MORAES, A. M. et al. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Rev. Tecnol. Ciên. Agropec.** João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 39-44, 2007.

MUNIZ, M. et al. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 1, p.140-146, 2007.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. **Plant Phys.** V. 25. 1974.

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

NAGAO, E.O. et al. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31. 1994.

NASCIMENTO, A. C. et al. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26. 2008.

NASCIMENTO, P. V. et al. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.

NAUTIYAL, A.R.; PUROHIT, A.N. Seed viability in sal. II. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.13, p.69- 76, 1985.

NICOLOSO, F.T. et al. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2059-62, 2008.

NOGUEIRA et al. Emergência e desenvolvimento inicial de plântulas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. em função de diferentes substratos. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 17-24, janeiro-abril, 2012.

OLIVEIRA et al. Caracterização morfológica de sementes e plântulas e germinação de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 643-653, jul.-set., 2012.

OLIVEIRA, E. de C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Propostas para a padronização de metodologias em análise de sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes, Brasília**, v. 11, n. 1/2, p. 3, 1989.

OLIVEIRA, L. C. et al. Emergência do baruzeiro sob ambientes protegidos e substratos. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 1, n. 1, p. 10-16, jul./set. 2014.

OLIVEIRA, O. S. **Tecnologia de sementes florestais: espécies nativas**. Curitiba: Imprensa Universitária, 2012.

ORO, P et al. Maturação fisiológica de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess e *Eugenia involucrata* DC. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 11-18, 2012.

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, 2011.

PAIVA, R. et al. **Espécies frutíferas com potencial econômico: avanços no processo de propagação**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, 2002.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. In **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** (Vol. 12, No. Edição Especial, pp. 56-69). Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal. 2000.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de Tangerineira ‘Poncã’ em função do pH e da concentração de ágar. **R. bras. Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 199-202, set-dez, 2002.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, v.42, p.432-443, 1995.

PERIOTTO, F. **Aspectos da germinação de sementes, da emergência de plântulas e da morfologia dos frutos e sementes de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. BERG (Myrtaceae)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 2008.

PETERSON, J.R. & COOPER, P.G. Some considerations of water in the germination test. **Seed Sci. & Technol.**, 7:329-340, 1979.

PIATCZAK, E.; WIELANEK, M.; WYSOKINSKA, A. Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, p. 431-437, 2005.

PICOLOTTO, L. et al. "Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira." **Scientia agraria** 8.1 (2007): 19-23.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyjhoff, 344p. 1987.

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

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; AGUIAR, I. B. Maturação e dispersão de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coords.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Abrates, 1993.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B.; PEIXOTO, M.C. Tecnologia de sementes: Testes de qualidade. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação – do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265-282.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; VIEIRA, J.D. Teste de germinação. In: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 70-90.

POPINIGIS, F. Fisiologia de sementes. Brasília: **Agriplan**, 1977.

PRADO, A. P. **Aspectos autoecológicos e silviculturais de *Eugenia involucrata* DC**. Dissertação de mestrado. 2009.

RABAIOLLI, S. M. S. **Sementes e miniestaquia em *Nectandra megapotamica* (SPRENG.) MEZ. e sementes e micropropagação em *Handroanthus chrysotrichus* (MART. EX DC.) J. MATTOS**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 100f. 2014.

RADMANN, E. B. et al. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L.. **Rev. Bras. De Agrociência**, v.7 n. 3, p. 171-175, set-dez, 2001.

RAMOS, J.D. et al. Produção de mudas de plantas frutíferas por semente. **Informe Agropecuário**, 23 (216):64-72, 2002.

RAMOS. N. P. et al. Germinação de sementes de *Zeyhera tuberculosa* (Vell.) Bur. (ipê- felpudo). **Revista Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 7, n. 1, p. 41-52, 2003.

REGO, S. S. **Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg e *Myrceugenia gertii* Landrum – Myrtaceae**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2008.

REIS, I. N. R. S. et al. Indução *in vitro* de brotos em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 21-27, 2008.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Secretaria da Agricultura e Abastecimento**. 1988.

- REJTHAR, J. et al. *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* as influenced by cytokinins, pH, sucrose, and nutrient concentration. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 6, p. doi: 10.9755/ejfa. v26i6. 18022, 2014.
- RIBEIRO, J.E.L.S. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.
- ROCHA, E. O. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg.** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- RODRIGUES, M.M. et al. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.171-173. 2006.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abix* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, v.58, p.131- 140, 1971.
- ROTEM, J. The genus *Alternaria*. **St. Paul**: The American Phytopathological Society, 1995. 326 p.
- SANCHOTENE, M.C.C. Frutíferas nativas úteis na arborização urbana. 2ed. Porto Alegre: **SAGRA**, 1989.
- SANTOS, A.F.; MEDEIROS, S.C.A.; SANTANA, Q.L. D. Fungos associados às sementes de espécies arbóreas da mata atlântica. **Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo**, n.42, 2001.
- SANTOS, M. M. **Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas, germinação e micropropagação de *Terminalia fagifolia* e *Terminalia argentea* (Combretaceae).** Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. 61f. Dissertação de mestrado. 2014.
- SCHEURER, M. et al. **Desinfestação de segmentos nodais de Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.): concentrações e agentes desinfestantes.** Anais da XXX Jornada Acadêmica Integrada. Universidade Federal de Santa Maria. 2015.
- SCHUCH, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**,35(4), 961-965. 2005.
- SCHUCH, L.O.B. et al. Crescimento em laboratório de plântulas de aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) em função do vigor das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.229-234, 1999.
- SELBY, C., LEE, R.; HARVEY, B.M.R. The effects of culture medium rigidity on adventitious bud production and tissue vitrification in needle cultures of sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.), **New phytologist**. 113:203-210. 1989.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. **Guaíba: Agropecuária**, 2001.

