

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

**ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO,
CALOGÊNESE, ORGANOGENESE *in vitro* E
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM
ACESSOS DE *Eugenia involucrata* DC.**

TESE DE DOUTORADO

Diego Pascoal Golle

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO, CALOGÊNESE,
ORGANOGENESE *in vitro* E ANÁLISE DA DIVERSIDADE
GENÉTICA EM ACESSOS DE *Eugenia involucrata* DC.**

por

Diego Pascoal Golle

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil

2010

G626e	Golle, Diego Pascoal, 1981- Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese <i>in vitro</i> e análise da diversidade genética em acessos de <i>Eugenia involucrata</i> DC. / Diego Pascoal Golle. - 2010. 159 f. ; il. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2010. "Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lia Rejane Silveira Reiniger" 1. Engenharia florestal 2. Cultura de tecidos 3. Marcadores moleculares 4. Biotecnologia florestal 5. <i>Eugenia involucrata</i> DC. I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II. Título CDU: 630*228
-------	--

Ficha catalográfica elaborada por
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO, CALOGÊNESE,
ORGANOGENESE *in vitro* E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA
EM ACESSOS DE *Eugenia involucrata* DC.**

elaborada por
Diego Pascoal Golle

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Leandro Vieira Astarita, Dr. (PUCRS)

Márcia Wulff Schuch, Dr^a. (UFPeI)

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM)

Maristela Machado Araújo, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a concretização desta importante etapa em minha vida.

À minha noiva, Graciela Sasso Fiuza, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e companheirismo em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais Ruy e Inês Golle, pelas palavras de afeto, pela constante torcida e pelo amor dedicado.

Aos meus sobrinhos, com muito amor, André, Gabi, Rafa e Isa, por tornarem todos os momentos especiais.

À minha irmã Andréa e meu cunhado Beto, pelo constante incentivo.

À minha amiga e orientadora, professora Dr^a. Lia Rejane Silveira Reiniger, por seu exemplo de profissionalismo e caráter, por todo o aprendizado profissional e pessoal que me proporcionou e, principalmente, pela amizade durante todos estes anos e que, com certeza, perdurará. Faltam palavras para que eu possa expressar toda a minha gratidão.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização do doutorado; bem como aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, pelo aprendizado e convivência.

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

À minha co-orientadora, Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, pelo incentivo, aprendizado, amizade e convivência.

À professora e co-orientadora, Dr^a. Maristela Machado Araújo, pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Ao professor Dr. Rogério Antônio Bellé, por todas as informações transmitidas, essenciais para a viabilização de diversas etapas dos experimentos.

À professora Zaida Inês Antonioli, pelo aprendizado e auxílio fundamental para a realização das análises moleculares.

À professora Dr^a. Nerinéia Dalfollo Ribeiro (UFSM) e ao Dr. Alan Cristiano Erig (MAPA) pela participação na qualificação da tese; pelas participações na qualificação e na banca de defesa, aos professores Dr^a. Lia Rejane Silveira Reiniger (UFSM), Dr. Leandro Vieira Astarita (PUCRS) e Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz; e pela participação na banca de defesa à Dr^a. Márcia Wulff Schuch (UFPel), Dr^a. Maristela Machado Araújo (UFSM). Agradeço pelas valiosas contribuições.

À minha querida colega de laboratório, Aline Ritter Curti, por todo o empenho e ajuda. Teu profissionalismo e amizade foram fundamentais em cada passo deste trabalho. Ao meu colega Enrique, pela amizade e parceria nos trabalhos de laboratório. Ao meu colega Daniel, pelo auxílio tantas vezes prestado, pela amizade e bate-papo. À minha amiga Carol Bevilaqua, pela amizade, auxílio e por tantas vezes lembrar que tudo vai dar certo. Ao colega de laboratório Márcio Navroski, pela amizade e auxílio, e à colega Aline Paim, pela amizade.

À amiga Dr^a. Jana Koefender, pela amizade, e à Dr^a. Ana Paula Pellegrino, que me auxiliou nos primeiros passos na cultura de tecidos.

A todos os meus amigos, colegas e professores que me incentivaram e possuíram papel fundamental em todos os momentos de minha graduação, mestrado e doutorado.

À secretária do PPGEF, Tita; por todo o apoio, amizade e auxílio.

À Dr^a. Maria do Carmo Bassols Raseira, da Embrapa/Cpact, pela ajuda, informações e recepção para a coleta de amostras de cerejeira do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa.

Aos que auxiliaram nas coletas em campo: Graciela Fiuza, Angélica Felippi, Felipe Corrêa, Marciele Felippi; Aline Curti, Clarice Maboni, Alceu Abílio Piovesan; que permitiram que parte deste trabalho fosse realizado.

Só tenho a dizer: obrigado!

“NÃO SABENDO QUE ERA IMPOSSÍVEL, FOI LÁ E FEZ!”

JEAN COCTEAU

“SE PUDE VER MAIS LONGE, FOI PORQUE ME APOIEI SOBRE O OMBRO DE GIGANTES!”

ISAAC NEWTON

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO, CALOGÊNESE, ORGANOGÊNESE *IN VITRO* E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Eugenia involucrata* DC.

AUTOR: DIEGO PASCOAL GOLLE

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC.) é uma espécie florestal brasileira com diversas características de interesse econômico, especialmente nos setores de silvicultura, fruticultura, paisagístico, ambiental e medicinal. No entanto, possui sementes recalcitrantes, as quais começam a perder sua viabilidade após duas semanas de coleta. Além disso, não existem informações sobre a variabilidade genética desta espécie. Este trabalho objetivou desenvolver metodologias para o cultivo *in vitro* de *E. involucrata* e avaliar a variabilidade genética existente em acessos desta espécie mantidos *in situ* e *ex situ*. Na propagação por técnicas de cultura de tecidos, avaliou-se a desinfestação de explantes, bem como foram estudados aspectos de crescimento e desenvolvimento *in vitro* após a inoculação de segmentos apicais e nodais em diferentes meios nutritivos. Também foi avaliado o efeito de diferentes fitorreguladores na otimização da multiplicação *in vitro*. Para a calogênese *in vitro*, foram avaliados métodos de desinfestação superficial, formas de inoculação dos explantes, introdução de reguladores de crescimento, os efeitos de diferentes regimes luminosos, do uso de antioxidantes e de citocininas. Foi analisada a formação de calos sobre diversos aspectos de desenvolvimento. Testaram-se diferentes métodos para a extração de DNA genômico da espécie, utilizando-se diferentes tecidos vegetais. Realizou-se a análise de acessos oriundos de populações mantidas *in situ* e *ex situ* por meio do uso de marcadores RAPD. Como resultados, foi possível estabelecer cultivos assépticos da espécie, além disso, o estabelecimento *in vitro* pode ser realizado com segmentos apicais e nodais, no entanto, segmentos nodais oferecem os melhores resultados. O meio $\frac{1}{2}$ MS é o mais adequado e auxilia na rizogênese, além de outros aspectos de desenvolvimento das plantas. A utilização de concentrações elevadas de TDZ associadas à ANA permite a multiplicação de brotos e o surgimento de gemas adventícias em segmentos nodais. GA₃ não promove o alongamento dos brotos e, em concentrações elevadas, apresenta-se tóxico. Para a calogênese *in vitro*, a melhor forma de cultivo é mantendo-se o explante em posição abaxial e na ausência de luz. Combinações entre auxinas e citocininas produzem os melhores índices de calogênese. O emprego da associação 2,4-D e TDZ promove a melhor formação de calos e de calos candidatos à embriogênese. É possível extrair DNA de boa qualidade a partir de folhas e câmbios de cerejeira, utilizando-se a maceração com o tampão de extração concentrado a 10%. A análise com marcadores moleculares RAPD mostrou-se eficiente na estratificação da variabilidade genética de acessos de cerejeira. Observou-se que a variabilidade está bem distribuída entre os acessos nas diferentes populações *in situ* e que, a população *ex situ* avaliada, não possui variabilidade satisfatória. Foi possível gerar informações consistentes que poderão auxiliar o cultivo e o planejamento de programas de melhoramento da espécie.

Palavras-chave: cultura de tecidos, marcadores moleculares, biotecnologia florestal.

ABSTRACT

Doctor Thesis
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

***IN VITRO* ESTABLISHMENT, MULTIPLICATION, CALLUS INDUCTION, ORGANOGENESIS, AND ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY IN *Eugenia involucrata* DC. ACCESSIONS**

AUTHOR: DIEGO PASCOAL GOLLE

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, february 26th 2010.

The cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) is a Brazilian forest species with traits of economic interest, especially in the forestry, horticulture, landscape, environmental and medicinal sectors. However, it has recalcitrant seeds, which begin to lose viability after two weeks of gathering. Moreover, doesn't known how its genetic variability is distributed. This study aimed to developed methodologies for *in vitro* culture of *E. involucrata* and evaluate the genetic variability in accessions maintained *in situ* and *ex situ*. *In vitro* propagation, besides desinfestation, we evaluated aspects of *in vitro* growth and development after the inoculation of the apical and nodal segments in different nutritive media. We also analyzed the effect of introduction of different growth regulators in the optimization of *in vitro* multiplication. For callus induction *in vitro* were evaluated methods of superficial desinfestation, ways of introduction of plant growth regulators, the effect of different light regimes, of the use of antioxidants and of the different cytokinins. The formation of callus on different aspects were evaluated. We tested different methods for extraction of genomic DNA from this specie using different plant tissues. We performed analysis of acess coming from populations maintained *in situ* and *ex situ* by the use of markers. It was possible to establish aseptic cultures of *E. involucrata*. The establishment *in vitro* can be accomplished with the apical and nodal segments, however, nodal segments offer the best results. The ½ MS is the most appropriate nutritive medium and helps in rooting. The use of high concentrations of TDZ associated with ANA enables shoot multiplication and the emergence of shoots from nodal segments. GA₃ does not promote the elongation of shoots and is toxic in high concentrations. Callus formation was obtained in leaf discs of *E. involucrata*. The best way to grow is maintaining the explants in abaxial position and in the dark. Combinations of auxins and cytokinins generate the highest percentage of callus formation. The association of 2,4-D and TDZ promotes better callus formation and callus candidates to embyogeneis. It is possible to extract good quality genomic DNA from *E. involucrata* leaves and cambia, using the maceration with the extraction buffer concentrate to 10%. Analysis with molecular markers was efficient in the stratification of genetic variability in accessions of cherry. It was observed that the variability is evenly distributed between the accessions in different *in situ* populations and that in the *ex situ* population assessed the variability is not satisfactory. It was possible to generate consistent information to assist in the cultivation and in planning of breeding programs of the species.

Key-words: tissue culture, molecular markers, forestry biotechnology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Efeito dos diferentes tempos de imersão de segmentos nodais de *E. involucrata* em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) sobre a porcentagem de contaminação bacteriana aos 21 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 40
- Figura 2** - Influência do tipo de explante na contaminação geral (aos 30 dias de cultivo) e na oxidação fenólica (aos 60 dias de cultivo) em *E. involucrata* DC. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 43
- Figura 3** - Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *E. involucrata* DC. Na figura “a” observa-se o estabelecimento inicial, após a desinfestação (21 dias); “b”, mostra o desenvolvimento inicial em segmentos apicais (7 dias); “c”, demonstra o desenvolvimento inicial das gemas em segmentos nodais (7 dias); “d”, apresenta o cultivo em meio com carvão ativado (60 dias); e, “e”, evidencia a rizogênese em segmento apical (seta com o número 1) e em segmento nodal (seta com o número 2), aos 60 dias de cultivo. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 48
- Figura 4** - Total de brotos emitidos em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. na ausência ou na presença (0,5 μ M) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M de thidiazuron (TDZ), aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 56
- Figura 5** - Comprimento de brotações emitidas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 μ M) de ácido naftalenoacético (ANA) e com as concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2009..... 58
- Figura 6** - Média de gemas adventícias emitidas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 μ M) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 60
- Figura 7** - Média de folhas emitidas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 μ M) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 61
- Figura 8** - Porcentagem de formação calogênica em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μ M de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 62

Figura 9 - Porcentagem de oxidação fenólica em segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 µM) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µM de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	63
Figura 10 - Porcentagem de vitrificação em segmentos nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 µM) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µM de (thidiazuron) TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	64
Figura 11 - Diferentes aspectos da indução de brotações em <i>E. involucrata</i> com o uso de TDZ, aos 60 dias de cultivo. Observa-se em “a” brotações na ausência de reguladores de crescimento; “b”, aumento no número e redução no comprimento de brotações em função dos reguladores de crescimento; “c”, emissão de diversas brotações oriundas de gemas adventícias (destacadas pelas setas); “d”, aspecto da formação de uma gema adventícia (seta 1) e do desenvolvimento de brotações oriundas das gemas pré-existentes no segmento nodal (seta 2); “e”, desenvolvimento de broto, a partir de gema adventícia e “f”, aspecto da hiperhidricidade, seta destaca aspecto vítreo da folha. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	65
Figura 12 - Figura 12 – Média de brotos por segmentos apicais e nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC., aos 60 dias de cultivo, nas concentrações 0, 5, 10 e 20 µM de ácido giberélico (GA ₃). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	66
Figura 13 - Figura 13 – Porcentagem de oxidação fenólica em segmentos apicais e nodais de <i>Eugenia involucrata</i> DC., aos 60 dias de cultivo, nas concentrações 0, 5, 10 e 20 µM de ácido giberélico (GA ₃). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	67
Figura 14 - Efeito de diferentes tempos (min) de imersão de explantes foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) sobre a porcentagem de contaminação geral, aos 21 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	76
Figura 15 - Efeito dos diferentes tempos (min) de imersão de explantes foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC. em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) sobre a porcentagem de contaminação fúngica, aos 21 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	77
Figura 16 - Intensidade de formação de calos em explantes foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC., aos 45 dias de cultivo, e respectivas notas em que: 0: representa a nota “0”, referente à ausência de formação de calos; 1: representa a nota “1”, resultado do início de formações calogênicas nas bordas dos discos foliares; 2: representa a nota “2”, com formação calogênica em toda a bordadura do disco foliar; e 3: representa a nota “3”, referente à formação de calos com crescimento secundário. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	79

Figura 17 - Intensidade de formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC., aos 45 dias de cultivo, e respectivas notas em que: 0: representa a nota “0”, referente à ausência de formação de calos; 1: representa a nota “1”, resultado do início de formações calogênicas nas bordas dos discos foliares; 2: representa a nota “2”, com formação calogênica em toda a bordadura do disco foliar; e 3: representa a nota “3”, referente à formação de calos com crescimento secundário. O número 4, representa a nota “4”, referente a calos com crescimento abundante, o qual ocorreu apenas aos 90 dias de cultivo. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 93

Figura 18 - Aspectos da rizogênese em calos formados a partir de discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. Raízes, após 45 dias de cultivo (em “a” e “b”), e raízes, após 90 dias de cultivo (em “c” e “d”). Setas indicam algumas das formações rizogênicas. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 97

Figura 19 - Aspecto da formação de calos nodulares, putativos a embriogênicos, em explantes foliares de *E. involucrata* DC., aos 70 dias de cultivo. Setas indicam as nodulações. Em destaque, no canto superior direito, um nódulo isolado. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 109

Figura 20 - Efeito de diferentes formas de inoculação de explantes e de diferentes reguladores de crescimento, adicionados ao meio nutritivo MS na oxidação de explantes foliares de *E. involucrata* DC., aos 70 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro de uma mesma forma de inoculação, e pela mesma letra minúscula, entre diferentes formas de inoculação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” foi atribuída sempre à média mais baixa já que, a oxidação, não é desejada no cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 110

Figura 21 - Aspecto dos diferentes tipos de calos observados em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.: calo friável (a), calo rizogênico (b – seta indica a raiz), calo firme (c) e calo nodular (d – seta indica formação nodular e, acima da imagem, destaque para uma estrutura nodular), aos 60 dias de cultivo. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 111

Figura 22 - Quantificação de DNA genômico de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Os números de 1.1 a 12.1 referem-se aos tratamentos, conforme descrito na Tabela 1. O número, após o ponto, indica que a imagem refere-se à primeira repetição do experimento. Os números de 25 a 200 indicam as concentrações de DNA conhecidas (25, 50, 75, 100, 150 e 200 ng μL^{-1}) de fago λ . Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 125

Figura 23 - Quantificação de DNA de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). As amostras de f1 a f4 são oriundas de DNA, extraído de folhas armazenadas por 21 meses; amostras de f5 a f15 são de DNA, extraído de folhas armazenadas por 10 meses; e as amostras c1 a c9 são de tecidos cambiais.

As diferentes massas dos padrões de DNA conhecidos (fago λ , em $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) encontram-se numeradas nos primeiros poços do gel. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 126

Figura 24 - Produtos da PCR por meio da técnica de polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). As amostras f1 a f4 referem-se ao DNA extraído de folhas armazenadas por 21 meses; as amostras f5 a f15 são oriundas de DNA extraído de folhas armazenadas por 10 meses. M1= 1 kb *ladder*, M2= 100 pb *ladder*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 128

Figura 25 - Produtos da PCR por meio da técnica de RAPD em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). As amostras c1 a c17 referem-se a DNA extraído de câmbios armazenados por 10 meses, em solução de CTAB a 2%, sem a presença de β -mercaptoetanol no armazenamento. M1= 1 kb *ladder*, M2= 100 pb *ladder*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 128

Figura 26 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), utilizando-se o *primer* OPM em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Na imagem, observam-se as amostras dos *bulks* de indivíduos de populações *in situ* de Frederico Westphalen, RS; e de populações *ex situ* da Embrapa/Cpact, Pelotas, RS. A primeira coluna à esquerda = 1 kb *ladder*, última coluna à direita = 100 pb *ladder*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 141

Figura 27 - Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), utilizando-se o *primer* OPA 02 em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Na imagem, observam-se as amostras dos *bulks* de indivíduos de populações *in situ* do CISM e FEPAGRO em Santa Maria, RS. A 1ª coluna à esquerda = 1 kb *ladder*, última coluna à direita = 100 pb *ladder*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 141

Figura 28 – Dendrograma elaborado a partir de estimativas de similaridade genética (índice de Jaccard), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, de diferentes *bulks* de *Eugenia involucrata* DC. As siglas representam as populações de coleta sendo: Frederico Westphalen (FW), Fepagro (F), CISM (C), Acessos da Embrapa (EA), e Banco de *Seedlings* da Embrapa (BS). Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ MS e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981).....	38
Tabela 2 – Efeito de diferentes explantes e meios nutritivos no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>E. involucrata</i> DC. Variáveis avaliadas aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	47
Tabela 3 – Interação entre a presença/ausência de luz e diferentes formas de uso de fitorreguladores na formação de calos (%), desenvolvimento dos calos por atribuição de notas (médias) e oxidação fenólica (%) em discos foliares de <i>E. involucrata</i> DC., aos 45 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	81
Tabela 4 - Efeito de diferentes balanços dos fitorreguladores: ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a formação de calos (%), as notas atribuídas aos calos (média) e a formação de calos rizogênicos (%) em explantes foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC., com 45 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	94
Tabela 5 - Efeito de diferentes balanços dos fitorreguladores: ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a média das notas atribuídas aos calos, ao incremento da massa dos calos (%), e a formação de calos rizogênicos (%) em explantes foliares de <i>Eugenia involucrata</i> DC, com 90 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	98
Tabela 6 - Efeito da forma de inoculação de explantes foliares e de diferentes reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo MS na formação de calos (%), média de notas atribuídas aos calos; formação de calos rizogênicos (%); formação de calos friáveis (%); formação de calos nodulares (%) e formação de calos firmes (%), aos 70 dias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>E. involucrata</i> DC. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	108
Tabela 7 – Efeito de diferentes citocininas na formação calogênica (%), calos friáveis (%), calos nodulares (%) e incremento - na massa dos calos - (%) em explantes foliares de <i>E. involucrata</i> DC., aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	113
Tabela 8 – Efeito de diferentes concentrações de citocininas sobre as notas atribuídas ao calejamento dos explantes e à oxidação fenólica após 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	114

Tabela 9 – Condições testadas no estabelecimento de protocolo para a extração de DNA genômico em <i>E. involucrata</i> DC. Diferentes formas órgãos, formas de armazenamento e condições de solubilização dos tecidos. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	121
Tabela 10 – Sequências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para a amplificação de DNA de <i>E. involucrata</i> DC. por meio da técnica de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	123
Tabela 11 – Composição dos <i>bulks</i> constituídos a partir do agrupamento dos indivíduos amostrados nas populações, os quais foram utilizados nas análises moleculares em <i>E. involucrata</i> DC. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..	135
Tabela 12 – Sequências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de DNA de <i>E. involucrata</i> DC., visando à análise da variabilidade de indivíduos, mantidos <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> . Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	138
Tabela 13 – Padrão de polimorfismos observados conforme os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises de marcadores RAPD em <i>Eugenia involucrata</i> DC. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....	140

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2 REVISÃO GERAL.....	21
2.1 A espécie <i>Eugenia involucrata</i> DC. (Myrtaceae).....	21
2.2 Biotecnologia aplicada às espécies florestais.....	24
2.2.1 Cultura de tecidos vegetais.....	26
2.2.1.1 Calogênese no cultivo <i>in vitro</i>	27
2.2.1.2 Clonagem no cultivo <i>in vitro</i>	28
2.2.2 Utilização de marcadores moleculares RAPD.....	29
3 CAPITULO I - ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eugenia involucrata</i> DC.: DESINFESTAÇÃO, INFLUÊNCIA DO EXPLANTE E DE DIFERENTES MEIOS NUTRITIVOS.....	32
3.1 Resumo.....	32
3.2 Abstract.....	33
3.3 Introdução.....	33
3.4 Material e métodos.....	35
3.5 Resultados e discussão.....	40
3.6 Conclusões.....	49
4 CAPÍTULO II - ASPECTOS DA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eugenia involucrata</i> DC. PELO USO DE COMBINAÇÕES ENTRE ANA E TDZ E EFEITOS DO GA₃ SOBRE OS CULTIVOS.....	50
4.1 Resumo.....	50
4.2 Abstract.....	51
4.3 Introdução.....	51
4.4 Material e métodos.....	53
4.5 Resultados e discussão.....	55
4.6 Conclusões.....	68

5 CAPÍTULO III - INDUÇÃO A CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE <i>Eugenia involucrata</i> DC. (MYRTACEAE): DESINFESTAÇÃO, REGULADORES DE CRESCIMENTO E PRESENÇA DE LUZ.....	69
5.1 Resumo.....	69
5.2 Abstract.....	70
5.3 Introdução.....	70
5.4 Material e métodos.....	72
5.5 Resultados e discussão.....	75
5.6 Conclusões.....	83
6 CAPÍTULO IV - DIFERENTES BALANÇOS ENTRE ANA, 2,4-D E BAP NA CALOGÊNESE E RIZOGÊNESE EM DISCOS FOLIARES DE <i>Eugenia involucrata</i> DC.....	85
6.1 Resumo.....	85
6.2 Abstract.....	86
6.3 Introdução.....	86
6.4 Material e métodos.....	88
6.5 Resultados e discussão.....	91
6.6 Conclusões.....	98
7 CAPÍTULO V - CALOGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO DE CALOS EM <i>Eugenia involucrata</i> DC.: INFLUÊNCIA DA FORMA DE INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES, DE DIFERENTES FONTES DE CITOCININAS E DA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTE.....	99
7.1 Resumo.....	99
7.2 Abstract.....	100
7.3 Introdução.....	100
7.4 Material e métodos.....	103
7.5 Resultados e discussão.....	106
7.6 Conclusões.....	115

8 CAPÍTULO VI - PROTOCOLO PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>Eugenia involucrata</i> DC. (MYRTACEAE) A PARTIR DE FOLHAS E CÂMBIOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	116
8.1 Resumo.....	116
8.2 Abstract.....	117
8.3 Introdução.....	117
8.4 Material e métodos.....	119
8.5 Resultados e discussão.....	124
8.6 Conclusões.....	129
9 CAPÍTULO VII - DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS <i>IN SITU</i> E <i>EX SITU</i> DE <i>Eugenia involucrata</i> DC. (MYRTACEAE) POR MEIO DE MARCADORES RAPD.....	130
9.1 Resumo.....	130
9.2 Abstract.....	131
9.3 Introdução.....	131
9.4 Material e métodos.....	133
9.5 Resultados e discussão.....	139
9.6 Conclusões.....	144
10 CONCLUSÕES GERAIS.....	145
REFERÊNCIAS GERAIS.....	146

1 INTRODUÇÃO GERAL

As espécies florestais apresentam grande relevância para a economia brasileira. De acordo com os dados da Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS, 2007), a participação do setor florestal no Produto Interno Bruto (PIB) do país atinge 3,5%, o que equivale a US\$ 37,3 bilhões. São gerados 4,33 milhões de empregos relacionados às florestas plantadas e, no tocante às florestas nativas, 2,58 milhões.

No entanto, embora o país apresente dimensões continentais, sendo detentor da flora mais diversificada do planeta (SANDES; DI BLASI, 2000) e, em consequência disto, vítima frequente da biopirataria; as espécies nativas não são integradas em sistemas produtivos, reduzindo a sua exploração econômica. Não obstante, é necessário que sejam traçadas estratégias no intuito de manter esta diversidade a partir de uma ótica sustentável, evitando-se pressões que degradem os ecossistemas naturais.

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC.) é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, de ocorrência natural no Rio Grande do Sul e em outros Estados brasileiros e países da América do Sul. Embora apresente um enorme potencial para integrar sistemas produtivos, ainda é pouco reconhecida para esta finalidade. Além de sua importância ecológica, uma vez que é uma espécie dispersada pela fauna e, por esta razão, adequada à recuperação de áreas degradadas, possui características de interesse paisagístico. Na silvicultura, destacam-se a excelente qualidade e a durabilidade natural de sua madeira. Apresenta, adicionalmente, recursos não madeiráveis, a partir da utilização desta espécie na área de fruticultura. Na literatura também são observados relatos acerca de suas propriedades medicinais.

Contudo, *E. involucrata* apresenta dificuldade em sua propagação, o que constitui um obstáculo ao seu aproveitamento econômico. Suas sementes são recalcitrantes e não mantêm seu potencial germinativo durante o armazenamento, iniciando-se a sua deterioração já nas primeiras semanas após a coleta (CARVALHO, 2008). Estudos sobre outras modalidades de propagação da espécie são incipientes.

Face ao exposto, técnicas de cultura de tecidos poderiam auxiliar na propagação da espécie por clonagem *in vitro*, bem como à seleção de genótipos

com características superiores. Além disso, em outra via da cultura de tecidos, por meio da formação de calos, é possível viabilizar estudos iniciais para a obtenção de plantas por organogênese indireta, além da possibilidade de obtenção de variantes somaclonais. Embora não desejados na clonagem, estes oferecem novas fontes de variabilidade genética, acelerando, muitas vezes, a obtenção de genótipos melhorados, especialmente em espécies florestais, as quais necessitam de muitos anos para atingir sua maturidade reprodutiva.

A maneira como está distribuída a variabilidade genética em cerejeira não é conhecida. Porém, tais informações são essenciais na implementação de projetos de pré-melhoramento. Frente a esta realidade, avaliar a variabilidade genética de acesso em populações que possam servir como fontes de genes úteis para o melhoramento genético torna-se uma ação importante.

Visando atender a essas necessidades, o presente trabalho segue duas frentes dentro da biotecnologia aplicada às espécies florestais: a cultura de tecidos e o uso de marcadores moleculares. O objetivo geral desta pesquisa foi desenvolver protocolos para o cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*, bem como avaliar metodologias para o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* de brotações por meio de diferentes fontes de explantes e com a adequação de um meio nutritivo; viabilizar a calogênese e a organogênese em discos foliares, de maneira a auxiliar estudos futuros de regeneração e de variação somaclonal; desenvolver uma metodologia para a extração de DNA genômico a partir de diferentes tecidos de cerejeira, possibilitando outros trabalhos na área molecular; e avaliar a diversidade genética existente em acessos mantidos *in situ* e *ex situ* de cerejeira, por meio de marcadores moleculares baseados em DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD).

O trabalho está dividido em sete capítulos, os quais estão organizados de acordo com objetivos específicos onde:

- no capítulo I, foram testados métodos para a obtenção de cultivos assépticos, bem como a influência de diferentes meios nutritivos e tipos de explantes no estabelecimento *in vitro* de *E. involucrata*;
- no capítulo II, foram avaliados reguladores de crescimento na multiplicação e alongamento *in vitro* de brotações oriundas de segmentos nodais de cerejeira;

- no capítulo III, avaliaram-se o estabelecimento de cultivos assépticos, a influência da inclusão de fitorreguladores e da presença de luz sobre a calogênese em discos foliares de *E. involucrata*;
- no capítulo IV, testaram-se diferentes balanços entre fitorreguladores na calogênese e na rizogênese em explantes foliares de cerejeira;
- no capítulo V, foram avaliadas a influência de diferentes posições de inoculação dos explantes foliares, da inclusão de antioxidante, de concentrações de citocininas, e o efeito destas condições sobre a caracterização dos calos formados;
- no capítulo VI, a extração de DNA genômico de *E. involucrata* foi realizada a partir de diferentes tecidos e métodos, no intuito de obter-se um protocolo para o isolamento de DNA com qualidade para o uso em análises moleculares;
- no capítulo VII, a diversidade genética de acessos de cerejeira mantidos *in situ* e *ex situ* foi estimada por meio de marcadores moleculares baseados em DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD).

2 REVISÃO GERAL

2.1 A espécie *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae)

Possuindo mais de três mil espécies, as quais estão distribuídas em 140 gêneros, a família Myrtaceae tem seus principais centros de dispersão na América e na Austrália. A maior parte de seus representantes possui frutos comestíveis e, por esta razão, são muito conhecidos popularmente. Nesta família, o gênero *Eugenia* está entre os mais importantes, pois apresenta diversas espécies com valor comercial (JOLY, 1993; RIBEIRO, 1999; SILVA et al., 2003).

Nativa de vários Estados do Brasil, com ocorrência no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, *Eugenia involucrata* DC. é conhecida como cerejeira, cerejeira-do-mato ou cerejeira-do-rio-grande. Esta árvore nativa também possui dispersão em outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2008). Conforme este mesmo autor, de acordo com a APG II (*The Angiosperm Phylogeny Group*, 2003), a posição taxonômica da cerejeira é a seguinte:

Divisão: Angiospermae

Clado: Rosídeas

Ordem: Myrtales

Família: Myrtaceae

Gênero: *Eugenia*

Espécie: *Eugenia involucrata* DC.

Sinonímea botânica: *Phyllocalyx involucratus* (DC.) Berg; *P. laevigatus* Berg.

A cerejeira pode ser encontrada nas florestas Estacional Decidua, Estacional Semidecidual, Ombrófila Densa e Ombrófila Mista; tanto nos estratos médio como superior (LORENZI, 1992). É uma espécie secundária tardia (AGUIAR et al., 2001) e, em alguns locais do Brasil, também encontra-se associada ao ambiente fluvial ou ripário (CARVALHO, 2008).

A cerejeira ocorre nos fragmentos florestais de forma dispersa, mais ou menos ao acaso, não formando agrupamentos e, por esta razão, é considerada uma

espécie rara. Contudo, possui ampla dispersão no Rio Grande do Sul, dando preferência a solos férteis e medianamente drenados. Não se observa regeneração abundante na espécie dentro dos fragmentos florestais. Adicionalmente, conforme alguns relatos, as sementes que caem das árvores não germinam ao redor da planta mãe (REITZ et al., 1988).

A cerejeira apresenta diversas características de interesse, dentre elas sua utilização madeireira, frutícola, medicinal, paisagística e ambiental. Todos estes atributos têm despertado o interesse por esta espécie arbórea.

Sua madeira é considerada densa, de cor branco-pardacenta, compacta, elástica, muito resistente e de boa qualidade. Tem sido utilizada na construção civil, produção de cabos de ferramentas, lenha e carvão. Apresenta boa durabilidade natural, mas, no entanto, é pouco explorada (SANCHOTENE, 1989; LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 2008).

Seus frutos possuem características organolépticas amplamente apreciadas no consumo humano, podendo ser consumidos tanto na forma *in natura* como após o processamento, onde são utilizados na fabricação de doces, geléias ou licores (LORENZI, 1992). Estes são bagas piriformes, lisas, glabras, de coloração verde quando imaturo, tornando-se de vermelho a vináceo na época de maturação. Atingem de 1,3 a 2,3 cm de comprimento, iniciando sua produção entre o sexto e o sétimo ano após o plantio (CARVALHO, 2008). Rego et al. (2006) caracterizaram que, do aparecimento do botão floral até que ocorra a antese, são necessários 12,7 dias, sendo o horário típico de abertura das flores entre 6 e 8 horas, permanecendo desta forma até o final de sua fecundação, momento este em que ocorre a queda dos estames. A fenofase de floração permanece por, aproximadamente, 33 dias (de julho a outubro), enquanto o período de frutificação é de 36 dias (de setembro a novembro).

Além disso, sua capacidade de produção de frutos demonstra a aptidão deste recurso genético nativo no que se refere à esta forma de aproveitamento de recursos florestais não madeiráveis. De acordo com SILVA (1991), a produção de apenas uma planta de cerejeira pode ser acima de mil frutos por safra, a qual pode ocorrer por até 200 anos. No entanto, sabe-se que em fragmentos florestais, onde ocorrem cerejeiras naturalmente, esta situação não é obtida, sendo necessárias adequações ao plantio em ambiente apropriado. Prado (2009) observou que de 23

matrizes de coleta em um fragmento florestal, apenas 10 produziram frutos e em intensidade extremamente reduzida.

Paisagisticamente a espécie é muito utilizada por sua excelente formação de copa e, do ponto de vista ambiental, é extremamente adequada à recuperação de áreas degradadas, principalmente pela ampla distribuição de suas sementes, já que seus frutos são atrativos para a avifauna (LORENZI, 1992).

Por possuir ação digestiva, antidiarréica e antirreumática, sua utilização é conhecida na medicina popular (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Ramos et al. (2006) e Paroul et al. (2008) avaliaram a composição química de óleos voláteis de cerejeira identificando a presença de 11 principais substâncias, todas sesquiterpenos.

O conhecimento da diversidade genética, essencial em programas de melhoramento, ainda é bastante desconhecido para esta espécie. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro de Pesquisas em Agricultura Clima Temperado (Embrapa/Cpact) em Pelotas, RS, possui um banco ativo de germoplasma com acessos de cerejeira, o qual foi iniciado em 1986, com sementes oriundas da Associação Brasileira de Fumicultores (AFUBRA – Santa Cruz do Sul, RS). Este banco é composto por 10 acessos de cerejeira (no entanto, em visita realizada a instituição, identificou-se 9 acessos), o qual foi ampliado na criação de um banco de *seedlings* com 100 plantas (no qual identificou-se 98 plantas), oriundas de sementes da própria Embrapa e de doações de outras regiões do Estado (BARBIERI et al., 2005, DEGENHARDT et al., 2007).

Tendo em vista o pouco conhecimento da variabilidade genética existente nesta espécie a qual, segundo Carvalho (2008), é predominantemente autógama, e que este conhecimento é essencial à conservação e ao melhoramento genético (RUBESTEIN et al., 2005), estudos nesta área precisam ser desenvolvidos.

Além disso, a cerejeira apresenta dificuldades de propagação. Prado (2009) observou que as sementes reduzem sua germinação quando expostas a luz difusa, como a luminosidade encontrada dentro das florestas. Também averiguou a necessidade de 35 matrizes para se obter a coleta de pelo menos 15 plantas; além da dificuldade de obtenção de um lote de sementes representativo. Não obstante, a espécie possui sementes recalcitrantes, não mantendo a viabilidade germinativa após duas semanas de armazenamento (CARVALHO et al., 2008).

De forma geral, a secagem é um processo essencial à maturação das sementes, permitindo a germinação em um grande número de tipos de sementes de espécies lenhosas. Porém, sementes recalcitrantes precisam manter o teor de água elevado para não perderem a capacidade germinativa (BEWLEY; BLACK, 1985). Tal fator faz com que as sementes deterioresem-se mais rapidamente, além do possível aumento da presença de organismos contaminantes que têm seu desenvolvimento estimulado pelo excesso de umidade.

Estudos desenvolvidos por Barbeto et al. (1998) permitiram o armazenamento de diásporos recém-coletados de cerejeira por até 120 dias, sem secagem inicial e mantidos em câmara fria, armazenados em sacos plásticos perfurados. Porém, estes mesmos autores observaram reduções no potencial germinativo da espécie. SILVA et al. (2005) testaram diversas técnicas de fracionamento em sementes de espécies de *Eugenia* spp., dentre elas *E. involucrata*. O fracionamento permitiu a germinação das sementes, porém, os níveis foram bastante exíguos. FRANZON; RASEIRA (2006) testaram a germinação *in vitro* de pólen de *E. involucrata*, contudo, no intuito de testar a viabilidade desta estrutura, e não a regeneração das plantas.

Esta carência de informações ratifica as afirmações de Degenhardt et al. (2007), os quais expuseram que, embora a grande potencialidade econômica existente na espécie, esta recebeu pouca atenção dos pesquisadores até o momento, necessitando de estudos em todas as áreas, dentre elas a avaliação da variabilidade genotípica, melhoramento genético e seleção de genótipos promissores para povoamentos.

Frente a esta carência de informações necessárias para o aproveitamento da espécie, técnicas de cultivo *in vitro* poderiam auxiliar na propagação e na multiplicação de genótipos superiores de cerejeira, bem como em estudos mais aprofundados em biotecnologia vegetal. Da mesma forma, análises moleculares podem oferecer informações acerca da variabilidade genética desta arbórea nativa e, assim, podem auxiliar no seu melhoramento genético.

2.2 Biotecnologia Aplicada às Espécies Florestais

Pode-se dizer que, de forma geral, a biotecnologia está dividida em três principais grupos quanto à sua aplicação em espécies florestais: cultura de tecidos, marcadores moleculares e transformação genética. Nesta revisão, serão enfatizados

dois destes principais aspectos: a cultura de tecidos (importância da propagação clonal e do cultivo de calos) e o uso de marcadores moleculares, em especial marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

As espécies florestais são de fundamental importância econômica, pois delas originam-se diversos produtos como madeira, biomassa para polpa celulósica, papel e energia para as indústrias. Além disso, muitas espécies ofertam produtos não madeiráveis para a indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

Com a crescente compreensão da função ecológica das florestas para a sustentabilidade da vida no planeta e as possíveis consequências decorrentes da exploração indiscriminada, florestamentos e reflorestamentos encontram-se nas agendas de diversas nações (MURALIDHARAN; KALLARACKAL, 2004). Utilizar a biotecnologia para o ganho de produtividade e sustentabilidade pode ser considerado, de acordo com Watanabe; Raman (1997), como uma das prioridades mundiais, já que a excessiva demanda por produtos oriundos de espécies vegetais, bem como o subsídio à sustentabilidade e à proteção do meio ambiente, necessitam destas técnicas para sua manutenção.

Também neste contexto, pode-se ressaltar que, de forma geral, os programas de melhoramento em essências florestais são inibidos pelas dificuldades existentes no controle de processos de polinização e de fecundação; dificuldades na análise de descendentes e na necessidade de grande área para o plantio. Adicionalmente, muitos anos são necessários para que as espécies atinjam sua maturidade reprodutiva e fenotípica, bem como a inexistência de mapas genéticos em muitas plantas arbóreas, os quais permitiriam a identificação de parentais adequados aos cruzamentos (TZFIRA et al., 1998, RESENDE, 1999). Entretanto, estas dificuldades vêm sendo superadas com o avanço da biotecnologia ligada ao melhoramento genético e a conservação de espécies lenhosas (MURALIDHARAN; KALLARACKAL, 2004).

A propagação vegetativa está entre os principais métodos de multiplicação de espécies florestais, a qual é extremamente vantajosa quando comparada à reprodução sexuada, pois permite reproduzir o componente genético total, consequentemente, existem maiores ganhos em uma mesma geração (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Neste contexto encontram-se as técnicas de cultura de tecidos vegetais, as quais oferecem potencial para a rápida multiplicação de linhagens elite

em larga escala. Em árvores, estas tecnologias são essenciais frente aos longos períodos necessários à multiplicação e à maturação das plantas (JAIN, 1997).

Comumente, em determinada etapa do melhoramento de plantas, utilizam-se técnicas de cultivo *in vitro*, as quais, muitas vezes, oferecem soluções únicas. Suas principais funções estão ligadas à conservação de germoplasma de forma asséptica, multiplicação de genótipos elite, cultura de embriões, estabilidade genética, aceleração de programas de melhoramento e restrição da variabilidade genética (FERREIRA et al., 1998). Por meio destas técnicas também é possível gerar variabilidade, utilizando-se métodos que estimulem a ocorrência de variação somaclonal (SANCHÉZ-CHIANG; JIMÉNEZ, 2009).

