

ALIRIO COROMOTO DABOIN MALDONADO

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA GABIROBEIRA (*Campomanesia* spp.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Doutorado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Berildo de Melo

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

ALIRIO COROMOTO DABOIN MALDONADO

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA GABIROBEIRA (*Campomanesia* spp.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Doutorado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 04 de junho de 2014.

Prof. Dr. Nei Peixoto	UEG
Prof. Dr. Pedro Henrique Ferreira Tomé	IFTM
Prof. Dr. Benjamim de Melo	UFU
Prof. Dr. Maurício Martins	UFU

Prof. Dr. Berildo de Melo
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lorenzo e Lucia, com amor.

À meus filhos, Patrícia, Vladimir e Amanda, como exemplo.

À meu amor Alda Romana Nunes, pela dedicação e estímulo.

Ao progresso da Ciência e pela preservação do Cerrado Brasileiro.

AGRADECIMENTOS

À Deus meu guia espiritual.

Ao meu amigo, irmão Prof. Dr. Reginaldo de Camargo, por ser um grande estimulador desta vitória.

À minha grande companheira Alda Romana Nunes, que com sua paciência e determinação colaborou para esta vitória.

Ao meu orientador do doutorado Prof. Dr. Berildo de Melo, que com seu conhecimento soube conduzir com paciência e dedicação possibilitando a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Lorenzo e Lucia, que me guiaram pelo caminho do estudo e dedicaram parte do seu tempo para minha educação.

À minha Irmã Luz Marina e família pela compreensão em relação à doença de minha mãe, durante meus estudos.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram com estes resultados, em especial à professora Denise Santana.

Aos meus colegas Larissa, João Paulo, Reinaldo e outros que me ajudaram no processo educativo para vencer as dificuldades.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Agronomia.

Aos meus familiares e amigos, colegas, pelo carinho, companheirismo e compreensão para mim nesta etapa muito importante de minha vida.

Aos membros da banca, pelas valiosas contribuições na revisão final da TESE.

A todos que de uma forma ou de outra possibilitaram a conclusão deste objetivo.

A todos meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL	5
2.1 Importância da gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) no bioma cerrado.....	5
2.2 Características botânicas da gabirobeira	7
2.3 Propagação de frutíferas nativas.....	12
2.3.1 Propagação sexuada da gabiropa (<i>Campomanesia</i> spp.)	13
2.3.2 Propagação assexuada da gabirobeira	16
2.4 Cultura de tecidos de frutíferas do cerrado	16
2.4.1 A micropropagação <i>in vitro</i> de frutíferas nativas	19
2.4.2 Germinação <i>in vitro</i>	20
2.5 Contaminação microbiana na micropropagação de frutíferas nativas.....	21
2.6 Oxidação fenólica na micropropagação de frutíferas nativas	22
2.6.1 Estratégias práticas para o manejo da oxidação <i>in vitro</i>	23
REFERÊNCIAS	25
CAPITULO 2 : Controle da contaminação na germinação <i>in vitro</i> da Semente de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.)	
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	33
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Avaliação aos dez dias.....	42
4.2 Avaliação aos 30 dias.....	46
5 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
 CAPITULO 3 : Utilização de antioxidantes no controle da oxidação na micropropagação de segmentos nodais de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) obtidos de plântulas de sementes germinadas <i>in vitro</i>	
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1 INTRODUÇÃO	56
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	57
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
 CAPITULO 4 : Desenvolvimento da plântula de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) na germinação <i>in vitro</i> da semente em meio MS com BAP	
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
1 INTRODUÇÃO	69
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	71
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
 CAPITULO 5 : Brotação de explantes obtidos na germinação <i>in vitro</i> de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) em diversas combinações de meio MS com BAP	
RESUMO.....	86
ABSTRACT.....	87

1 INTRODUÇÃO	88
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	90
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
5 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98
CONSIDERAÇÕES GERAIS	101