SILVA et al. Desempenho de plantas isoladas de soja, biometria e qualidade fisiológica das sementes. **Revista da FZVA Uruguaiana**, V.19, n.1, p.1-9. 2013.

SILVA, C.V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, 2005.

SILVA, C.V.; et al. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.2, 2003.

SILVA, L.M.M. & AGUIAR, I.B. Efeito dos substratos e temperaturas na germinação de sementes de *Cnidoscopus phyllacanthus* Pax & K. Hoffm. (Faveleira). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 9-14, 2004.

SILVA, R. P. et al. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.23, n.2, p.377-381, ago. 2001.

SINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. **Hortscience**, v.19, p.227-228, 1984.

SKIRVIN, R. M. et al. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, n. 4, p. 292-294, 1986.

SMIDERLE, O. S.; MINAMI, K. Emergência e vigor de plântulas de goiabeira em diferentes substratos. **Revista Científica Rural**, v. 6, n. 1, p. 38-45, 2001.

SOARES, A. G.; FREIRE-JÚNIOR; SIQUEIRA, R. S. Curso de higiene e sanificação Mna indústria de alimentos (Apostila). Rio de Janeiro, **Embrapa – CTAA**, 1992. 97 p.

SOARES, I. D. **Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Psidium rufum* DC. (Myrtaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2015.

SOARES, D. J. et al. Diversidade fúngica em sementes de mamoneira oriundas de Pindamonhangaba-SP. In: **Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso**. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 4.; Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 1., 2010, João Pessoa. Inclusão social e energia: anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

SOBRAL, M. *Eugenia involucrata* DC. In: SOBRAL, M. A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Unisinos**, 2003.

SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul**, Brasil. RiMa, 2006.

SOUZA, S. C. A, et al. Biometria de frutos e predação de sementes de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn. (Fabaceae - Caesalpinioideae) provenientes de três localidades do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 864-866, jul. 2007.

SOUZA, J. A. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2046-2048, out, 2008.

STEFANEL, C. M. **Ocorrência e incidência de gêneros fúngicos em sementes e desinfestação superficial de segmentos nodais de Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.)** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Maria. 2013.

STRAPASSON, M. et al. Fungos Associados às Sementes de Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.45, jul./dez. 2002.

TABARELLI, M. et al. Variation of seed dispersal spectrum of woody plants across a rainfall gradient in northeastern Brazil. **Journal of Arid Environmental**, [S.I.], v. 53, p. 197-210, 2003.

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus* spp.** 67 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

TERMIGNONI, R.R. Cultura de tecidos vegetais. Porto Alegre: **Ed. UFRGS**, 2005.

THORPE, T. A. et al. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPACNPq, 1990, p.37-70.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Eds.). **Plant tissue culture, development, and biotechnology**. CRC Press. 2011.

VALADARES et al. Germinação, desenvolvimento de plântulas e teste de tetrazólio em *Poecilanthe parviflora* Bentham (Fabaceae - Faboideae). **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.39 - 47, 2009.

VALE, L. S. et al. Efeito de diferentes misturas de substrato e tamanho de recipientes na produção de mudas mamoeiro. In: BARBOSA, J. G.; MARTINEZ, H. E. P.; PEDROSA, M. W. Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato. Viçosa: **UFV**, 2004. p. 385.

VASIL, V.; HILDEBRANDT, A. C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 889-892, 1965.

WANG, T. S.; HU, S. Z.; KORN, D. DNA primase from KB cells. Characterization of a primase activity tightly associated with immune affinity purified DNA polymerase-alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 3, p. 1854-1865, 1984.

WATANABE, K. N.; RAMAN, K.V. Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. In: WATANABE, K. N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin, Texas, U.S.A.: Academic Press, 1997.

WENDLING, I. et al. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130). 2006.

WETZEL, M. M. V. S. Patologia de Sementes. Campinas: **Fundação Cargill**, 1987.

WIELEWICKI, A. P. et al. Proposta de Padrões de Germinação e Teor de Água para Sementes de Algumas Espécies Florestais Presentes na Região Sul do Brasil. **Revista brasileira de sementes**, v. 28, n. 3, p. 191-197, set./dez. 2006.

WILLAN, R.L. **Guia para la manipulación de semillas forestales com especial referencia a los trópicos**. Roma: Estudio FAO Montes - Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion, 1991.

WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, v. 89, p.977-981, 1989.

XAVIER, A. et al. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) Biotecnologia florestal. Viçosa: **Ed. UFV**, 2007.

XAVIER, A. et al. **Silvicultura clonal - Princípios e Técnicas**. 2 ed., Viçosa: UFV, 2013. 280p.