Os marcadores moleculares também são ferramentas importantes no melhoramento florestal e tem sido amplamente utilizados. Pode-se salientar a sua importância para gerar conhecimentos acerca da variabilidade existente em determinada espécie, fator este fundamental para o melhoramento genético. Além disso, podem ser empregados na construção de mapas genéticos, no melhoramento assistido por marcadores, entre outras funções (GOLLE et al., 2009). A utilização de marcadores moleculares será salientada posteriormente nesta revisão.

2.2.1 Cultura de Tecidos Vegetais

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); ou, conforme citam Taiz; Zeiger (2004), totipotência é a conservação da capacidade genética total para o desenvolvimento de uma planta completa. Por meio desta técnica, fragmentos de tecidos vegetais vivos, denominados “explantes”, são retirados de plantas de interesse e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas. Estes fragmentos podem ser compostos por células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI et al., 2001).

Utilizam-se meios nutritivos determinados para que as plantas se desenvolvam no cultivo *in vitro*, com formulações que seguem as necessidades de cada vegetal. De forma geral, os meios de cultura apresentam em sua composição, basicamente: macronutrientes, micronutrientes, suplemento de ferro, vitaminas, água, fontes de carboidratos, mio-inositol e, quando necessário, reguladores de

crescimento (DODDS; ROBERTS, 1995). Desta forma, aproximam-se as condições *in vitro* àsquelas necessárias para que as plantas se desenvolvem no ambiente, como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os principais reguladores de crescimento utilizados são pertencentes aos grupos das auxinas, os quais controlam o alongamento celular e a rizogênese, entre outros processos (HINOJOSA, 2000); as citocininas, que são promotoras da divisão celular e da emissão de gemas adventícias (BARRUETO CID, 2000); e as giberelinas, responsáveis, principalmente, pelo alongamento de caules (MATSUMOTO, 2000). Obviamente, não são apenas estas as rotas morfogênicas conduzidas por estes reguladores de crescimento, da mesma forma como existem outros grupos de reguladores, como o etileno e o ácido abscísico, menos usuais no cultivo *in vitro*.

A produção de plantas *in vitro* pode ocorrer por organogênese direta ou indireta. Na primeira, tem-se a formação de órgãos diretamente, sem a passagem por fases intermediárias; enquanto que, na segunda, passa-se obrigatoriamente pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ambas as circunstâncias podem ser de interesse ao cultivo *in vitro*.

2.2.1.1 Calogênese no cultivo *in vitro*

Proveniente de células originadas por sucessivas mitoses, como resposta a estímulos do balanço entre reguladores de crescimento e outros fatores do meio de cultura e ambiente, calos são um sistema obtido *in vitro* caracterizado por um arranjo de células. O calo não é um órgão com tecidos executando funções específicas, mas, sim, um sistema com gradientes nutricionais e de reguladores de crescimento que estão orientados acropetamente (TERMIGNONI, 2005).

Em determinadas condições, centros meristemáticos do tecido calogênico podem diferenciar-se originando raízes, brotos ou embriões somáticos. Este cultivo, capaz de ser realizado tanto em meio de cultura líquido quanto sólido, pode objetivar estudos em diversos campos, como a citologia e a bioquímica (NEUMANN et al., 2009).

Os calos podem ser obtidos a partir de diversos órgãos, dentre eles, merece atenção o uso de explantes foliares. Diversos trabalhos buscam a formação de calos

em explantes foliares de espécies florestais como: *Blighia sapida* (WEBSTER et al., 2006), *Paulowia tomentosa* (CORREDOIRA et al., 2008), *Salix humboldtiana* (SANTOS et al, 2005); *Litchi chinensis* (MA et al., 2009), entre outros.

Estudos com calos também podem servir como ponto de partida para a determinação de condições necessárias ao desenvolvimento das plantas, bem como à obtenção de produtos oriundos do metabolismo secundário (LANDA et al., 2000). A regeneração a partir de tecidos calogênicos é fundamental para trabalhos posteriores de transformação genética, já que, nestas técnicas, apenas um grupo de células é transformado. De acordo com Pasquali; Zanettini (2007), a cultura de tecidos é condição fundamental para estes processos.

Uma importante aplicação do cultivo *in vitro* por meio da formação de calos (organogênese indireta) é a possibilidade da obtenção de variação somaclonal. Embora indesejada na propagação clonal, esta variação pode ser amplamente utilizada em programas de melhoramento, gerando novas cultivares em plantas cultivadas (AMIRATO, 1986). Os somaclones têm origem em alterações no nível de ploidia da célula e/ou variações epigenéticas, como mutações, rearranjos cromossômicos, transposons, metilação de DNA, entre outros (NEUMANN et al., 2009)

Com o auxílio de marcadores moleculares tem sido detectada a ocorrência de variação somaclonal em algumas espécies lenhosas como: *Malus pumila*, *Prunus persica*, *Coffea arabica*, *Quercus suber* (SÁNCHEZ-CHIANG; JIMÉNEZ, 2009). Estes mesmos autores verificaram maior variação somaclonal em espécies lenhosas frutíferas do que espécies tipicamente madeireiras.

2.2.1.2 Clonagem no cultivo *in vitro*

Comparado com pesquisas desenvolvidas em outras áreas de interesse, a clonagem *in vitro* de espécies florestais ainda é bastante modesta. Este interesse teve uma importância especial no cultivo de clones de *Eucalyptus* spp., em que o Brasil destaca-se como modelo no melhoramento por propagação vegetativa (DHAWAN; SAXENA, 2004).

Estas tecnologias têm se expandido em espécies perenes (RATHORE et al., 2004). A propagação vegetativa de árvores adultas selecionadas, ou em outra etapa

de seu desenvolvimento, provém um dos mais promissores métodos para o melhoramento de espécies florestais cultivadas (PARANJOTHY et al., 1990).

De acordo com Grattapaglia; Machado (1998), a micropropagação é, sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos mais difundida e com maior utilização no âmbito comercial. Estes autores a dividem em quatro estágios: estágio “0”, o qual corresponde aos tratamentos dados à planta matriz; estágio “I”, onde ocorre a seleção de explantes, desinfestação e cultivo em ambiente asséptico; estágio “II”, que se refere a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas; e estágio “III”, onde é realizada a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e, subsequentemente, o transplântio para o solo.

Nestas técnicas, uma das limitações encontradas em espécies lenhosas é a formação de raízes (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Tal obstáculo tem sido superado a exemplo da propagação de *Eucalyptus tereticornis* onde, a partir de plantas com quatro anos de idade, foi possível obter o enraizamento apenas alterando o balanço de nutrientes e substâncias adicionais ao meio nutritivo (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000).

Assim, o progresso na área de propagação *in vitro* de espécies florestais vem ganhando mais destaque, sendo que suas principais aplicações encontram-se na conservação de germoplasma, na aceleração de programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores, na limpeza clonal, e na sua utilização como base para outros processos biotecnológicos (XAVIER et al., 2007). Recentemente, tem recebido destaque a automação dos sistemas de cultura de tecidos, especialmente pela utilização de biorreatores na produção em grande escala de mudas de espécies de interesse como, por exemplo, *Eucalyptus* spp. Desta forma, custos têm sido minimizados e os ganhos em produtividade aumentaram em uma escala satisfatória (PENCHEL et al., 2007).

2.2.2 Utilização de marcadores moleculares RAPD

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de melhoramento e de genética eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral genótipos de fácil identificação visual. Tais marcadores contribuíram para as primeiras versões de mapas genéticos. Porém, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos reduzia a probabilidade de se

encontrarem associações significativas entre estes e caracteres de importância econômica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Milach (1998), Guo et al. (2006) e Agarwal et al. (2008), os marcadores moleculares diferenciam-se pela tecnologia empregada para revelar a variabilidade de DNA. As técnicas podem ser divididas em duas categorias: técnicas que não utilizam PCR (baseadas em hibridização) e técnicas baseadas em PCR (*polymerase chain reaction*). A técnica de RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*) está entre as mais utilizadas no primeiro grupo citado. Em contrapartida, existe uma grande diversidade de técnicas em marcadores baseados em PCR, como o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), o AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), os microssatélites ou SSRs (*single sequence repeats*), os ISSRs (*inter-single sequence repeats*), os minissatélites ou VNTRs (*variable number o tandem repeats*), entre outros.

Demais possíveis utilizações dos marcadores citados permitem o acesso ao conhecimento da diversidade existente nas espécies. O reconhecimento da variabilidade é essencial para que seja exequível o manejo sustentável e a conservação. Tais avaliações de variabilidade sempre foram de interesse dos geneticistas e têm sido úteis na conservação, melhoramento, manejo e fragmentação florestal, influenciando em inúmeras tomadas de decisões (ZUCCHI, 2002).

Uma das vantagens oferecidas pela técnica de PCR é a possibilidade de gerar quantidades expressivamente grandes de DNA a partir de fragmentos específicos do genoma. Para isto, é importante que o DNA obtido tenha boa qualidade. Após amplificação, estes fragmentos podem ser observados a olho nu em gel de eletroforese. No entanto, uma das limitações da PCR é a necessidade de construção de *primers* específicos, o que constitui um obstáculo aos trabalhos com espécies que não possuem sequenciamento de nenhuma região de seu genoma. Face ao exposto, um avanço na biologia molecular foi a utilização de *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade de conhecimento prévio de sequências (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Na década de 90, Williams et al. (1990) patentearam a técnica acima citada, a qual foi denominada de “DNA polimórfico amplificado ao acaso” (RAPD). Algumas das vantagens do uso desta classe de marcadores são: a grande quantidade de

locos, gerando informações numerosas, e a possibilidade de realizar a análise sem marcação radiativa (ZUCCHI, 2002).

Para que o DNA seja amplificado por esta técnica, regiões do genoma complementares ao *primer* devem estar separadas por até 4.000 pares de bases e em orientações opostas. Desta maneira, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma. O polimorfismo revelado possui algumas possíveis bases moleculares, como a ocorrência de mutações de ponto no sítio de anelamento do *primer*, as quais poderiam impedir este processo e, conseqüentemente, a não amplificação; além da existência de deleções e inserções entre os dois sítios de pareamento do *primer*, as quais também são fontes de polimorfismo (CAIXETA et al., 2009).

Assim, estudos visando avaliar a diversidade genética em espécies florestais como *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI et al., 2005), *Enterolobium contortisiliquum* (SANTANA et al., 2008), *Dimorphandra mollis* (OLIVEIRA et al., 2008), têm sido viabilizados pela utilização de marcadores RAPD. Neste íterim, pode-se salientar a importância do conhecimento da diversidade genética em populações naturais ou conservadas *ex situ* para o pré-melhoramento de plantas, o qual objetiva conhecer o material genético antes de introduzi-lo em programas de melhoramento (PEREIRA et al., 2009). Além disso, estes estudos também são auxiliares na conservação das espécies.

3 CAPÍTULO I

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DC.: DESINFESTAÇÃO, INFLUÊNCIA DO EXPLANTE E DE DIFERENTES MEIOS NUTRITIVOS

3.1 Resumo

Apresentando diversas características de interesse nos setores da silvicultura, fruticultura, meio ambiente e medicinal, *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae) é uma espécie florestal nativa de vários Estados brasileiros, a qual possui dificuldades na propagação por sementes. Este trabalho objetivou desenvolver uma metodologia para o estabelecimento e o desenvolvimento *in vitro* desta espécie por meio do uso de segmentos apicais e nodais. Foram testados diferentes tratamentos de desinfestação superficial à base de hipoclorito de sódio e um tratamento adicional, após poda efetuada para estimular a emissão de brotações jovens, utilizando o bicloreto de mercúrio. Segmentos apicais e nodais foram inoculados nos meios nutritivos MS, ½ MS e WPM. Em um primeiro momento, adicionou-se aos meios de cultura 1 µM de ANA e 5 µM de TDZ e, após, os explantes foram subcultivados nos respectivos meios nutritivos, porém, na ausência de reguladores de crescimento, mas com o acréscimo de 1 g L⁻¹ de carvão ativado. Para obter culturas assépticas de *E. involucrata* é necessário a realização de podas nas plantas doadoras de explantes, visando à emissão de ramos jovens, e o tratamento com bicloreto de mercúrio mostrou-se eficiente. O meio ½ MS é o mais adequado para o desenvolvimento *in vitro* das plantas por meio do cultivo de segmentos apicais enquanto que, para o cultivo a partir de segmentos nodais, são apropriados os meios ½ MS e WPM. O meio ½ MS possibilitou os melhores índices de enraizamento nos explantes, juntamente com o meio WPM, mas pode ser indicado por ser mais econômico que este. É possível o estabelecimento e o enraizamento *in vitro* explantes apicais e nodais de *E. involucrata* DC.

Palavras-chave: segmento apical, segmento nodal, meios de cultura

***IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *Eugenia involucrata* DC.: DESINFESTATION, EXPLANT INFLUENCE AND OF DIFFERENT NUTRITIONAL MEDIA**

3.2 Abstract

With several features of interest in the forestry, horticulture, environment and medicine sectors, *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae) is a Brazilian native forest species with difficulties in propagation. This study aimed to establish a protocol for the *in vitro* establishment and development of this species through the use of apical and nodal segments. We tested different treatments of disinfection with the use of NaOCl and a desinfestation treatment after pruning, for the emergence of young shoots. The apical and nodal segments were inoculated in the nutrient media MS, ½ MS and WPM, at first by adding to these 1 µM of NAA and 5 µM of TDZ, and a second stage, the explants were cultured in the same nutrient media without the inclusion of growth regulators but with the addition of 1 g L⁻¹ of activated charcoal. For obtaining aseptic cultures of *E. involucrata* is must pruning for issuing shoots and treatment with HgCl₂ was adequate. The ½ MS is most suitable for the *in vitro* development of the plant through the apical segments, while the nodal segments grow best with ½ MS medium and WPM. The ½ MS and WPM media in better rates of rooting in explants, but ½ MS is more economical. It is possible to establish *in vitro* and root apical and nodal explants of *E. involucrata* DC.

Key-words: apical segment, nodal segment, culture medias

3.3 Introdução

O Brasil possui uma infinidade de recursos genéticos com potencial para integrar o sistema produtivo primário do país. No entanto, muitos destes recursos ainda não são utilizados, em contraponto à excessiva exploração de outros, o que também não é desejável. Técnicas que permitam tanto a utilização destes recursos

como sua possível conservação, especialmente pela redução de pressões em seu habitat natural, são extremamente importantes, e a cultura de tecidos enquadra-se nessa condição, já que o seu uso pode subsidiar a produção e a proteção de espécies de interesse (WATANABE; RAMAN, 1997).

As plantas arbóreas possuem um lugar de destaque no setor econômico. Delas provém uma grande gama de produtos como madeira, polpa celulósica, energia industrial, subprodutos de interesse alimentício e farmacêutico, além de sua importância ambiental (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae), conhecida como cerejeira, possui diversos atributos que a tornam uma espécie com grande potencial de utilização, mas, no entanto, é pouco explorada. Sua madeira é moderadamente pesada e possui alta durabilidade (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008). Como tem boa formação de copa, pode ser muito aproveitada paisagisticamente e, do ponto de vista ambiental, é considerada uma espécie adequada para a recuperação de áreas degradadas. Os frutos de *E. involucrata*, embora pouco aproveitados, são muito apreciados *in natura* ou após o processamento, como doces e geléias (LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002). De acordo com Carvalho (2008), sua frutificação em solo fértil ocorre entre os seis e sete anos de idade. Silva (1991) relatou que uma única cerejeira pode frutificar por até 200 anos, produzindo cerca de mil frutos por safra. Além disso, esta espécie possui propriedades medicinais antidiarréicas, digestivas e antirreumáticas (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Contudo, a cerejeira apresenta difícil propagação, tendo sementes extremamente recalcitrantes, às quais perdem sua viabilidade logo após o armazenamento, principalmente devido ao alto teor de umidade que estas possuem. Para Lorenzi (1992) e Carvalho (2008), após duas semanas o potencial germinativo das sementes já sofre reduções significativas. Assim, a propagação por técnicas vegetativas seria uma alternativa à produção de mudas.

Além disso, é de suma importância no melhoramento de espécies lenhosas a propagação vegetativa e, mais especificamente, a cultura de tecidos, já que espécies florestais necessitam de longos ciclos de vida para se reproduzirem (PARANJOTHY et al., 1990). Acrescenta-se a isso o fato da cultura de tecidos poder auxiliar na conservação de germoplasma destas espécies (FERREIRA et al., 1998). Xavier et al. (2007) relataram que a propagação *in vitro* está entre as técnicas da biotecnologia vegetal com maior interesse científico e econômico, sendo a

micropropagação de espécies florestais a mais difundida e com aplicações comprovadas no setor.

Diversos critérios são importantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro* como, por exemplo, a escolha da melhor fonte de explantes e a forma mais adequada de assepsia destes. Quanto aos meios nutritivos, existem formulações distintas que devem ser ajustadas para cada espécie. O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suas diluições são, costumeiramente, os mais utilizados. No entanto, existem formulações específicas a determinados grupos de plantas como, por exemplo, o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), mais usual em espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998, GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Desta forma, o presente trabalho objetivou estabelecer cultivos assépticos de *Eugenia involucrata* DC., bem como avaliar a influência da utilização de segmentos nodais e apicais e de diferentes meios nutritivos sobre o estabelecimento e demais aspectos de desenvolvimento *in vitro* das plantas.

3.4 Material e Métodos

Para permitir o desenvolvimento de cultivos livres de contaminantes e o estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata*, foram realizados dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul.

No primeiro experimento, foram utilizadas como doadoras de explantes espécimes de cerejeira cultivados em casa de vegetação. As plantas foram mantidas em vasos plásticos com 22 cm de altura e 24 cm de diâmetro (capacidade para aproximadamente 8 L) contendo o substrato Plantmax®. Estas apresentavam aproximadamente dois anos de idade e permaneceram cobertas com sombrite a 50% sendo que, em épocas de maior calor, instalou-se sobre o sombrite uma manta de tecido-não-tecido (TNT) branco. Além de irrigações diárias, as plantas receberam, mensalmente, 400 ml de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) a 1 g L⁻¹ e, a cada 15 dias, 400 ml de solução a 1 g L⁻¹ de nitrogênio (uréia). Pulverizações quinzenais foram realizadas com solução a base de Cercobin700PM® (thiophanato metílico) a 1 g L⁻¹ e sulfato de estreptomicina a 0,1 g L⁻¹, visando obter um pré-tratamento para a posterior desinfestação dos explantes.

Neste experimento, foram utilizados como explantes segmentos nodais de ramos que não fossem extremamente lenhosos (embora apresentassem aspecto semi-lenhoso), os quais possuíam, aproximadamente, 15 cm de comprimento e de quatro a cinco segmentos nodais. Para homogeneizar os explantes, foram excluídos os segmentos apical e basal do ramo. Realizou-se, com tesoura, o corte dos ramos e de meia folha destes. Após, foram imersos em água destilada contendo 1 g L^{-1} do fungicida Benlate 500® (benomyl) e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina. Em laboratório, os explantes foram lavados com o auxílio de água corrente, esponja e detergente comercial. Neste momento também foram seccionados os segmentos, os quais permaneceram imersos em água destilada até a desinfestação.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram expostos por 30 segundos à solução de etanol a 70% (v/v), seguido de um enxágue com água estéril. Posteriormente, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v), contendo três gotas de detergente comercial, permanecendo sob agitação por 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. A concentração de NaOCl foi escolhida com base em testes realizados previamente. A seguir, foi realizado um triplo enxágue e os explantes permaneceram em água estéril durante o procedimento de inoculação. A unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade de 150 ml, contendo 30 ml de meio nutritivo e três explantes. O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar. Desta forma, conduziu-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 10 repetições, em um total de 60 parcelas e 180 explantes introduzidos.

Para a introdução *in vitro*, realizou-se a remoção dos resquícios foliares existentes e, também, seccionaram-se os segmentos a 0,3 cm acima da região nodal e 0,8 cm abaixo desta. O corte da parte basal foi realizado em bisel, visando aumentar a superfície de contato com o meio e facilitar a introdução. Cada explante possuía duas gemas dormentes.

Aos 21 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis: contaminação geral (sendo a ocorrência de contaminantes junto aos explantes, independentemente do microrganismo causador); contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes); contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes); oxidação fenólica (escurecimento dos explantes); todas expressas em porcentagem.

No segundo experimento, as plantas, que apresentavam aproximadamente três anos de idade, permaneceram em casa de vegetação, inicialmente, sob as mesmas condições descritas anteriormente. No entanto, quatro semanas precedentes à coleta dos explantes, realizou-se uma poda em toda a parte aérea das plantas. As podas foram realizadas deixando-se regiões de galhos e ramos com duas ou mais gemas visíveis.

Após a poda, os tratos culturais foram efetuados da mesma forma relatada no experimento anterior, contudo, foi intensificado o uso da solução de nitrogênio (uréia), à qual foi adicionado potássio na proporção de 2:1, efetuando-se uma aplicação semanal. Além disso, os tratos sanitários foram administrados a cada sete dias, encharcando-se os ramos por completo.

Para a coleta dos explantes, foram escolhidos ramos jovens, verdes, possuindo entre dois e três segmentos, considerando-se o apical e o(s) nodal(is). Os segmentos foram imersos em solução contendo Benlate500® (benomyl) a 1 g L^{-1} e sulfato de estreptomicina a $0,1 \text{ g L}^{-1}$, durante 30 minutos. Em Laboratório, foram cuidadosamente lavados em água corrente, com o auxílio de esponja e detergente comercial, e seccionados com o uso de uma tesoura. Após, permaneceram por 30 minutos em solução de etanol a 70% (v/v), seguido de um enxágue em água estéril. A seguir, em capela de exaustão, os explantes foram imersos em solução de bicloreto de mercúrio (HgCl_2) a 0,05% (p/v), onde permaneceram por 10 minutos. Posteriormente, foram enxaguados com água estéril e, em câmara de fluxo laminar, foram expostos à agitação por 15 minutos em solução de NaOCl a 1,5% (v/v) acrescida de três gotas de detergente comercial. Passado este período, as plantas foram enxaguadas três vezes e permaneceram, durante a inoculação, em água estéril contendo 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico. Os explantes foram compostos por segmentos apicais (região apical dos ramos), seccionados em bisel a 0,8 cm do nó e contendo uma gema dormente; e segmentos nodais, os quais tiveram seus pares de folhas laterais retirados, deixando-se apenas o vestígio inicial do limbo, e cortados a 0,3 cm acima e 0,8 cm abaixo da região do nó, a qual possuía duas gemas dormentes. O corte da região basal foi realizado em bisel.

Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 2×3 onde, os níveis do fator “A”, referem-se a dois tipos de explantes (segmentos apicais e segmentos nodais) e, os níveis do fator “B”, a três meios nutritivos. Os meios utilizados foram o MS (MURASHIGE; SKOOG,

1962), $\frac{1}{2}$ MS (composto pela diluição do meio MS à metade de sua concentração normal de sais) e WPM – *Wood Plant Medium* (LLOYD; MCCOWN, 1981). O ensaio apresentou 10 repetições, cada uma composta por um frasco com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e dois explantes, contabilizando 60 unidades experimentais e 120 explantes inoculados. Os frascos foram fechados com papel alumínio. A composição dos meios nutritivos MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM pode ser visualizada na Tabela 1. Aos meios foram acrescidos 30 g L^{-1} de sacarose, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar.

Tabela 1 – Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), $\frac{1}{2}$ MS e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981)*

	MS (mg L ⁻¹)	$\frac{1}{2}$ MS (mg L ⁻¹)	WPM (mg L ⁻¹)
Macronutrientes			
Ca(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	-	-	556,000
NH ₄ NO ₃	1.650,000	825,000	400,000
KNO ₃	1.900,000	959,000	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,000	220,000	96,000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,000	185,000	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000	85,000	170,000
K ₂ SO ₄	-	-	990,000
Micronutrientes			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,300	11,150	22,300
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,600	4,300	8,600
H ₃ BO ₃	6,200	3,100	6,200
KI	0,830	0,415	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250	0,125	0,250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,012	0,250
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,012	-
Ferro-EDTA			
Na ₂ EDTA	37,250	18,620	37,250
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,850	13,925	27,850
Vitaminas			
Tiamina-HCl	0,100	0,050	1,000
Piridoxina- HCl	0,500	0,250	0,500
Ác. Nicotínico	0,500	0,250	0,500
Glicina	2,000	1,000	2,000
Mio-inositol	100,000	100,000	100,000

*Dados adaptados de Xavier et al. (2009).

Durante os primeiros 30 dias de cultivo, os explantes permaneceram nos meios nutritivos citados, aos quais foi acrescido $1 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético (ANA) e $5 \text{ }\mu\text{M}$ de tidiazuron (TDZ). Após este período, os explantes foram

subcultivados por mais 30 dias nos respectivos meios nutritivos, porém, na ausência de reguladores de crescimento e com o acréscimo de 1 g L^{-1} de carvão ativado.

Aos 60 dias, foram avaliadas as variáveis: contaminação geral (%), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%) (seguindo-se os mesmos critérios descritos no experimento anterior). Adicionalmente, avaliaram-se as variáveis: oxidação fenólica (visualizada pela coloração do explante, mesmo quando o aspecto oxidativo não inibiu o seu desenvolvimento), média de brotos por explantes (considerando-se como broto qualquer desenvolvimento das gemas do explante), média de brotos desenvolvidos por explante (considerando-se como brotos apenas àqueles desenvolvidos e que haviam emitido folhas), média de folhas emitidas por explante, porcentagem de enraizamento, intumescimento dos explantes, porcentagem de calos na base dos explantes e, por fim, estabelecimento *in vitro* (porcentagem de explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento).

Em ambos os experimentos, para a vedação dos frascos, foi utilizado papel alumínio. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e após a inclusão dos reguladores de crescimento ou carvão ativado. Os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e $1,5 \text{ atm}$ de pressão. As unidades experimentais foram dispostas em sala de cultivo com temperatura controlada de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias. O fotoperíodo foi regulado para 16 horas.

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, estes foram transformados pela função $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, dados de tratamentos quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial e, dados de tratamentos qualitativos, à comparação de médias por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas e os modelos matemáticos também apresentam os valores não transformados. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) foi utilizado para o processamento dos dados.

3.5 Resultados e Discussão

No primeiro experimento, não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos testados para as variáveis contaminação geral ($P= 0,0627$), contaminação fúngica ($P= 0,2421$) e oxidação fenólica ($P=0,6291$). Apenas foram observadas diferenças para a contaminação bacteriana ($P=0,0126$).

O padrão de comportamento dos tratamentos para a presença bacteriana ajustou-se a um modelo de regressão linear decrescente (Figura 1), em que, com o aumento dos tempos de contato dos segmentos nodais com o hipoclorito de sódio, a contaminação bacteriana reduziu significativamente. O melhor tratamento utilizado foi à imersão dos segmentos por 25 minutos no agente desinfestante, com 39,35% de explantes apresentando colônias bacterianas.

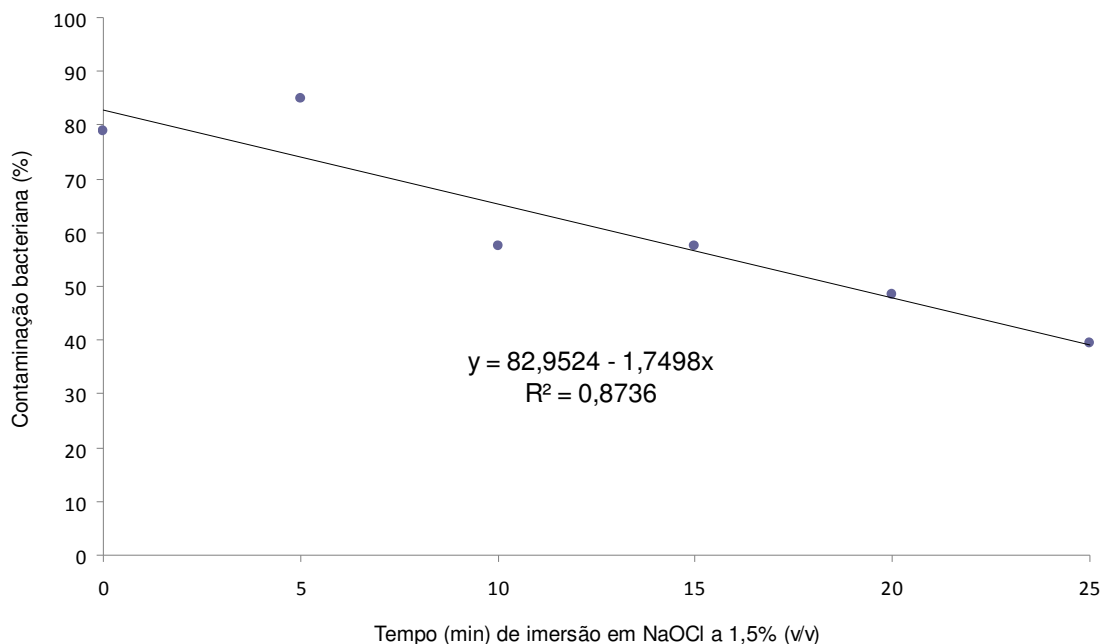


Figura 1 – Efeito dos diferentes tempos de imersão de segmentos nodais de *E. involucrata* em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) sobre a porcentagem de contaminação bacteriana aos 21 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Foram observados altos índices de microrganismos na variável contaminação geral (média de 67,14%), e reduzida contaminação fúngica (7,06%). Isso demonstra que os tratamentos de desinfestação superficial não foram eficientes em controlar a

presença de bactérias no cultivo, sugerindo a utilização de procedimentos adicionais para promover o estabelecimento *in vitro* livre destes contaminantes.

Contaminações são obstáculos à cultura de tecidos de espécies lenhosas, merecendo atenção especial. Em *Pongamia pinnata*, uma árvore da família das leguminosas, o estabelecimento de culturas assépticas é limitado pelas contaminações microbianas. Nesta espécie, só é possível estabelecer culturas assépticas com o uso de *Plant preservative mixture* (PPM) e Cefotaxima (SUJATHA; HAZRA, 2007).

Observou-se que nos tratamentos em que foram empregados maiores tempos de contato dos tecidos vegetais com o hipoclorito de sódio houve a ocorrência de injúrias nos explantes. Isso sugere que a utilização de outros procedimentos de desinfestação para melhorar a eficiência deste processo deve ser avaliada, e que não é recomendado o aumento da concentração do agente desinfestante ou dos períodos de imersão. Estas injúrias causadas aos tecidos tiveram reflexos na oxidação fenólica (57,55%), possivelmente como resposta celular ao estresse causado, já que, ferimentos, podem estimular a atividade da fenilalanina amonialiase (PAL), à qual está relacionada à formação de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004); mas, também, em função do tipo de explante inoculado, pois os segmentos eram semi-lenhosos, favorecendo a oxidação e reação mais ativamente com o hipoclorito de sódio. Como alternativa, optou-se pelo uso (no experimento subsequente) de explantes mais jovens, obtidos por meio de podas, os quais teriam menos contato com o ambiente e, ao mesmo tempo, possibilitariam um maior controle sanitário das plantas.

Na lenhosa *Ulmus minor*, o cultivo de brotações diretamente extraídas das plantas no campo resultou em contaminações muito elevadas, próximas a 100%. Contudo, utilizando ramos com brotos dormentes, os quais foram mantidos em casa de vegetação, as contaminações reduziram em 90% (CONDE et al., 2008).

É importante destacar que muitos contaminantes apareceram após algumas semanas de cultivo, o que indica a possível presença de microrganismos endofíticos nos tecidos. Apesar disto, pode-se obter o estabelecimento *in vitro* de cerejeira, conforme se observa na Figura 3 (ao final deste capítulo), embora as contaminações tenham inviabilizado o prosseguimento do cultivo neste primeiro momento.

No segundo experimento, as avaliações das contaminações bacterianas e fúngicas evidenciaram a eficiência do processo de desinfestação utilizado,

possivelmente pela otimização dos tratamentos sanitários durante o desenvolvimento das brotações jovens, bem como pelo acréscimo do HgCl_2 durante a assepsia.

Este resultado assemelha-se ao que vem sendo observado na obtenção de culturas assépticas de diversas espécies perenes, nas quais o HgCl_2 mostra-se muito eficiente. Shirin; Rana (2007) obtiveram a regeneração *in vitro* de *Banbusa galuascens* desinfestando explantes nodais com a imersão destas estruturas em solução de bicloreto de mercúrio a 1% por 10 minutos; já em *Holarrhena antidysenterica*, uma espécie arbórea com propriedades medicinais, a desinfestação também empregou o HgCl_2 , porém, em uma concentração mais reduzida (0,1%), ficando em contato com os explantes por apenas 2 minutos (MALLIKARJUNA; RAJENDRUDU, 2007).

Não houve interação ($P=0,3718$), influência do tipo de explante ($P= 0,3218$) e nem do meio nutritivo utilizado ($P=0,3746$) sobre a presença de bactérias junto aos cultivos (0,41%) e, no que diz respeito à presença de fungos (13,75%), observou-se o mesmo resultado, com os valores de “P”, respectivamente, 0,1730; 0,3144; e 0,5616. Porém, estes índices de contaminação estão dentro dos limites aceitáveis para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.

A variável contaminação geral apresentou, aos 30 dias, diferenças significativas ($P= 0,0421$) entre os níveis do Fator “A” (Figura 3). Explantes oriundos de segmentos apicais apresentaram a menor taxa de contaminação geral (6,66%), diferindo estatisticamente dos segmentos nodais (19,16%). Este resultado demonstra que tecidos mais jovens e menos lenhosos, além de estarem menos tempo em contato com o ambiente, dificilmente apresentam contaminações endógenas.

A oxidação fenólica, avaliada aos 60 dias, também apresentou diferenças ($P=0,0028$) apenas para o Fator “A” (Figura 2). Segmentos nodais jovens apresentaram reduzida contaminação (15,74%), diferindo daquela observada em segmentos apicais (38,33%), em que, em função da fragilidade dos tecidos, houve um aumento nas injúrias durante o processo de desinfestação, o qual ampliou a ocorrência de oxidações no decorrer do tempo, possivelmente pelas mesmas razões citadas no experimento anterior.

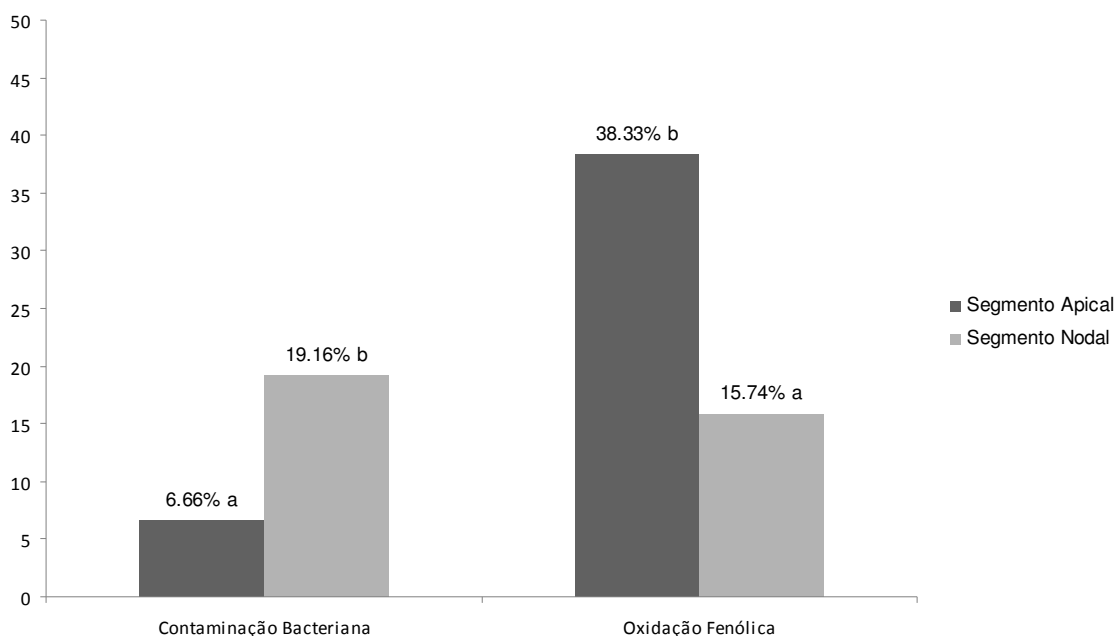


Figura 2 – Influência do tipo de explante na contaminação geral (aos 30 dias de cultivo) e na oxidação fenólica (aos 60 dias de cultivo) em *E. involucrata* DC. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Na maioria das vezes, a presença de contaminações ou de aspectos oxidativos nos explantes, embora indesejados, não inviabilizaram o estabelecimento e o desenvolvimento das culturas *in vitro*.

Todos os níveis dos fatores testados foram eficientes na promoção do estabelecimento *in vitro* de cerejeira. Não se observaram diferenças significativas para esta variável em nenhum dos níveis dos fatores estudados (níveis do fator “A” com $P=0,0789$; níveis do fator “B” com $P=0,5371$) e nem para interação ($P=0,8440$); a média geral de estabelecimento foi de 91,92%. Este resultado evidencia nitidamente que o cultivo desta espécie, tanto por meio de segmentos apicais como nodais, é extremamente promissor, favorecendo a sua propagação por clonagem.

Houve interação entre os fatores estudados (tipo de explante e meio de cultura) para as variáveis média de brotos por explante ($P=0,0060$), média de brotos desenvolvidos por explante ($P=0,0284$) e média de folhas por explante ($P=0,0237$); estes dados estão expostos na Tabela 2. O aspecto geral das culturas estabelecidas

e do desenvolvimento inicial *in vitro*, em segmentos apicais e nodais, pode ser visualizado na Figura 3.

O uso do meio $\frac{1}{2}$ MS promoveu um aumento no número de brotos por explantes no cultivo de segmentos apicais (1,20), sendo superior ao meio WPM (0,55). O meio MS (0,75), no entanto, não diferiu dos demais. Na introdução *in vitro* de segmentos nodais, o meio WPM (1,75) mostrou-se superior ao meio MS (1,16), mas não diferiu da utilização do meio $\frac{1}{2}$ MS (1,50), que, por sua vez, não diferiu de ambos.

Pode-se inferir que os meios $\frac{1}{2}$ MS e WPM foram favoráveis ao desenvolvimento *in vitro* de cerejeira. A maior adaptação dos explantes nestes meios demonstrou a preferência da espécie pelo cultivo em meios nutritivos com redução em sua concentração iônica em comparação ao meio de cultura MS. Para Vengadesan et al. (2002) e Nunes et al. (2002), o meio WPM possui cerca de 45% da força iônica do meio MS. Frente a esta afirmativa, pode-se concluir que o meio $\frac{1}{2}$ MS possui 50% desta capacidade iônica, explicando os bons resultados visualizados em ambos.

Dados semelhantes foram observados ao serem testados diferentes meios de cultura para a micropropagação de *Acacia mangium* a partir de explantes nodais. Monteuiis (2004) registrou que o melhor desenvolvimento ocorreu com a redução da concentração dos sais do meio MS, tanto à metade como à $\frac{1}{3}$. Além disso, também foi possível propagar a planta em meios com redução da sacarose para 5 g L⁻¹. Estas características são muito particulares a cada espécie e, em alguns casos, ao genótipo. Em *Melia azedarach*, por exemplo, foi observado, ao testar-se os meios MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM e B5, os efeitos positivos do meio MS com sua constituição completa de sais, especialmente no número de brotações emitidas (HUSAIN; ANIS, 2009). Tal resultado é díspar ao observado em cerejeira.

De maneira geral, não foram observadas diferenças estatísticas entre o uso de segmentos apicais e nodais, exceto quando inoculados em meio WPM, onde o maior número de brotos (1,75) ocorreu em segmentos nodais, enquanto que os segmentos apicais apresentaram menor desempenho (0,83).

No cultivo de *Magnolia x soulangiana* em que foram utilizadas brotações apicais, Kamenicka; Lanakova (2000) obtiveram maior crescimento e desenvolvimento em um meio nutritivo denominado “S”, porém, os meios WPM e $\frac{1}{2}$ WPM também apresentaram um desempenho satisfatório, demonstrando que esta

espécie adapta-se em meios de cultura com capacidades iônicas reduzidas, semelhante às observações em cerejeira.