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
1	Estágios de desenvolvimento da plântula de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg. (Myrtaceae). Fonte: Acta bot. bras. 24(3): 613-623. 2010.	8
2	Exposição da gabirobeira no cerrado da Fazenda Água Limpa. Uberlândia-MG. 2011.	9
3	Exposição da folha e do fruto da gabirobeira, Uberlândia – MG. 2011.	9
4	Apresentação da flor de gabirobeira, Uberlândia- MG. 2011.	10
5	Apresentação do fruto de gabirobeira colhido na Fazenda Água Limpa/UFU, Uberlândia-MG. 2011.	11
6	Semente extraída do fruto da gabirobeira para os ensaios, Uberlândia-MG. 2011.	11
7	Extração da semente do fruto de gabirobeira colhido para os experimentos, Uberlândia-MG. 2011.	12
8	Muda da gabirobeira desenvolvida na casa de vegetação da Fazenda Água Limpa/UFU, Uberlândia- MG. 2012.	15
9	Germinação <i>in vitro</i> da semente de gabirobeira em função das concentrações de hipoclorito de sódio (%) durante dez dias. Uberlândia-MG. 2012.	43
10	Contaminação <i>in vitro</i> das sementes de gabiropa aos 10 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG. 2012.	43
11	Germinação <i>in vitro</i> das sementes de gabiropa aos 10 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG.2012.	44
12	Germinação das sementes de gabiropa aos 10 dias em função dos diferentes tempos de imersão na solução de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG.2012.	45
13	Germinação <i>in vitro</i> da semente de gabirobeira em 30 dias sobre efeito de hipoclorito de sódio, Uberlândia - MG. 2012.	47
14	Contaminação <i>in vitro</i> das sementes de gabiropa aos 30 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG. 2012.	47

15	Germinação <i>in vitro</i> das sementes de gabirola aos 30 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio Uberlândia-MG.2012.	48
16	Apresentação do experimento com antioxidantes na sala de crescimento, Uberlândia-MG. 2012.	60
17	Número de brotos do explante de segmentos nodais de gabirola em função dos tratamentos de antioxidantes. Uberlândia-MG. 2012.	62
18	Propagação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de gabirola utilizando-se carvão ativado como antioxidante. Uberlândia-MG. 2012.	63
19	Número de brotos da germinação <i>in vitro</i> das sementes de gabirola em função da concentração de hipoclorito de sódio (%), Uberlândia - MG. 2012.	78
20	Número de folhas das plântulas de gabirola em função da concentração de hipoclorito de sódio (%) Uberlândia - MG. 2012.	79
21	Altura das plântulas de gabirola em função da concentração de hipoclorito de sódio (%) Uberlândia - MG. 2012.	80
22	Apresentação de altura de plantas com aumento da concentração de hipoclorito de sódio. Uberlândia - MG. 2012.	80
23	Brotos (%) dos explantes de gabirola após inoculação em função das diferentes concentrações de BAP (mg L ⁻¹).Uberlândia-MG. 2012.	95
24	Brotação de explantes obtidos na germinação <i>in vitro</i> de gabirola em diversas combinações de meio MS com BAP. Uberlândia-MG. 2012.	96

LISTA DE TABELAS

		PÁGINA
1	Resumo das análises de variância para contaminação e germinação <i>in vitro</i> das sementes de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) em dez dias, obtidas sobre efeitos de diferentes concentrações de hipoclorito (%) em diversos tempos (min). Uberlândia-MG.2012.	42
2	Resumo das análises de variância para contaminação (%) e germinação (%) <i>in vitro</i> das sementes de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) em 30 dias, obtidas sobre efeitos de diferentes concentrações de hipoclorito (%) em diversos tempos de imersão (min). Uberlândia-MG. 2012.	46
3	Resumo das análises de variância para oxidação (%) e número de brotos de segmentos nodais de gabirobeira cultivados <i>in vitro</i> submetidos a diferentes meios de MS combinados com antioxidantes. Uberlândia- MG. 2012.	61
4	Porcentagem de oxidação (%) e número de brotos do explante de segmentos nodais de gabirobeira em função dos tratamentos de antioxidantes. Uberlândia-MG. 2012.	62
5	Resumo das análises de variância para número médio de brotos, folhas e altura da plântula (mm) obtidas no experimento aos 60 dias, sobre efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, em diversos tempos, na germinação <i>in vitro</i> da semente de gabirobeira (<i>Campomanesia</i> spp.) Uberlândia-MG.2012.	77
6	Resumo da análise de variância para brotos e oxidação <i>in vitro</i> de explantes de gabirobeira submetidos a diferentes concentrações de meio MS e BAP. Uberlândia-MG. 2012	94
7	Porcentagem de oxidação no explante da gabirobeira em função dos diferentes concentrações de meio MS. Uberlândia – MG. 2012.	96

RESUMO

MALDONADO, ALIRIO COROMOTO DABOIN. **Propagação *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.).** 2014. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia¹

A gabirobeira é uma frutífera do cerrado brasileiro que ganha destaque devido a sua importância social, econômica e comercial, sua preservação, contudo, está ameaçada pela expansão da fronteira agrícola e pelo extrativismo predatório. O presente trabalho teve como objetivo propor um protocolo que permita sua propagação *in vitro*. Foram efetuados diversos experimentos durante os anos de 2010 a 2013, usando frutos colhidos de vinte matrizes de gabirobeira selecionadas na Fazenda “Água Limpa” da Universidade Federal de Uberlândia - MG. No capítulo 1, foram compiladas informações teóricas e genéricas sobre a gabirobeira. No capítulo 2, foram analisados, os efeitos da desinfestação na germinação *in vitro* da semente com diversas concentrações de hipoclorito de sódio, associado ao álcool etílico (70%) e ao fungicida tiofanato metílico (1 g L⁻¹), o meio MS utilizado foi suplementado com 1,5% de sacarose e BAP (1 mg L⁻¹). A desinfestação proporcionou o estabelecimento da frutífera *in vitro*, aos 10 dias de crescimento ocorreu menor contaminação (4,80%), com maior germinação (94%) com o aumento na concentração de hipoclorito de sódio até 3,50%. Porém, aos 30 dias a desinfestação proporcionou 100% de germinação e nenhuma contaminação com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio até 3,33%. O capítulo 3, teve como objetivo avaliar diferentes antioxidantes na oxidação, durante a micropropagação de segmentos nodais de gabirobeira obtidos de plântulas de sementes germinadas *in vitro*. A oxidação (%) foi avaliada em 15 dias e o número de brotos em 30 dias, sendo obtidos os seguintes resultados: para a característica oxidação não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo o meio MS + PVP o menos oxidante. Já para o número de brotos ocorreu diferença significativa entre os tratamentos com substâncias antioxidantes e a presença ou ausência de luz, sendo que nos tratamentos a seguir: MS + PVP, MS + carvão ativado, MS + ácido ascórbico e MS no escuro, não houve diferença significativa. Portanto, os tratamentos que contêm PVP e carvão ativado no meio MS, apresentam-se como melhores alternativas para controlar a oxidação e gerar maior número de brotos dos explantes de gabirobeira na sua propagação *in vitro*. No capítulo 4 avaliou-se, aos 60 dias, o desenvolvimento da plântula de gabirobeira. Os dados coletados mostraram, o efeito da concentração de hipoclorito (3,60%) em sinergia com álcool, e fungicida, aliado a presença de BAP (1 mg L⁻¹) no meio MS, influenciaram positivamente o estabelecimento fisiológico das plântulas, com número médio de brotos, número de folhas e altura máxima das plantas obtidos (1,4; 5,52; 17,67 mm), independentemente do tempo de imersão. O capítulo 5, objetivou verificar o melhor meio de cultura MS nas diferentes combinações com BAP e escolher o explante com maior número de brotos, sem oxidação. Conforme os dados, conclui-se que a concentração de BAP a 0,5 mg L⁻¹ permitiu um maior crescimento e desenvolvimento dos brotos do explante de segmentos nodais, acima dessa concentração ocorreu oxidação do explante. O meio mais diluído MS 1/4 (25% do meio MS básico) foi mais eficaz para a propagação *in vitro* dos segmentos nodais de gabirobeira.

Palavras-chave: Germinação, *in vitro*, brotação, citocinina, antioxidantes, estabelecimento.