Em relação aos brotos desenvolvidos por explante, em que se considerou apenas a ocorrência de desenvolvimento expressivo com emissão de folhas, o meio $\frac{1}{2}$ MS foi superior aos meios MS e WPM quando foram utilizados segmentos apicais, apresentando as médias de 1,00; 0,40 e 0,33, respectivamente. No entanto, em segmentos nodais, não houve diferenças entre o uso dos meios MS (1,00), $\frac{1}{2}$ MS (1,31) e WPM (1,43). Não ocorreram diferenças entre os tipos de explantes inoculados apenas no uso do meio $\frac{1}{2}$ MS, sendo que, para os demais meios nutritivos, explantes oriundos de segmentos nodais foram mais promissores para a emissão de brotos. Possivelmente, isso se deva ao fato de segmentos nodais terem suas gemas laterais, próximas à inserção dos pecíolos foliares, bem mais desenvolvidas desde a coleta dos explantes, iniciando sua quebra de dormência logo após a inoculação.

Para segmentos apicais, a maior emissão de folhas ocorreu com a utilização do meio $\frac{1}{2}$ MS (2,80), que foi superior aos meios MS (1,05) e WPM (1,20). Por outro lado, não houve diferença entre estes meios nutritivos no desenvolvimento de folhas em segmentos nodais, sendo observadas as médias 3,55 (MS), 4,00 ($\frac{1}{2}$ MS) e 5,06 (WPM).

Exceto para o meio $\frac{1}{2}$ MS, em que não se observaram diferenças para o cultivo de segmentos apicais (2,80) ou nodais (4,00); o emprego de segmentos nodais mostrou-se mais favorável ao desenvolvimento foliar em explantes de cerejeira nos meios nutritivos MS (3,55) e WPM (5,06), enquanto segmentos apicais tiveram médias, para estes mesmos meios, de 1,05 e 1,20. Em *Arbutus unedo*, uma espécie lenhosa, o uso de segmentos nodais foi inferior ao de ápices em todas as variáveis avaliadas (GOMES; CANHOTO, 2009), diferente do observado em cerejeira e, embora não tenham sido utilizados ápices caulinares mas, sim, segmentos apicais, é possível traçar este comparativo dado as diferenças dos tecidos quanto a sua idade. Esta mesma diferença foi observada durante o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus nitens* (GOMES; CANHOTO, 2003).

Obteve-se o enraizamento *in vitro* dos explantes após 60 dias de cultivo, tanto em segmentos apicais como nodais (Tabela 2; Figura 3). O enraizamento pode ter sido estimulado pelo uso dos fitorreguladores ANA (1 μ M) e TDZ (5 μ M), mais especificamente ANA, já que as auxinas estão relacionadas ao enraizamento

adventício (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os fitorreguladores teriam funcionado como um tratamento “pulse”, já que foram empregados apenas no cultivo inicial dos explantes.

Outra possibilidade seria o uso do carvão ativado, uma vez que este agente também pode ser favorável à condução desta rota organogênica (CALDAS et al., 1998). Em *Balanites aegyptiaca*, a associação de carvão com ácido indolbutírico (IBA) foi favorável ao enraizamento (SIDDIQUE; ANIS, 2009).

Contudo, como as únicas fontes de variação no experimento foram os meios nutritivos e os tipos de explantes, foi possível observar o favorecimento deste processo por determinados meios. Os níveis do Fator “B” evidenciaram diferenças significativas ($P= 0,0268$) para o enraizamento (Tabela 2), em que o meio $\frac{1}{2}$ MS (17,50%) foi mais promissor, sendo superior ao MS (2,50%). O meio WPM (5,00) não diferiu de ambos, podendo ser considerado como intermediário.

Em *Crataeva nurvala*, o enraizamento foi obtido com a utilização de ANA e ocorreu apenas em meio $\frac{1}{2}$ MS, semelhante ao observado em cerejeira, porém, não sendo possível a rizogênese no cultivo de explantes em meio WPM (WALIA et al., 2007). Em *Balanites aegyptiaca*, Anis et al. (2010) observaram a vantagem do meio MS reduzido à metade de sua concentração de sais sobre os processos rizogênicos em segmentos nodais. Nesta lenhosa, o uso da auxina ANA não diferiu do maior valor de enraizamento observado, o qual ocorreu com o uso de AIB (ácido indolbutírico).

A melhor adequação do meio $\frac{1}{2}$ MS pode estar ligada à relação carbono/nitrogênio (C/N), em que a redução do nitrogênio (conforme ocorre no meio) e o aumento de fontes de carboidrato (às quais se mantiveram em seu nível normal no meio $\frac{1}{2}$ MS, a saber, 30 g L^{-1}) favoreceram os processos de enraizamento. Xavier et al. (2009) expuseram que o alto conteúdo de carboidratos atua como um fator importante à rizogênese, já que a iniciação radicial requer energia. Estes mesmos autores relataram a existência de evidências sobre a melhor ocorrência de enraizamento quando se mantêm as plantas bem nutridas, mas com redução nos teores de nitrogênio.

A presença de intumescimento nos explantes (Tabela 2), a princípio indesejável, apresentou interação entre os níveis dos fatores testados ($P= 0,0179$). O uso de segmentos nodais (18,74%) não diferiu dos segmentos apicais (15,00%), quando cultivados em meio $\frac{1}{2}$ MS. No entanto, segmentos nodais propiciam menos

intumescimento em relação aos segmentos apicais, especialmente quando cultivados nos meios MS e WPM.

A formação de calos na base dos explantes, também indesejada no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais e apicais, mostrou interação entre os níveis dos fatores testados ($P = 0,0272$). Não houve diferenças para os tipos de explantes testados, exceto quando cultivados em meio $\frac{1}{2}$ MS, ocorrendo menor calogênese na base dos explantes em segmentos nodais (12,50%) em relação aos segmentos apicais (45,00%). A maior porcentagem de calogênese na base dos explantes, em segmentos apicais, ocorreu quando foram cultivados no meio WPM (66,66%), o qual não diferiu do meio $\frac{1}{2}$ MS (45,00%). O meio nutritivo MS formou apenas 20,00% de calos na base dos explantes.

Tabela 2 – Efeito de diferentes explantes e meios nutritivos no desenvolvimento *in vitro* de *E. involucrata* DC. Variáveis avaliadas aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

Meio	-----Brotos por Explante-----			-----Brotos Desenvolvidos por Explante-----		
	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média
MS	0,75 a b A	1,16 b A	0,95	0,40 b B	1,00 a A	0,70
1/2 MS	1,20 a A	1,50 a b A	1,35	1,00 a A	1,31 a A	1,15
WPM	0,55 b B	1,75 a A	1,15	0,33 b B	1,43 a A	0,88
Média	0,83	1,47		0,57	1,25	
CV (%)		16,61			19,87	
Meio	-----Folhas Emitidas por Explante-----			-----Enraizamento (%)-----		
	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média
MS	1,05 b B	3,55 a A	2,30	5,00	0,00	2,50 b
1/2 MS	2,80 a A	4,00 a A	3,13	15,00	20,00	17,50 a
WPM	1,20 b B	5,06 a A	3,40	5,00	5,00	5,00 a b
Média	1,68	4,20		8,33	8,33	
CV (%)		27,87			14,15	
Meio	-----Intumescimento do Explante (%)-----			-----Calo na Região Basal (%)-----		
	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média
MS	55,00 b B	27,77 a A	41,38	20,00 a A	44,44 a A	32,22
1/2 MS	15,00 a A	18,74 a A	16,87	45,00 a b B	12,50 a A	28,75
WPM	61,11 b B	12,50 a A	36,80	66,66 b A	38,74 a A	52,70
Média	43,70	19,67		43,88	31,89	
CV (%)		17,54			20,52	

*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. A letra "a" é atribuída conforme o que se deseja no cultivo *in vitro*.

Portanto, pode-se dizer que, para segmentos apicais, o meio $\frac{1}{2}$ MS foi o mais adequado ao seu desenvolvimento, ao passo que, no uso de segmentos nodais, foram mais promissores ao processo de propagação os meios $\frac{1}{2}$ MS e WPM. Contudo, pode-se indicar o uso do meio $\frac{1}{2}$ MS, uma vez que permite o estabelecimento, o desenvolvimento e o enraizamento *in vitro* de explantes oriundos de segmentos nodais e apicais de *E. involucrata*. Adicionalmente, é mais econômico, considerando-se o seu modo de preparo, já que o uso do meio MS costuma ser rotineiro em laboratórios de cultura de tecidos, facilitando, assim, a execução dos trabalhos.

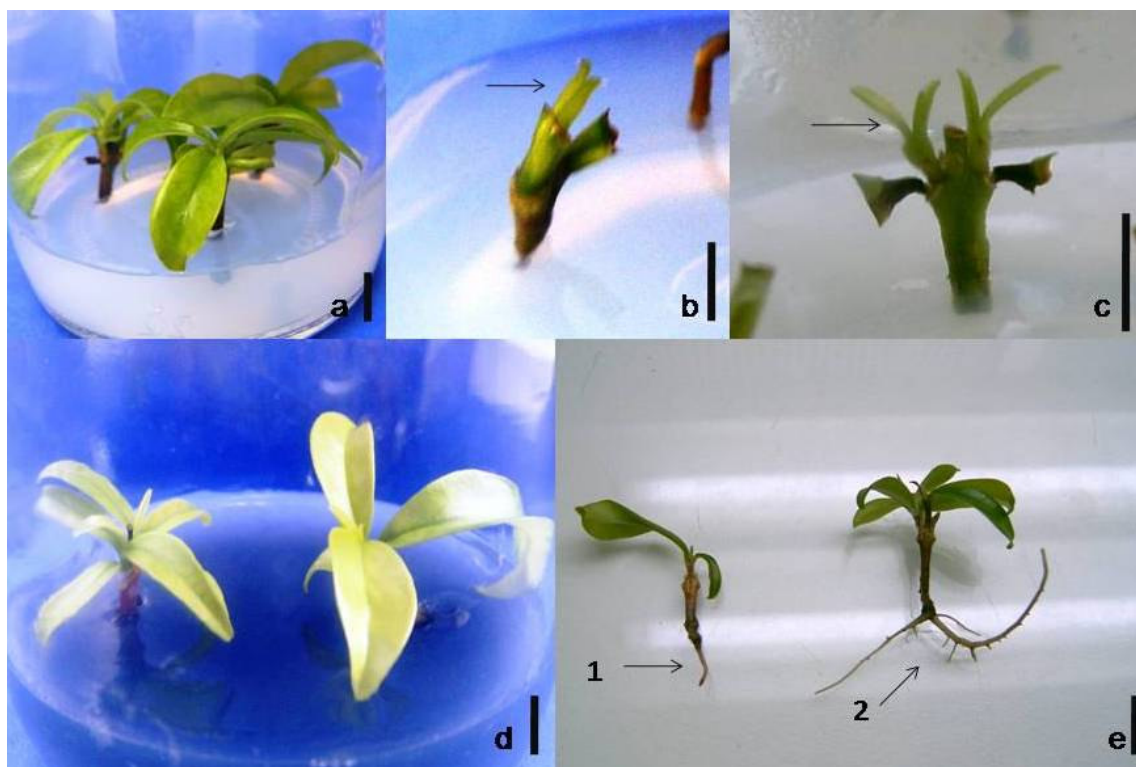


Figura 3 – Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *E. involucrata* DC. Na figura “a” observa-se o estabelecimento inicial, após a desinfestação (21 dias); “b”, mostra o desenvolvimento inicial em segmentos apicais (7 dias); “c”, demonstra o desenvolvimento inicial das gemas em segmentos nodais (7 dias); “d”, apresenta o cultivo em meio com carvão ativado (60 dias); e, “e”, evidencia a rizogênese em segmento apical (seta com o número 1) e em segmento nodal (seta com o número 2), aos 60 dias de cultivo. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

3.6 Conclusões

- Tratamentos à base de hipoclorito de sódio a 1,5%, nos tempos testados, não são eficientes à desinfestação de segmentos nodais de *E. involucrata* que já possuam aspectos lenhosos.
- É possível a obtenção de culturas assépticas de *E. involucrata* por meio do cultivo de segmentos nodais e apicais obtidos após a realização de poda, e desinfestados com o auxílio de bicloreto de mercúrio a 0,05%, e hipoclorito de sódio a 1,5%.
- Para segmentos apicais de *E. involucrata*, o uso do meio de cultura ½ MS é mais adequado que os meios MS e WPM.
- Os meios nutritivos ½ MS e WPM são apropriados para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*, recomendando-se o meio ½ MS pela economia e praticidade.
- A utilização de segmentos nodais é mais promissora ao cultivo *in vitro* de *E. involucrata* do que o uso de segmentos apicais.

4 CAPÍTULO II

ASPECTOS DA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DC. PELO USO DE COMBINAÇÕES DE ANA E TDZ E EFEITOS DO GA₃ SOBRE O CULTIVO

4.1 Resumo

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae) é uma importante espécie florestal com potencialidade econômica. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do TDZ sobre a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata* e os efeitos do GA₃ nas culturas assépticas. Foi testada a ausência e a presença de ANA (0,5 µM) combinado ao TDZ nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µM sobre diversos aspectos da multiplicação *in vitro* de *E. involucrata*. Na avaliação do alongamento das brotações, utilizaram-se explantes cultivados *in vitro* por quatro meses sendo que, após este período, foi introduzido nas culturas o GA₃ nas concentrações 0, 5, 10 e 20 µM. O uso do TDZ combinado com ANA favoreceu a emissão de brotações e de gemas nos explantes, especialmente a 32 µM. Concentrações intermediárias de TDZ também promoveram brotações, mas induziram à ocorrência de hiperhidricidade nos explantes. A utilização de GA₃ não foi favorável ao alongamento das brotações, sendo tóxica aos explantes na concentração de 20 µM. É possível multiplicar e induzir segmentos nodais de cerejeira à organogênese na presença de TDZ, preferencialmente combinado com ANA, no entanto, o uso de GA₃ não propicia o alongamento dos explantes de *E. involucrata*.

Palavras-chave: micropropagação, gemas adventícias, organogênese

ASPECTS OF THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Eugenia involucrata* DC. THROUGH THE USE OF COMBINATIONS BETWEEN NAA AND TDZ AND EFFECTS OF GA₃

4.2 Abstract

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae) is an important tree species with economic potential. This study aimed to evaluate the effect of TDZ on *in vitro* multiplication of nodal segments of *E. involucrata* and the effects of GA₃ in aseptic cultures. It was tested the effect of the absence and presence of NAA (0.5 µM) combined with TDZ at concentrations of 0, 2, 4, 8, 16 and 32 µM on various aspects of *in vitro* multiplication of *E. involucrata*. In assessing the growth of the shoots were used explants cultured *in vitro* four months, after it was introduced GA₃ in the medium, at concentrations of 0, 5, 10 and 20 µM. The use of TDZ combined with NAA favored the issuance of shoots and buds in the explants, especially at 32 µM. Intermediate concentrations of TDZ also promoted shoot, but induced the occurrence of hyperhidricity in explants. The use of GA₃ did not favor the elongation of the shoots, being toxic to the explants concentrations from 20 µM. It is possible to multiply and to induce organogenesis nodal segments in the presence of TDZ, however, the use of GA₃ does not provide the elongation of explants of *E. involucrata*.

Key-words: micropropagation, adventitious buds, organogenesis

4.3 Introdução

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC.- Myrtaceae) é uma espécie de ocorrência natural em vários Estados brasileiros, distribuindo-se do Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Apresenta diversas características desejáveis dos pontos de vista madeireiro, frutícola, paisagístico, ambiental e medicinal. No entanto, possui difícil propagação, pois suas sementes são recalcitrantes, ou seja, não se mantêm viáveis durante o armazenamento (LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002; CARVALHO, 2008).

A exploração sustentável da cerejeira é limitada pela falta de conhecimentos relacionados às suas características de propagação e pela incipiência de dados referentes à distribuição de sua variabilidade genética. Espécies florestais necessitam de longos períodos de tempo para atingir a maturidade reprodutiva e fenotípica, além de apresentarem dificuldades nos processos de cruzamentos, o que inibe os programas de melhoramento (TZFIRA et al., 1998; RESENDE, 2001). Uma alternativa na aceleração destes programas é a utilização de técnicas de cultura de tecidos, as quais apresentam diversas vantagens como a possibilidade de conservação de germoplasma *in vitro*, a propagação de clones superiores, o estabelecimento de culturas livres de patógenos, o patenteamento de processos e materiais obtidos pela biotecnologia, além de servirem de base para outras técnicas biotecnológicas, a exemplo da transformação genética (XAVIER et al., 2007).

Além de propagar as plantas *in vitro*, a otimização deste processo pela emissão de numerosas brotações pode ser realizada, ampliando os resultados obtidos. As citocininas, muitas vezes combinadas às auxinas, têm sido empregadas na obtenção de propágulos por meio de multiplicação. Para Sujatha; Hazra (2007), o thidiazuron (TDZ) está entre as citocininas mais utilizadas na cultura de tecidos de espécies lenhosas. Os autores também relataram que este regulador de crescimento é, geralmente, requerido em quantidades maiores quando comparado a outros, como, por exemplo, as citocininas representantes do grupo das aminopurinas. Já as giberelinas (em especial o ácido giberélico [GA₃]) são conhecidas por promoverem o alongamento dos internós das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, promovem o crescimento e a rediferenciação de tecidos sendo, por esta razão, muito comuns em trabalhos de cultura de tecidos (MATSUMOTO, 2000).

Considerado os relatos acima, por meio de técnicas de multiplicação *in vitro* seria possível propagar de forma eficiente a espécie *E. involucrata*, contribuindo-se com conhecimentos para os campos da silvicultura, fruticultura, melhoramento e conservação de recursos genéticos vegetais.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a multiplicação *in vitro* de *E. involucrata* por meio do uso de combinações de reguladores de crescimento que incluem a presença e a ausência de ácido naftalenoacético (ANA) e diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ), bem como analisar o uso da giberelina GA₃ no alongamento de explantes mantidos em cultivo por quatro meses.

4.4 Material e Métodos

Para atender aos objetivos propostos, foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul.

No primeiro experimento, para a obtenção de explantes, foram utilizadas plantas matrizes mantidas em casa de vegetação. Estes exemplares de cerejeira passaram por uma poda cerca de quatro semanas antes da coleta de explantes visando à emissão de ramos jovens. As plantas permaneceram em vasos de 22 cm de altura por 24 cm de diâmetro (capacidade para aproximadamente 8 L) cobertas por sombrite a 50% e, em períodos de maior calor, também utilizou-se como cobertura tecido não tecido (TNT) branco. Foram realizadas irrigações diárias e, a cada 15 dias, aplicaram-se 400 ml de uma solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) a 1 g L^{-1} enquanto que, semanalmente, foram utilizados 400 ml de nitrogênio (uréia) a 1 g L^{-1} . Igualmente, todas as semanas e no dia anterior à coleta de explantes, pulverizaram-se as plantas até o encharcamento total com solução à base de Cercobin700PM® (thiophanato metílico) a 1 g L^{-1} e sulfato de estreptomicina a $0,1 \text{ g L}^{-1}$, objetivando este processo como um pré-tratamento, auxiliar na posterior desinfestação dos explantes.

No dia anterior à obtenção dos explantes, as plantas foram regadas visando manter o turgor das células vegetais. As coletas foram realizadas no início da manhã. Escolheu-se ramos jovens, verdes, sem a presença de aspectos lenhosos, com três a quatro segmentos nodais, em que foi excluído o segmento mais apical e, também, desconsiderou-se o segmento mais próximo à base quando ele apresentava-se lenhoso ou com aspectos de maior desenvolvimento em relação aos demais. Durante a coleta, retirou-se parte das folhas e os segmentos ficaram imersos em água destilada com 1 g L^{-1} de Benlate 500® (Benomyl) e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina, permanecendo nesta solução por, aproximadamente, 30 minutos. Em Laboratório, os ramos foram lavados com o auxílio de esponja e detergente comercial e permaneceram em água corrente por 5 minutos. Em seguida, foram seccionados os segmentos nodais que obedeceram ao seguinte processo de desinfestação: imersão em etanol a 70% (v/v) por 30 segundos; enxágue em água destilada; agitação em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) por 15

minutos; imersão em solução de bicloreto de mercúrio (HgCl_2) a 0,05% (p/v) por 10 minutos; enxágue em água estéril; e imersão por 10 minutos em solução de NaOCl a 1,5% (v/v). Por fim, foi realizado um triplo enxágue em água estéril. Nas soluções de NaOCl foram acrescidas 3 gotas de detergente comercial visando surfactar a tensão superficial.

As etapas citadas foram realizadas em câmara de fluxo laminar. Após o último enxágue, os explantes foram mantidos em solução de água estéril contendo 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico. Utilizaram-se segmentos nodais os quais, após a retirada dos resquícios foliares, foram seccionados a 0,3 cm acima e 0,8 cm abaixo da região do nó. A região basal foi cortada em bisel visando o aumento da superfície de contato com o meio nutritivo. O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial 2×6 . Os níveis do fator “A” referiram-se à ausência ou a presença ($0,5 \mu\text{M}$) de ácido naftalenoacético (ANA), e os níveis do fator “B” foram compostos por diferentes concentrações de tidhiazuron (TDZ), sendo: 0, 2, 4, 8, 16 e $32 \mu\text{M}$. O experimento contou com oito repetições cada uma contendo dois explantes, totalizando 96 unidades experimentais e 192 segmentos nodais introduzidos *in vitro*. Cada unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e dois explantes, conforme citado. O meio de cultura utilizado foi o $\frac{1}{2}$ MS, composto pela metade da concentração de sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar. O pH dos meios foi ajustado, após a inclusão dos reguladores de crescimento e antes da inclusão do ágar, para 5,8. Os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis: média de brotos por explantes; comprimento do maior broto (cm), considerando-se da inserção no explante até o lançamento da primeira folha, sem contar a área das folhas; média de gemas emitidas por explante (considerando-se gemas adventícias, oriundas da organogênese dos tecidos e não gemas já pré-existentes, comuns em segmentos nodais); média de folhas por explante; calos formados na base (%); vitrificação (%); massa verde (g); e oxidação fenólica (%).

No segundo experimento, foram utilizados segmentos apicais e nodais (os quais foram coletados e desinfestados da mesma forma como exposto no experimento I) que estavam sendo cultivados *in vitro*, em meio $\frac{1}{2}$ MS, há quatro

meses. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial 2 x 4, em que os níveis do fator “A” referiram-se ao tipo de explante (segmento apical ou nodal) e os níveis do fator “B” às concentrações de GA₃ adicionadas ao meio ½ MS, a saber: 0, 5, 10 e 20 µM. Para a adição do GA₃, a solução estoque deste fitorregulador foi preparada e teve seu pH ajustado para 5,8 com a adição de ácido clorídrico (HCl) e/ou hidróxido de sódio (NaOH), ambos a 0,1N. Após, a solução foi filtrada em filtro Millipore de 0,22 micra. A adição das concentrações pertinentes aos tratamentos foi feita após a autoclavagem do meio de cultura (com o mesmo pH), quando este encontrava-se próximo a 40°C. Posteriormente, o meio foi vertido nos frascos de cultivo.

O experimento teve um total de oito tratamentos com oito repetições, totalizando 64 unidades experimentais. Cada repetição foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio de cultura e 1 explante. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis: comprimento dos brotos (cm), sendo avaliado o comprimento do caule rudimentar mais alto formado entre a primeira folha e o explante, e não o comprimento total da brotação; média de brotos emitidos por explante, e oxidação fenólica (%). Em ambos os experimentos, as unidades experimentais permaneceram em sala de cultivo com temperatura controlada de 25±3°C e fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

Após avaliar a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, estes foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. Para as análises qualitativas utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e, para avaliações quantitativas, foi realizada a análise de regressão polinomial. No caso da presença de interações, foram realizados os desdobramentos dos níveis quantitativos dentro dos qualitativos. As análises foram efetuadas com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

4.5 Resultados e Discussão

Após 60 dias de cultivo foi possível observar diferenças entre os tratamentos testados no primeiro experimento para a maioria das variáveis avaliadas. No que se

refere ao número de brotos emitidos por explante, houve interação ($P = 0,0021$) entre a presença ou a ausência de ANA e os níveis de TDZ utilizados (Figura 4). Na ausência de ANA, não foi possível ajustar o comportamento biológico dos explantes a uma equação polinomial. Observou-se que a maior média de brotos emitidos por explantes ocorreu na ausência do TDZ (1,95). No entanto, na combinação de concentrações de TDZ com 0,5 μM de ANA, foi possível ajustar a variável número de brotos por explante a um comportamento quadrático. Na ausência de TDZ o número de brotos é maior do que o observado durante a maioria das concentrações utilizadas, sendo o ponto de mínimo, obtido a partir de cálculo, com o uso de 11,62 μM de TDZ. Porém, observou-se que, após esta concentração, ocorreu um aumento do número de brotações, obtendo-se um máximo a 32 μM de TDZ, ponto em que a média foi de 2,0 brotos emitidos em cada explante, evidenciando que altas concentrações de TDZ, combinadas com ANA, favorecem a emissão de brotações.

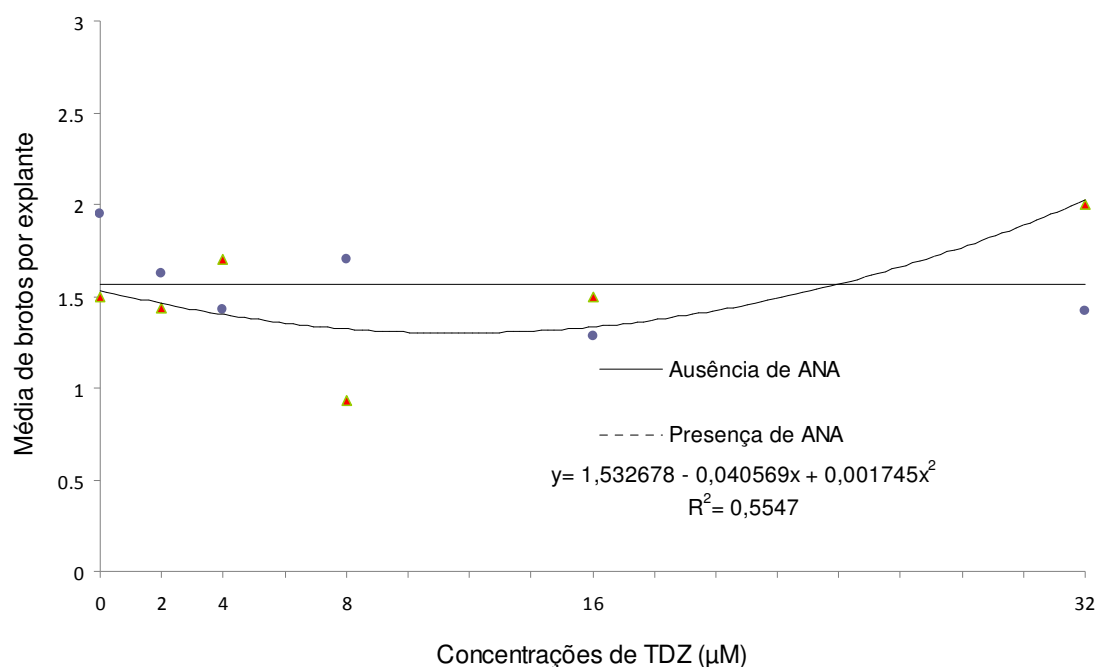


Figura 4 – Total de brotos emitidos em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. na ausência ou na presença (0,5 μM) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μM de thidiazuron (TDZ), aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Possivelmente, a redução inicial no número de brotos emitidos esteja ligada ao intumescimento nas regiões de brotações dos explantes (onde existem as gemas dormentes) com o aumento nas concentrações de TDZ. Esta diminuição ocorreu,

principalmente, nas concentrações de 2 a 16 μM de TDZ. Contudo, a concentração mais elevada propiciou o estímulo necessário para o aumento da emissão de brotações por multiplicação. Pode-se inferir que, nas concentrações mais reduzidas, o balanço entre auxina e citocinina não foi adequado para a emissão de um número maior de brotos, pois além do aporte exógeno, é bastante provável que os explantes possuam níveis endógenos de auxinas suficientes para tornar a citocinina exógena equilibrada, favorecendo o intumescimento. Todavia, com o aumento significativo da concentração da citocinina, houve o favorecimento das brotações.

Fato semelhante foi observado Faisal et al. (2005) no arbusto lenhoso *Rauvolfia tetraphylla*, onde houve aumento no número de brotos emitidos por segmentos nodais devido a inclusão do TDZ no meio de cultura. Porém, as concentrações intermediárias foram mais favoráveis à multiplicação do que a maior concentração utilizada, contrastando com os resultados observados para cerejeira no presente trabalho. No entanto, a concentração mais elevada utilizada em *Rauvolfia tetraphylla* não corresponde à 1/3 da concentração mais adequada à multiplicação em *E. involucrata*.

Em nós cotiledonares da espécie arbórea *Oroxylum indicum* foram testadas diversas citocininas, objetivando a multiplicação *in vitro* da planta, a qual foi possibilitada pelo uso de TDZ. Entretanto, para esta espécie, a melhor multiplicação ocorreu com o uso de 6-benziladenina - BA (DALAL; RAI, 2004). Da mesma maneira, Siddique; Anis (2007) testaram diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais em *Cassia angustifolia*. Os autores observaram que o TDZ apresentou os melhores resultados, tanto isoladamente como em combinação com ANA ou ácido indolacético (AIA). Igualmente, na multiplicação de *Balanites aegyptiaca* foi evidenciado o efeito positivo do TDZ (SIDDIQUE; ANIS, 2009). Em *Pongamia pinata*, ocorreu significativo incremento na média de brotos por explante com concentrações mais elevadas de TDZ. Sujatha; Hazra (2007) ainda observaram que as maiores concentrações estimularam respostas mais rápidas dos tecidos, que ocorreram já nas primeiras semanas após a inoculação *in vitro*. Nesta espécie, a concentração mais elevada foi de 13,6 μM , bastante inferior à concentração considerada ótima em cerejeira, que corresponde a 32 μM .

Ocorreu interação entre os fatores testados em relação ao comprimento (cm) das brotações ($P=0,0289$) (Figura 5). Na ausência de ANA, não houve ajuste de um modelo matemático ao fenômeno biológico em questão. Todavia, o maior

comprimento observado (0,28 cm) ocorreu na ausência de TDZ, enquanto que, na presença deste fitorregulador, houve redução do comprimento, a qual acompanhou a elevação dos níveis utilizados. Não havendo ajuste da equação, pode-se dizer que a média geral para todos os tratamentos utilizados foi de 0,14 cm. Na presença de 0,5 µM de ANA, observou-se que a ausência de TDZ não propiciou o maior comprimento (0,11 cm), como observado quando na ausência da auxina; sendo que este se elevou na medida em que as concentrações utilizadas aumentaram, observando-se seu maior valor com a concentração 16 µM de TDZ (0,23). Calculando-se a máxima eficiência técnica, o maior comprimento seria obtido com o uso de 19,84 µM, combinado com o ANA a 0,5 µM. Acima desta concentração o comprimento tende novamente a reduzir, como observado a 32 µM (0,12 cm).

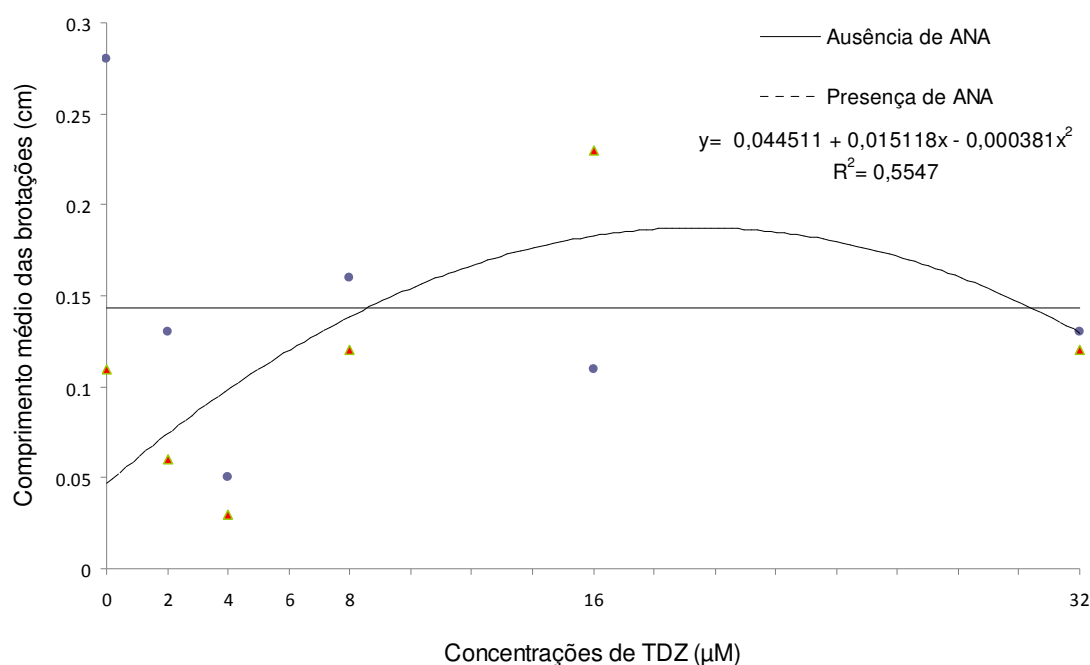


Figura 5 - Comprimento de brotações emitidas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 µM) de ácido naftalenoacético (ANA) e com as concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µM de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Pode-se relatar que, na ausência de ANA, houve redução do crescimento pelo aumento na concentração de TDZ, o que pode ser considerado concordante com as expectativas, já que as citocininas favorecem a multiplicação celular e, não, o alongamento das células, como é o caso das auxinas (BARRUETO CID, 2000; HINOJOSA, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004). Por outro lado, na presença da

combinação entre auxina e citocinina, observou-se o sinergismo entre estes dois reguladores de crescimento no que se refere ao desenvolvimento das brotações, exceto na presença de ANA isolado de TDZ (quando este se encontrava a 0 μM) e quando houve aumento excessivo da citocinina (32 μM).

Em *Vitex negundo* ocorreu aumento no comprimento das brotações com a crescente concentração de TDZ no meio nutritivo, no entanto, somente até determinada concentração, sendo, após, desfavorável o uso de TDZ no que se refere ao alongamento das brotações (AHMAD; ANIS, 2007); o que foi semelhante ao observado no uso de TDZ combinado ao ANA em cerejeira. No entanto, Ahmad; Anis (2007) não associaram TDZ a auxinas. Em *Leucaena leucocephala*, o aumento na concentração de TDZ favoreceu a emissão de brotações, mas reduziu seu comprimento (SHAIK et al., 2009), o que está muito próximo das observações realizadas acerca do comportamento *in vitro* de cerejeira neste trabalho. Combinações entre ANA e TDZ favoreceram o aumento no comprimento das brotações em *Balanites aegyptiaca*, porém, os melhores resultados foram obtidos com BA (ANIS et al., 2010). Cabe salientar, no entanto, que em todos os trabalhos consultados as concentrações de TDZ utilizadas foram menores do que àquelas usadas em cerejeira. Os aspectos das culturas estabelecidas com o uso de TDZ na ausência de ANA (às quais apresentaram encurtamento dos caules) podem ser visualizados na Figura 11, no final deste capítulo.

No que se refere à presença de gemas adventícias (Figura 6), desconsiderando as gemas pré-existentes no segmento nodal e levando-se em conta apenas gemas oriundas da organogênese direta dos explantes (Figura 11), observou-se a interação ($P = 0,0047$) entre os fatores avaliados. Na ausência de ANA não ocorreu formação de gemas com 0, 2, 4 e 8 μM de TDZ, mas estas foram observadas com 16 μM (0,28) e 32 μM (2,83). A formação de gemas na ausência de ANA ajustou-se a um modelo linear, com o crescente surgimento de gemas obedecendo ao aumento das concentrações de TDZ. Na presença de 0,5 μM de ANA também foi observado o comportamento linear da variável formação de gemas, com o aumento de gemas por explante seguindo a ascendência dos níveis de TDZ. Não ocorreu formação de gemas nas concentrações de TDZ de 0, 2 e 4 μM ; no entanto, observou-se a formação de gemas com o uso de 8 μM (0,67), 16 μM (1,57) e 32 μM (2,50), evidenciando o sinergismo existente na interação entre ANA e TDZ para esta variável.

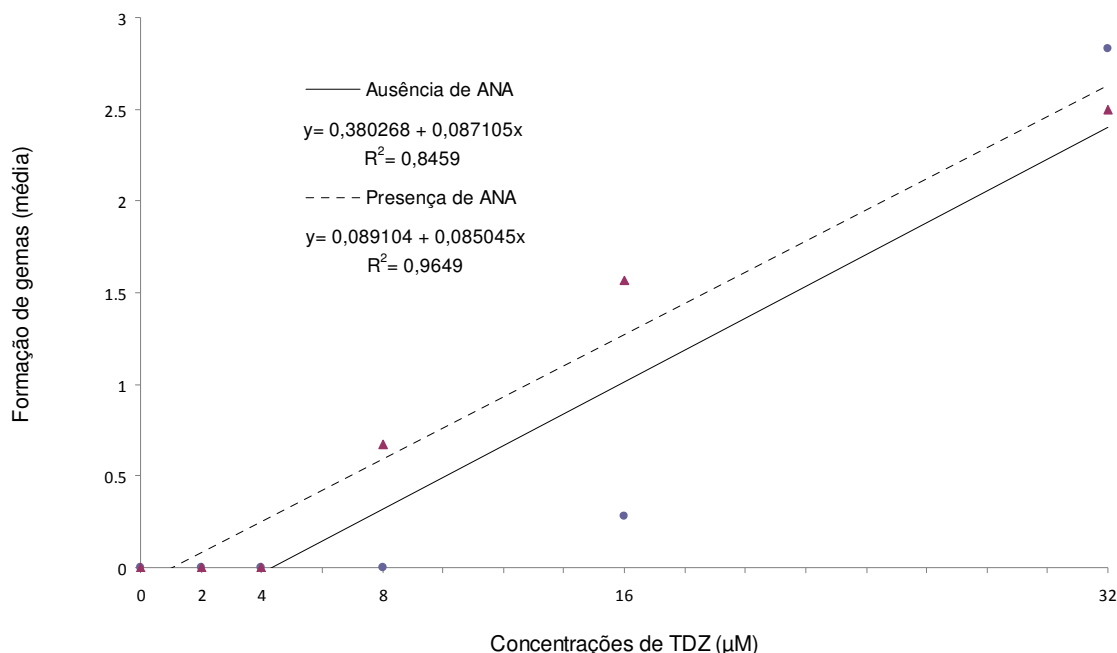


Figura 6 – Média de gemas adventícias emitidas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou presença (0,5 μM) de ácido naftalenoacético (ANA) e nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μM de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Respostas semelhantes às obtidas em cerejeira foram relatadas em *Pinus pinea*, onde o aumento da concentração de TDZ no meio nutritivo estimulou a indução de brotações (CORTIZO et al., 2009).

Igualmente, foi observada interação ($P = 0,0259$) entre os fatores para a média de folhas emitidas por explantes (Figura 7). Na ausência do fitorregulador ANA, a variável ajustou-se a um comportamento quadrático, ocorrendo a redução do número de folhas nas concentrações iniciais de TDZ, e verificando-se o menor número de folhas a 16 μM (1,66). De acordo com o cálculo do vértice da equação, o menor número de folhas seria obtido com 16,33 μM de TDZ. No entanto, como é desejável a presença de folhas, as melhores concentrações de TDZ seriam 0 (2,22) e 32 μM (2,05). Na presença de ANA (0,5 μM), não foi possível ajustar os dados observados a um modelo matemático. Os maiores números de folhas foram

observados a 0 (2,22), 16 (2,08) e 32 (2,08) μM de TDZ, enquanto os menores ocorreram a 2 (1,59), 4 (1,85) e 8 (1,32) μM de TDZ.

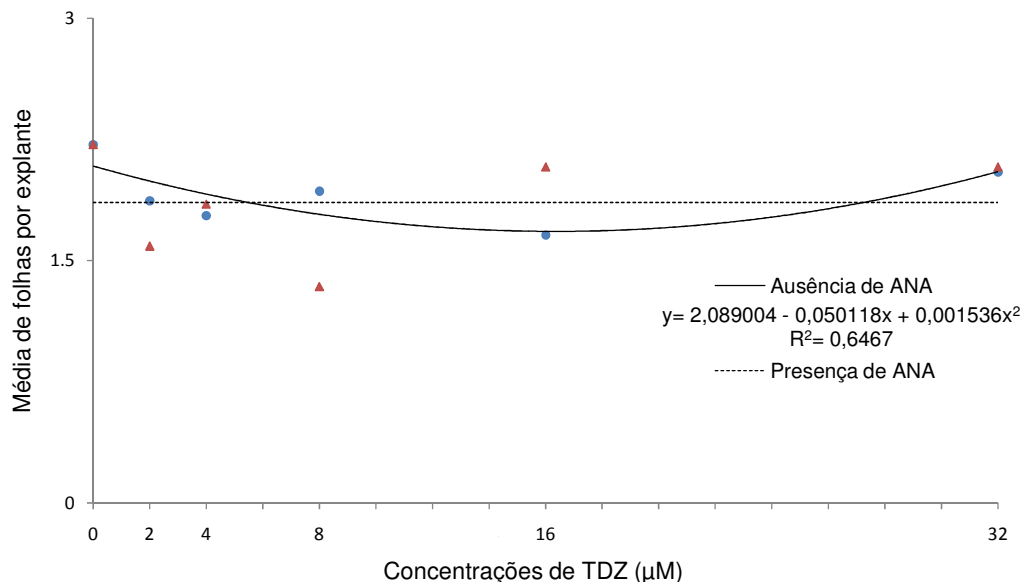


Figura 7 – Média de folhas emitidas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 μM) de ácido naftalenoacético (ANA) e com concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μM de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Na formação de calos, especialmente na base dos explantes, não foi observada interação entre os fatores principais testados. Porém, houve diferenças entre os níveis do fator “B” ($P = 0,0004$), os quais se ajustaram a um modelo quadrático (Figura 8). Na ausência de TDZ, ocorreu reduzida formação calogênica (34,37%), que aumentou com o incremento nos níveis de TDZ de 2 (54,12%), 4 (79,28%) e 8 μM (81,25%). O ponto de máxima formação de calos ocorreria com 16,21 μM de TDZ, segundo o cálculo de vértice da equação. No entanto, foi observado que nos níveis de 16 μM (63,37%) e 32 μM (53,12%) houve a redução na formação calogênica nos explantes. Esta diferença entre o ponto de máxima e os dados observados pode ser explicada pelo reduzido ajuste da equação para a formação de calos, o qual se deve, a princípio, à dispersão dos pontos, em especial quando não houve presença de reguladores de crescimento e, conseqüentemente, baixa formação calogênica.

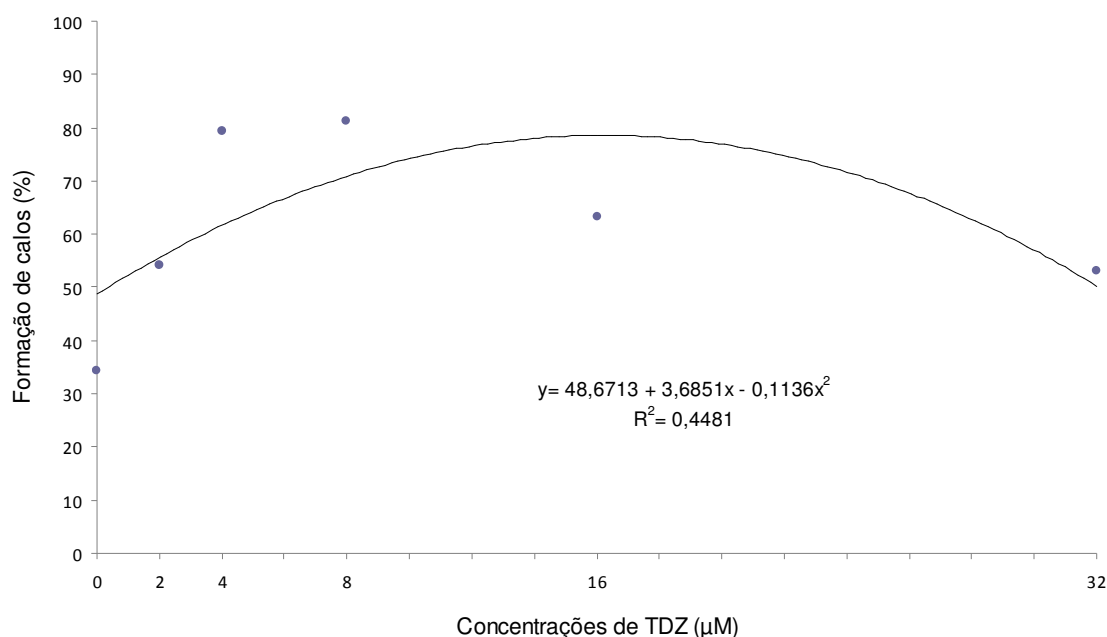


Figura 8 – Porcentagem de formação calogênica em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, nas concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 μM de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Houve interação entre os níveis dos fatores estudados para a porcentagem de oxidação fenólica (Figura 9). Na ausência de ANA no meio nutritivo, a oxidação apresentou comportamento quadrático, tendo seus níveis em elevação conforme o aumento da concentração de TDZ, atingindo seu máximo a 16 μM (21,43%). Pelo cálculo do vértice da parábola, a maior oxidação ocorreria na presença de 17,50 μM de TDZ, reduzindo-se em seguida. Esta estimativa foi confirmada pelas observações, uma vez que, após a adição de 16 μM, a oxidação fenólica diminuiu. Na presença de ANA não foi possível ajustar o comportamento da oxidação a um modelo matemático. A porcentagem de oxidação foi de 16,53%. Contudo, as oxidações, de maneira geral, não inviabilizaram o desenvolvimento dos cultivos. Também se observou nas avaliações que, muitas vezes, a região oxidada desprendia-se do explante facilmente e, abaixo, já existiam novos tecidos formados. Uma característica comum da espécie é a descamação durante o crescimento, o que pode ter sido o motivo que desencadeou a oxidação observada.

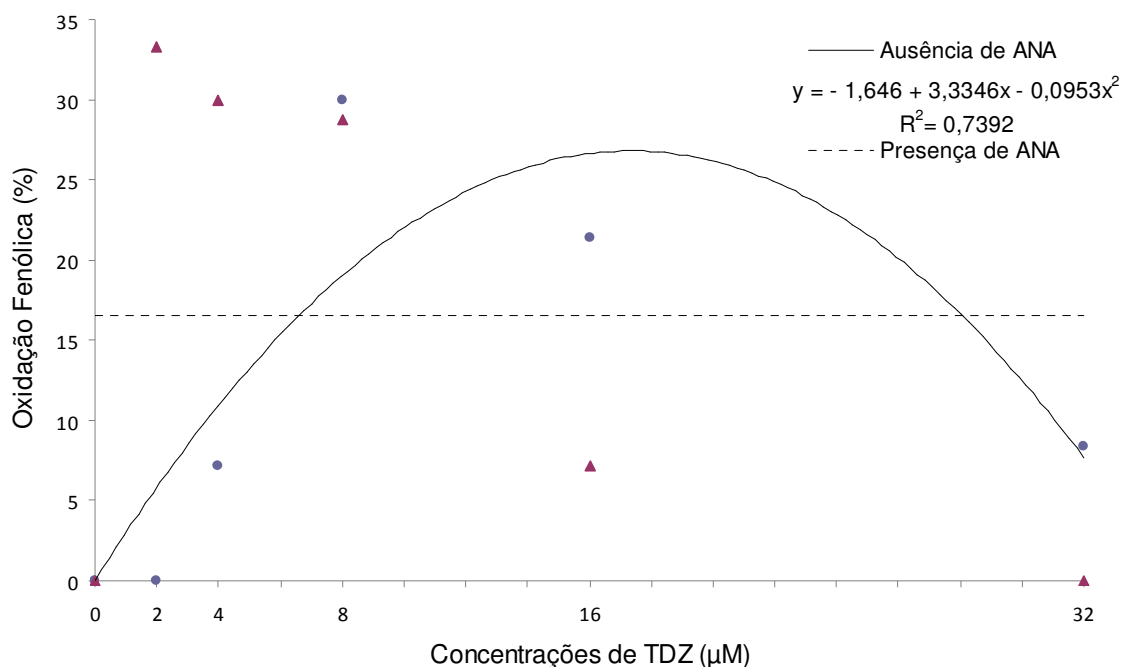


Figura 9 – Porcentagem de oxidação fenólica em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 µM) de ácido naftalenoacético (ANA) e das concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µM de thidiazuron (TDZ). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Foi observada interação ($P = 0,0000$) entre os fatores testados quanto à ocorrência de vitrificação nos explantes (Figura 10). Na ausência de ANA, observou-se um comportamento quadrático das vitrificações sob as diferentes concentrações de TDZ. A maior vitrificação (40%) ocorreu com 8 µM de TDZ. Por meio do cálculo do vértice do polinômio, observou-se que a maior vitrificação ocorreria com 15,70 µM de TDZ, após, a tendência é de redução deste evento. No entanto, como a vitrificação é indesejada e, simultaneamente, o interesse maior do uso de TDZ é em função do incremento na multiplicação, pode-se indicar o uso de concentrações de 32 µM, quando não ocorreu vitrificação. Na presença de ANA não foi possível ajustar os dados ao modelo matemático, sendo observados 9,05% de vitrificação.

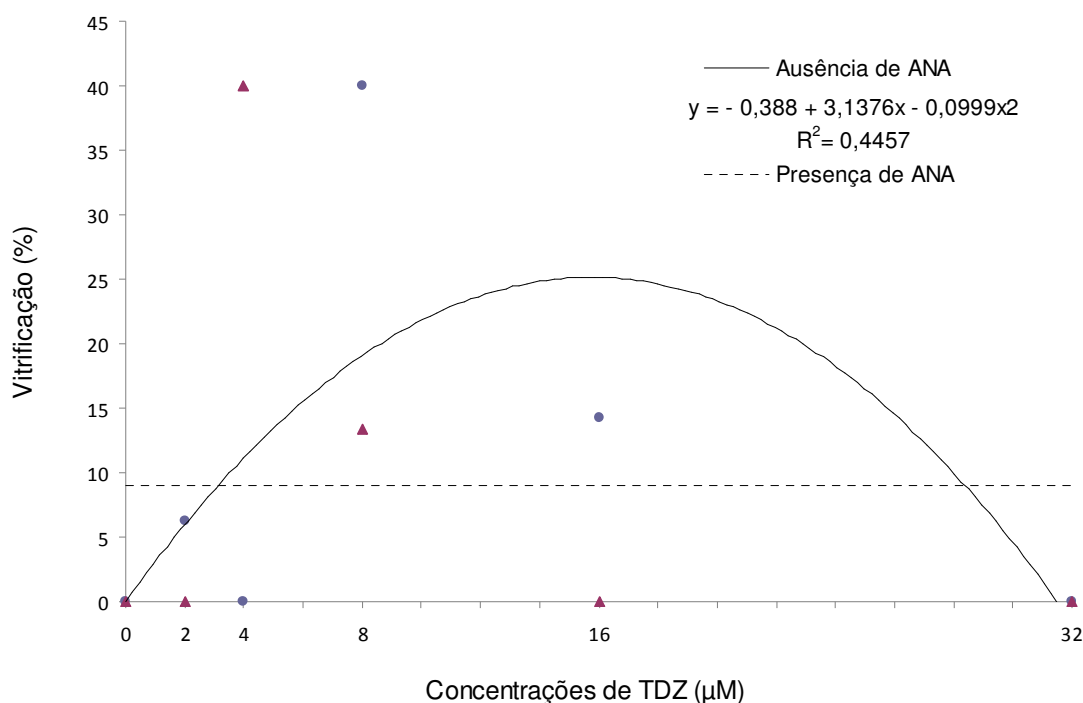


Figura 10 – Porcentagem de vitrificação em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, na ausência ou na presença (0,5 µM) de ácido naftalenoacético (ANA) e das concentrações 0, 2, 4, 8, 16 e 32 µM de (thidizuron) TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A ocorrência de vitrificação (hiperhidricidade) não foi observada de forma típica, mas, sim, pelo baixo desenvolvimento dos explantes, aspecto vítreo das folhas desenvolvidas e pelo fato destas se quebrarem facilmente com o toque. No entanto, pode-se dizer que a vitrificação (Figura 11) afetou o desenvolvimento de algumas plantas apenas nas concentrações intermediárias de TDZ utilizadas, e com o incremento das concentrações, foi possível manter os cultivos isentos da ocorrência deste fenômeno.

O uso de algumas citocininas, em especial o TDZ, pode acarretar a ocorrência de hiperhidricidade (BARRUETO-CID, 2000). A vitrificação foi registrada no cultivo *in vitro* de *Pyrus pyrifolia*. Entre as diversas citocininas testadas para a multiplicação, o TDZ foi responsável pela maior porcentagem de plantas vitrificadas (KADOTA; NIIMI, 2003). Em diversos híbridos de *Populus* também foi observada a ocorrência de vitrificação. Bosela (2009) observou que o fenômeno ocorreu com a introdução de antibióticos no meio nutritivo e que, quando estes foram combinados com TDZ, a hiperhidricidade foi significativamente mais elevada.

Não houve diferença significativa para a interação ($P= 0,4348$) entre os fatores estudados, tampouco para os seus níveis ($P= 0,6675$; $P= 0,1037$) isoladamente no que se refere à variável massa verde. A média observada foi de 0,166 g por explante.



Figura 11 – Diferentes aspectos da indução de brotações em *E. involucrata* com o uso de TDZ, aos 60 dias de cultivo. Observa-se em “a” brotações na ausência de reguladores de crescimento; “b”, aumento no número e redução no comprimento de brotações em função dos reguladores de crescimento; “c”, emissão de diversas brotações oriundas de gemas adventícias (destacadas pelas setas); “d”, aspecto da formação de uma gema adventícia (seta 1) e do desenvolvimento de brotações oriundas das gemas pré-existentes no segmento nodal (seta 2); “e”, desenvolvimento de broto, a partir de gema adventícia e “f”, aspecto da hiperhidricidade, seta destaca aspecto vítreo da folha. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

No segundo experimento, com o uso de GA_3 , observou-se que, nas concentrações testadas, esta giberelina não promoveu diferença entre os tratamentos, ou seja, não houve interação ($P= 0,7467$) significativa e também não foram significativos os níveis do fator “A” ($P= 0,5976$) e os níveis do fator “B” ($P= 0,6956$). A média do comprimento dos brotos foi de 0,18 cm (considerando-se apenas a região de caule e, não, o comprimento total), e a porcentagem média de aumento dos brotos foi de 80,88%.

Estes resultados assemelham-se aos observados no cultivo *in vitro* do porta enxerto de macieira “marubakaio”, onde não houve diferenças entre as concentrações de GA₃ utilizadas, a não ser no primeiro subcultivo, mas, no decorrer do tempo, esta variação deixou de ser expressiva. MACHADO et al. (2004) relataram que o GA₃ não foi eficiente no alongamento, podendo ser suprimido do cultivo. Por outro lado, Vengadesan et al. (2003) registraram a eficiência da introdução de GA₃ no meio nutritivo no cultivo *in vitro* de *Acacia sinuata*, em que obtiveram alongamento satisfatório.

No que se refere ao número de brotos emitidos, observou-se diferença entre os níveis do fator “B” (Figura 12), com valor de “P”= 0,0000; em que a ausência de GA₃ propiciou o maior número de brotos emitidos, o qual reduziu-se à medida em que as concentrações aumentaram. Com o uso de 20 µM de GA₃ os brotos entraram em senescência e, por fim, inviabilizaram-se, demonstrando a toxidez causada por concentrações elevadas dessa giberelina.

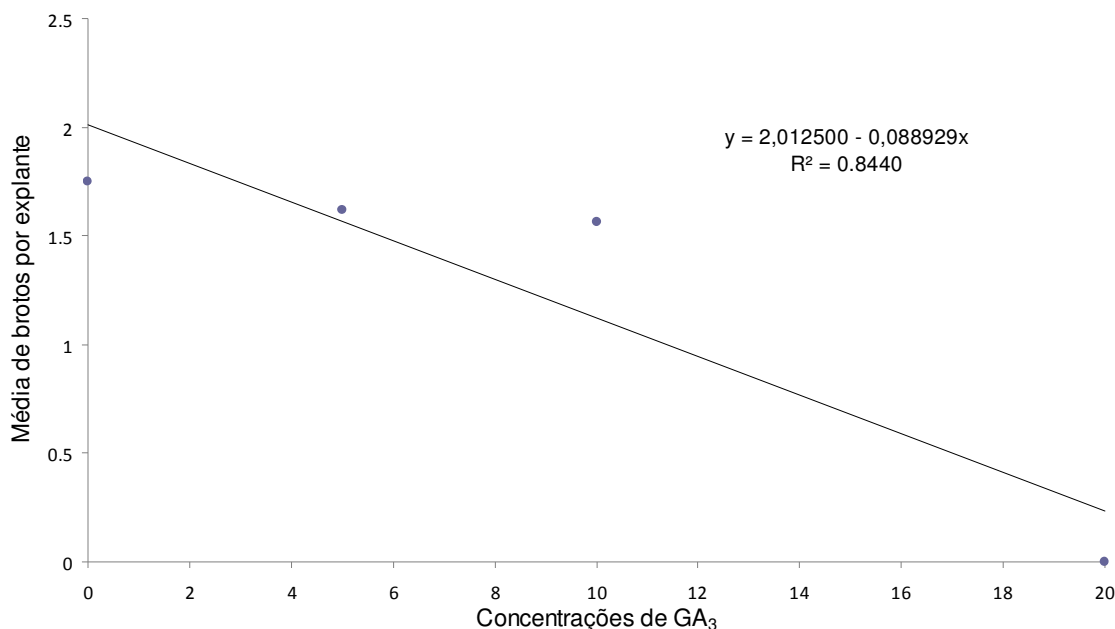


Figura 12 – Média de brotos por segmentos apicais e nodais de *Eugenia involuocrata* DC., aos 60 dias de cultivo, nas concentrações 0, 5, 10 e 20 µM de ácido giberélico (GA₃). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Em *Rubus* spp., semelhante aos resultados observados, também foi evidenciado o efeito negativo do GA₃ no desenvolvimento das plantas. Embora esta

giberelina tenha sido eficiente no alongamento, não se mostrou favorável ao desenvolvimento (VILLA et al., 2008).

A oxidação fenólica (Figura 13) apresentou diferenças ($P = 0,0000$) em relação ao emprego de distintas concentrações de GA_3 ajustando-se a um modelo linear crescente. A utilização da maior concentração de GA_3 (20 μM) promoveu a maior oxidação dos explantes (82,25%), sucedida por sua inviabilização para o cultivo *in vitro*.

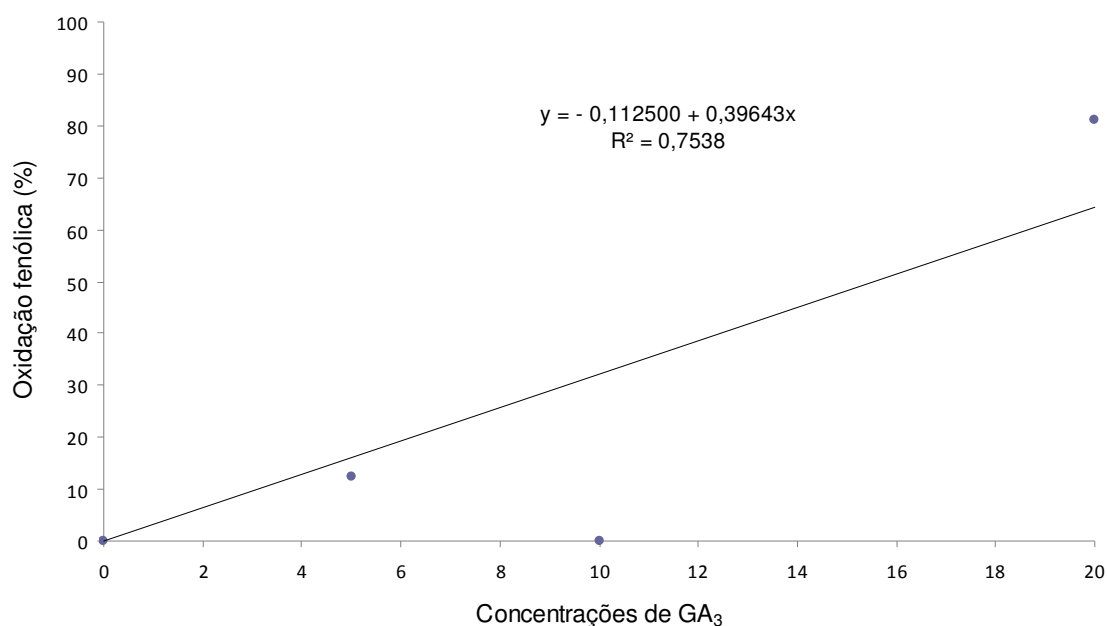


Figura 13 – Porcentagem de oxidação fenólica em segmentos apicais e nodais de *Eugenia involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo, nas concentrações 0, 5, 10 e 20 μM de ácido giberélico (GA_3). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Na ausência de GA_3 (0%) e a 5 μM (12,50%) e 10 μM (0%), produziram-se níveis nulos ou reduzidos de oxidação, que não comprometeram o cultivo *in vitro* da espécie, independente da utilização de segmentos apicais ou nodais.

4.6 Conclusões

- O emprego de ANA a 0,5 μM combinado com 32 μM de TDZ permite a obtenção do maior número de brotos por explantes e a maior média de emissão de gemas adventícias;
- o maior alongamento de brotos é obtido pelo uso da combinação entre ANA a 0,5 μM e TDZ a 16 μM ;
- a menor obtenção de calos ocorre na ausência de fitorreguladores, no entanto, a presença de calos não prejudica o desenvolvimento *in vitro* das plantas;
- na concentração de TDZ em que há a melhor formação de brotos e gemas, a ocorrência de vitrificação não é verificada, não interferindo no cultivo;
- o uso do ácido giberélico não favorece, significativamente, o alongamento *in vitro* de brotações;
- a utilização de 20 μM de GA_3 reduz o desenvolvimento *in vitro* dos explantes, aumentando a oxidação e a inviabilização dos tecidos.

5 CAPÍTULO III

INDUÇÃO À CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE): DESINFESTAÇÃO, REGULADORES DE CRESCIMENTO E PRESENÇA DE LUZ

5.1 Resumo

A cerejeira-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* DC.) é uma espécie nativa com grande potencial para uso madeireiro, frutícola e medicinal. O presente trabalho objetivou desenvolver metodologias para o estabelecimento de cultivos assépticos e avaliar a influência de reguladores de crescimento e da presença de luz sobre a calogênese em discos foliares de *E. involucrata*, visando possibilitar estudos mais avançados em biotecnologia vegetal. Foram testados diferentes tratamentos de desinfestação superficial à base de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v), nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. Para avaliar a calogênese, foi conduzido um experimento bifatorial (2x5) no qual se avaliaram a ausência ou presença de luz durante o cultivo, e cinco diferentes empregos de reguladores de crescimento: ANA, 2,4-D, BAP e as combinações ANA + BAP e 2,4-D + BAP, todos a 5 µM. Após 30 dias de cultivo diversas variáveis foram avaliadas. O tempo de imersão em NaOCl a 1,5% (v/v) por 15 minutos permite a obtenção de cultivos assépticos. A ausência de luz é favorável à calogênese em discos foliares, exceto no uso isolado de 2,4-D. O emprego de 2,4-D e de BAP, de forma isolada, não favorece a calogênese em explantes foliares de *E. involucrata*. Os maiores percentuais de obtenção de calos ocorrem pelo uso de ANA e das combinações ANA + BAP e 2,4-D + BAP, evidenciando-se especial sinergismo no uso dos reguladores de crescimento de forma conjunta.

Palavras chave: cultivo de calos, cultura de tecidos, biotecnologia florestal

CALOGENESIS INDUCTION IN LEAF EXPLANTS OF *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE): DESINFESTATION, GROWTH REGULATORS AND PRESENCE OF LIGHT

5.2 Abstract

The cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) is a native species with great potential for timber, fruit and medicinal. This study aimed to develop methodologies for the establishment of aseptic cultures and to evaluate the influence of growth regulators and the effect of light on callus induction from leaf discs of *E. involucrata* as to enable more research into plant biotechnology. Different treatments on surface disinfection using sodium hypochlorite (NaOCl) to 1.5% (v / v) in the times of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 minutes were tested. To assess callus formation, an (2x5) factorial experiment was conducted which evaluated the presence or absence of light during cultivation and five different uses of growth regulators: NAA, 2,4-D, BAP and combinations of NAA and BAP, 2,4-D and BAP, all at 5 µM. After 30 days of cultivation several variables were evaluated. The time of immersion in 1.5% NaOCl (v/v) for 15 minutes get aseptic culture of leaf discs. The absence of light is favorable to callus induction from leaf discs, except the use of 2,4-D alone. The use of 2,4-D and BAP in isolation do not promote callus induction from leaf explants of *E. involucrata*. The highest percentages of getting calluses occur by the use of NAA and combinations of NAA and BAP, 2,4-D and BAP, showing synergism in these particular combinations of regulators.

Key-words: callus culture, tissue culture, forestry biotechnology

5.3 Introdução

Na economia brasileira, as espécies florestais apresentam grande relevância. De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS, 2007), a participação do setor florestal no PIB do país atinge 3,5%, o que equivale a US\$ 37,3 bilhões. São gerados 4,33 milhões de empregos relacionados a florestas

plantadas e, no tocante a florestas nativas, 2,58 milhões. A maior parte desta produção está ligada a espécies exóticas, frente ao escasso uso e valorização de recursos genéticos nativos.

Contudo, o Brasil é considerado o país com a mais significativa diversidade vegetal do mundo, o que contrasta com as afirmações anteriores. De acordo com Sandes; Di Blasi (2000), a maior parte das espécies vegetais brasileiras é desconhecida. Acredita-se que existam entre 350 mil e 550 mil espécies, sendo que apenas 55 mil são catalogadas. Este panorama reflete a necessidade de estudos referentes aos recursos genéticos locais, os quais podem representar oportunidades para o desenvolvimento econômico.

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC.) é uma Myrtacea de ocorrência natural em vários Estados brasileiros, entre eles o Rio Grande do Sul (CARVALHO, 2008). Apresenta características de interesse no âmbito dos recursos florestais madeiráveis, como madeira de excelente qualidade e durabilidade; além de recursos não madeiráveis, pois possui frutos muito apreciados e com potencialidades para a fruticultura; além de revelar aptidão paisagística e atributos para a recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002). Adiciona-se a estas características o fato da cerejeira ser empregada na medicina popular, possuindo ação antidiarréica, antirreumática e digestiva. Para PAROUL et al. (2007) e RAMOS et al. (2006) há, nesta espécie, um grande número de óleos voláteis, em sua maioria sesquiterpenos.

Um dos obstáculos encontrados para a instalação de povoamentos de cerejeira é a sua propagação. Por meio de sementes, a produção de mudas possui pouca viabilidade, visto serem altamente recalcitrantes, iniciando a perda de seu potencial germinativo após, aproximadamente, duas semanas de armazenamento (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008). Estudos adicionais de métodos alternativos de propagação da espécie ainda são incipientes, bem como conhecimentos sobre sua diversidade genética e domesticação.

Técnicas de cultura de tecidos vegetais podem promover a obtenção de plantas *in vitro* por organogênese direta ou indireta, sendo que esta segunda passa, obrigatoriamente, pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Calos são tecidos formados por células desdiferenciadas, os quais ocorrem em resposta a condições químicas e físicas dos meios nutritivos. A partir da neorganogênese, estes tecidos podem novamente diferenciar-se originando raízes, brotos, embriões

somáticos, entre outros (TERMIGNONI, 2005). Conforme LANDA et al. (2000), o cultivo de calos também pode determinar as condições de cultura que os explantes de determinadas espécies requerem para o seu crescimento e sobrevivência, estudos de desenvolvimento celular e exploração de produtos oriundos do metabolismo secundário.

Nesse contexto, considerando-se que a madeira de cerejeira é extremamente rígida, dificultando seu uso em alguns processos como a obtenção de celulose (CARVALHO, 2008), a cultura de tecidos por organogênese indireta poderia favorecer a ocorrência de variantes, gerando variabilidade genética por meio de variação somaclonal. Estas variações podem ser utilizadas em programas de melhoramento, permitindo a geração de novas cultivares (AMIRATO, 1986), especialmente em espécies autógamas, como é classificada a cerejeira de acordo com Carvalho (2008). Além disso, a partir da cultura de tecidos é possível a realização de estudos avançados de transformação genética. Para Pasquali; Zanettini (2007), a regeneração de plantas por meio destas técnicas é condição *sine qua non* para a transformação genética.

O presente trabalho objetivou desenvolver uma metodologia para a desinfestação superficial de explantes foliares de *E. involucrata*, visando promover o estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas; bem como analisar a influência de diferentes formas de uso de fitorreguladores no meio de cultura e da presença ou ausência de luz na obtenção de calos.

5.4 Material e Métodos

Foram desenvolvidos dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pertencente ao Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul.

As matrizes doadoras de explantes possuíam aproximadamente 2 anos de idade e foram cultivadas em casa de vegetação, onde permaneceram em vasos plásticos com dimensões de 24 cm de diâmetro por 22 cm de altura (aproximadamente 8 L de capacidade) preenchidos com o substrato Plantmax®. As plantas foram dispostas em bancadas cobertas por sombrite com capacidade de 50% de redução da intensidade luminosa. Em épocas de maior luminosidade e aumento da temperatura, foi instalada, sobre o sombrite, uma cobertura de tecido-

não-tecido (TNT) branco. Efetuou-se regas diárias e, bimestralmente, forneceu-se um aporte nutricional com a inclusão de 400 ml de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) a 1 g L^{-1} e, a cada 15 dias, a adição de 500 ml de solução de nitrogênio (uréia) a 1 g L^{-1} . Para a manutenção da sanidade das plantas e como pré-tratamento na desinfestação do material vegetal, pulverizou-se quinzenalmente a parte aérea e a superfície do substrato com solução à base de Cercobin700PM® (thiophanato metílico) a 1 g L^{-1} e sulfato de estreptomicina (100 mg L^{-1}), até obter-se o encharcamento total das plantas e superfície do solo. Previamente ao isolamento dos explantes, foi realizada uma pulverização adicional com a mesma solução.

No primeiro experimento, coletaram-se, nas primeiras horas do dia e após a irrigação das plantas na noite anterior, folhas jovens (com tamanho igual ao de folhas completamente expandidas e que não tivessem sido recém emitidas pela planta), as quais foram imersas em solução de água destilada contendo 1 g L^{-1} do fungicida Benlate 500® (benomyl) e 100 mg L^{-1} do antibiótico sulfato de estreptomicina, onde permaneceram por 30 minutos. O material foi conduzido ao Laboratório onde as folhas foram lavadas com o auxílio de detergente comercial e esponja e, então, enxaguadas em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada a imersão em etanol a 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de enxágue com água destilada estéril. A seguir, em câmara de fluxo laminar, as folhas permaneceram sob agitação branda e constante em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) de cloro ativo (concentração escolhida com base em experimentos anteriores), a qual foi acrescida de três gotas de detergente comercial visando surfactar a tensão superficial. As folhas permaneceram em agitação nos períodos de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, os quais constituíram os tratamentos. Desta forma, conduziu-se o experimento em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e 11 repetições, totalizando 66 unidades experimentais. Cada parcela foi composta por um frasco com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e três discos foliares, contabilizando 198 explantes. Após os tratamentos com NaOCl, realizou-se um triplo enxágue com água destilada estéril. Para a confecção dos discos foliares, utilizou-se um cortador cilíndrico metálico (cortador de couro) com circunferência de 1,5 cm de diâmetro.

As unidades experimentais foram mantidas em sala de cultivo com temperatura controlada de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa

de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia. Aos 21 dias, foram avaliadas as variáveis: contaminação geral (porcentagem de contaminação ocorrente nos explantes, independente do microrganismo causador), contaminação bacteriana (porcentagem de ocorrência de colônias bacterianas no explante ou na região de contato deste com o meio nutritivo), contaminação fúngica (porcentagem relativa à presença de micélio fúngico nos explantes ou na região de contato deste com o meio nutritivo), oxidação fenólica (porcentagem de explantes com alterações na coloração, decorrente da presença de compostos fenólicos) e, aos 30 dias, analisou-se a formação de calos (presença de formação calogênica independente de seu estágio de desenvolvimento).

O segundo experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial 2×5 , totalizando 10 tratamentos, os quais tiveram 10 repetições, perfazendo um total de 100 unidades experimentais. Os níveis do fator “A” testados foram à presença ou a ausência de luminosidade no decorrer do experimento. A presença de luz foi obtida mantendo-se as unidades experimentais sob fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produzida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia; enquanto a ausência de luminosidade foi obtida pela permanência dos frascos dentro de caixas de papelão cobertas por sacos plásticos escuros, mantidas na sala de cultivo sob as mesmas condições de ambiente, exceto a luminosidade. Os níveis do fator “B” foram cinco diferentes inclusões de fitorreguladores, todos a $5 \mu\text{M}$, no meio de cultura, a saber: ácido naftaleno acético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-benzilaminopurina (BAP), além das combinações ANA + BAP e 2,4-D + BAP.

Cada parcela foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e três discos foliares, obtendo-se um total de 300 explantes inoculados. Para a vedação dos frascos foi utilizado papel alumínio. As inoculações ocorreram em câmara de fluxo laminar e a obtenção dos discos foliares foi efetuada da mesma forma descrita no experimento anterior. Em Laboratório, as folhas foram lavadas com o auxílio de esponja e detergente comercial e, em seguida, permaneceram em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, passaram pelo seguinte procedimento: imersão em etanol a 70% (v/v) por 30 segundos; enxágue em água destilada e autoclavada; imersão em solução de NaOCl a 1,5% (v/v) por 15 minutos; e, por fim, um triplo enxágue em água destilada estéril.

Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis: porcentagem de formação de calos (presença de calos nos explantes, independente do tamanho e desenvolvimento), média da proporção de notas atribuídas ao desenvolvimento dos explantes, média do somatório de notas atribuídas aos explantes, e porcentagem de oxidação fenólica (explantes oxidados com alterações na coloração decorrente da presença de compostos fenólicos). As notas atribuídas aos calos foram: 0) ausência de formação calogênica; 1) início da formação calogênica nas bordas dos discos foliares; 2) formação calogênica em toda a bordadura dos discos foliares e 3) formação calogênica com crescimento secundário.

Em ambos os experimentos, o meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio nutritivo foi ajustado para 5,8 posteriormente à inclusão dos reguladores de crescimento e antes da inclusão do ágar e da autoclavagem, a qual ocorreu por 20 minutos a 121 °C e 1,5 atm de pressão.

Os dados foram transformados pela função $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. Utilizou-se a transformação após ser testada a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett. Quando o teste F foi significativo, dados oriundos de tratamentos quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial, enquanto que, para dados de tratamentos qualitativos, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Na exposição de dados foram utilizados os valores reais observados, bem como nos modelos matemáticos gerados. As análises foram efetuadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

5.5 Resultados e Discussão

No primeiro experimento, não foram constatadas diferenças estatísticas para as variáveis contaminação bacteriana ($P=0,0660$) e oxidação fenólica ($P=0,2517$). A taxa geral de contaminação bacteriana observada nos experimentos foi de 14,13%, enquanto a porcentagem de ocorrência de oxidação fenólica atingiu 9,58% dos explantes. Estes índices podem ser considerados baixos, especialmente por se

tratar de uma espécie lenhosa. Xavier et al. (2009) apontaram as contaminações e a oxidação fenólica como os principais agentes que afetam o sucesso do estabelecimento de cultivos *in vitro* em espécies florestais, considerando que níveis reduzidos de contaminação e de oxidação não inviabilizam a cultura de tecidos.

A contaminação geral ($P = 0,0001$) ajustou-se a um comportamento quadrático (Figura 14), em que o melhor tratamento utilizado foi o período de 15 minutos de imersão dos explantes em solução de NaOCl a 1,5% (v/v), onde não ocorreram contaminações junto aos explantes. A máxima eficiência técnica para esta variável foi de 17,96 minutos (17 minutos e 57 segundos, aproximadamente). Observou-se que tempos menores apresentaram índices elevados de contaminação como, por exemplo, o tratamento testemunha (60,57%) e aqueles em que as folhas permaneceram na solução de NaOCl por 5 (24,22%) e 10 minutos (21,20%). Pode-se dizer que estes períodos de imersão em solução de NaOCl não foram suficientes para eliminar as contaminações superficiais. Após 15 minutos de imersão, observou-se, novamente, uma elevação das taxas de contaminantes aos 20 minutos (15,13%) e aos 25 minutos (9,08). Estas maiores exposições dos explantes à solução aumentaram as injúrias nas folhas, ocasionando a fragilização dos tecidos.

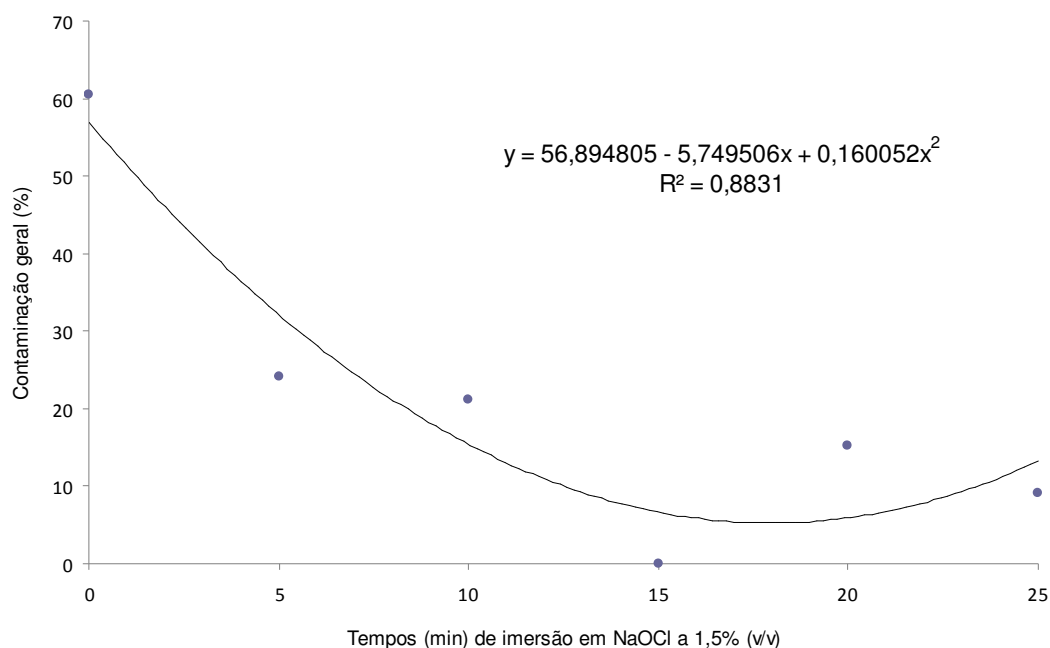


Figura 14 - Efeito de diferentes tempos (min) de imersão de explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) sobre a porcentagem de contaminação geral, aos 21 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Os índices de contaminação por fungos ($P = 0,0021$) (Figura 15) também ajustaram-se a um modelo quadrático, semelhante ao observado na contaminação geral. A presença de micélios fúngicos junto aos explantes nos períodos de imersão em NaOCl de 0 (27,25%), 5 (6,05%) e 10 (3,03%) minutos, bem como de 20 (3,02%) e 25 (9,08%) minutos, apresentaram os maiores índices de contaminação. Aos 15 minutos de exposição não se observou a presença de contaminantes. A máxima eficiência técnica foi de 15,06 minutos (aproximadamente 15 minutos e 4 segundos).

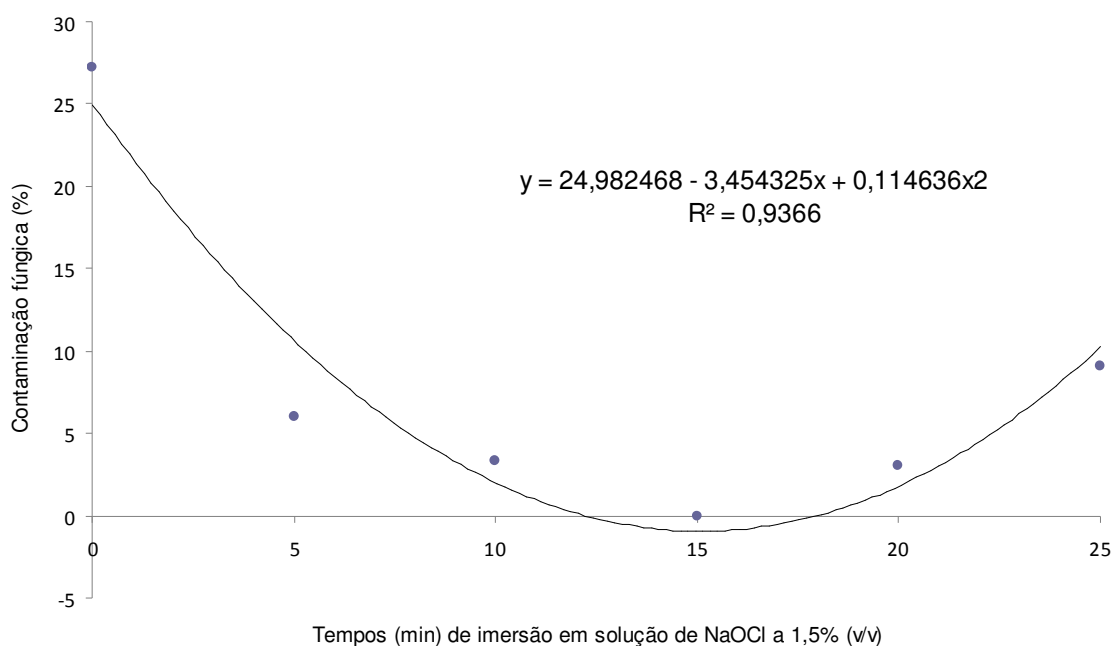


Figura 15 – Efeito dos diferentes tempos (min) de imersão de explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) sobre a porcentagem de contaminação fúngica, aos 21 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Os resultados obtidos assemelham-se às observações de MA et al. (2009) com a espécie frutífera lenhosa *Litchi chinensis*, em que os autores obtiveram cultivos assépticos de explantes foliares com o emprego de NaOCl a 1,5%, em tempos de imersão de 15 e 20 minutos. LIMA et al. (2008) conseguiram culturas de explantes foliares de *Croton urucurana* a partir da imersão dos explantes por 15 minutos em solução de NaOCl a 1%; sendo esta última concentração mais reduzida do que a utilizada no presente trabalho para *E. involucrata*.