¹ Comitê Orientador: Berildo de Melo – UFU (Orientador)

ABSTRACT

MALDONADO, ALIRIO COROMOTO DABOIN. ***In vitro* propagation of gabirobeira (*Campomanesia* spp.)**. 2014.102 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnica) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia¹

Gabirobeira is a typical fruit from the Brazilian Savannah presenting social, economic and commercial importance; however, its preservation is threatened by the expansion of agriculture and by predatory extractivism. This study proposes a protocol for *in vitro* propagation of the species. Several experiments were done from 2010 to 2013, using fruits harvested from twenty selected gabirobeira shrubs on the farm “Água Limpa” at the Federal University Uberlândia - MG. In Chapter 1, theoretical and general information about the species were compiled. Chapter 2 presents the effects of seed disinfection on *in vitro* germination, comparing several concentrations of sodium hypochlorite, associated with ethanol (70%) and with the fungicide methyl thiophanate (1 g L^{-1}), in MS medium supplemented with 1.5% sucrose and BAP (1 mg L^{-1}). Seed disinfection allowed *in vitro* establishment of the fruit shrub and, after growth for 10 days the least contamination was observed (4.80%), with greatest germination (94%) after treatment with increasing concentrations of sodium hypochlorite, up to 3.50%. Thirty days after seeding in the medium 100% germination and no contamination were observed with sodium hypochlorite concentrations of up to 3.33%. Chapter 3 evaluates the effects of different anti-oxidants during micropropagation of nodal segments of gabirobeira obtained from seedlings germinated *in vitro*. Oxidation (%) was evaluated 15 days after transfer to the different media and the number of sprouts 15 days later. The following results were observed: There were no significant differences among the treatments for oxidation, and the medium MS + PVP was the least oxidant. Significant differences among the treatments with anti oxidant substances and lighting were observed for the number of sprouts, and the treatments MS + PVP, MS + activated charcoal, MS + ascorbic acid and MS in the dark were similar to each other. Therefore, treatments containing PVP and activated charcoal in MS medium are the best option to control oxidation and generate the greatest number of sprouts in gabirobeira explants for *in vitro* propagation. Chapter 4 evaluated, 60 days after *in vitro* introduction, gabirobeira seedling development. Collected data indicate that the effect of sodium hypochlorite (3.60%) in synergy with ethanol and fungicide, coupled to the presence of BAP (1 mg L^{-1}) in MS medium, positively affected the physiological establishment of the seedlings, as shown by the number of sprouts, leaves and seedling height (1.4, 5.52, and 17.67 mm, respectively), regardless of immersion time. Chapter 5, determined the best combination MS culture medium, in combination with BAP, to select the explant with the greatest number of sprouts, with no oxidation. According to the data, it can be concluded that BAP at 0.5 mg L^{-1} resulted in greater growth and sprout development in nodal segment explants, while greater concentrations of the hormone resulted in explant oxidation. Diluted MS medium to 1/4 (25% of the base MS medium) was more effective for *in vitro* propagation of gabirobeira nodal segments.

Key words: germination, *in vitro*, shoot, cytokinin, antioxidant, establishment.

¹ Supervising Committee: Berildo de Melo - UFU(Supervisor)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade é muito importante para a segurança alimentar, econômica e ecológica do planeta, pois dela depende a vida das gerações futuras. Por esse motivo, existe uma grande preocupação quanto à manutenção, avaliação e troca da diversidade genética em âmbito mundial (LEITE, 2005).

O cerrado detém 5% da biodiversidade do planeta, é considerado a savana mais rica do mundo, um dos biomas mais ameaçados do Brasil. Sua área original era de 204 milhões de hectares, no entanto já perdeu 47,84% de sua cobertura vegetal até 2008 (MMA, 2010).

Além de sua importância ambiental, o cerrado tornou-se capaz de gerar riquezas, contribuindo para a produção de alimentos, de fibras e de outros produtos, em quantidade e qualidade adequadas às necessidades e exigências do mercado, e de promover o desenvolvimento integrado e sustentável, garantindo qualidade de vida para a população (EMBRAPA, 2005).

Durante um longo período de tempo, o cerrado foi considerado uma região de pouco interesse econômico, de solos pobres, ácidos e sem fertilidade pelos agricultores brasileiros. Após a década de 60, e devido às pesquisas e tecnologias implementadas pela Empresa Brasileira de Agropecuária - EMBRAPA, a região dos cerrados foi transformada em um importante pólo de produção de alimentos do país. O cerrado produz hoje 25% da produção nacional de grãos alimentícios e possui 40% do rebanho bovino do Brasil. Grande parte dos agricultores não respeita a legislação ambiental, utiliza os recursos naturais do cerrado sem manejo ecológico.