Observou-se que os tempos mais elevados de contato dos explantes com o NaOCl causaram danos aos tecidos, principalmente a descoloração, provavelmente resultante da degradação da clorofila. Também foi observada oxidação após o corte nas bordas dos explantes.

Aos 30 dias de cultivo não ocorreu formação de calos neste experimento. Além disso, houve, no decorrer do tempo, a perda de coloração dos explantes e o escurecimento destes. É possível deduzir que não ocorreu calogênese devido à ausência de reguladores de crescimento, os quais, muitas vezes, são necessários para que isto aconteça. Neste caso, em especial, os reguladores podem ser considerados de fundamental importância, pois se está trabalhando com tecidos já desenvolvidos, os quais precisam de estímulos para a condução às rotas calogênicas. Semelhante ao observado em cerejeira, não houve a formação de calos na ausência de reguladores de crescimento em explantes foliares de *Salix humboldtiana* (SANTOS *et al.*, 2005), *Theobroma grandiflorum* (LEDO *et al.*, 2002), *Caryocar brasiliense* (LANDA *et al.*, 2000); *Calotropis gigantea* (ROY *et al.*, 2000) e *Dieffenbachia* spp. (SHEN *et al.*, 2007). Os autores citados relataram a importância da inclusão de fitorreguladores na indução à desdiferenciação celular.

No segundo experimento observou-se, nitidamente, a interação entre os diferentes níveis dos fatores testados no que se refere à formação de calos nos explantes ($P = 0,0155$). A suplementação de fitorreguladores ratifica as observações do experimento anterior, sobre a necessidade da inclusão destas substâncias para conduzir os tecidos foliares à calogênese. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

Quanto à porcentagem de formação de calos nos discos foliares, a ausência de luminosidade foi favorável e diferiu da presença de luz nos tratamentos com 5 μM de ANA; 5 μM de ANA + 5 μM de BAP, e 5 μM de 2,4-D + 5 μM de BAP, com valores, para ausência de luz, de 23,31; 26,64 e 33,30% respectivamente; enquanto na presença de luminosidade, as médias observadas para estes mesmos fitorreguladores foram, na sequência, 0; 6,66 e 3,33%. Na presença de luz não ocorreram diferenças entre os distintos empregos de reguladores de crescimento. No entanto, quando cultivados no escuro, o uso da combinação composta por 5 μM de 2,4-D + 5 μM de BAP (33,30%) foi estatisticamente superior à utilização de 5 μM de BAP (6,66%) e do uso de 5 μM de 2,4-D (3,33%); e não diferiu do uso da

combinação 5 μ M de ANA + 5 μ M de BAP (26,64%) e de 5 μ M ANA isoladamente (23,31%).

As notas atribuídas aos calos (Figura 16) mostraram-se eficientes na estratificação dos tratamentos, mais especificamente na interação entre os níveis dos fatores testados.

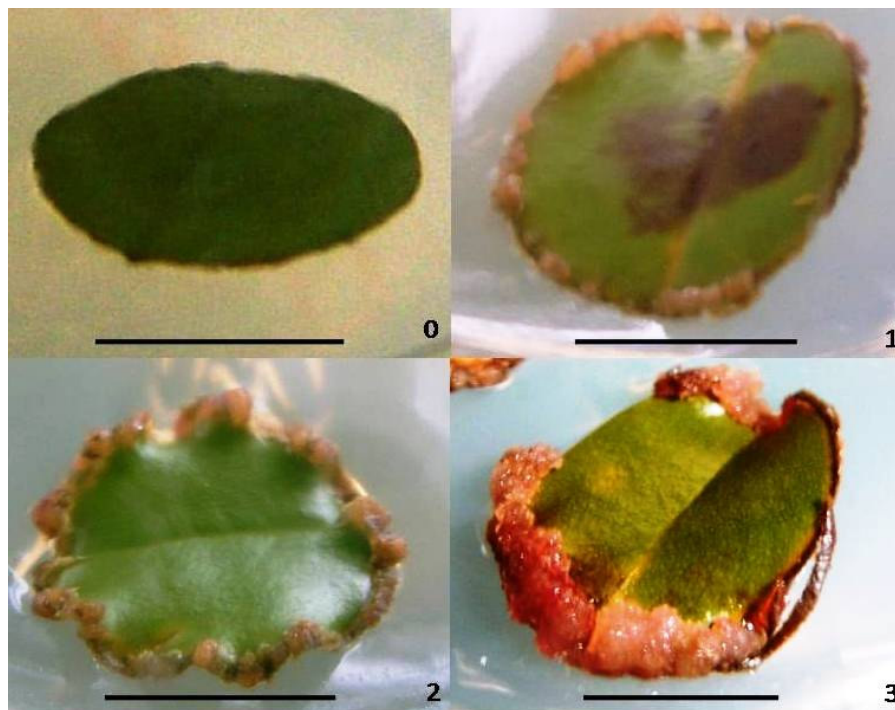


Figura 16 – Intensidade de formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC., aos 45 dias de cultivo, e respectivas notas onde: 0: representa a nota “0”, referente a ausência de formação de calos; 1: representa a nota “1”, resultando do início de formações calogênicas nas bordas dos discos foliares; 2: representa a nota “2”, com formação calogênica em toda a bordadura do disco foliar; e 3: representa a nota “3”, referente a formação de calos com crescimento secundário. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

No que se refere à variável “média da proporção de notas atribuídas” ($P=0,0137$), a ausência de luminosidade foi favorável ao desenvolvimento das estruturas calogênicas, diferindo nos tratamentos em que houve a inclusão de ANA (5 μ M) e da combinação 2,4-D + ANA (ambos a 5 μ M), com médias de 0,37 e 0,80 na ausência de luminosidade; e 0 e 0,06 na presença de luz. Não ocorreram diferenças entre os níveis do fator “B” (emprego de fitorreguladores) quando os explantes foram cultivados na presença de luz, os quais apresentaram médias das notas relativamente baixas. Porém, quando mantidos no escuro, observou-se que a maior média ocorreu no uso da combinação 5 μ M de 2,4-D + 5 μ M de BAP (0,80),

sendo este nível superior ao uso isolado de 5 μ M de 2,4-D (0,03) e de 5 μ M de BAP (0,10) e não diferindo de 5 μ M de ANA (0,37) e da combinação 5 μ M de ANA + 5 μ M de BAP (0,40). Entretanto, estes dois últimos também não diferiram de 2,4-D e BAP (ambos a 5 μ M) isoladamente, podendo ser considerados intermediários.

Houve interação para a variável obtida a partir da média da soma das notas atribuídas aos calos ($P= 0,0142$), o que auxiliou na confirmação dos resultados acima descritos, mais uma vez evidenciando a interação entre os níveis dos fatores testados e o sinergismo existente entre o cultivo dos explantes na ausência de luz e os níveis do fator “B”: ANA, ANA + BAP e 2,4-D + BAP (todos a 5 μ M). No desdobramento das interações notou-se que a ausência de luz favoreceu a formação de calos, principalmente na presença de 5 μ M de ANA, 5 μ M de ANA + 5 μ M de BAP e 5 μ M de 2,4-D + 5 μ M de BAP, com médias da soma das notas de 1,10; 1,20 e 2,40; enquanto que, na presença de luz, estes valores reduziram-se para 0; 0,40 e 0,20. Condizendo com todos os resultados das variáveis anteriormente relatadas, na presença de luz não ocorreram diferenças nos diversos empregos de fitorreguladores e as médias apresentadas são relativamente reduzidas. Em contrapartida, na ausência de luminosidade, o uso da combinação 5 μ M de 2,4-D e 5 μ M de BAP (2,40) foi superior ao uso isolado destes (médias de 0,10 e 0,30) e não diferiu de 5 μ M de ANA (1,10) e da combinação 5 μ M de ANA e 5 μ M de BAP (1,20).

Face ao exposto, pode-se dizer que a ausência de luz é extremamente favorável à formação de calos em explantes de *E. involucrata*, resultado este que é ratificado pelas observação de NOGUEIRA et al. (2007), os quais registraram, na calogênese *in vitro* da espécie florestal *Byrsonima intermedia*, melhores resultados quando os explantes foram cultivados no escuro e, em contrapartida, para atingir a mesma porcentagem de formação de calos na presença de luz, foram necessárias concentrações bem mais elevadas de reguladores de crescimento. Da mesma forma, RAHARJO; LITZ (2007) observaram, em *Litchi chinensis*, a vantagem da ausência de luz na calogênese em explantes foliares, sendo, neste caso específico, possível a obtenção de embriões somáticos. No entanto, para esta mesma espécie (*L. chinensis*), MA et al. (2009) relataram resultados opostos, ocorrendo maior formação de calos em explantes foliares na presença de luz, diferença esta atribuída pelos autores à variabilidade genética.

Tabela 3 – Interação entre a presença/ausência de luz e diferentes formas de uso de fitorreguladores na formação de calos (%), desenvolvimento dos calos por atribuição de notas (médias) e oxidação fenólica (%) em discos foliares de *E. involucrata* DC., aos 45 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

-----Formação de Calos (%)-----			
Reguladores de Crescimento	Presença de Luz	Ausência de Luz	Média
ANA a 5 µM	0,00 a* B*	23,31 a b c A	11,65
2,4-D a 5 µM	3,33 a A	3,33 c A	3,33
BAP a 5 µM	9,99 a A	6,66 b c A	8,32
ANA a 5 µM + BAP a 5 µM	6,66 a B	26,64 a b A	16,65
2,4-D a 5 µM + BAP a 5 µM	3,33 a B	33,30 a A	18,31
Média	4,66	18,64	
CV (%)		13,78	
-----Proporção das notas (média)-----			
Reguladores de Crescimento	Presença de Luz	Ausência de Luz	Média
ANA a 5 µM	0,00 a B	0,37 a b A	0,18
2,4-D a 5 µM	0,03 a A	0,03 b A	0,03
BAP a 5 µM	0,10 a A	0,10 b A	0,09
ANA a 5 µM + BAP a 5 µM	0,13 a A	0,40 a b A	0,26
2,4-D a 5 µM + BAP a 5 µM	0,06 a B	0,80 a A	0,43
Média	0,06	0,33	
CV (%)		21,90	
-----Soma das Notas (média)-----			
Reguladores de Crescimento	Presença de Luz	Ausência de Luz	Média
ANA a 5 µM	0,00 a B	1,10 a b A	0,55
2,4-D a 5 µM	0,10 a A	0,10 b A	0,10
BAP a 5 µM	0,30 a A	0,30 b A	0,30
ANA a 5 µM + BAP a 5 µM	0,40 a B	1,20 a b A	0,80
2,4-D a 5 µM + BAP a 5 µM	0,20 a B	2,40 a A	1,30
Média	0,20	1,02	
CV (%)		41,66	
-----Oxidação Fenólica (%)-----			
Reguladores de Crescimento	Presença de Luz	Ausência de Luz	Média
ANA a 5 µM	49,97 a b A	23,33 a A	36,65
2,4-D a 5 µM	29,98 a b A	69,98 b B	49,98
BAP a 5 µM	19,98 a A	19,99 a A	19,98
ANA a 5 µM + BAP a 5 µM	49,98 a b B	9,99 a A	29,98
2,4-D a 5 µM + BAP a 5 µM	73,31 b B	29,98 a b A	51,64
Média	44,64	30,65	
CV (%)		20,24	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra "a" é atribuída ao valor mais próximo do desejado para a variável em questão na cultura de tecidos.

O efeito da luz e do escuro durante o cultivo também foi estudado na calogênese a partir de raízes em *Lycium barbarum*. O maior índice de calos e de calos embriogênicos foi obtido no cultivo em presença de luminosidade (HU et al., 2008). Em *Prunus serotina*, a formação de calos para a posterior regeneração de plantas a partir de explantes foliares também ocorre na ausência de luz, semelhante à cerejeira e contrariando os relatos em *L. barbarum* (LIU; PIJUT, 2008).

No que concerne à variabilidade genética, pode-se dizer que, observando o comportamento *in vitro* de explantes foliares de *E. involucrata*, em uma mesma unidade experimental houve formação de calos em diferentes intensidades, bem como a ausência de calos. Este tipo de resposta é bastante conhecida em cultura de tecidos vegetais, sendo denominada de genótipo especificidade ou genótipo dependência. Diferentes resultados podem ser observados no desenvolvimento de plantas pertencentes ao mesmo gênero, à mesma espécie e diferentes cultivares ou, simplesmente, genótipos diferentes (AMIRATO, 1986).

A oxidação fenólica também apresentou interação ($P= 0,0015$) entre os fatores testados. A ausência de luminosidade foi, de forma geral, favorável para a ocorrência de explantes sem sintomas de oxidação fenólica, provavelmente pela menor ação da enzima fenilalanina amoniliase (PAL) na ausência de luz, o que será discutido posteriormente. Este fato foi observado principalmente quando se utilizaram as combinações ANA + BAP e 2,4-D + BAP (todos a 5 μM), registrando-se 9,99% e 29,98%, na ausência, e 49,98% e 73,31%, na presença de luz. Contrariamente, com o uso do 2,4-D a 5 μM a maior oxidação ocorreu na ausência de luz (69,98%), em comparação à presença (29,98). Este resultado, *a priori*, possui relação com o fato do 2,4-D ser uma auxina extremamente forte. Na ausência de luz, sua atividade foi estimulada e houve efeito tóxico do 2,4-D, corroborando com as afirmações de SANTOS et al. (2005) a respeito dos possíveis efeitos fitotóxicos desta auxina.

A inclusão de BAP de maneira isolada apresentou a menor taxa de oxidação na presença de luz (19,98), porém, seu uso não foi favorável à formação de calos, como apresentado anteriormente. BAP foi superior apenas à combinação 5 μM de 2,4-D e 5 μM BAP (73,31%); e todos os demais empregos de fitorreguladores não diferiram entre si. Na ausência de luz, todos os tratamentos foram superiores ao 2,4-D a 5 μM (69,98%) isoladamente, não diferindo entre si e com a menor média de

oxidação de 9,99% para a associação ANA + BAP (ambos a 5 μ M) e a maior, de 29,98%, para 2,4-D + BAP (a 5 μ M).

Embora não diferindo, muitas vezes, do uso isolado de ANA, percebeu-se, nitidamente, o sinergismo existente nas combinações entre as auxinas testadas e a citocinina, de forma especial quando os discos foliares foram cultivados no escuro, não sendo favorável, como já relatado, o uso do 2,4-D de forma isolada. Estes resultados diferem daqueles avaliados por LIMA et al. (2008) em *Croton urucurana*, em que 2,4-D, isoladamente, favoreceu de forma significativa a indução de calos e, em contra partida, sua associação com BAP não foi favorável. No entanto, para *Blighia sapida*, a obtenção de calos deu-se de maneira satisfatória por meio da utilização de combinações entre 2,4-D + BAP (WEBSTER et al., 2006).

As oxidações não inviabilizaram, de forma geral, o desenvolvimento dos calos, sobretudo quando ocorreram em manchas isoladas ou de forma branda. Na presença de luz percebeu-se um aumento significativo das oxidações, impedindo o desenvolvimento dos calos e reiterando a observação de que, na ausência de luminosidade, a desdiferenciação celular é mais promissora.

Este fator está ligado à ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), a qual cataliza o processo de formação de compostos fenólicos pela eliminação de uma molécula de amônia da fenilalanina, formando o ácido cinâmico. A atividade desta enzima é ampliada por fatores como, por exemplo, a presença de luz (TAIZ; ZEIGER, 2004). Assim, na ausência de luminosidade, houve a redução de compostos fenólicos e a canalização das rotas metabólicas das células na formação de calos, propiciando o resultado observado.

5.6 Conclusões

- É possível estabelecer cultivos assépticos a partir discos foliares de *E. involucrata* por meio do uso de NaOCl a 1,5% (v/v) durante 15 minutos (de forma geral), sendo observados os pontos de máxima eficiência de 17,96 minutos, para a redução das contaminações gerais, e de 15,06 minutos para a redução das contaminações fúngicas.
- A calogênese em explantes foliares de *E. involucrata* depende da inclusão de fitorreguladores no meio de cultura.

- A ausência de luz durante o período de cultivo favorece a calogênese e reduz a oxidação fenólica.
- O uso de 2,4-D e de BAP, isoladamente, a 5 μ M, não são favoráveis à calogênese em discos foliares de *E. involucrata*.
- A utilização de ANA a 5 μ M e das combinações ANA + BAP e 2,4-D + BAP (todos a 5 μ M) favorece a formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata*.
- É possível desdiferenciar células de tecidos foliares de *Eugenia involucrata* DC.

6 CAPÍTULO IV

DIFERENTES BALANÇOS ENTRE ANA, 2,4-D E BAP NA CALOGÊNESE E RIZOGÊNESE EM DISCOS FOLIARES DE *Eugenia involucrata* DC.

6.1 Resumo

Eugenia involucrata DC. é uma espécie florestal nativa com grande potencial econômico. Todavia, observa-se a escassez no uso de espécies regionais, o que é, geralmente, decorrente da reduzida disponibilidade de informações existentes sobre estas. Este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes balanços entre reguladores de crescimento na calogênese e rizogênese em discos foliares de *E. involucrata*, conhecimentos que podem servir como referenciais para estudos adicionais de morfogênese da espécie e para novas pesquisas biotecnológicas que dependam do cultivo de células *in vitro*. Foram testadas, em dois experimentos, as combinações (em μM) entre ANA + BAP nas concentrações de 5:0, 0:5, 10:0, 0:10, 5:5, 5:10, 10:5 e 10:10 e entre 2,4-D + BAP, combinados a 5:5, 5:10, 10:5 e 10:10. Aos 45 dias de cultivo todos os tratamentos formaram calos nos explantes, sendo o uso de ANA e todas as suas combinações com BAP, bem como o uso de 2,4-D e BAP a 5:5 e 10:10 (μM), superiores ao uso de BAP isolado e às demais concentrações combinando 2,4-D + BAP. Apenas o uso de ANA de forma isolada, a 10 μM , induziu a formação de raízes. Aos 90 dias de cultivo, foi possível estratificar melhor os tratamentos e observou-se que as combinações entre 2,4-D e BAP nas concentrações de 5:5 e 10:10 (μM) favorecem a formação de calos e que o melhor tratamento para a rizogênese é a adição de 10 μM de ANA ao meio MS. É possível mediar processos de desdiferenciação e rediferenciação celular a partir de explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC.

Palavras-chave: rizogênese, organogênese, reguladores de crescimento

DIFFERENT BALANCE BETWEEN NAA, 2,4-D AND BAP IN THE CALOGENESIS AND ROOTING IN *Eugenia involucrata* DC. LEAF DISCS

6.2 Abstract

Eugenia involucrata DC. is a native forest tree with great economic potential. However, there is a shortage in the use of regional species, which is usually due to the limited availability of existing information. This study evaluated the effect of different balance between growth regulators on callus induction and root formation in leaf discs of *E. involucrata*. These results may serve as references for future studies of morphogenesis of this forestry species and for new biotechnology research that depend on the *in vitro* culture of cells. In two experiments, the associations (in μM) of NAA and BAP at concentrations of 5:0, 0:5, 10:0, 0:10, 5:5, 5:10, 10:5 and 10:10 and between 2,4-D and BAP, at 5:5, 5:10, 10:5 and 10:10 were tested. After 30 days of culture, all treatments in the explants formed calli, and the use of ANA and all combinations of BAP and the use of 2,4-D and BAP at 5:5 and 10:10 (μM) better than the use of BAP alone and the other concentrations combining 2,4-D and BAP. Only the use of NAA at 10 μM induced the rooting formation. At 60 days of culture, was able to stratify better the treatments and we observed that the combinations of 2,4-D and BAP at concentrations of 5:5 and 10:10 (μM) were favorable the formation of calli and that the best treatment for rooting is the addition of 10 μM NAA in MS medium. Mediate processes of cell dedifferentiation and re-differentiation from leaf explants of *Eugenia involucrata* DC is possible.

Key-words: rizogênese, organogênese, growth regulators

6.3 Introdução

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) possui madeira de excelente qualidade e durabilidade, sendo utilizada para a fabricação de móveis, lenha, carvão e cabos de ferramentas. Por ser muito rígida é pouco utilizada para outras finalidades como, por exemplo, obtenção de celulose. Seus frutos possuem

coloração variando entre o vermelho e tons vináceos e são muito apreciados na alimentação, tanto *in natura* como após o processamento. Esta espécie também apresenta atividades medicinais (LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Não obstante, seu uso tem sido escasso, notadamente pela falta de conhecimentos sobre sua forma de propagação e sobre sua variabilidade genética. Não obstante, a cerejeira possui sementes recalcitrantes, às quais começam a deteriorar após duas semanas de armazenamento (CARVALHO, 2008).

A obtenção de órgãos *in vitro* pode ocorrer de forma indireta, a qual passa pela formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Estas estruturas permitem a regeneração posterior de plantas por organogênese ou por embriogênese somática (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004). Adicionalmente, a formação de calos pode conduzir à variação somaclonal, a qual é indesejada quando objetiva-se a clonagem, mas, em determinadas situações, é favorável, principalmente para espécies em que se deseja ampliar o reservatório de variabilidade genética. Este pode ser o caso em cerejeira que é classificada como autógama (CARVALHO, 2008).

A variação somaclonal pode ter origem a partir de alterações no nível de ploidia e variações epigenéticas, às quais incluem mutações, rearranjos cromossômicos, mudanças na estrutura cromossômica, metilação de genes, ativação de transposons, entre outras (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; NEUMANN et al., 2009). Shen et al. (2007) expuseram que a produção de variantes somaclonais é possível de ser obtida *in vitro*, sobretudo quando ocorre a passagem dos tecidos pela fase calogênica. A partir desta técnica o tempo necessário para a obtenção de plantas com novas características pode ser extremamente reduzido ao comparar-se com o uso de técnicas clássicas, em especial nas plantas lenhosas, em que o período necessário para atingir a maturidade é muito longo.

A variação somaclonal oferece potencial promissor para a exploração da variabilidade (KORBAN; CHEN, 1992). Além disso, por meio da obtenção do cultivo de células *in vitro*, podem-se utilizar métodos de transformação genética para a introdução de características desejadas nas plantas, sendo, para esta finalidade, a cultura de tecidos uma condição fundamental (PASQUALI; ZANETTINI, 2007).

Ademais a todos estes aspectos relatados, calos são propícios à proliferação e à morfogênese *in vitro*, já que são tecidos desdiferenciados e jovens, o que lhes

atribui infinitas possibilidades de uso (MA et al., 2009). Para a obtenção de calos devem ser estudadas as melhores condições que permitam a formação destas estruturas como, por exemplo, o balanço entre auxinas e citocininas. Sabe-se que níveis mais equilibrados destes reguladores conduzem à formação de calos, no entanto, alterações neste balanço podem conduzir a rotas organogênicas, como a formação de raízes, brotos ou gemas adventícias. Para raízes, é fundamental o aumento na concentração de auxina em relação à citocinina, enquanto que a redução das auxinas e aumento na concentração citocinínica induz à formação de brotações ou, então, calos propícios a esta rota morfogênica (HINOJOSA, 2000; TERMIGNONI, 2005).

A comunidade científica tem demonstrado interesse na elucidação destes aspectos em espécies florestais, a exemplo de *Salix humboldtiana* (SANTOS et al., 2005); *Blighia sapida* (WEBSTER et al., 2006); *Morinda citrifolia* (BAQUE et al., 2010), entre outras; nas quais os balanços entre auxinas e citocininas têm conduzido tecidos foliares à formação de calos e demais estruturas, como raízes, brotos e, em *Litchi chinensis*, a embriões (MA et al., 2009).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a influência do balanço de fitorreguladores sobre a calogênese e a rizogênese *in vitro* em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC., informações estas que podem servir como referenciais para estudos adicionais de morfogênese da espécie e para novas pesquisas biotecnológicas que dependam do cultivo de células *in vitro*.

6.4 Material e Métodos

Para atender aos objetivos propostos, foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente ao Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, localizado no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul.

As plantas doadoras de explantes utilizados nestes experimentos foram cultivadas na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da UFSM. Apresentavam aproximadamente 2 anos de idade e foram mantidas em vasos plásticos com altura de 22 cm e diâmetro de 24 cm (aproximadamente 8 L de capacidade) contendo o substrato comercial Plantmax®. Foram dispostas em bancadas e, para reduzir a intensidade luminosa incidente, utilizou-se um sombrite a

50% sendo que, em épocas de maior luminosidade e calor, foi disposto tecido-não-tecido (TNT) branco sobre o sombrite. A cada dois meses as plantas receberam 400 ml de solução à base de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) a 1 g L^{-1} e, a cada quinze dias, receberam a mesma quantidade de solução de nitrogênio (uréia) em igual concentração. Quinzenalmente, as plantas foram pulverizadas com solução composta por água destilada acrescida de 1 g L^{-1} de Cercobin700PM® (thiophanato metílico) e 100 mg L^{-1} de sulfato de estreptomicina, até obter-se o completo encharcamento; objetivando, assim, estabelecer um pré-tratamento, auxiliar na posterior desinfestação de explantes em Laboratório.

As plantas foram regadas no dia anterior à coleta das folhas, a qual foi realizada no início da manhã, evitando a redução do turgor das células vegetais. Foram coletadas folhas jovens, que não fossem recentemente emitidas e que apresentassem tamanho semelhante às folhas adultas, ou seja, completamente expandidas. Foram escolhidas folhas das regiões medianas das plantas e dos ramos. Durante a coleta, o material foi acondicionado em água destilada contendo 1 g L^{-1} de Benlate500® (benomyl) e 100 mg L^{-1} de sulfato de estreptomicina. O material permaneceu nesta solução por 30 minutos. Após, em Laboratório, passaram pelo seguinte processo de desinfestação: permanência por 5 minutos em água corrente; agitação por 30 segundos em solução de etanol a 70% (v/v); enxágue em água destilada estéril; agitação em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) (obtido a partir do produto com 10% de cloro ativo) por 15 minutos (acrescido de três gotas de detergente comercial) e, por fim, um triplo enxágue em água destilada estéril, o qual ocorreu em câmara de fluxo laminar.

Este ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos e 10 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio de cultura e três explantes (discos foliares), em um total de 120 unidades experimentais e 360 explantes inoculados. Os frascos foram fechados com papel alumínio. O meio de cultura utilizado foi o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar, além dos fitorreguladores que compuseram os tratamentos. Estes, por sua vez, consistiram da introdução dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 5:0; 0:5; 10:0; 0:10; 5:5; 5:10; 10:5; 10:10 (em μM), respectivamente; e de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e BAP nas

concentrações 5:5; 5:10; 10:5; e 10:10 (em μM) respectivamente. A auxina 2,4-D não foi adicionada ao meio de forma isolada devido aos resultados observados em experimentos anteriores não se mostrarem favoráveis.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 após a inclusão dos reguladores de crescimento e antes da inclusão do ágar. Os meios foram autoclavados por 20 minutos à temperatura de 121°C e 1,5 atm de pressão. Os discos foliares foram obtidos com o uso de um cortador metálico cilíndrico (cortador de couro), o qual foi previamente esterilizado por autoclavagem durante 40 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura controlada de $25\pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias. As unidades experimentais foram acondicionadas em caixas de papel cobertas por plásticos escuros, visando prover ausência total de luminosidade durante todo o período de cultivo.

Aos 45 dias, foram avaliadas as variáveis: formação de calos (porcentagem de calos formados independente de seu estágio de desenvolvimento); média das notas atribuídas aos calos; rizogênese (porcentagem de explantes que apresentaram formação de raízes); e oxidação fenólica (porcentagem de explantes com aspectos oxidativos). Foram atribuídas aos calos as notas: 0) ausência de formação calogênica; 1) formação branda de calos; 2) formação calogênica em toda a bordadura dos discos foliares, e 3) formação calogênica com crescimento secundário.

No segundo experimento os tratamentos utilizados foram os mesmos citados no primeiro experimento deste capítulo. Todavia, foram transferidos apenas os explantes que formaram calos ou calos rizogênicos, mantendo-se o tratamento de origem e, assim, permitindo a melhor observação do desenvolvimento dos calos após um período prolongado de tempo. Considerou-se como um experimento separado – e não como subcultivo – pelo fato de se estar selecionando os explantes, excluindo aqueles que não se desenvolveram no período da primeira avaliação e, desta forma, reduzindo-se o efeito da variabilidade genética para melhorar a aproximação dos resultados apenas aos tratamentos utilizados.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com número variável de repetições (de três a seis) em um total de 53 unidades experimentais, compostas pelas mesmas condições do experimento anterior (três explantes por frasco, contabilizando 159 explantes inoculados).

Foram avaliadas, após os 90 dias de cultivo (considerando-se os 30 dias do experimento anterior), as mesmas variáveis já relatadas, exceto a formação de calos, uma vez que todos os explantes transferidos apresentavam estas estruturas. Às notas atribuídas foi acrescido o valor “4” quando houve crescimento dos calos de forma abundante, cobrindo a maior parte da área do explante. Foi incluída a variável incremento da formação calogênica, obtida por meio da pesagem dos explantes em balança analítica e do cálculo da relação entre peso final e inicial. No experimento anterior esta variável não havia sido incluída para evitar contaminações oriundas da manipulação dos explantes durante as avaliações.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Estes foram submetidos à transformação pela função $\sqrt{x+0,5}$ e à análise de variância. As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Na exposição dos dados foram utilizados os valores reais. As análises foram executadas com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

6.5 Resultados e Discussão

No primeiro experimento, observaram-se diferenças significativas para todas as variáveis analisadas, exceto para a oxidação fenólica ($P= 0,2904$), que apresentou média geral de 3,55%. Esta média pode ser considerada baixa, o que é desejável, já que oxidações podem inviabilizar o desenvolvimento dos explantes. Pequenas oxidações foram visualizadas e alterações de coloração, às quais não comprometeram o crescimento dos calos. Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos em relação às variáveis: porcentagem de formação de calos ($P= 0,0116$); média das notas atribuídas aos calos ($P= 0,0003$); e porcentagem de calos rizogênicos ($P= 0,0000$), encontram-se na Tabela 4.

Na formação calogênica os tratamentos contendo ANA isoladamente, tanto a 5 μM (70,32%) como a 10 μM (74,97%) ou combinados com BAP, em todas as proporções testadas, apresentaram os melhores resultados e não diferiram entre si. As médias para as combinações ANA + BAP (em μM) foram: 5:5 (70,34%); 5:10 (73,39%); 10:5 (80,92%) e 10:10 (62,46%). Estes, por sua vez, também não diferiram do tratamento contendo 2,4-D + BAP, nas proporções (em μM) 5:5

(85,15%) e 10:10 (66,64%), e foram todos superiores ao uso de BAP a 5 μ M (45,80%), a 10 μ M (48,10%) e as combinações de 2,4-D + BAP (em μ M) a 5:10 (49,98%) e 10:5 (49,95%), os quais, por sua vez, não diferiram.

Quanto às médias obtidas pelas notas atribuídas aos calos, o comportamento observado foi extremamente semelhante à variável formação de calos, sendo os tratamentos compostos por ANA a 5 μ M (1,70), a 10 μ M (1,50) e as combinações ANA + BAP (em μ M) de 5:5 (1,44), 5:10 (1,33), 10:5 (1,61), 10:10 (1,17); bem como os tratamentos contendo 2,4-D + BAP nas proporções (em μ M) de 5:5 (1,77) e 10:10 (1,10), aqueles que apresentaram as maiores média de notas atribuídas e não diferiram entre si. Observou-se que foram superiores aos tratamentos compostos por BAP a 5 μ M (0,45), a 10 μ M (0,52) e, também, destacaram-se em relação as combinações 2,4-D + BAP (em μ M) de 5:10 (0,89) e 10:5 (0,74), às quais apresentaram as menores médias de notas atribuídas. Os padrões de calogênese, aos quais foram atribuídas notas, podem ser observados na Figura 17.

Foi possível inferir que os tratamentos que incluíam BAP, nas concentrações testadas e isolado de auxinas, não foram adequados à formação de calos nos explantes, mesmo quando aumentada a concentração de 5 para 10 μ M. Estes resultados são semelhantes àqueles registrados em explantes foliares de *Camptotheca acuminata*, em que o uso isolado de citocinina (neste caso a 6-benziladenina – BA) permitiu a formação calogênica, mas em baixos percentuais. Os melhores resultados também foram observados quando BA (6-benziladenina) foi combinada com ANA ou 2,4-D (WANG et al., 2006).

A combinação 2,4-D + BAP foi benéfica à formação de calos nos discos foliares aos 45 dias de cultivo, notadamente quando estes estavam equilibrados (5:5; 10:10), privilegiando a calogênese e ratificando a teoria do balanço hormonal, que preconiza que concentrações próximas de auxina/citocinina favorecem o surgimento de calos (HINOJOSA, 2000).

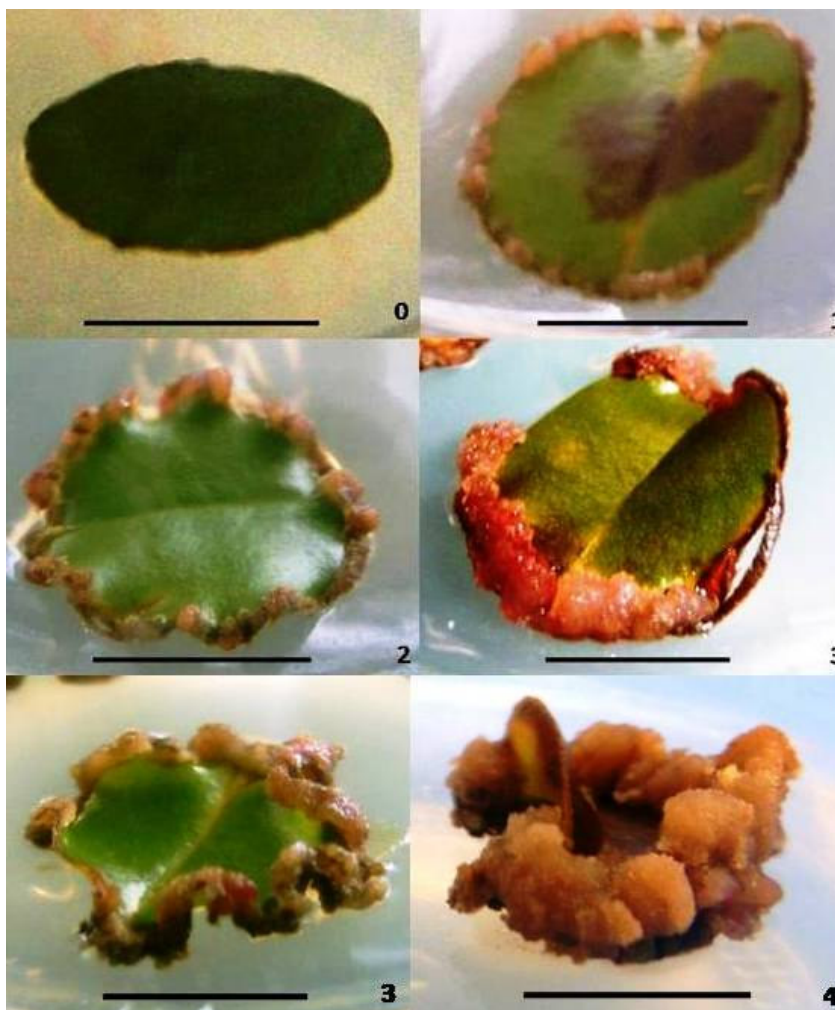


Figura 17 – Intensidade de formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC., aos 45 dias de cultivo e, respectivas notas, onde: 0: representa a nota “0”, referente a ausência de formação de calos; 1: representa a nota “1”, resultando do início de formações calogênicas nas bordas dos discos foliares; 2: representa a nota “2”, com formação calogênica em toda a bordadura do disco foliar; e 3: representa a nota “3”, referente a formação de calos com crescimento secundário. O número 4, representa a nota “4”, referente a calos com crescimento abundante, o qual ocorreu apenas aos 90 dias de cultivo. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Aos 45 dias de cultivo, apenas o tratamento composto por ANA a 10 μ M apresentou formação de raízes, o que ocorreu em 18,32% dos explantes, sendo superior aos demais, os quais não diferiram entre si e não induziram à formação de estruturas radiculares. Este resultado também reforça a teoria referente ao balanço entre reguladores de crescimento, em que se espera que concentrações elevadas de auxinas induzam à rizogênese (HINOJOSA, 2000), além de servir como

parâmetro para avaliar a capacidade de resposta morfogênica dos explantes. Sorin et al. (2005) relataram que a formação de raízes adventícias é um processo complexo, pois envolve múltiplos fatores endógenos da planta, reguladores de crescimento e fatores ambientais, como, por exemplo, a luminosidade. Estes fatores corroboram com o que citam Taiz; Zeiger (2004), referindo-se à formação de raízes adventícias como uma das funções das auxinas.

Tabela 4 - Efeito de diferentes balanços dos fitorreguladores: ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a formação de calos (%), as notas atribuídas aos calos (média) e a formação de calos rizogênicos (%) em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC., com 45 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

Tratamentos	-----Variáveis-----		
	Formação de Calos (%)	Nota atribuída (média)	Calos Rizogênicos (%)
5 µM de ANA	70,32 a*	1,70 a	0,00 b
5 µM de BAP	45,80 b	0,45 b	0,00 b
10 µM de ANA	74,97 a	1,50 a	18,32 a
10 µM de BAP	48,10 b	0,52 b	0,00 b
5 µM de ANA + 5 µM de BAP	70,34 a	1,44 a	0,00 b
5 µM de ANA + 10 µM de BAP	73,39 a	1,33 a	0,00 b
10 µM de ANA + 5 µM de BAP	80,92 a	1,61 a	0,00 b
10 µM de ANA + 10 µM de BAP	62,46 a	1,17 a	0,00 b
5 µM de 2,4-D + 5 µM de BAP	85,15 a	1,77 a	0,00 b
5 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP	49,98 b	0,89 b	0,00 b
10 µM de 2,4-D + 5 µM de BAP	49,95 b	0,74 b	0,00 b
10 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP	66,64 a	1,10 a	0,00 b
CV (%)	13,24	21,78	6,42

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

No experimento II, aos 90 dias de cultivo dos explantes, a variável oxidação fenólica não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos testados ($P=0,2191$). A média geral observada de oxidação fenólica foi de 5,02%, a qual, quando ocorreu, não prejudicou visualmente o desenvolvimento dos explantes. As variáveis: média de notas atribuídas aos calos ($P=0,0000$); incremento da formação calogênica em porcentagem ($P=0,0000$); e porcentagem de calos rizogênicos ($P=0,0004$) apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 5).

No que diz respeito às notas atribuídas, os tratamentos contendo ANA isoladamente a 5 μ M (2,87) e a 10 μ M (2,94), bem como as combinações ANA + BAP (em μ M) de 5:5 (2,93), 5:10 (2,39), 10:5 (2,86) e 10:10 (2,99); além dos tratamentos combinando as concentrações de 2,4-D + BAP (em μ M) de 5:5 (3,44) e 10:10 (2,73) apresentaram os melhores resultados e não apresentaram diferenças entre si. Estes tratamentos foram superiores ao uso das combinações de 2,4-D + BAP (em μ M) de 5:10 (2,24) e 10:5 (1,88), os quais não diferiram, mas foram superiores àqueles em que foi acrescido o BAP a 5 μ M (1,11) e a 10 μ M (0,99). O aspecto dos calos quanto às notas foi semelhante ao observado anteriormente; entretanto, aos 90 dias, o desenvolvimento destas estruturas foi maior, o que fez com que fosse atribuída a nota 4 (Figura 17).

Em explantes foliares de *Salix humboldtiana* a utilização de ANA isolada de BAP também privilegiou o desenvolvimento dos calos, enquanto que o uso da citocinina, de forma isolada, não foi favorável. Santos et al.(2005) observaram que combinações ANA + BAP foram mais favoráveis à calogênese, de forma especial quando a proporção de ANA foi mais elevada em relação à BAP.

Diferente dos resultados obtidos em *E. involucrata* em que, com o emprego da combinação 2,4-D + BAP apenas proporções equilibradas destes reguladores de crescimento foram favoráveis à formação de calos nos explantes, em segmentos foliares de *Blighia sapida*, uma espécie florestal, a maior porcentagem de resposta dos explantes aos reguladores de crescimento, ocorreu quando a concentração de 2,4-D foi cerca de quatro vezes maior do que a concentração de BAP (WEBSTER et al., 2006).

A variável incremento da formação calogênica mostrou a melhor estratificação dos resultados, em que as combinações de 2,4-D + BAP (em μ M) de 5:5 (80,28%) e 5:10 (82,37%) foram superiores aos demais tratamentos e não mostraram diferenças entre si. A última combinação citada apresentou-se distinta em sua resposta nesta variável quando comparada à anterior. Os tratamentos citados foram superiores a todos os demais.

O emprego de 2,4-D foi superior na formação de calos em *Camptotheca acuminata* (WU et al., 2003). Da mesma forma, em *Blighia sapida*, a maior massa fresca foi obtida com o uso de 2,4-D associado à BAP, em comparação à combinação ANA + BAP (WEBSTER et al., 2006). Para Wang et al. (2006), 2,4-D

costuma ser a auxina mais eficiente na formação de calos em diferentes tipos de explantes cultivados *in vitro*.

Para a formação de raízes (Figura 18), o melhor tratamento foi à adição de 10 μM de ANA ao meio de cultura, o qual apresentou 33,30% de formação de raízes, sendo significativamente superior aos demais. O tratamento composto pela combinação 10 μM 2,4-D + 10 μM BAP apresentou 13,32% de raízes formadas, destacando-se em relação aos outros, mas sendo inferior ao emprego de ANA a 10 μM . Todas as demais formas de acréscimo de fitorreguladores testadas não induziram à formação de raízes nos calos. Em alguns casos, as raízes surgiram também ligadas diretamente aos explantes, evidenciando a ocorrência de organogênese direta, a qual não passa pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além disso, espera-se que a auxina, como observado, seja responsável em níveis elevados pela formação de raízes (HINOJOSA, 2000), já que a rizogênese adventícia está associada às atividades auxínicas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Na espécie lenhosa *Morinda citrifolia*, o uso de ANA permitiu a formação de raízes em explantes foliares. Além desta auxina, BAQUE et al. (2010) também utilizaram ácido indolbutírico (AIB) obtendo, igualmente, enraizamento. Tais resultados são semelhantes aos observados neste trabalho.

Embora os calos não tenham originado brotações, a presença de raízes mostrou a existência de determinação e competência celular para a neorganogênese, sendo possível a morfogênese em tecidos calogênicos de cerejeira. Para Termignoni (2005), compreende-se por neorganogênese a formação *de novo* de estruturas organizadas, denominadas órgãos. Não obstante, embora seja conhecido que os diferentes órgãos e tecidos apresentam diferentes respostas *in vitro*, estes resultados podem servir como referenciais para a rizogênese em cerejeira. A rizogênese adventícia é um fator essencial nos processos de propagação vegetativa em espécies lenhosas, sendo que, reguladores de crescimento, componentes fenólicos, características genéticas e o estado nutricional atuam de forma marcante sobre estas rotas (FETT-NETO et al., 2001).



Figura 18 – Aspectos da rizogênese em calos formados a partir de discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. Raízes, após 45 dias de cultivo (em “a” e “b”), e raízes, após 90 dias de cultivo (em “c” e “d”). Setas indicam algumas das formações rizogênicas. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Adicionalmente, estes órgãos (raízes) formados a partir de calos, além de assépticos, são extremamente juvenis, e podem ser utilizados no cultivo *in vitro*. Na lenhosa *Lycium barbarum*, por exemplo, foi observada a formação de calos embriogênicos e a regeneração de plantas por meio do cultivo de raízes (HU et al., 2008).

Tabela 5 - Efeito de diferentes balanços dos fitorreguladores: ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a média das notas atribuídas aos calos, ao incremento da massa dos calos (%), e a formação de calos rizogênicos (%) em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC, com 90 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Tratamentos	-----Variáveis-----		
	Nota atribuída (média)	Incremento dos Calos (%)	Calos Rizogênicos (%)
5 µM de ANA	2,87 a	73,02 c	0,00 c
5 µM de BAP	1,11 c	32,26 d	0,00 c
10 µM de ANA	2,94 a	72,58 c	33,30 a
10 µM de BAP	0,99 c	32,63 d	0,00 c
5 µM de ANA + 5 µM de BAP	2,93 a	74,82 b	0,00 c
5 µM de ANA + 10 µM de BAP	2,39 a	69,28 c	0,00 c
10 µM de ANA + 5 µM de BAP	2,86 a	75,14 b	0,00 c
10 µM de ANA + 10 µM de BAP	2,99 a	76,40 b	0,00 c
5 µM de 2,4-D + 5 µM de BAP	3,44 a	80,28 a	0,00 c
5 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP	2,24 b	82,37 a	0,00 c
10 µM de 2,4-D + 5 µM de BAP	1,88 b	75,86 b	0,00 c
10 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP	2,73 a	77,18 b	13,32 b
CV (%)	8,84	1,38	9,42

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

6.6 Conclusões

- Para a obtenção de calos em explantes foliares de *E. involucrata*, as melhores combinações de fitorreguladores envolvem 2,4-D + BAP nas proporções, em µM, de 5-5 e 10-10.
- A utilização de 10 µM de ANA induz ao surgimento de raízes em calos oriundos de explantes foliares após 45 dias de cultivo.
- Aos 90 dias, as raízes podem ser induzidas por meio da inclusão, ao meio de cultura, de 10 µM de ANA ou da associação 10 µM de 2,4-D + 10 µM de BAP.
- É possível mediar processos de desdiferenciação e rediferenciação celular, a partir de explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC.

7 CAPÍTULO V

CALOGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO DE CALOS EM *Eugenia involucrata* DC.: INFLUÊNCIA DA FORMA DE INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES, DE DIFERENTES FONTES DE CITOCININAS E DA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTE

7.1 Resumo

O cultivo *in vitro* por organogênese indireta permite realizar estudos fisiológicos, a obtenção de plantas, de embriões somáticos e, por meio da variação somaclonal, a ampliação do reservatório de variabilidade genética. O presente trabalho objetivou, em um primeiro momento, avaliar o efeito de diferentes formas de inoculação de explantes foliares de cerejeira (abaxial, adaxial, com e sem cortes) em meio nutritivo com diferentes combinações de reguladores de crescimento para a espécie *Eugenia involucrata* DC., uma essência florestal com potencialidade em diversos setores da atividade econômica. Em um segundo momento, foi avaliado o efeito da inclusão de um agente antioxidante (ácido ascórbico) e de 2,4-D associado às citocininas CIN, BAP, TDZ, 2-ip e Zea na produção de diferentes tipos de calos, entre estes, calos candidatos à embriogênese somática. Em todos os experimentos foi utilizado o meio de cultura MS. A posição de inoculação dos explantes afeta a calogênese e a organogênese em segmentos foliares de *E. involucrata*, sendo a posição mais adequada a abaxial sem cortes na região do limbo foliar. No primeiro experimento, foi mais promissora associação dos reguladores de crescimento 2,4-D + BAP nas concentrações de 10:5 µM. O agente antioxidante não mostrou efeito sobre os explantes. Na obtenção de calos, a melhor citocinina foi TDZ, independente da concentração utilizada, que pode ser substituído por Zea a 10 µM. Zea foi a melhor citocinina na obtenção de calos friáveis, enquanto TDZ favoreceu a formação de calos nodulares, os quais apresentam aspectos embriogênicos.

Palavras-chave: posição de explantes, calos nodulares, embriogênese somática

CALOGENESIS IN *Eugenia involucrata* DC.: INFLUENCE OF THE LEAF EXPLANTS POSITION, DIFFERENT CYTOKINS SOURCES AND ANTIOXIDANT AGENT

7.2 Abstract

The *in vitro* culture by way of indirect organogenesis allow physiological studies, the production of plants, somatic embryos and, through somaclonal variation, the expansion of the reservoir of genetic variability. This study was, at first, to evaluate the effect of different inoculation of leaf explants (abaxial, adaxial, with and without cuts) in nutrient medium with different combinations of growth regulators on *Eugenia involucrata* DC., a forest species with potential in various sectors of economic activity. In a second step, the effect of including an antioxidant agent and 2,4-D associated with CIN, BAP, TDZ, 2-ip and Zea cytokinins in the production of different types of calli, among these calli candidate somatic embryogenesis, were evaluated. In all experiments, we used the MS medium. The position of the explant inoculation affects the callus induction and organogenesis in leaf segments of *E. involucrata*, and the appropriate placement in the abaxial without cuts in the region of the leaf blade. In the first experiment, was most promising combination of growth regulators 2,4-D + BAP at concentrations of 10-5 µM. The antioxidant agent (ascorbic acid) showed no effect on the explants. To obtain calli, the best cytokinin was TDZ independent of the concentration used, which can be replaced by Zea to 10 µM. Zea was the best cytokinin to obtain friable calli, while TDZ favored the formation of nodular calli, which present embryogenic aspects.

Key-words: explants position, nodular callus, somatic embryogenesis

7.3 Introdução

Frente ao grande potencial de impacto que pode ser obtido pela aplicação das técnicas de propagação *in vitro*, especialmente em espécies florestais (XAVIER et al., 2007), é crescente o número de trabalhos que vêm sendo desenvolvidos para tornar estas tecnologias acessíveis e economicamente viáveis. Contudo, as

pesquisas realizadas em cultura de tecidos de espécies florestais são pouco expressivas ao se comparar com os conhecimentos gerados para espécies agrícolas.

Os calos, estruturas intrínsecas à organogênese indireta, são grupos de células em divisão obtidas por estímulos do meio nutritivo, do ambiente e de fitorreguladores. Com estímulos específicos, processos morfogênicos podem conduzir estas células à formação de brotos, raízes ou embriões somáticos (NEUMANN et al., 2009). Calos são propícios à proliferação celular e morfogênese, pois são desdiferenciados e se encontram em estado juvenil (MA et al., 2009); podem ser utilizados em sistemas de propagação massiva, bem como em transformação genética (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004), já que este último processo necessita atingir tecidos a nível celular para que sejam posteriormente regenerados.

Outra vantagem da obtenção de calos reside no seu potencial como fonte de variação somaclonal, a qual é capaz de ampliar a variabilidade genética. A formação de somaclones é oriunda de alterações de ploidia e variações epigenéticas como mutações, rearranjos cromossômicos, transposons, metilação, entre outras causas (NEUMANN et al., 2009). Embora indesejada quando o intuito é a produção de clones, pode ser de fundamental importância em espécies com pouca diversidade genética, acelerando ganhos no melhoramento (AMIRATO, 1986).

Além disso, de acordo com Landa et al. (2000), pesquisas referentes à calogênese também podem servir como ponto inicial para a determinação de condições exigidas pelas plantas para sobreviver e crescer, estudos ligados ao desenvolvimento celular, bem como a obtenção de produtos provenientes do metabolismo secundário, fator de interesse em espécies com potencial medicinal.

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae), conhecida popularmente como cerejeira, é uma espécie nativa de vários Estados brasileiros, dentre eles o Rio Grande do Sul. Apresenta potencial madeireiro, frutícola, paisagístico, ambiental e medicinal (LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002; PAROUL, 2007). Suas sementes, quando em armazenamento, sofrem intensa redução em seu potencial germinativo após duas semanas de coleta, o que dificulta sua propagação. Além disso, esta espécie só atinge a idade reprodutiva entre 6 e 7 anos de idade (CARVALHO, 2008). Assim, o melhoramento genético que em espécies lenhosas é naturalmente demorado em função dos longos períodos necessários para que as

plantas atinjam sua maturidade sexual e expressem determinados caracteres (RESENDE, 1999), pode ser mais rapidamente obtido.

Face ao exposto, a produção por cultura de tecidos de cerejeira pode viabilizar a obtenção de embriões somáticos e o aprofundamento de estudos referentes ao comportamento da espécie quando cultivada *in vitro*. Adicionalmente, por meio da variação somaclonal, podem-se obter novas fontes de variabilidade genética para esta espécie, que é considerada autógama de acordo com Carvalho (2008).

Em trabalhos anteriores com a espécie em questão, observou-se a ocorrência de oxidação nos explantes, possivelmente pelo aumento na ação da enzima fenilalanina amoniliase (PAL), que atua sobre rotas precursoras de compostos fenólicos e é estimulada pela luz, injúrias aos explantes, entre outros fatores. Embora se tenha observado que cultivando os tecidos no escuro há uma expressiva redução na oxidação fenólica, ela poderia ser minimizada de forma mais intensiva, já que, de acordo com Xavier et al. (2009), os compostos fenólicos afetam o desenvolvimento *in vitro* de espécies florestais. Substâncias antioxidantes (como o ácido ascórbico) podem ser adicionadas ao meio nutritivo visando à redução deste evento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ainda neste sentido, a forma de inoculação dos explantes e o nível de injúria ocorrente nos mesmos em seu preparo para a inoculação, podem ser um fator de extrema importância no que se refere ao desenvolvimento dos das culturas e á oxidação. Contudo, poucos trabalhos relatam pesquisas referentes à forma de inoculação de explantes foliares no cultivo *in vitro* de espécies florestais.

Outro fator importante na calogênese, com vistas à sua utilização em técnicas mais avançadas de biotecnologia florestal, é a determinação da concentração e do tipo de citocinina, adequada aos processos morfogênicos que se deseja com o cultivo, já que, de acordo com Termignoni (2005), os calos mais propícios a regeneração são àqueles que se apresentam com constituição firme, e esta depende, principalmente, da atividade citocinínica em suas células.

Frente aos fatores relatados, objetivou-se avaliar a influência de diferentes formas de inoculação de explantes foliares e de citocininas, bem como o emprego de ácido ascórbico sobre a formação de diversos tipos de calos e a oxidação fenólica.

7.4 Material e Métodos

Para atender aos objetivos desta pesquisa, foram conduzidos dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente ao Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Para ambos os experimentos, as plantas doadoras de explantes apresentando aproximadamente entre 3 e 4 anos de idade foram mantidas em casa de vegetação, plantadas em vasos de 24 cm de diâmetro por 22 cm de altura (capacidade de aproximadamente 8 L) contendo o substrato Plantmax®. Os vasos permaneceram sob cobertura de sombrite a 50% e, em períodos mais quentes, foi acrescentada uma cobertura de tecido-não-tecido (TNT) branco.

Foram realizadas irrigações diárias e, mensalmente, as plantas receberam 400 ml de solução contendo nitrogênio, fósforo e potássio (NPK: 5-20-20) a 1 g L^{-1} enquanto que, a cada quinze dias, foram aplicados 400 ml de solução de nitrogênio (uréia) a 1 g L^{-1} . Para manter a sanidade das plantas e realizar tratamentos culturais auxiliares na posterior desinfestação; foram realizadas, semanalmente, pulverizações com solução contendo Cercobin700PM® (thiophanato metílico) a 1 g L^{-1} e sulfato de estreptomicina a $0,1 \text{ g L}^{-1}$, até ser obtido o encharcamento total da área foliar e superfície do substrato.

As coletas das folhas que serviram como fontes de explantes foram realizadas pela manhã, tomando-se o cuidado de regar as plantas na noite anterior, visando manter o turgor das células vegetais. Durante a coleta, as folhas foram mantidas em água destilada contendo Benlate 500® (benomyl) a 1 g L^{-1} e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina, onde permaneceram por 30 minutos.

Em Laboratório, as folhas foram lavadas com o auxílio de detergente comercial e esponja, permanecendo em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, foram desinfestadas conforme segue: imersão em etanol a 70% (v/v) por 30 segundos; lavagem em água destilada; imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v), contendo três gotas de detergente comercial, por 15 minutos; e triplo enxágüe em água destilada e autoclavada.

Para avaliar a influência da forma de inoculação dos explantes, foi conduzido o primeiro experimento em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 4 x 3. Os níveis do fator "A" foram quatro posições de inoculação

dos explantes foliares no meio nutritivo, a saber: na posição abaxial e sem cortes na área foliar; na posição abaxial e com cortes; na posição adaxial e sem cortes; e na posição adaxial com cortes. Os explantes consistiram de fragmentos foliares de 1 x 1,5 cm, realizados com o auxílio de bisturi, contendo corte em toda a região de bordadura. Na inoculação dita “com cortes”, realizaram-se cortes na região do limbo foliar (seis cortes). Os níveis do fator “B” foram os diferentes fitorreguladores adicionados ao meio de cultura: 10 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e as combinações entre 5 μM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) + 5 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 5 μM de 2,4-D + 10 μM de BAP.

As concentrações dos fitorreguladores foram escolhidas com base em resultados de experimentos anteriores. A combinação 2,4-D e BAP foi incluída por promover a formação de calos e, ANA, por induzir a formação de raízes, possibilitando avaliar a influência da posição dos explantes não apenas sobre a calogênese, mas, também, sobre a organogênese *in vitro*.

O experimento incluiu 12 tratamentos com 10 repetições, cada uma composta por um frasco com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e dois explantes, totalizando 120 unidades experimentais e 240 explantes inoculados. Os frascos foram vedados com papel alumínio. As parcelas permaneceram em sala de cultivo com temperatura controlada de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias. Durante os primeiros 45 dias, os frascos foram mantidos no escuro, sendo dispostos em caixas de papel vedadas e cobertas por plásticos escuros. Após, foram transferidos para a luz por 25 dias adicionais, até completarem 70 dias de inoculação.

Foram avaliadas as variáveis: formação de calos (%), notas atribuídas aos calos (0, 1, 2, 3 e 4), calos rizogênicos (porcentagem de calos com formação de raízes), calos friáveis (porcentagem de calos com aspecto friável), calos firmes (porcentagem de calos firmes à introdução do bisturi), calos nodulares (porcentagem de calos com aspectos nodulares, putativos à embriogênese somática) e oxidação fenólica (%). As notas corresponderam à: 0) ausência de formação calogênica; 1) formação de calo cicatricial ou início da formação calogênica nas bordas dos discos foliares; 2) formação calogênica em toda a bordadura (ou nas regiões de cortes) dos discos foliares; 3) formação calogênica com crescimento secundário; e 4) formação calogênica com crescimento abundante.

Para avaliar o efeito do ácido ascórbico e de diferentes fontes de citocininas foi conduzido um segundo experimento. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema trifatorial $2 \times 2 \times 5$, sendo o fator “A” composto pela ausência ou presença (100 mg L^{-1}) de ácido ascórbico; os níveis do fator “B”, foram constituídos pelas concentrações de citocininas (5 ou $10 \text{ }\mu\text{M}$) e, os níveis do fator “C”, por diferentes citocininas, a saber: cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), 2-isopenteniladenina (2-ip) e zeatina (ZEA).

Este ensaio envolveu um total de 20 tratamentos com cinco repetições, sendo cada parcela composta por uma placa de petry de 12 cm de diâmetro contendo 20 ml de meio nutritivo e cinco discos foliares, totalizando 100 unidades experimentais e 500 explantes. Os discos foliares foram obtidos com o auxílio de um cortador metálico cilíndrico (cortador de couro) com diâmetro de 1,5 cm, e foram cortados e introduzidos no meio nutritivo na posição abaxial.

As unidades experimentais foram mantidas em sala de cultivo sob as mesmas condições relatadas no experimento anterior, porém, na ausência de luminosidade, durante o decorrer do experimento (60 dias).

Foram avaliadas as variáveis: formação de calos (%), calos friáveis (%), calos firmes (%), calos globulares (%), incremento na massa dos calos, obtido a partir dos valores de massa (g) inicial e final (%), notas atribuídas aos calos e oxidação fenólica. Todas as variáveis seguiram os mesmos critérios do experimento anterior, sendo incluída apenas a variável “incremento da massa dos calos”, que foi estimada com o auxílio de uma balança analítica.

Em ambos os experimentos, o meio base utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar. Os meios tiveram, após a inclusão de todos os seus componentes (exceto o ágar), seu pH ajustado para 5,8, posteriormente foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,5 atm de pressão.

Por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov avaliou-se normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Bartlett. Utilizou-se a transformação dos dados para a função $\sqrt{x+0,5}$ e estes foram submetidos à análise de variância. Quando significativos, tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Na presença de interações entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As

análises foram efetuadas com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

7.5 Resultados e Discussão

Houve interação entre a forma de inoculação dos explantes e os diferentes fitorreguladores adicionados ao meio nutritivo para a variável formação de calos ($P=0,0030$) (Tabela 6). Com a adição de $10\ \mu\text{M}$ de ANA ao meio de cultura, a inoculação dos explantes na posição adaxial com cortes ($50,00\%$) foi estatisticamente inferior a todas às demais, que não diferiram entre si. Entre os diferentes reguladores de crescimento somente houve diferenças quando estes foram inoculados na posição adaxial com corte, em que a combinação de $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D + $10\ \mu\text{M}$ de BAP (100%) e $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D + $5\ \mu\text{M}$ de BAP ($87,50\%$) foram superiores à $10\ \mu\text{M}$ de ANA ($78,55\%$). Assim, observou-se que a inoculação mantendo a face adaxial em contato com o meio e contendo cortes na região do limbo foliar é desfavorável à calogênese em cerejeira.

Este resultado é contrário àquele observado em *Platanus occidentalis*, em que foi possível obter calos e a emissão de brotações em explantes foliares cultivados *in vitro*, mas, para tanto, os explantes foliares foram dispostos mantendo o contato da região adaxial com o meio de cultura. Além disso, foram realizados de três a quatro cortes nesta região, objetivando aumentar a área de contato do meio com as células do tecido (SUN et al., 2009).

As notas atribuídas aos calos (Tabela 6) também evidenciaram a interação ($P=0,0042$) entre os níveis dos fatores testados. Com $10\ \mu\text{M}$ de ANA e com a combinação $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D + $5\ \mu\text{M}$ de BAP não foram observadas diferenças entre as formas de inoculação dos explantes. Apesar disso, com a associação de $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D + $10\ \mu\text{M}$ de BAP, a inoculação dos explantes na posição abaxial sem cortes ($2,31$) e adaxial com cortes ($2,31$) favoreceram à formação de calos. Nas posições abaxial com cortes e adaxial com cortes, as combinações de 2,4-D + BAP foram superiores à ANA em relação às notas atribuídas à calogênese. A inoculação na posição adaxial sem cortes foi superior ao emprego dos diferentes reguladores de crescimento em comparação à combinação de $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D + $10\ \mu\text{M}$ de BAP, enquanto na posição adaxial sem cortes a associação de $5\ \mu\text{M}$ de 2,4-D + $5\ \mu\text{M}$ de

ANA foi superior à 10 μ M de ANA, não diferindo da outra combinação entre 2,4-D + BAP.

Poucos trabalhos com espécies lenhosas relataram a importância da forma de inoculação dos explantes na calogênese. Para obter calos em folhas de *Juniperus oxycedrus*, a inoculação dos explantes ocorreu mantendo-se a posição adaxial dos explantes (GOMES; SEGURA, 1996). Em *Litchi chinensis*, Raharjo; Litz (2007) observaram maior formação de calos em segmentos foliares pela inoculação com a face abaxial em contato com o meio, resultados que se assemelham ao observado em cerejeira. No entanto, também para *L. chinensis*, Ma et al. (2009) registraram que a inoculação dos explantes com a face adaxial em contato com o meio nutritivo foi mais significativa para a obtenção de calos.

Ao contrário do esperado, não houve influência dos diferentes fitorreguladores de crescimento na formação de calos rizogênicos, mas, sim, da maneira como os explantes foram inoculados (Tabela 6). Em outras palavras, foram significantes os níveis do fator “A” ($P= 0,0000$). A posição abaxial sem cortes (13,55%) foi superior a todas às demais formas de inoculação dos explantes. Possivelmente, a forma de contato das células dos tecidos com o meio nutritivo favoreceu esta resposta organogênica, bem como a ausência de cortes, já que se observou que a escarificação é responsável pela maior formação de calos cicatriciais e pela liberação de compostos fenólicos que poderiam inibir determinadas rotas morfogênicas. Estes dados são díspares em relação aos relatos de Pierik (1990), o qual observou que lesões na superfície de contato dos explantes com o meio de cultura aumentam a possibilidade de absorção de nutrientes e de fitorreguladores, permitindo melhores resultados organogênicos.

Na formação de calos friáveis (Tabela 6) houve interação ($P=0,0037$) entre os fatores testados. Quando se utilizou a combinação de 5 μ M de 2,4-D + 10 μ M de BAP, a introdução dos explantes foliares na posição abaxial sem cortes foi favorável (20,00%), enquanto em todas as demais formas de introdução dos explantes não foi observada a formação de calos friáveis. Também nesta forma de inoculação dos explantes, 5 μ M de 2,4-D + 10 μ M de BAP foram superiores em relação às demais inclusões de reguladores de crescimento ao meio nutritivo.

Tabela 6- Efeito da forma de inoculação de explantes foliares e de diferentes reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo MS na formação de calos (%), média de notas atribuídas aos calos; formação de calos rizogênicos (%); formação de calos friáveis (%); formação de calos nodulares (%) e formação de calos firmes (%), aos 70 dias de cultivo *in vitro* de *E. involucrata* DC. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

----- Formação de calos (%) -----				
Fontes de Variação	10 µM ANA	5 µM 2,4-D + 5 µM BAP	5 µM 2,4-D + 10 µM BAP	Média
Abaxial Sem Corte	91,64 a A*	100,00 a A	100,00 a A	97,21
Abaxial Com Corte	80,00 a A	83,32 a A	81,24 a A	81,52
Adaxial Sem Corte	78,55 a A	100,00 a A	87,77 a A	88,77
Adaxial Com Corte	50,00 b B	87,50 a A	100,00 a A	79,17
Média	75,04	92,70	92,25	
CV (%)		8.39		
----- Nota atribuída (média) -----				
Fontes de Variação	10 µM ANA	5 µM 2,4-D + 5 µM BAP	5 µM 2,4-D + 10 µM BAP	Média
Abaxial Sem Corte	1,10 a B	1,46 a B	2,31 a A	1,62
Abaxial Com Corte	0,90 a B	1,75 a A	1,75 a b A	1,47
Adaxial Sem Corte	1,00 a B	1,50 a A	1,33 b A B	1,28
Adaxial Com Corte	0,69 a B	1,54 a A	2,31 a A	1,43
Média	0,92	1,56	1,86	
CV (%)		13.23		
----- Calos rizogênicos (%) -----				
Fontes de Variação	10 µM ANA	5 µM 2,4-D + 5 µM BAP	5 µM 2,4-D + 10 µM BAP	Média
Abaxial Sem Corte	16,64	7,13	16,87	13,55 a
Abaxial Com Corte	0,00	0,00	0,00	0,00 b
Adaxial Sem Corte	14,26	0,00	0,00	4,75 b
Adaxial Com Corte	0,00	0,00	0,00	0,00 b
Média	7,72	1,78	4,22	
CV (%)		9,10		
----- Calos friáveis (%) -----				
Fontes de Variação	10 µM ANA	5 µM 2,4-D + 5 µM BAP	5 µM 2,4-D + 10 µM BAP	Média
Abaxial Sem Corte	0,00 a B	0,00 a B	20,00 a A	6,67
Abaxial Com Corte	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	0,00
Adaxial Sem Corte	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	0,00
Adaxial Com Corte	0,00 a A	0,00 a A	0,00 b A	0,00
Média	0,00	0,00	5,00	
CV (%)		7,57		
----- Calos nodulares (%) -----				
Fontes de Variação	10 µM ANA	5 µM 2,4-D + 5 µM BAP	5 µM 2,4-D + 10 µM BAP	Média
Abaxial Sem Corte	0,00	30,00	25,00	18,33
Abaxial Com Corte	0,00	5,00	10,00	5,00
Adaxial Sem Corte	0,00	20,00	35,00	10,00
Adaxial Com Corte	5,00	0,00	25,00	18,33
Média	1,25 B	13,75 A B	23,75 A	
CV (%)		18,08		
----- Calos firmes (%) -----				
Fontes de Variação	10 µM ANA	5 µM 2,4-D + 5 µM BAP	5 µM 2,4-D + 10 µM BAP	Média
Abaxial Sem Corte	25,00	000	40,00	21,67
Abaxial Com Corte	5,00	20,00	15,00	13,33
Adaxial Sem Corte	5,00	30,00	25,00	20,00
Adaxial Com Corte	10,00	10,00	40,00	20,00
Média	11,25 B	15,00 A B	30,00 A	
CV (%)		20.30		

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" foi atribuída à média, considerada como melhor em função do cultivo *in vitro*.

A formação de calos firmes ocorreu independentemente da forma de introdução dos explantes, sendo significativos apenas os fitorreguladores e as combinações entre testadas ($P=0,0168$). Para este fim, a combinação 5 μM de 2,4-D + 5 μM de BAP (30,00%) foi superior à 10 μM de ANA (11,25%), e não diferiu da combinação 5 μM de 2,4-D + 5 μM de BAP (15,00%) que apresentou-se como um tratamento intermediário. Para Termignoni (2005), calos com aspecto firme são favoráveis à organogênese.

Na formação de calos nodulares foram significativos apenas os níveis do fator “B”, referentes aos fitorreguladores e sua forma de uso ($P=0,0006$). Estes calos, putativos a embriogênicos, tiveram sua maior ocorrência com 10 μM de 2,4-D + 5 μM de ANA (23,75%), combinação que foi superior a 10 μM de ANA (1,25%) e não diferiu de 5 μM de 2,4-D + 5 μM de ANA (13,75%) que, por sua vez, também, não divergiu de 10 μM de ANA. Na Figura 1 podem ser observados aspectos dos calos nodulares.

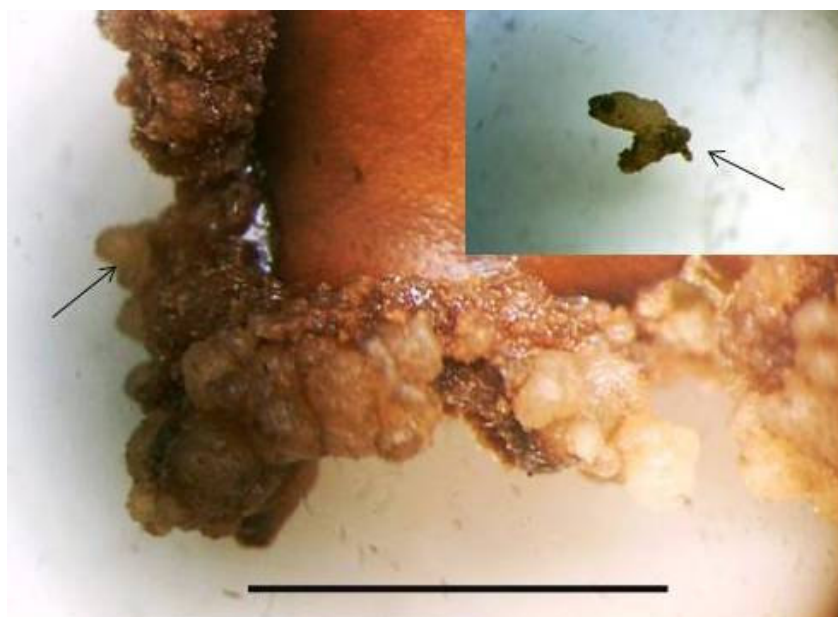


Figura 19 – Aspecto da formação de calos nodulares, putativos a embriogênicos, em explantes foliares de *E. involucrata* DC., aos 70 dias de cultivo. Setas indicam as nodulações. Em destaque, no canto superior direito, um nódulo isolado. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A oxidação fenólica apresentou interação ($P = 0,000$) entre os níveis dos fatores testados, podendo-se observar (Figura 20) que a maior oxidação ocorreu nos tratamentos em que há presença de 2,4-D, possivelmente pela maior atividade metabólica desta auxina. Na presença de 10 μM de ANA observou-se melhor a influência da posição dos explantes, com menores oxidações ocorrendo nas posições abaxial sem cortes (16,64%) e adaxial sem cortes (14,26%), sendo ambas superiores à introdução dos segmentos foliares na posição abaxial com cortes (70,00%) e adaxial com cortes (50,00%), evidenciando que a presença de cortes nas folhas aumenta a oxidação, possivelmente como resposta às injúrias causadas nos tecidos.

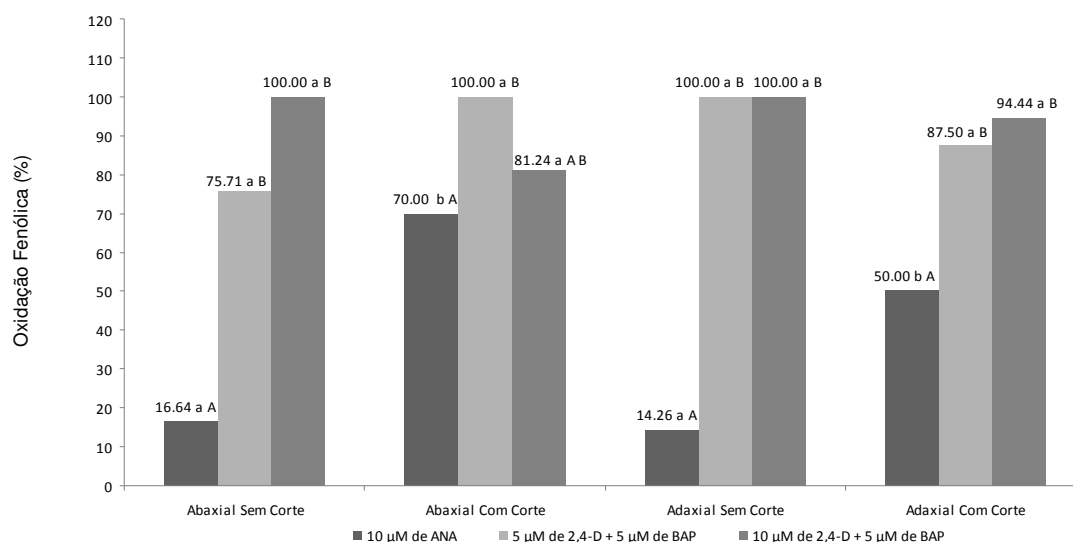


Figura 20- Efeito de diferentes formas de inoculação de explantes e de diferentes reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo MS, na oxidação de explantes foliares de *E. involucrata* DC., aos 70 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro de uma mesma forma de inoculação, e pela mesma letra minúscula, entre diferentes formas de inoculação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” foi atribuída sempre à média mais baixa já que a oxidação não é desejada no cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A oxidação fenólica é um fator comum em cultivo de espécies lenhosas, sendo estes compostos, muitas vezes, produzidos em áreas injuriadas dos explantes (ANDRADE et al., 2000). Xavier et al. (2009) relataram que os compostos fenólicos são, de forma geral, precursores da síntese de lignina. Embora não se

tenha observado redução no desenvolvimento dos calos frente à oxidação, após a conclusão do experimento, mantendo-os na presença de luz, houve um aumento significativo das oxidações, prejudicando os explantes. Para Ledo et al. (2002), além de ferimentos e outros fatores inerentes ao explante, a oxidação pode ser provocada pelos próprios reguladores de crescimento. Além disso, a atividade da fenilalanina amoniliase (PAL), enzima que atua no metabolismo de compostos fenólicos, é aumentada pela exposição de tecidos a injúrias (TAIZ; ZEIGER, 2004).

No segundo experimento, a presença ou a ausência do agente antioxidante (ácido ascórbico) não favoreceu nenhuma das variáveis avaliadas, especialmente a oxidação fenólica ($P=0,4855$), que seria a variável que melhor demonstraria o efeito do mesmo. Não houve interações, ocorrendo apenas influência dos níveis do fator “C” (citocininas), para as variáveis: formação calogênica ($P=0,0427$), porcentagem de calos friáveis ($P=0,0211$) e porcentagem de calos nodulares ($P=0,0000$). Os diferentes tipos de calos (friáveis, firmes, rizogênicos e nodulares) podem ser observados na Figura 21.



Figura 21 – Aspecto dos diferentes tipos de calos observados em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC.: calo friável (a), calo rizogênico (b – seta indica a raiz), calo firme (c) e calo nodular (d – seta indica formação nodular e, acima da imagem, destaque para uma estrutura nodular), aos 60 dias de cultivo. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A maior formação calogênica (Tabela 7) ocorreu com a utilização de TDZ (80,57%), o qual foi superior ao uso de BAP (48,25%). O uso de ZEA (64,75%) e de 2-ip (56,50%) não diferiu dos demais tratamentos, permitindo classificá-los como intermediários. Em explantes foliares de *Paulownia tomentosa*, o uso de TDZ foi considerado ideal para a indução à calogênese; além disso, permitiu a formação de múltiplas brotações (CORREDOIRA et al., 2008), resultado próximo ao observado em *E. involucrata*.

Todavia, em explantes foliares de *Byrsonima intermedia*, em que foi testada a utilização de TDZ e BAP em conjunto com 2,4-D, Nogueira et al. (2007) concluíram que a presença das citocininas não foi favorável à calogênese. Este resultado é discrepante em relação aos observados em *E. involucrata*, já que a interação entre os reguladores de crescimento, além de promover a calogênese, permitiu a observação do sinergismo existente entre TDZ e 2,4-D no processo de desdiferenciação celular. Testando o efeito das citocininas BAP, CIN e Zea em diversas concentrações, todas introduzidas no meio de cultura em conjunto com ANA, e objetivando a obtenção de calos para culturas de células em suspensão de *Calotropis gigantea*, Roy et al. (2000) concluíram acerca da eficiência da CIN neste intuito, em detrimento às demais citocininas testadas; diferindo dos resultados observados em cerejeira em que, de forma geral, o uso de CIN não foi satisfatório.

Em *Phellodendron amurense*, uma Rutacea lenhosa, a formação de calos em explantes foliares foi favorecida pela combinação entre 2,4-D e TDZ, sendo superior ao 2,4-D associado à BAP. Azad et al. (2005) também testaram a substituição do 2,4-D por ácido naftalenoacético (ANA), mas os resultados não foram satisfatórios como na utilização de 2,4-D.

Para a obtenção de calos friáveis (Tabela 7), o emprego de 2-ip (40,75%) foi superior ao de BAP (13,00%), sendo que os demais tratamentos não mostraram diferenças em relação a estes. Pinto et al. (2002) relatam, em estudo de embriogênese em *Quercus suber*, que a citocinina 6-benziladenina (BA) promoveu o maior número de calos friáveis. Esta citocinina apresenta composição semelhante ao BAP, utilizado no experimento em cerejeira, o qual não foi eficiente frente à utilização do 2-ip.

Já na obtenção de calos nodulares, os quais são candidatos a calos embriogênicos, o TDZ (24,00%) foi superior a todas as demais citocininas (Tabela

7); igualmente, este regulador de crescimento foi responsável pelo maior incremento em maior massa observado (94,69%).

Em termos de incremento na massa dos calos, em que também só houve efeito significativo para os níveis do fator “C” (tipo de citocinina; $P=0,0038$); o uso de TDZ (94,70%) não diferiu do uso de ZEA (93,60%) e do uso de 2-ip (93,25%), mas foi superior ao uso de BAP (92,85%) e da CIN (92,65%). Em *Litchi chinensis*, a presença de estruturas globulares (semelhantes ao que foi considerado como nódulos neste trabalho) foi denominada como embriões em estágio globular e o emprego de 2,4-D não foi necessário para isso (MA et al., 2009). Em explantes foliares de *Quercus robur*, Corredoira et al. (2006) obtiveram a formação de tecidos calogênicos, estruturas embriogênicas nodulares e embriões somáticos, porém, para este processo, a citocinina utilizada foi BAP combinado com ANA e caseína hidrolizada.

Não foi observada diferença entre as interações duplas ($P=0,4904$; $P=0,7530$; e $P=0,1557$) e nenhum dos níveis dos fatores testados isoladamente ($P=0,1040$; $P=0,9366$; e $P=0,5569$) para a formação de calos firmes em explantes foliares de *E. involucrata*, sendo obtida uma média de 24,65%. Em *Quercus suber* os maiores índices de formação de calos firmes (denominados pelos autores como compactos) ocorreu na introdução de ZEA (PINTO et al., 2002). Para posterior regeneração os calos de maior interesse são os firmes, pois, de forma geral, são mais aptos à regenerar, conforme cita Termignoni (2005), além dos nodulares, os quais são candidatos à embriogênese somática.