Por isso, este ecossistema está sofrendo danos, provenientes da ação das queimadas, do extrativismo predatório e da agricultura industrial, colocando em risco a sobrevivência de diversas espécies de plantas, como as fruteiras nativas, mesmo antes de serem conhecidas pelos taxonomistas e pesquisadores. O interesse industrial pelas frutas do cerrado cresceu após os anos 40. A mangaba foi explorada durante a segunda guerra mundial para produção de látex. Há estudos da década de 70 que comprovam a possibilidade de o babaçu e a macaúba serem utilizados como biocombustíveis. O pequi

já é industrializado e seu óleo é comercializado. O palmito de guariroba, de sabor amargo, é comercializado à semelhança do palmito doce. Frutíferas como a mangaba, a cagaita, o araticum e a gabirobeira, mesmo sem serem domesticadas, vêm sendo utilizadas pela indústria do sorvete e picolés, de forma extrativista e predatória (AVIDOS; FERREIRA, 2003).

A vegetação do cerrado possui um grande número de famílias de frutíferas, com gêneros diversificados, cujas espécies têm frutos diversos, quanto à forma, tamanho e sabor. A industrialização e comercialização dos frutos como a gabiroba, o baru, o pequi, a cagaita, a mangaba, o caju-do-cerrado, o araticum, entre outras, são importantes para desenvolver um mercado que possa gerar renda e qualidade de vida às populações locais e, além disso, facilitar a exportação da matéria prima para outras regiões, mantendo-se a qualidade e a conservação do produto (NAVES, 1999).

A gabirobeira (*Campomanesia* spp.), também conhecida em algumas regiões como guavirova, guavira, guabiroba-miúda e guabiroba-do-mato, como frutífera do cerrado, apresenta potencial para a introdução ao cultivo comercial. Seus frutos são saborosos e ricos em vitamina C e Fe, sendo essa associação extremamente benéfica, visto que a presença da vitamina C melhora a absorção do ferro. O fruto pode ser consumido in natura, ou na forma de sucos, sorvetes, doces, geléias além de ser útil como matéria prima para fabricação de licores, sendo explorado comercialmente para produção de picolés e sorvetes. A casca e as folhas, preparadas em infusão, possuem efeitos terapêuticos, são adstringentes e usadas nos tratamentos gastrintestinais, ou dos males do trato urinário e apresentam grande importância na indústria farmacêutica (LIMA, 2004).

A gabirobeira (*Campomanesia* spp.) pode ser utilizada na arborização urbana e na recuperação de áreas degradadas. É considerada como uma espécie que possui boas perspectivas de produção comercial em função da sua grande densidade, frequência e distribuição no ambiente do cerrado. Tem facilidade de propagação natural por ser uma planta melífera, com boa quantidade de sementes distribuídas, precocidade no início da produção, extensão de período produtivo, alta variabilidade genética, e boa aceitação no mercado devido ao seu sabor aromático e adocicado. Porém, sua semente é considerada recalcitrante, a planta apresenta pouca tolerância a pragas e doenças e seus frutos possuem baixa resistência ao transporte e armazenamento depois da coleta (PEIXOTO, et al., 2005).

Por isso, é importante investir no trabalho de domesticação das fruteiras nativas do cerrado para que possam ser cultivadas e comercializadas. Conforme Junqueira et al., 2008, a domesticação consiste em um conjunto de processos, técnicas e ações realizadas de forma consciente ou inconsciente e que transformam as espécies de plantas e animais adequadas às necessidades humanas.

Segundo Pereira et al., 2001, para preservar as espécies nativas com potencial econômico é necessário criar unidades de conservação e bancos ou coleções de germoplasmas a fim de manter a variabilidade genética. Tais unidades e bancos garantiriam a conservação das espécies e sua utilização em programas de melhoramento para superar as limitações na exploração comercial, além de desenvolver técnicas mais eficientes de propagação assexuada e de padrões de qualidade para o processamento pós-colheita e viabilidade comercial.