Tabela 7 – Efeito de diferentes citocininas na formação calogênica (%), calos friáveis (%), calos nodulares (%) e incremento – na massa dos calos - (%) em explantes foliares de *E. involucrata* DC., aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2009

Fonte de Variação	Calos (%)	Calos friáveis (%)	Calos nodulares (%)	Incremento (%)
CIN	56,25 a* b	30,00 a b	3,00 b	92,65 b
BAP	48,25 b	13,00 b	2,00 b	92,85 b
TDZ	80,57 a	37,07 a b	24,00 a	94,70 a
2,IP	56,50 a b	40,75 a	1,25 b	93,25 a b
ZEA	64,75 a b	36,25 a b	1,00 b	93,60 a b
CV (%)	16,14	18,29	10,3	0,61

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para a variável notas atribuídas aos calos, observou-se interação entre as diferentes citocininas utilizadas e suas concentrações ($P=0,0056$) (Tabela 8). Com a concentração 5 μM , a citocinina TDZ (1,50) foi superior à ZEA (0,645), não diferindo das demais citocininas. Com 10 μM houve a inversão desta resposta, com ZEA apresentando maior intensidade de formação calogênica (1,464), sendo superior à BAP (0,580) e à 2-ip (0,700), não diferindo das demais. Nenhuma das citocininas apresentou diferenças entre as concentrações utilizadas, exceto ZEA, em que 10 μM foi superior a 5 μM . A menor oxidação fenólica (26,00%) foi observada com ZEA, diferindo de BAP (56,00%) e não diferindo das demais citocininas que, por sua vez, não diferiram de BAP. Somente houve, para esta variável, efeito do tipo de citocinina utilizado ($P=0,0292$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Efeito de diferentes concentrações de citocininas sobre as notas atribuídas ao calejamento dos explantes e à oxidação fenólica após 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2009

	-----Notas Atribuídas-----			Oxidação
	5 μM	10 μM	Média	
CIN	0,790 a* b A	0,950 a b A	0,870	46,50 a b
BAP	0,935 a b A	0,580 b A	0,750	56,00 b
TDZ	1,500 a A	1,200 a b A	1,350	32,25 a b
2-ip	1,125 a b A	0,700 b A	0,910	39,50 a b
ZEA	0,645 b B	1,464 a A	1,050	26,00 a
Média	0,998	0,978		40,05
CV (%)		22,28		17,71

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra "a" foi atribuída ao valor mais próximo ao desejado em cultura de tecidos.

Por fim, o enraizamento não apresentou interações duplas entre os fatores ($P=0,2734$; $P=0,0501$; e $P=1037$) e nem interações simples ($P=0,4438$; $P=0,6926$; e $P=0,2916$); o que pode ser considerado esperado, já que, resultados em experimentos anteriores, evidenciaram o enraizamento em taxas significativas, apenas no uso da auxina ácido naftalenoacético (ANA), de forma isolada.

7.6 Conclusões

- A melhor forma de inoculação de explantes foliares no meio de cultura, para a obtenção de calos, é mantendo a posição abaxial em contato com o meio nutritivo, sem cortes no limbo foliar.
- Para a rizogênese, explantes foliares de *E. involucrata* devem ser inoculados na posição abaxial sem cortes.
- O emprego da citocinina TDZ, nas concentrações 5 μM e 10 μM , em conjunto com 2,4-D favorece significativamente a formação de calos.
- A utilização da citocinina ZEA, nas concentrações 5 μM e 10 μM , favorece a formação de calos friáveis.
- A inclusão de ZEA a 10 μM é tão eficiente quanto TDZ na formação de calos em explantes foliares de cerejeira.
- Para a formação de calos nodulares, com aspecto embriogênico, a combinação entre a auxina 2,4-D (5 μM) e a citocinina TDZ (5 ou 10 μM) é a mais indicada.

8 CAPÍTULO VI

PROTOCOLO PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE) A PARTIR DE FOLHAS E CÂMBIOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

8.1 Resumo

Para avaliar a diversidade genética de espécies vegetais por meio de marcadores moleculares é necessário dispor de métodos eficientes de extração de DNA genômico. O presente trabalho objetivou desenvolver protocolos para a extração de DNA em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae), possibilitando estudos posteriores de variabilidade genética. Foram testadas as extrações a partir de folhas armazenadas por 10 ou 21 meses, a inclusão do tampão de extração CTAB a 2 e a 10% e diferentes formas de homogeneização do macerado com o CTAB. Também foi testada a possibilidade de usar câmbios armazenados por 10 meses em CTAB a 2% na presença e na ausência de 0,2% de β -mercaptoetanol; e a adição do tampão de extração CTAB a 2 e a 10% na maceração. Após a quantificação do material extraído, realizaram-se reações de PCR empregando-se oito *primers* RAPD, com o objetivo de averiguar se a qualidade das soluções de DNA genômico obtidas seria suficiente para permitir amplificações do DNA. Para folhas, ambos os períodos de armazenamento são adequados, contudo, o maior rendimento é obtido com o menor tempo de conservação. A melhor qualidade é gerada com o uso do CTAB a 10% e homogeneização realizada em Gral. Para os câmbios, o armazenamento deve ser realizado em CTAB na ausência de β -mercaptoetanol, sendo adequada a maceração em CTAB a 2 ou a 10%. O rendimento de DNA é maior na extração a partir de folhas. A qualidade do DNA isolado foi comprovada pelas reações de RAPD, em que todos os 8 *primers* testados anelaram em amostras de DNA oriundas de folhas e câmbios.

Palavras-chave: CTAB, isolamento de DNA, marcadores moleculares

PROTOCOL FOR GENOMIC DNA ISOLATION OF *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE) FROM LEAVES AND CAMBIAL TISSUES IN DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

8.2 Abstract

To assess the genetic diversity of plant species using molecular markers is necessary to have efficient protocols for extraction of genomic DNA. This study aimed to develop protocols for extracting DNA from *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae), enabling further studies of genetic variability. The extractions from leaves stored for 10 or 21 months, the addition of 2 to 10% CTAB extraction buffer and different ways of mixing the macerated with CTAB were tested. We also tested the possibility to use cambial storage for 10 months in the 2% CTAB in the presence and absence of 0.2% β -mercaptoethanol, and the addition of extraction buffer 2 and 10% CTAB in maceration. After quantification of the extracted material were carried out PCR reactions employing eight RAPD primers in order to establish whether the quality of the solutions of genomic DNA obtained was sufficient to allow amplification of DNA. For leaves, both periods of storage are adequate, but higher yields are obtained with shorter storage. The best quality is generated with the use of 10% CTAB and mixing performed in Gral. For cambial, the storage should be performed in CTAB in the absence of β -mercaptoethanol, and appropriate soaking in 2 or 10% CTAB. The yield is higher in DNA extraction from leaves. However, the quality of isolated DNA was confirmed by the RAPD reactions, in which all primers tested annealed in DNA samples derived from leaves and cambial.

Key-words: CTAB, DNA isolation, molecular markers

8.3 Introdução

Marcadores moleculares têm potencial para a utilização em programas de melhoramento de plantas nas suas mais diversas etapas e das mais distintas formas. Pereira et al. (2009) ressaltaram a importância do uso das técnicas de biologia molecular no pré-melhoramento de espécies vegetais, momento em que se

deseja conhecer o material genético antes de introduzi-lo em um programa de melhoramento. Estes autores destacaram, entre outros aspectos, a importância do uso de marcadores em análises da diversidade genética em bancos de germoplasma.

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. – Myrtaceae) é uma espécie nativa que ocorre do Rio Grande do Sul ao Estado de Minas Gerais, a qual é predominantemente autógama (CARVALHO, 2008) e apresenta diversas características de interesse na silvicultura e fruticultura, entre outros setores (LORENZI, 1992). Porém, pouco se conhece sobre a distribuição da variabilidade genética existente nesta espécie.

A análise da variabilidade genética e da estrutura de populações de espécies lenhosas tem sido realizada, como em *Sorbus terminalis* (BELLETI et al., 2008), *Mangifera indica* (RAJWANA et al., 2008), *Cedrus libani* (SEMAAN; DODD, 2008), bem como em espécies nativas brasileiras, a exemplo de *Xylopia brasiliensis* (PINTO; CARVALHO, 2004), *Euterpe oleraceae* (OLIVEIRA et al., 2007), entre outras. A maior parte dos estudos visando avaliar a diversidade genética de espécies lenhosas está relacionada à compreensão da biodiversidade, à dinâmica de populações naturais ou aos processos iniciais de domesticação (FINKELDEY et al., 2010).

Não obstante, a possibilidade de se analisar um grande número de indivíduos por meio de marcadores moleculares requer a extração de DNA com qualidade e quantidade adequadas em que, além de um bom método de extração, são necessários cuidados especiais na coleta e na conservação do material vegetal (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Embora metodologias de extração possam servir de padrão para diversas espécies, Rachmayanti et al. (2006) relataram que, muitas vezes, espécies até de um mesmo gênero possuem grande variabilidade em sua composição química ou, em uma mesma espécie, esta composição pode variar entre seus próprios tecidos, direcionando à necessidade de estabelecimento de protocolos eficientes de extração de DNA altamente específicos.

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo otimizado para a extração de DNA genômico de *Eugenia involucrata* DC. a partir de diferentes tecidos vegetais, armazenados sob diferentes condições e incluindo-se modificações na metodologia padrão de extração.

8.4 Material e Métodos

Foi conduzido um experimento no Laboratório de Marcadores Moleculares do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul; em que foram testados diferentes tipos de tecidos coletados, distintos períodos de armazenamento destes tecidos e diferentes formas de maceração e solubilização inicial de membranas.

Os tecidos foram compostos por: 1) folhas armazenadas por 21 meses; 2) folhas armazenadas por 10 meses; 3) câmbios coletados e armazenados por 10 meses em solução de cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 2% (p/v); e 4) câmbios armazenados por 10 meses em solução de CTAB a 2% (p/v) acrescida de 0,2% de β -mercaptoetanol, visando reduzir a possível oxidação fenólica.

As folhas foram coletadas diretamente das árvores e, logo após, receberam uma assepsia realizada com algodão hidrófilo, visando retirar a poeira existente sobre o material sendo, então, acondicionadas em sacos plásticos. Estes foram fechados procurando-se retirar o ar existente em seu interior e, em seguida, o material foi armazenado em gelo até a chegada ao Laboratório (aproximadamente 5 horas). O material foi mantido congelado em freezer (-20°C) até a realização das extrações.

Os câmbios foram coletados com auxílio de um cortador cilíndrico metálico (cortador de couro) com diâmetro de 1,5 cm. Primeiramente, na região do tronco onde seria retirada a amostra, realizou-se uma assepsia prévia com algodão embebido em etanol a 70% (v/v). O cortador foi introduzido no tronco das árvores e, após, com auxílio de uma pinça, a estrutura cambial foi retirada do interior do cortador metálico. Realizou-se uma secção, com auxílio de bisturi, na região mediana dos câmbios e ambas as partes foram introduzidas em tubos de microcentrífuga com capacidade para 2 ml, contendo 1 ml de tampão de extração 2 X CTAB (2% de CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA, pH 8,00; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,00; 1% de PVP-40). Quando foi utilizado o β -mercaptoetanol, visando reduzir possíveis agentes oxidantes, este foi introduzido a 0,2% (v/v) na solução de CTAB. Após a introdução dos câmbios na solução, estes foram mantidos em gelo até a chegada ao Laboratório (aproximadamente 2 horas), onde permaneceram em freezer (-20°C) até o momento das extrações.

Além das diferentes formas de armazenamento dos tecidos e dos diferentes materiais utilizados, também foram testadas algumas variações na etapa inicial de extração, ou seja, na solubilização dos tecidos. Para tanto, as folhas (600 mg) foram inicialmente maceradas em Gral com o auxílio de um pilão e da adição de nitrogênio líquido (-196°C), visando obter um macerado homogêneo e, em consequência, um melhor rompimento das paredes celulares. Foi testada a introdução, com o auxílio de uma espátula, do macerado em tubos de microcentrífuga com capacidade para 2 ml, aos quais foi acondicionado material até a marca de 1,2 ml. Alternativamente, em outras amostras foliares, o material vegetal foi mantido no Gral sendo acrescido o tampão de extração, realizando-se a homogeneização e, recuperando-se, com micropipeta, 1,2 ml, que foram transferidos para os tubos de reação.

Nas folhas maceradas e inseridas nos tubos de precipitação foram acrescidos 700 μl do tampão de extração CTAB, ao qual foram adicionados 5% de β -mercaptoetanol (este antioxidante também foi adicionado na maceração em Gral). O tampão CTAB foi utilizado na mesma formulação citada para o armazenamento dos câmbios, porém, utilizando-se o detergente catiônico concentrado a 2 ou a 10% (p/v). Nas folhas maceradas no Gral, foi acrescido o CTAB nas concentrações testadas de 2 e 10% no volume de 2 ml. No entanto, quando maceradas em cadinho, as folhas em que se utilizou CTAB a 10% (p/v) receberam 1 ml adicional da solução a 2%, visto que o tampão de extração a 10% é muito denso.

Para a maceração dos câmbios, três estruturas (aproximadamente 1.200 mg) foram introduzidos ao Gral juntamente com a solução em que se encontravam armazenadas. Foram acrescidos mais 2 ml da solução de CTAB a 2% (p/v) ou, então, a 10% (p/v). Os câmbios foram macerados por 15 minutos. Após, 1,2 ml do macerado (principalmente a fase aquosa) foi inserido em tubos de microcentrífuga com capacidade para 2 ml.

Deve-se salientar que, em todos estes procedimentos iniciais, o tampão de extração foi mantido em banho-maria a 65°C , no intuito de reduzir sua viscosidade e facilitar a homogeneização do material, além de auxiliar na aceleração do processo de solubilização das membranas celulares. A síntese das condições testadas na extração de DNA encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições testadas no estabelecimento de protocolo para a extração de DNA genômico em *E. involucrata* DC. Diferentes formas órgãos, formas de armazenamento e condições de solubilização dos tecidos. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

Tratamento	Órgão	Armazenamento	Solubilização	CTAB
1	Folhas	21 meses a -20 °C	Tubos de microcentrífuga	2%
2				10%
3			Cadinho	2%
4				10%
5	Folhas	10 meses a -20 °C	Tubos de microcentrífuga	2%
6				10%
7			Cadinho	2%
8				10%
9	Câmbio	10 meses a -20 °C, em CTAB 2%	Cadinho	2%
10				10%
11	Câmbio	10 meses a -20 °C, em CTAB 2% + 0,2% de β -mercaptoetanol	Cadinho	2%
12				10%

A partir desta etapa, o restante da extração, com pequenas modificações, seguiu o procedimento descrito por ZUCCHI (2002), desenvolvido para *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae), com base nos protocolos de Murray; Thompson (1980) e Rogers; Bendich (1985).

O macerado, juntamente com o tampão de extração, foi mantido em banho-maria a 65 °C por 60 minutos sendo, a cada 15 minutos, homogeneizado com o auxílio de um vórtex. Após, o material foi retirado do banho-maria e acrescentaram-se 700 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico - CIA (24:1). Os tubos foram homogeneizados por inversões durante 1 minuto e, então, foram centrifugados em microcentrífuga *eppendorf* por 15 minutos a 14.000 rpm. Depois da centrifugação, foram recuperados 700 μ l do sobrenadante, o qual foi transferido para novos tubos *eppendorf* de 1,5 ml. Adicionaram-se, sobre o sobrenadante, 520 μ l de isopropanol gelado. O material foi misturado por inversão, cuidadosamente, e armazenado em freezer (-20 °C) *overnight*.

No dia seguinte, o DNA foi precipitado por centrifugação a 10.000 rpm durante por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, cuidadosamente, para não ocasionar a perda do *pellet* de ácidos nucleicos, e adicionou-se 1 ml de solução de lavagem (etanol a 76% e acetado de amônio a 10 mM) por 30 minutos. O material foi misturado por inversão branda dos tubos. Novamente, foi realizada uma centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi descartada e secaram-se os *pellets* em estufa a 37°C por, aproximadamente, 40 minutos ou até se observar a ausência de soluções líquidas no tubo. Os *pellets* foram ressuspensos em 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,00; 1 mM de EDTA, pH 8,00) e mantidos *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, acrescentaram-se 50 µl da solução de acetato de amônio a 7,5 M misturando-se o conteúdo por inversão. Adicionaram-se 375 µl de etanol absoluto gelado invertendo-se diversas vezes os tubos de forma cuidadosa, para a limpeza do material. Os ácidos nucleicos foram recuperados por centrifugação a 10.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentaram-se 500 µl de etanol a 70% (v/v) durante 20 minutos para a lavagem dos *pellets* e exclusão de resíduos de acetato de amônio. Esta lavagem em etanol foi repetida por mais uma vez. Os *pellets* foram mantidos em estufa a 37°C por 40 minutos.

Os ácidos nucleicos foram eluídos em 50 µl de água ultrapura (Milli-Q) e, então, foram acrescidos 2 µl de RNase (a 10 mg ml⁻¹) mantendo-se o material em banho-maria a 37°C por 30 minutos. As soluções de DNA foram mantidas em freezer (a -20°C) até a sua utilização.

Para avaliar as diferenças na eficiência dos métodos utilizados, foi realizada a quantificação do material por meio de eletroforese em gel horizontal de agarose a 1% (p/v). Utilizou-se, para a confecção do gel e para a corrida eletroforética, o tampão TBE 1X (Tris base; ácido bórico, EDTA a 0,5 M, pH 8,00). Para a corrida eletroforética foram utilizados 5 µl de DNA *template* misturados a 3 µl do tampão de carregamento azul de bromofenol (azul de bromofenol a 0,025%; glicerol a 30%; tampão TE q.s.p.). As amostras foram dispensadas nos poços em gel submerso, ao lado de concentrações de DNA conhecidas, obtidas por meio de diluições do DNA do fago λ a 25, 50, 75, 100, 150 e 200 ng. A eletroforese foi realizada a 3 V/cm durante 40 minutos. Para a coloração do DNA, foram adicionados ao tampão na cuba de eletroforese 25 µl de brometo de etídeo a 10 mg ml⁻¹. O gel foi visualizado

em transluminador ultravioleta (UV) e documentado através de aparato fotográfico. Todo o procedimento foi repetido duas vezes.

Os melhores resultados obtidos para tecidos foliares e câmbio foram repetidos, novamente, em um grupo maior de amostras para confirmar a confiabilidade do método. Após a repetição da extração, a quantificação foi realizada pelo mesmo procedimento descrito anteriormente.

Para avaliar a capacidade de amplificação das amostras através de reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram testados oito *primers* RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso). Os *primers* estão listados na Tabela 10. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC-100, em um volume total de 25 µl, contendo: 10 mM de Tris-HCl pH 8,3; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 mM de dNTPs; 0,25 µM de *primer* (Operon Technologies®); 5,0 ng de DNA *template*; 1 unidade de Taq DNA Polimerase e água ultrapura q.s.p.

Tabela 10 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação de DNA de *E. involucrata* DC. por meio da técnica de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Santa Maria, RS, UFSM, 2010

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')
OPA - 01	CAGGCCCTTC
OPA - 02	TGCCGAGCTG
OPA - 03	AGTCAGCCAC
OPA - 04	GGAAGTCGCC
OPA - 11	CAATCGCCGT
OPA - 13	CAGCACCCAC
OPA - 19	CAAACGTCGG
OPM	GAAACACCCC

A amplificação foi composta por 48 ciclos, sendo: 92°C por 30 segundos; 37°C por 1 minuto e 30 segundos; e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Antecedendo

o ciclo, foi realizada uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos e, após, uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel horizontal de agarose a 1,5% (p/v). A corrida eletroforética foi realizada a 3,5 V/cm durante 180 minutos. O gel foi carregado com 18 µl de amostra, sendo 15 µl de produtos da PCR e 3 µl de tampão de carregamento. Utilizou-se os marcadores de peso molecular 1 kb e 100 bp (Invitrogen®). A coloração das bandas e a fotodocumentação foram realizadas conforme descrito anteriormente.

8.5 Resultados e Discussão

Conforme se observa na Figura 22, foi possível realizar a extração a partir de tecidos foliares armazenados em freezer, em ambos os períodos testados. A análise do gel resultante evidenciou que a melhor forma de extração se dá pela maceração dos tecidos em nitrogênio líquido com inclusão do tampão de extração direto no Gral, possivelmente por melhorar a homogeneização do material. Da mesma forma, a extração só foi possível ao utilizar-se o tampão CTAB com concentração de 10%. Visualmente, por meio da comparação com as concentrações conhecidas de DNA, foi possível inferir que a média de DNA extraído dos tecidos foliares, armazenados por 21 meses, foi entre 75 e 100 ng µl⁻¹, enquanto em folhas armazenadas por 10 meses estes valores foram entre 150 e 200 ng µl⁻¹.

O CTAB é um detergente catiônico utilizado na solubilização das membranas celulares, o qual permite, dependendo da concentração de NaCl (cloreto de sódio) utilizada em conjunto, a precipitação seletiva de diferentes componentes durante as demais fases da extração (MAZZA; BITTENCOURT, 2000). Portanto, pode-se inferir que o aumento na concentração do CTAB favoreceu a solubilização das membranas e, conseqüentemente, aumentou o rendimento da extração. Na extração de DNA a partir de madeira processada, visando estudos forenses de identificação de espécies, também é necessário o aumento da concentração do CTAB, sendo recomendado 3% (ASIF; CANNON, 2005). Este fator corrobora com a afirmativa de que maiores concentrações de CTAB favorecem a extração em material parcialmente degradado, todavia, em cerejeira foi necessário o aumento nesta concentração para melhorar a extração em material, *a priori*, menos degradado do que madeira processada.

Também foi possível obter amostras de DNA genômico a partir da extração de câmbios, as quais apresentaram menor rendimento, sendo este próximo a ou inferior a $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Porém, este conteúdo também pode ser considerado satisfatório, pois análises moleculares baseadas em PCR necessitam de pequenas quantidades de DNA molde. Por exemplo, para uma reação de marcadores RAPD, são necessárias quantidades de DNA entre 2 e 20 ng (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A melhor forma de extração de DNA a partir de câmbios ocorreu com o uso de CTAB tanto a 2% como a 10% (p/v), sem a inclusão do β -mercaptoetanol no armazenamento dos tecidos. De acordo com Romano (1998), para evitar a ação de compostos fenólicos é frequente o uso do β -mercaptoetanol, entretanto, em concentrações elevadas, este agente pode melhorar a qualidade do DNA extraído, mas reduzir o seu rendimento. Portanto, acredita-se que, por esta razão, não foi tão satisfatória a extração a partir de câmbios armazenados em CTAB na presença deste antioxidante.

Embora durante o armazenamento o β -mercaptoetanol não tenha sido utilizado em concentração elevada, é possível inferir que o excessivo tempo de contato com os tecidos (10 meses) tenha tido ação degradante sobre o DNA, afetando o rendimento durante o processo de extração.

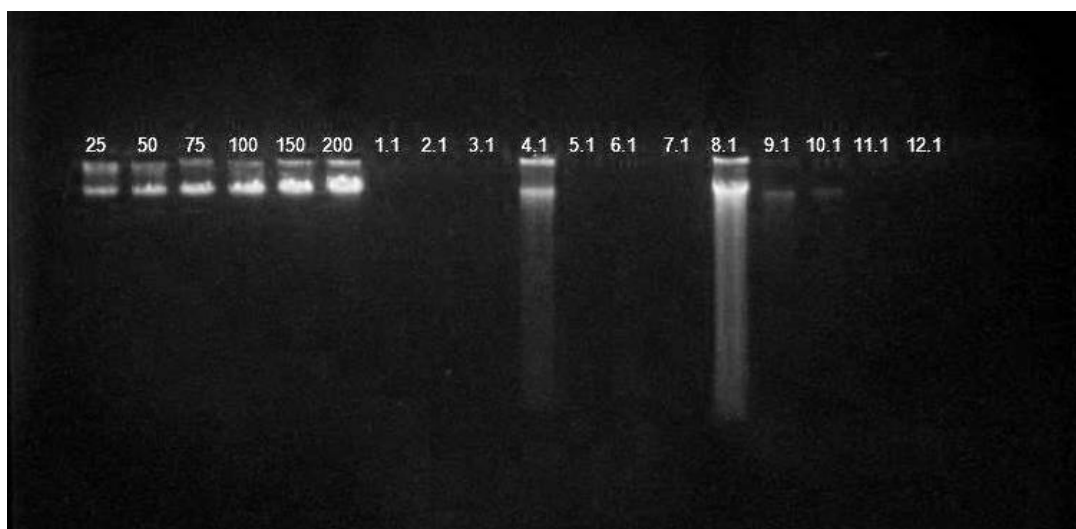


Figura 22 – Quantificação de DNA genômico de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Os números de 1.1 a 12.1 referem-se aos tratamentos, conforme descrito na Tabela 1. O número após o ponto indica que a imagem refere-se à primeira repetição do experimento. Os números de 25 a 200 indicam as concentrações de DNA conhecidas ($25, 50, 75, 100, 150$ e $200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) de fago λ . Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A Figura 23 comprova a qualidade do DNA extraído em amostras de folhas e câmbios por meio dos métodos que apresentaram os melhores resultados, conforme descrito anteriormente. Para os câmbios, foi utilizada a extração com CTAB a 10%, apesar do procedimento utilizando este detergente catiônico a 2% também ter viabilizado a extração.

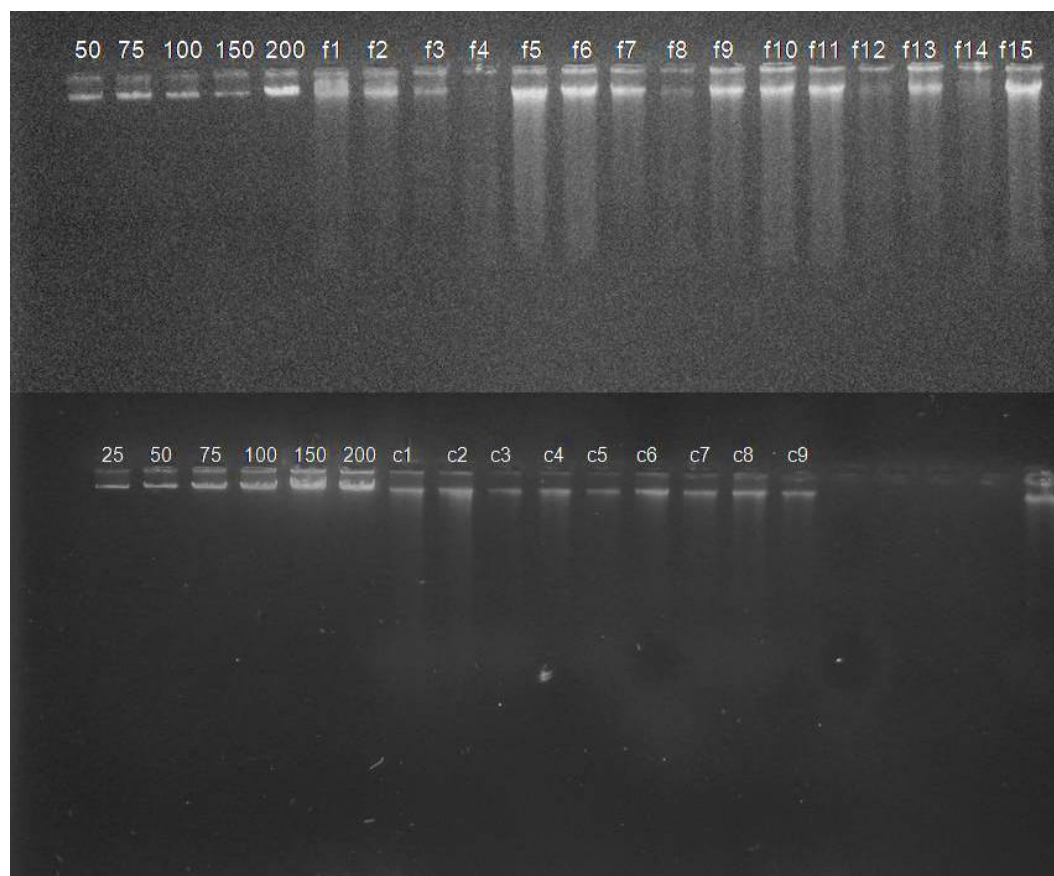


Figura 23 – Quantificação de DNA de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). As amostras de f1 a f4 são oriundas de DNA extraído de folhas armazenadas por 21 meses; amostras de f5 a f15 são de DNA extraído de folhas armazenadas por 10 meses; e as amostras c1 a c9 são de tecidos cambiais. As diferentes massas dos padrões de DNA conhecidos (fago λ , em $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) encontram-se numeradas nos primeiros poços do gel. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Na maior parte das amostras de DNA extraídas de tecidos foliares, independente do tempo de armazenamento, obtiveram-se quantidades entre 150 e 200 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. Portanto, pode-se recomendar a utilização do método CTAB, não havendo a necessidade de *kits* de extração, os quais aumentam os custos deste procedimento. Diferente dos resultados obtidos em cerejeira, na espécie arbórea *Kielmeyera lathrophyton* não foi possível a extração de DNA de tecidos foliares

pelo método CTAB, sendo necessário o emprego de um *kit* fornecido por empresa da área molecular (FERES et al., 2005).

Nas extrações a partir de câmbios obtiveram-se entre 25 e 50 ng μl^{-1} de DNA genômico, faixa de concentração adequada para a realização de análises com marcadores moleculares baseados em PCR. Deve-se considerar, adicionalmente, que a extração de material por meio de amostras cambiais é uma excelente alternativa para espécies que atingem altura significativa em seu ambiente natural, dificultando a coleta de folhas.

Amostras de casca e câmbio não mostraram bom rendimento na identificação de árvores geneticamente transformadas de *Populus tremula* x *P. tremuloides*, mas, quando armazenados em freezer ou coletados em forma de material fresco, é possível realizar a extração e demais análises necessárias (FLADUNG et al., 2004). Este resultado é díspar as observações em cerejeira, onde se obteve extrações com qualidade satisfatória tanto a partir de folhas como a partir de câmbios.

Para a avaliação da variabilidade em cpDNA na espécie florestal *Manilkara huberi*, também foi possível utilizar DNA extraído de amostras de folhas e câmbio (AZEVEDO et al., 2008), ratificando a importância de protocolos de extração otimizados de diferentes tecidos para a aplicação em análises moleculares.

Ocorreu o anelamento das amostras com todos os oito *primers* RAPD testados, evidenciando a qualidade do método utilizado para a extração. Na Figura 24 podem ser visualizados os produtos de amplificação do *primer* OPM, usando-se como DNA *template* soluções extraídas a partir de folhas. Na Figura 25 encontram-se os produtos de amplificação do *primer* OPA 02, em que o DNA usado nas reações foi oriundo do isolamento a partir de câmbios.

Todas as amostras foliares permitiram a amplificação com os oito *primers*, o que demonstra a robustez do método descrito neste trabalho para a extração de DNA genômico de cerejeira. No entanto, embora a maior parte das amostras de DNA extraído de câmbios tenha amplificado, em algumas não foi possível realizar a reação de PCR, provavelmente pela presença de agentes contaminantes que não foram adequadamente removidos da solução de DNA, em que poderiam se destacar os componentes fenólicos, os quais, muitas vezes, são responsáveis pela degradação das amostras (ROMANO, 1998).

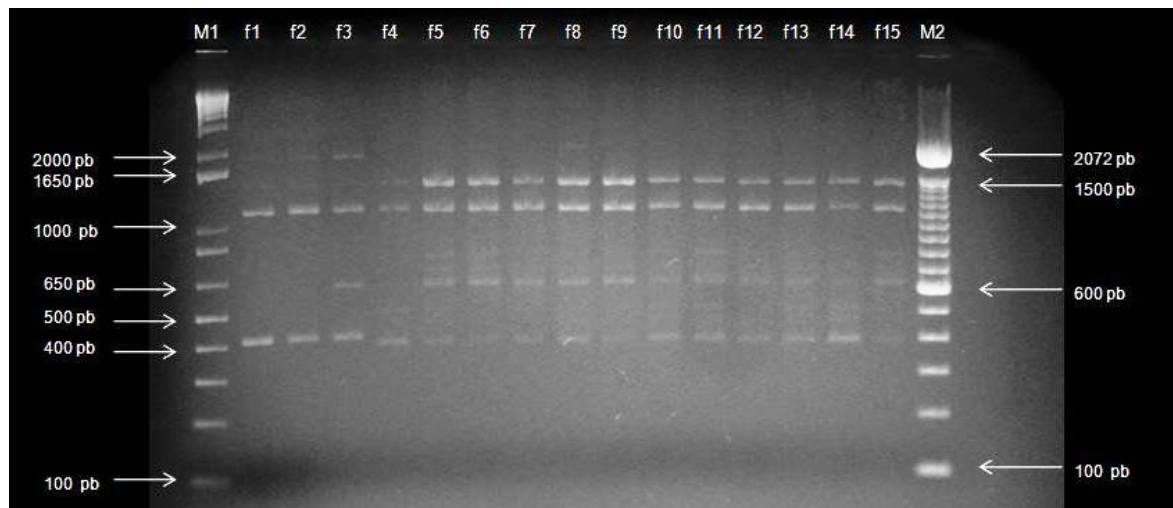


Figura 24 – Produtos da PCR por meio da técnica de RAPD em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). As amostras f1 a f4 referem-se a DNA extraído de folhas armazenadas por 21 meses; as amostras f5 a f15 são oriundas de DNA extraído de folhas armazenadas por 10 meses. M1= 1 kb ladder, M2= 100 pb ladder. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

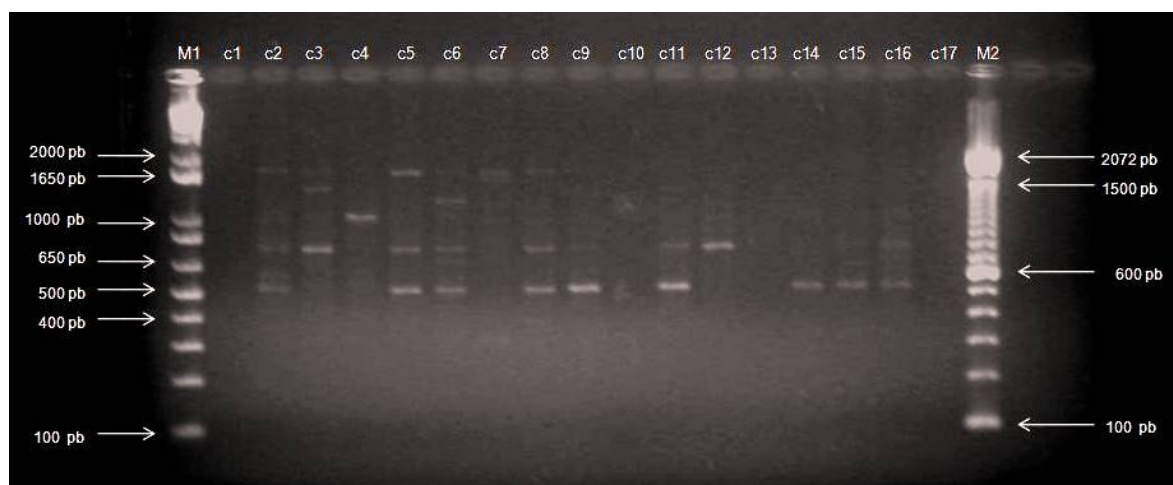


Figura 25 – Produtos da PCR por meio da técnica de RAPD em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). As amostras c1 a c17 referem-se a DNA extraído de câmbios armazenados por 10 meses em solução de CTAB a 2%, sem a presença de β -mercaptoetanol no armazenamento. M1= 1 kb ladder, M2= 100 pb ladder. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

8.6 Conclusões

- É possível extrair DNA genômico a partir de tecidos foliares e cambiais de *Eugenia involucrata* DC., com qualidade e quantidade adequadas ao uso em reações em cadeia da polimerase (PCR)
- Pode-se realizar a extração de DNA genômico em cerejeira a partir de tecidos foliares armazenados por até 21 meses.
- A quantidade de DNA genômico isolado em folhas de cerejeira é inversamente proporcional ao tempo de armazenamento.
- Em tecidos foliares, a melhor solubilização das membranas ocorre com a maceração em Gral com CTAB a 10%.
- Tecidos cambiais devem ser armazenados em CTAB a 2% na ausência de β -mercaptoetanol.
- O rendimento de DNA é maior na extração a partir de folhas.
- O DNA genômico de cerejeira isolado a partir do procedimento descrito neste trabalho apresenta qualidade suficiente para ser utilizado em análises moleculares com marcadores RAPD.

9 CAPÍTULO VII

DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS *IN SITU* E *EX SITU* DE *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE) POR MEIO DE MARCADORES RAPD

9.1 Resumo

Eugenia involucrata DC. é uma espécie florestal brasileira com grande potencial econômico. Porém, inexiste informações acerca da distribuição da sua variabilidade genética, conhecimento fundamental para o planejamento de um programa de melhoramento genético. Este trabalho objetivou avaliar o uso de marcadores RAPD em análises genéticas e estimar a variabilidade existente em diferentes acessos de *E. involucrata*. Foram amostradas três populações *in situ*, localizadas em Frederico Westphalen e em Santa Maria, e duas *ex situ*, em Pelotas, todas no Estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizados oito *primers* RAPD para acessar a variabilidade genética da espécie. Todos os *primers* geraram bandas polimórficas e permitiram a construção de um dendrograma em que foi possível visualizar três principais grupos com diferentes níveis de variabilidade genética. Há maior variabilidade nos acessos mantidos *in situ*, e a variabilidade genética está distribuída nestas populações. Acessos mantidos *ex situ* apresentam baixa variabilidade.

Palavras-chave: variabilidade genética, melhoramento florestal, *bulks*

GENETIC DIVERSITY *IN SITU* AND *EX SITU* ACCESSIONS OF *Eugenia involucrata* DC. (MYRTACEAE) BY RAPD MARKERS

9.2 Abstract

Eugenia involucrata DC. is a Brazilian tree species with economic potential. However, there is no information about the distribution of its genetic variability, fundamental knowledge for the planning of a breeding program. This study aimed to evaluate the use of markers in genetic analysis and estimate the variability in different accessions of *E. involucrata*. We sampled three *in situ* populations, located in Frederico Westphalen and Santa Maria, and two *ex situ*, in Pelotas, all in Rio Grande do Sul State. Were used eight RAPD primers to assess the genetic variability. All primers generated polymorphic bands and allowed the construction of a dendrogram in which it was possible to see three principal groups with different levels of genetic variability. There is greater genetic variability in accessions maintained *in situ* and genetic variability is distributed in these populations. The accessions conserved *ex situ* have low variability.

Key-words: genetic variability, forest improvement, bulks

9.3 Introdução

Muitas espécies com potencial econômico não são exploradas pela carência existente no conhecimento de sua variabilidade genética. *Eugenia involucrata* DC. é uma Myrtaceae nativa do Brasil com potencial em silvicultura e fruticultura, entre outros ramos econômicos (LORENZI, 1992, CARVALHO, 2008), a qual pode ser incluída neste contexto.

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética de uma espécie pode possibilitar o desenvolvimento de bancos de germoplasma representativos, os quais são essenciais para o pré-melhoramento e posterior desenvolvimento de germoplasma melhorado. Os marcadores moleculares podem auxiliar nesse processo (PEREIRA et al., 2009). Além disso, informações de natureza genética de espécies florestais nativas são escassas na literatura, provavelmente em função da

complexidade e da diversidade que esses indivíduos apresentam (SANTANA et al., 2008).

Marcadores moleculares são ferramentas importantes na análise da diversidade em espécies florestais, como é possível se observar em *Sorbus terminalis* (BELLETI et al., 2008), *Mangifera indica* (RAJWANA et al., 2008), *Cedrus libani* (SEMAAN; DODD, 2008), bem como em suas correspondentes nativas brasileiras, como *Xylopia brasiliensis* (PINTO; CARVALHO, 2004), *Enterolobium contortisiliquum* (SANTANA et al., 2008), entre outras.

Dentre os marcadores moleculares utilizados em análises genéticas estão os marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso). Tais marcadores possuem diversas vantagens em relação aos demais, como dispensar conhecimento prévio de sequências do genoma das espécies (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e não utilizar sondas radioativas (ZUCCHI, 2002). Outras vantagens dos marcadores RAPD residem na sua facilidade de utilização, rapidez na obtenção de dados, aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo e custo reduzido. As bases moleculares destes marcadores estão ligadas à revelação de polimorfismos devido a mutações de ponto em seus sítios de pareamento ou, então, inserções e deleções que podem ocorrer entre os dois sítios que flanqueiam a região que será amplificada (CAIXETA et al., 2009).

Muitas vezes, no entanto, os grupos de plantas a serem avaliados são extremamente grandes, o que requer um número elevado de análises e, conseqüentemente, o aumento dos custos. Uma forma de agilizar as análises quando se deseja conhecer a variabilidade da espécie é a utilização de *bulks*, os quais são compostos por conjuntos de amostras vegetais (folhas, sementes, câmbios, diluições de DNA) diminuindo a quantidade de processamentos, minimizando custos e viabilizando a caracterização de diversos acessos (BRESOLIN et al., 2007).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de uso de *primers* RAPD em acessar a variabilidade genética em *bulks* de acessos de cerejeira; bem como avaliar a diversidade genética existente entre acessos (mantidos *ex situ*) e indivíduos em populações naturais (conservados *in situ*), como fontes de germoplasma representativo da espécie.

9.4 Material e Métodos

Para avaliar a variabilidade genética em *E. involucrata* DC., foi coletado material vegetal em cinco populações, sendo três *in situ* (uma em Frederico Westphalen, RS; e duas em Santa Maria, RS) e duas *ex situ*, composta pelos acessos e pelo banco de *seedlings* de cerejeira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa em Agricultura de Clima Temperado (EMBRAPA/CPACT), localizado em Pelotas, RS.

Em todos os indivíduos amostrados realizou-se o referenciamento geográfico com o auxílio de um equipamento GPS - Sistema de Posicionamento Global (Garmin GPSMAP 96C®). As plantas foram identificadas com fita de marcação e numeradas na própria fita com caneta de retroprojeter, visando auxiliar na localização dessas matrizes caso necessário.

Em Frederico Westphalen (RS) as coletas foram realizadas na Vila Faguense, local amplamente antropizado em que ocorreu a conservação de alguns fragmentos florestais; e também no fragmento florestal localizado no Centro de Ensino Superior do Norte do RS (CESNORS/UFSM). Foram coletadas amostras foliares as quais passaram, primeiramente, por um processo de higienização com algodão hidrófilo. Após, foram inseridas em sacos plásticos vedados hermeticamente e, em seguida, mantidas em gelo até a chegada ao Laboratório, onde foram conservadas em freezer (a -20° C) até o momento da extração do DNA genômico. O município de Frederico Westphalen está localizado, geograficamente ao norte do RS, a 27°21'25" de latitude e 53°22'27" de longitude, em uma altura de 566 metros em relação ao nível do mar.

No Banco Ativo de Germoplasma da EMBRAPA/CPACT foram coletadas amostras de todos os nove acessos existentes, oriundos do plantio de sementes doadas pela Associação Brasileira dos Fumicultores (AFUBRA), cuja sede é Santa Cruz do Sul, RS. No banco de *seedlings*, proveniente de sementes dos acessos descritos anteriormente e de doações de pessoas da região de Pelotas, foi realizada uma amostragem sistematizada, sendo coletadas folhas em um a cada cinco indivíduos da linha de plantio. O armazenamento das folhas foi realizado seguindo-se o mesmo procedimento já descrito para as folhas coletadas em Frederico Westphalen. A cidade de Pelotas está localizada ao sul do Estado do RS, a

31°46'19" de latitude e 52°20'33" de longitude, sendo sua altura em relação ao nível do mar de 17 metros.

Nas áreas do Centro de Instruções Militares do Exército (CISM) e da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - Unidade Florestas (FEPAGRO/FLORESTAS), localizadas em Santa Maria, RS, as coletas foram aleatórias. Santa Maria encontra-se no centro do Estado do RS, a 29°41'03" de latitude e 53°48'25" de longitude, estando a 95 metros de altitude em relação ao nível do mar. Nestes indivíduos foram retiradas amostras cambiais com o auxílio de um objeto cilíndrico metálico (cortador de couro) com diâmetro de 1,5 cm. Antes da introdução do cortador, realizou-se uma assepsia no tronco da árvore com algodão hidrófilo e etanol a 70%. O câmbio foi seccionado em duas partes e introduzido em um tubo de reação de 2 ml, contendo 1 ml de tampão de extração (2% de CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA, pH 8,00; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,00; 1% de PVP-40). Na sequência, os tubos foram armazenados em gelo até a chegada no Laboratório, onde foram conservados em freezer (a -20°C) até o momento do isolamento do DNA genômico.

Para as análises, foram constituídos *bulks* com as amostras dos indivíduos das populações; estes foram compostos por três indivíduos, dos quais foi retirada uma alíquota igual de massa fresca de tecido vegetal para a extração de DNA genômico. Para a confecção dos *bulks*, foram utilizadas as árvores que estavam amostradas na sequência, dentro de um mesmo raio de até 60 m. Árvores que estavam a mais de 100 m de distância foram amostradas em *bulks* separados. Quando em um raio de 60 m havia mais de três árvores, foram compostos *bulks* adicionais; entretanto, quando o exemplar estava isolado dos demais pela distância, e não havendo três árvores, constituiu-se um *bulk* com dois indivíduos ou, ainda, optou-se pela amostragem individual. No entanto, este tipo de situação teve reduzida ocorrência (Tabela 11). As amostras de DNA genômico receberam denominações conforme a população de origem, sendo: FW (Frederico Westphalen), EA (Acessos da EMBRAPA/CPACT), BS (Banco de *Seedlings* da EMBRAPA/CPACT), C (CISM) e F (FEPAGRO). A composição dos *bulks* formados em relação ao número de indivíduos amostrados pode ser visualizada na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição dos *bulks* constituídos a partir do agrupamento dos indivíduos amostrados nas populações, os quais foram utilizados nas análises moleculares em *E. involucrata* DC. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

População	Bulk	Número de Indivíduos no Bulk
Frederico Westphalen	FW1	2
Frederico Westphalen	FW2	3
Frederico Westphalen	FW3	3
Frederico Westphalen	FW4	3
Acessos Embrapa	EA1	3
Acessos Embrapa	EA2	3
Acessos Embrapa	EA3	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS1	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS2	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS3	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS4	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS5	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS6	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS7	3
Banco de <i>Seedlings</i> Embrapa	BS8	3
CISM	C3	3
CISM	C4	3
CISM	C5	3
CISM	C6	3
CISM	C8	1
FEPAGRO	F1	3
FEPAGRO	F2	3
FEPAGRO	F4	3
FEPAGRO	F5	1
FEPAGRO	F7	3
FEPAGRO	F8	2
FEPAGRO	F9	3
Total	27	75

Para a extração de DNA genômico dos tecidos utilizou-se o método descrito por ZUCCHI (2002), baseado nas metodologias de Murray; Thompson (1980) e Rogers; Bendich (1985), com algumas modificações, especialmente na fase inicial de maceração dos tecidos e homogeneização na presença do tampão de extração.

As amostras foliares (600 mg) foram, inicialmente, maceradas em Gral com o auxílio de nitrogênio líquido (-196°C). Em seguida, foram acrescentados 2 ml de tampão de extração (10% de CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA, pH 8,00; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,00; 1% de PVP-40), previamente aquecido a 65°C, ao qual foram adicionados 5% de β -mercaptoetanol. Após uma homogeneização inicial, acresceu-se 1 ml de tampão de extração (2% de CTAB; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA, pH 8,00; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,00; 1% de PVP-40) em menor concentração, também contendo 5% de β -mercaptoetanol. Na sequência, foram transferidos 1,2 ml do macerado homogeneizado no tampão para um tubo de reação tipo eppendorf com capacidade para 2 ml.

Para os câmbios, 1.200 g, juntamente com o tampão de extração em que estavam armazenados, foram acondicionados em cadinho, sendo adicionados 2 ml do tampão de extração a 10%. Os câmbios foram macerados por, aproximadamente, 15 minutos. Após, foram transferidos 1,2 ml do macerado (principalmente a parte líquida) para um tubo de reação com capacidade para 2 ml.

A metodologia de extração foi similar para ambos os tipos de amostra (folhas e câmbios). O macerado, na presença do tampão de extração, foi mantido em banho-maria a 65°C por 60 minutos, recebendo agitações periódicas em vórtex, a cada 15 minutos. Após ser retirado do banho-maria, foram acrescentados à solução 700 µl de clorofórmio: álcool isoamílico – CIA (24:1). O material foi misturado por inversões do tubo durante 1 minuto sendo, em seguida, centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação foram recuperados 700 µl do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos de reação com capacidade para 1,5 ml. A estes, adicionaram-se 520 µl de isopropanol gelado, sendo, a seguir, o material mantido em freezer a -20°C *overnight*.

No dia seguinte, o DNA foi precipitado por centrifugação durante 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não ocasionar a perda do *pellet* de ácidos nucleicos. Adicionou-se ao *pellet* 1 ml de solução de lavagem (etanol a 76% e acetato de amônio a 10 mM) por 30 minutos. O material foi misturado, cuidadosamente, por inversão dos tubos. Novamente, foi realizada uma centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi descartada e os *pellets* foram secos em estufa a 37°C por 40 minutos ou até se observar a ausência de soluções líquidas no tubo. Os *pellets* foram ressuspensos em 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,00; 1 mM de EDTA, pH 8,00) e mantidos *overnight* a 4°C.

Na sequência, acrescentaram-se 50 µl de solução de acetato de amônio a 7,5 M, misturando-se o conteúdo por inversão para que se unisse aos ácidos nucleicos. Adicionaram-se 375 µl de etanol absoluto gelado, invertendo-se diversas vezes os tubos de forma cuidadosa, para a limpeza do material. Os ácidos nucleicos foram recuperados por centrifugação a 10.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentaram-se 500 µl de etanol a 70% (v/v) durante 20 minutos para a lavagem dos *pellets* e exclusão de resíduos de acetato de amônio. Esta lavagem em etanol foi repetida por mais uma vez. Os *pellets* foram mantidos em estufa a 37°C para secagem por 40 minutos.

Os *pellets* foram ressuspensos em 50 µl de água ultrapura. Acrescentaram-se 2 µl de RNase (a 10 mg ml⁻¹), sendo o material mantido em banho-maria a 37°C por 30 minutos. As soluções de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C até a sua utilização.

A quantificação foi realizada por meio de eletroforese em gel horizontal de agarose a 1% (p/v). Na confecção do gel e como tampão de corrida utilizou-se o TBE 1X (Tris base; ácido bórico; EDTA a 0,5 M, pH 8,00). Na corrida eletroforética, foram utilizados 5 µl de DNA *template*, misturado com 3 µl do tampão de carregamento azul de bromofenol (azul de bromofenol a 0,25%; glicerol a 30%; tampão TE q.s.p.). As amostras foram dispensadas nos poços em gel submerso, ao lado de concentrações de DNA conhecidas, obtidas por meio de diluições do DNA do fago λ (Invitrogen®) a 25, 50, 75, 100, 150 e 200 ng. A eletroforese foi realizada a 3 V/cm durante 40 minutos. Para a coloração do DNA adicionaram-se, ao tampão, 25 µl de brometo de etídeo a 10 mg ml⁻¹. O gel foi visualizado em transluminador ultravioleta (UV) e documentado por meio de equipamento fotográfico. Todo o procedimento foi repetido duas vezes.

Para as reações de amplificação foram utilizados oito oligonucleotídeos iniciadores de amplificação – *primers* - RAPD. Os *primers*, listados na Tabela 12, foram selecionados em função dos resultados obtidos por Zucchi (2002) com *Eugenia dysenterica*. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC-100, em um volume total de 25 µl, contendo: 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 mM de dNTPs; 0,25 µM de *primer* (Operon Technologies®); 5,0 ng de DNA *template*; 1 unidade de Taq DNA Polimerase; e água ultrapura q.s.p.

Tabela 12 – Sequências de bases dos *primers* utilizados na amplificação de DNA de *E. involucreta* DC., visando a análise da variabilidade de indivíduos, mantidos *in situ* e *ex situ*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

<i>Primers</i>	Seqüência (5' - 3')
OPA - 01	CAGGCCCTTC
OPA - 02	TGCCGAGCTG
OPA - 03	AGTCAGCCAC
OPA - 04	GGAAGTCGCC
OPA - 11	CAATCGCCGT
OPA - 13	CAGCACCCAC
OPA - 19	CAAACGTCGG
OPM	GAAACACCCC

A amplificação foi realizada durante 48 ciclos, sendo: 92°C por 30 segundos; 37°C por 1 minuto e 30 segundos; e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Antecedendo o ciclo, foi realizada uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, após, uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel horizontal de agarose a 1,5% (p/v). A corrida eletroforética foi realizada a 3,5 V/cm durante 180 minutos. O gel foi carregado com 18 µl de amostra, sendo 15 µl de produtos da PCR e 3 µl de tampão de carregamento. Utilizaram-se os marcadores de peso molecular 1 kb e 100 bp (Invitrogen®). A coloração das bandas e a fotodocumentação foi realizada conforme descrito anteriormente.

A partir da leitura dos géis, foi confeccionada uma matriz binária na qual os *bulks* foram genotipados quanto à presença (1) ou ausência (0) de bandas no gel. Foi calculada a porcentagem de polimorfismo gerado por cada um dos *primers* utilizados, utilizando-se a expressão:

$$P = \frac{nbp}{nbt}$$

Em que:

P = porcentagem (taxa) de polimorfismos;

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

A partir da matriz de dados, foi calculado o coeficiente de similaridade de Jaccard entre todos os *bulks*, conforme a expressão:

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

Em que:

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

b = número de casos em que ocorre a presença somente no indivíduo i ;

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

Com as estimativas dos coeficientes de similaridade de Jaccard foi constituído um dendrograma pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas - UPGMA (ROHLF, 2001). A consistência do dendrograma foi testada pela correlação cofenética, cuja significância foi testada pelo teste de Mantel com 1.000 permutações aleatórias.

9.5 Resultados e Discussão

Ocorreu amplificação de sequências de DNA com os oito *primers* testados neste trabalho, indicando que todos podem ser utilizados em análises moleculares na espécie *Eugenia involucrata* DC. Os *primers* geraram 60 bandas que permitiram a construção da matriz binária para as análises subsequentes. O índice de polimorfismos variou de 66,67%, a 100%, conforme se pode observar na Tabela 13.

Tabela 13 – Padrão de polimorfismos observados por meio de marcadores RAPD, conforme os primers utilizados nas análises moleculares em *Eugenia involucrata* DC. Santa Maria, RS, UFSM, 2010

<i>Primer</i>	Número de bandas observadas	Número de bandas polimórficas	Porcentagem de polimorfismos
OPA 01	06	04	66,67
OPA 02	07	07	100,00
OPA 03	05	04	80,00
OPA 04	06	05	83,33
OPA 11	08	08	100,00
OPA 13	10	10	100,00
OPA 19	10	10	100,00
OPM	08	08	100,00
Total	60	56	
Média	7,5	7	93,33.

Houve, portanto, a transferibilidade de primers entre duas espécies do mesmo gênero, uma vez que os decâmeros foram empregados com sucesso, inicialmente, em *Eugenia dysenterica* (ZUCCHI et al., 2005). Além disso, em *E. involucrata*, os primers geraram mais marcas e maiores porcentagens de polimorfismo que em *E. dysenterica*. Desta forma, foi possível realizar as análises de RAPD partindo-se de um número menor de primers do que aquele comumente testado em outros trabalhos, em que dezenas de kits são avaliados sendo, posteriormente, selecionados poucos iniciadores. SANTANA et al. (2008), analisando populações de *Enterolobium contortisiliquum* obtiveram 71 produtos de amplificação utilizando 20 primers, número este bastante reduzido comparado aos resultados obtidos em cerejeira com apenas 8 oligonucleotídeos iniciadores.

Os padrões de bandas observados nos géis podem ser visualizados nas Figuras 26 e 27. Na Figura 26 encontram-se amostras dos bulks das populações de Frederico Westphalen, Acessos da Embrapa e Banco de Seedlings, mostrando os padrões de bandas obtidas com o primer OPM; na Figura 27 podem-se observar os padrões de bandas gerados com o primer OPA 02 nas populações da FEPAGRO e CISM.

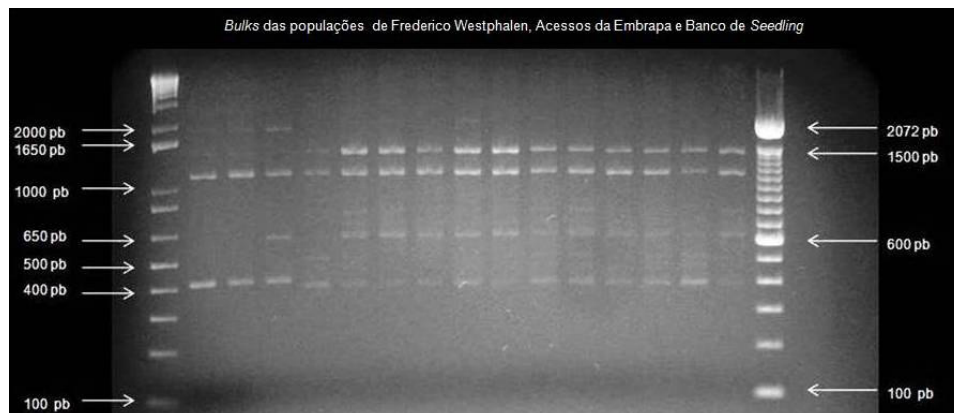


Figura 26 – Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), utilizando-se o *primer* OPM em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Na imagem, observam-se as amostras dos *bulks* de indivíduos de populações *in situ* de Frederico Westphalen, RS; e de populações *ex situ* da Embrapa/Cpact, Pelotas, RS. A primeira coluna à esquerda = 1 kb *ladder*, última coluna à direita = 100 pb *ladder*. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.



Figura 27 – Padrões de bandas obtidas por meio dos produtos da PCR, a partir da técnica de polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), utilizando-se o *primer* OPA 02 em *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Na imagem, observam-se as amostras dos *bulks* de indivíduos de populações *in situ* do CISM e FEPAGRO, em Santa Maria, RS. A 1ª coluna à esquerda = 1 kb *ladder*, última coluna à direita = 100 pb *ladder*. Santa Maria, RS, UFSM, 2009.

O elevado polimorfismo observado foi além das expectativas, considerando-se que a espécie é classificada como autógama (CARVALHO, 2008). Nesta categoria de espécies vegetais a variabilidade genética esperada distribui-se entre populações, havendo maior uniformidade entre indivíduos dentro de uma dada

população; fato este não observado, já que as análises evidenciaram boa distribuição da variabilidade genética, em que, muitas vezes, acessos de populações distantes foram mais similares do que aqueles de populações próximas.

Avaliando-se o dendrograma (Figura 28) gerado a partir das estimativas de similaridade de Jaccard, pode-se observar a formação de três principais grupos distintos. A correlação cofenética confirmou a consistência do dendrograma produzido, sendo obtido um valor de $r = 0,95291$. A análise do dendrograma foi efetuada com base na similaridade de aproximadamente 0,50; objetivando a melhor visualização da formação dos grupos.

O primeiro grupo, formado por *bulks* de populações naturais da FEPAGRO (F2, F7, F8 e F9), além de C4 e C8, é o de maior dissimilaridade, apesar da proximidade dos locais onde se desenvolvem na região de Santa Maria, RS.

O agrupamento intermediário em relação à dissimilaridade é constituído pelos demais *bulks* da FEPAGRO (F1, F4 e F5), do CISM (C5, C3 e C6) e de Frederico Westphalen (FW1 a FW4). Analisando-se os subgrupos dentro deste agrupamento, por procedência, F1 e F4 são muito similares, divergindo consideravelmente de F5. Igualmente, FW1 e FW2 são semelhantes, apresentando razoável dissimilaridade do *bulk* FW4 e tendo FW3 dissimilaridade intermediária. C3 e C5 são mais similares entre si que em relação à C6. Contudo, F1 e F4 compartilham maior similaridade com C5 do que com F5; FW1, FW2 e FW3 com F5 do que com FW4; e C3 com FW4 do que com C5. Isso demonstra que a variabilidade genética está distribuída entre as populações onde os indivíduos foram amostrados, independente do fluxo gênico, já que a distância entre as populações de Frederico Westphalen e aquelas da FEPAGRO e do CISM é de, aproximadamente, 290 km, enquanto que entre as populações do CISM e da FEPAGRO é de cerca de 13 km e os *bulks* de Frederico Westphalen foram coletados em populações que distam, no máximo, 1,3 Km.

A distância mínima entre matrizes recomendada para a coleta de sementes de populações florestais, visando manter a variabilidade genética, é de 50 a 100 m (KAGEYAMA; GANDARA, 1999). No presente trabalho, no entanto, populações com distâncias superiores a essas apresentaram alguns *bulks* muito similares; em contraposição, amostras de uma mesma população ou de *bulks* mais próximos foram, muitas vezes, mais dissimilares. FW4 e EA2, por exemplo, têm estimativa de similaridade de 0,59; C4 e C5, por sua vez, de 0,18. Essas observações apontam a necessidade de estudos adicionais para auxiliar a elucidar os mecanismos

responsáveis pela distribuição da variabilidade genética observada, bem como para confirmar a prevalência da autogamia como modo de reprodução de *E. involucrata* DC. Além disso, confirmam a necessidade do conhecimento da distribuição da variabilidade genética existente nas populações para uma melhor coleta de material visando à conservação da espécie, permitindo não apenas o início de um programa de melhoramento, mas a obtenção de lotes de sementes com representatividade satisfatória.

A maioria dos *bulks* das populações naturais apresentou relações de similaridade inferiores ou, no máximo, igual a 0,5, denotando a existência de razoável variabilidade genética entre os indivíduos. OLIVEIRA et al. (2007) também relataram a ocorrência de diferenças expressivas entre acessos de uma mesma população de *Euterpe oleraceae*. Os indivíduos mantidos *in situ* apresentaram maior diversidade genética e, em consequência, são mais adequados para trabalhos de pré-melhoramento em cerejeira.

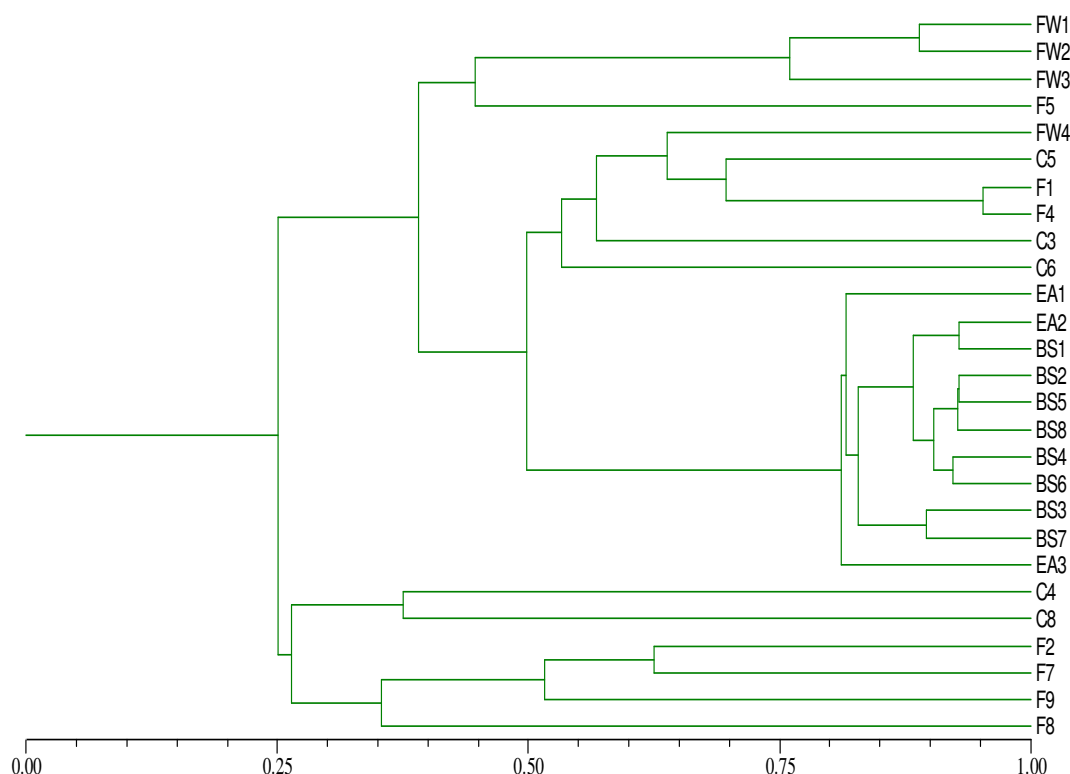


Figura 28 – Dendrograma elaborado a partir de estimativas de similaridade genética (índice de Jaccard), definido pelo critério de agrupamento UPGMA, de diferentes *bulks* de acessos de *E. involucrata* DC. As siglas representam as populações de coleta sendo: Frederico Westphalen (FW), Fepagro (F), CISM (C), Acessos da Embrapa (EA), e Banco de *Seedlings* da Embrapa (BS). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

O terceiro agrupamento, o mais uniforme e o de maior similaridade genética, é composto pelos Acessos e Banco de *Seedlings* conservados *ex situ*. Esta descoberta é muito desfavorável tendo-se em vista que a função de um banco de germoplasma é manter uma coleção o mais variável possível. Os Acessos da Embrapa são em número de nove plantas apenas, cujas sementes originaram a maior parte do Banco de *Seedlings*, o que pode explicar a reduzida diversidade genética observada. Por outro lado, em uma coleção de germoplasma de *Euterpe oleraceae*, Oliveira *et al.* (2008) observaram, por meio de marcadores RAPD e microssatélites, a existência de variabilidade genética satisfatória. Estes autores apontaram que coleções compostas por número pequeno de plantas podem ter pouca variabilidade, o que corrobora a hipótese elaborada para cerejeira.

Considerada a reduzida similaridade entre os Acessos da Embrapa e o Banco de *Seedlings*, em relação às populações mantidas *in situ*, todos os locais amostrados neste trabalho poderiam servir para a coleta de sementes e/ou de propágulos, objetivando a ampliação da variabilidade genética e a implantação de uma coleção de germoplasma mais representativa da diversidade genética existente em *Eugenia involucrata*.

Face ao exposto, as informações geradas podem ser de grande importância para a implantação de bancos de germoplasma, conhecimento da variabilidade genética para futuros cruzamentos, conservação de recursos genéticos e manejo ambiental. Estudos adicionais devem ser realizados, avaliando-se a estrutura genética das populações, visando ampliar a obtenção de variabilidade para programas de melhoramento e conservação.

9.6 Conclusões

- Os *primers* RAPD OPA 01, OPA 02, OPA 03, OPA 04, OPA 11, OPA 13, OPA 19 e OPM geram grande número de bandas polimórficas em *Eugenia involucrata* e podem ser utilizados para análises genéticas.
- Os acessos *in situ* de *Eugenia involucrata* DC. possuem maior diversidade genética que aqueles mantidos *ex situ*.
- A diversidade genética está distribuída entre as populações naturais de *Eugenia involucrata* DC.

10 CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho forneceu embasamento científico significativo para a propagação *in vitro*, e auxiliará o desenvolvimento de tecnologias de base biotecnológica e de trabalhos de pré-melhoramento e de melhoramento genético em *Eugenia involucrata* DC.

Foi possível multiplicar plantas *in vitro*, e os conhecimentos gerados possibilitarão a propagação da espécie por esta via. Além disso, obtiveram-se resultados satisfatórios de desenvolvimento *in vitro*, como, por exemplo, enraizamento, um importante gargalo na cultura de tecidos em espécies florestais.

O cultivo de calos forneceu informações substanciais sobre os balanços adequados de fitorreguladores e as características físicas necessárias para o desenvolvimento *in vitro* dos explantes. Igualmente, permitiu avaliar aspectos organogênicos, desencadeados via organogênese indireta, e a formação de calos putativos à embriogênese somática.

A análise da diversidade genética permitiu a obtenção de informações, acerca da distribuição da variabilidade genética em populações naturais e sintéticas, de suma importância para o pré-melhoramento, para a conservação de germoplasma, bem como para o planejamento de um programa de melhoramento genético de *E. involucrata* DC.

REFERÊNCIAS GERAIS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617 - 631, 2008.

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, p. 1 - 18, 2001.

AHMAD, N.; ANIS, M. Rapid clonal multiplication of a woody tree, *Vitex negundo* L. through axillary shoots proliferation. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 71, n. 3, p. 195 - 200, November, 2007.

AMIRATO, P.V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: BHOJWANI, S.S. (Ed.) **Plant tissue culture and its agricultural applications**. Cambridge: University press, 1986. p. 23 - 45.

ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174 - 180, jan./mar. 2000.

ANIS, M.; VARSHNEY, A.; SIDDIQUE, I. *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 78, n. 2, p. 151 - 158, February, 2010.

ASIF, M.J.; CANNON, C.H. DNA extraction from processed Wood: a case study for the identification of the endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 23, n. 2, p. 185 - 192, June 2005.

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

AZAD, M.A.K. et al. *In vitro* regeneration of the medicinal woody plant *Phellodendron amurense* Rupr. through excised leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 43 - 50, January 2005.

AZEVEDO, V.C.R. et al. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 859 - 867, jul. 2008.

BACKES, A.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Porto Alegre: Pallotti, 2002. p. 275.

BAQUE, M.A.; HANN, E.J.; PAEK, K.Y. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 46, n.1, p. 71 – 80, February, 2010.

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**, Pelotas, v. 20, n. 1, p. 184 - 188, 1998.

BARBIERI, R.L. et al. **Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa/Cpact, 2005. 27 p. (Documento, n. 143).

BARROS, A.M. et al. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 899 - 909, setembro, 2005.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 55 - 81.

BELLETTI, P.; MONTELEONE, I.; FERRAZINI, D. A population genetic study in a scattered Forest species, wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Crantz], using RAPD markers. **European Journal of Forest Research**, Freising, v. 127, n. 2, p. 103 - 114, March 2008.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York and London: Plenum Press, 1985. 367 p.

BOSELA, M.J. Effects of β -lactam antibiotics, auxins, and cytokinins on shoot regeneration from callus cultures of two hybrid aspens, *Populus tremuloides* x *P. tremula* and *P. x canescens* x *P. gradidentata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 249 - 261, September 2009.

BRESOLIN, A.P.S.; CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C. **Bulks de DNA na caracterização de germoplasma vegetal**. Pelotas: Embrapa/Cpact, 2007. 28 p. (Documentos, n. 218).

CAIXETA, E.T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. p. 11 - 93.

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

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

CONDE, P. et al. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. **Plant cell, tissue and organ culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 113 - 119, January 2008.

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

CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A.M. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, n. 6, p. 525 - 533, November/December 2006.

CORTIZO, M. et al. Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.) **Trees – structure and function**, Darmstadt, v. 23, n. 4, p. 835 - 842, August 2009.

DALAL, N.V.; RAI, V.R. *In vitro* propagation of *Oroxylum indicum* Vent. A medicinally important forest tree. **Journal of Forest Research**, Tokyo, v. 9, n. 1, p. 61 - 65, February 2004.

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

DHAWAN, V.; SAXENA, S. Cloning forestry species. In: SRIVASTAVA, P.S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Eds.). **Plant biotechnology and molecular markers**. New Delhi: Anamaya publishers, 2004. p. 183 - 194.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiment in plant tissue culture**. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 1995. 256 p.

FAISAL, M.; AHMAD, N.; ANIS, M. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 187 - 190, February 2005.

FERES, F. et al. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de Savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 277 - 283, abr./jun. 2005.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2000. p. 255 - 258.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 21 - 43.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el analisis genético**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 221 p.

FETT NETO, A.G. et al. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globules*. **Tree physiology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 457 - 464, May 2001.

FINKELDEY, R.; LEINEMANN, L.; GALILING, O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 35, n.5, p. 1251 – 1258, February 2010.

FLADUNG, M. et al. Identification of transgenes from Wood of genetically transformed poplar trees. **Wood science and technology**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 207 - 215, June 2004.

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

GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p. 316 - 321, May/June 2003.

_____. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 45, n. 1, p. 72 - 82, February 2009.

GOMEZ, M.P.; SEGURA, J. Morphogenesis in leaf and single-cell cultures of mature *Juniperus oxycedrus*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 16, n. 8, p. 681 - 686, August 1996.

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

GUO, W. *et al.* Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, p. 343 - 351, 2006.

HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 15 - 53.

HU, Z. *et al.* Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 52, n. 1, p. 93 - 96, March 2008.

HUSAIN, M.K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 31, n. 4, p. 765 - 772, July 2009.

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, U.S.A.: Academic Press, 1997. p. 227 - 238.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777 p.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, n. 3, p. 261 - 265, March 2003.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. Restauração, conservação genética e produção de sementes. In: Simpósio mata ciliar: ciência e tecnologia, 1999. Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. p. 59 - 68.

KAMENICKA, A.; LANAKOVA, M. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of magnolia *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 22, n. 2, p. 129 - 134, June 2000.

KORBAN, S.S.; CHEN, H. Apple. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Eds.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p. 203 - 227.

LANDA, F.S.L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56 - 63, dez. 2000. Edição especial.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197 - 217, October 1981.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604 - 607, dez. 2002.

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

LIU, X.; PIJUT, P.M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, n. 2, p. 113 - 123, August 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Washington, v. 30, p. 327 - 421, 1981.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

MA, X.Y.; YI, G.J.; HUANG, X.L. Leaf callus induction and suspension culture establishment in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Huaizhi. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 31, n. 2, p. 401 - 405, March 2009.

MACHADO, M.P.; CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxertos de macieira “marubakaio” em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 5, n. 1 - 2, p. 69 - 72, 2004.

MALLIKARJUNA, K.; RAJENDRUDU, G. High frequency *in vitro* propagation of *Holarrhena antidysenterica* from nodal buds of mature tree. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 51, n. 3, p. 525 - 529, September 2007.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 83 - 105.

MAZZA, M.C.M.; BITTENCOURT, J.V.M. Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 41, p. 12 - 17, jul./dez. 2000.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p. 17 - 28.

MONTEUUIS, O. *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 1, p. 102 - 107, January/February 2004.

MURALIDHARAN, E.M.; KALLARACKAL, J. Current trends in Forest tree biotechnology. In: SRIVASTAVA, P.S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Eds.). **Plant Biotechnology and Molecular Markers**. New Delhi: Anamaya publishers, 2004. p. 169 - 182.

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

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 1134 - 1137, October, 1980.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture – a toll in biotechnology**: basics and application. Berlin: Springer Verlang, 2009. 333 p.

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

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

NUNES, E.C. et al. *In vitro* cultures of *Cedrella fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue Ande Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 1, p. 259 - 268, September 2002.

OLIVEIRA, D.A. et al. Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do Estado de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 355 - 363, 2008.

OLIVEIRA, M.S.P. et al. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 438 - 443, junho 2008.

OLIVEIRA, M.S.P. et al. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1645 - 1653, nov./dez. 2007.

PARANJOTHY, K. et al. Clonal multiplication of woody perennials. In: BHOJWANI, S.S. **Plant tissue culture**: applications and limitations. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 190 - 219.

PAROUL, N. et al. Avaliação da composição química do óleo volátil de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30., 2007. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2007. p. 1-1.

PASQUALI, G.; ZANETTINI, M.H.B. Transgênese florestal. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotechnologia florestal**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p. 317 - 334.

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p. 76 - 92.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; COSTA, F.R.C. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. p. 103 - 128.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PINTO, G. et al. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 38, n. 6, p. 569 - 572, November/December 2002.

PINTO, S.I.C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista brasileira de botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 597 - 605, jul./set. 2004.

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

RACHMAYANTI, Y. et al. Extraction, amplification and characterization of Wood DNA from Dipterocarpaceae. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 45 - 55, March 2006.

RAHARJO, S.H.T.; LITZ, R.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, n. 2 - 3, p. 113 - 119, May 2007.

RAJAWANA, I.A. et al. Assessment of genetic diversity among mango (*Mangifera indica* L.) genotypes using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 297 - 301, July 2008.

RAMOS, M.F.S. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 58 - 66, 2006.

RATHORE, J.S. et al. Micropropagation of Woody Plants. In: SRIVASTAVA, P.S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Eds.). **Plant biotechnology and molecular markers**. New Delhi: Anamaya publishers, 2004. p. 195 - 205.

REGO, G.M.; LAVORANTI, O.J.; NETO, A.A. **Monitoramento dos estádios fenológicos reprodutivos da cerejeira-do-mato**. Colombo: Embrapa/Cnpf, 2006. 5 p. (Comunicado Técnico, n. 171).

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento. 1988. 525 p.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de espécies perenes. In: NASS, L.L. et al. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 356 - 421.

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. 800 p.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102 - 123, jan./fev. 2001.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 69 – 76, 1985.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC**: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 1989. 210 p.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargem, 1998. p. 163 - 189.

ROY, A.T.; KOUTOULIS, A.; DE, D.N. Cell suspension culture and plant regeneration in the latex-producing plant, *Calotropis gigantean* (Linn.) R. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 15 - 22, October 2000.

RUBESTEIN, K.D. et al. **Crop genetic resources**: na economic appraisal. Washington: USDA, 2005. 41 p.

SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V.M. Técnica molecular para la detección de variantes somaclonales. **Agronomía Mesoamericana**, Costa Rica, v. 20, n. 1, p. 135 - 151, 2009.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: FEPLAN, 1989. 304 p.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 13, p. 28 - 32, 2000.

SANTANA, G.C. et al. Diversidade genética de *enterolobium contorsiliquum* (Vell.) Morong. no baixo Rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 427 - 433, Maio/Junho 2008.

SANTANA, G.C. et al. Diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. no baixo Rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 427 - 433, 2008.

SANTOS, B.R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510 - 514, mai/jun, 2005.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Fatos e números do Brasil florestal**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2007. 109 p.

SEMAAN, M.T.; DODD, R.S. Genetic variability and structure of the remnant natural populations of *Cedrus libani* (Pinaceae) of Lebanon. **Tree Genetics and Genome**, Heidelberg, v. 4, n. 4, p. 757 - 766, October 2008.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 25 - 74.

SHAIK, N.M. et al. Improved method of *in vitro* refeneration in *Leucaena leucocephala* – a leguminous pulpwood tree species. **Physiology and Molecular Biology Plants**, Lucknow, v. 15, n. 4, p. 311 - 318, October 2009.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511 - 518, April 2000.

SHIRIN, F.; RANA, P.K. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown callus in *Bambusa glaucescens* Willd. **Plant Biotechnology Reports**, Tokyo, v. 1, n. 3, p. 141 - 147, August 2007.

SIDDIQUE, I.; ANIS, M. Direct plant regeneration from nodal explants of *Balanites aegyptiaca* L. (Del.): a valuable medicinal tree. **New Forests**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 53 - 62, January 2009.

_____. *In vitro* shoot multiplication and plantlet regeneration from nodal explants of *Cassia angustifolia* (Vahl.): a medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 29, n. 3, p. 223 - 238, June 2007.

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, p. 213 - 221, 2003.

SILVA, C.V.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 86 - 92, 2005.

SILVA, S. **Frutas Brasil frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 1991. 166 p.

SORIN, C. et al. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require argonaute1w. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 17, n. 5, p. 1343 - 1359, May 2005.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167 - 178, 2003.

SUJATHA, K.; HAZRA, S. Micropropagation of mature *Pongamia pinnata* Pierre. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 608 - 613, December 2007.

SUN, Y. et al. Adventitious bud regeneration from leaf explants of *Platanus occidentalis* L. and genetic stability assessment. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 31, n. 1, p. 33 - 41, January 2009.

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

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p.

TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its applications to future forests. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 439 - 446, October 1998.

VENGADESAN, G. et al. *In vitro* propagation of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. From nodal segments of a 10-year-old tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, n. 4, p. 409 - 414, July 2003.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 4, p. 507 - 511, 2004.

VILLA, F. et al. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1754 - 1759, Nov./dez. 2008.

WALIA, N.; KAUR, A.; BABBAR, S.B. An efficient, in vitro cyclic production of shoots from adult trees of *Crataeva nurvala* Bauch. Ham. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 3, p. 277 - 284, March 2007.

WANG, H.M. et al. Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 50, n. 4, p. 725 - 728, December 2006.

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. p. 1 - 13.

WEBSTER, S.A. et al. Somatic embryogenesis from leaf and zygotic embryo explants of *Blighia sapida* "cheese" ackee. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, n. 5, p. 467 - 472, September/October, 2006.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531 - 6535, 1990.

WU, S.; ZU, Y.; WU, M. High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 33 - 43, December 2003.

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. p. 55 - 74.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272 p.

YANAKA, F.Y. et al. Variabilidade genética em populações naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com base em isoenzimas e marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 1897 - 1904, nov./dez. 2005.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 148 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M.I. et al. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 975 - 980, out. 2005.