O desenvolvimento da técnica de cultivo *in vitro* da gabirobeira é de importância fundamental no melhoramento genético de plantas, a fim de “regenerar” embriões de sementes, manter o acesso a bancos de germoplasmas e propiciar a obtenção de cultivares superiores.

Sabe-se que a gabirobeira propaga-se por meio das sementes, mergulhia e mudas extraídas de forma natural, mas existem poucas experiências relacionadas à sua propagação. Na propagação de plantas por meio de sementes, nem sempre se tem certeza de que o indivíduo formado vai manter as mesmas características selecionadas das plantas matrizes, em função da recombinação gênica, o que não acontece na propagação assexuada (ONO, 1992).

Nesta propagação cada planta individualmente produzida é, na maioria das vezes, geneticamente idêntica à planta-mãe, sendo este o maior motivo de sua aplicação (PAIVA; GOMES, 1995).

A reprodução assexuada consiste na produção de novos indivíduos usando partes ou órgãos da planta matriz, tais como ramos, gemas, estacas, folhas, células, raízes e outras. A propagação *in vitro*, frequentemente utilizada na floricultura, fruticultura e na silvicultura, envolve técnicas capazes de reproduzir em massa genótipos previamente selecionados. O uso desta reprodução, segundo Malavasi (1994) pode distribuir com maior rapidez e eficiência os resultados dos programas de melhoramento genético, reduzindo seus custos finais. Na cultura da gabirobeira, tal como na da erva-mate, a propagação assexuada poderá ter grande avanço e dedicação da pesquisa, em virtude do

seu potencial para reduzir o período de produção de mudas: de 1,5 a 2 anos no sistema de produção por sementes, para apenas seis meses (CARVALHO, 1994).

Durante o desenvolvimento da presente pesquisa para realizar a micropropagação, optou-se pela germinação *in vitro* da semente de gabirobeira (*Campomanesia* spp.), tendo em vista a ocorrência de sérios problemas com o estabelecimento dos explantes naturais, produzidos pela oxidação e a contaminação que dificultaram a propagação *in vitro* da gabirobeira.

O presente trabalho objetivou avaliar a micropropagação *in vitro* de gabirobeira (*Campomanesia* spp.), estabelecendo um protocolo que facilite a propagação desta espécie em programas de melhoramento vegetal. Nesse sentido, os experimentos realizados para avançar na formação de um protocolo que permita sua domesticação foram:

- Controle da contaminação na germinação *in vitro* da semente de gabirobeira (*Campomanesia* spp.).
- Utilização de antioxidantes na micropropagação *in vitro* de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.).
- Desenvolvimento da plântula de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) na germinação *in vitro* da semente em meio MS com BAP.
- Brotação *in vitro* de explantes obtidos na germinação *in vitro* de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em diversas combinações de MS com BAP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 Importância da gabirobeira (*Campomanesia* spp.) no bioma cerrado

De acordo com Maria do Carmo C. Sanchotene, a Gabiroba, palavra de origem guarani, quer dizer "árvore de casca amarga". Existem no Brasil, no entanto, muitas espécies e variedades de frutas que levam esse mesmo nome de origem indígena. Algumas se desenvolvem em formações arbustivas, outras têm o porte de grandes árvores e chegam a alcançar entre 8 e 25 metros de altura.

A gabiropa ocorre no cerrado, cerradão, campo sujo (SILVA et al., 2001) e mata ciliar (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990). É uma planta bem distribuída, podendo ser encontrada nos estados de São Paulo, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina, chegando às regiões adjacentes da Argentina, do Paraguai (LEGRAND; KLEIN, 1977) e do Paraná (LANDRUM, 1986).

O cerrado brasileiro, atualmente denominado de celeiro do mundo, era pouco explorado no passado. Este ecossistema ocupava 24% da área total do País (204 milhões de hectares), estando presente em 13 estados brasileiros e no Distrito Federal. É a segunda maior biodiversidade da América do Sul, superada apenas pela Amazônia. (MMA, 2010).

Todo esse potencial econômico natural sinaliza a importância das pesquisas para manutenção, conservação e manejo da biodiversidade do cerrado. Existem cerca de 6.500 espécies de plantas neste ecossistema, das quais mais de 200 já possuem uso econômico (madeireiro, medicinal, forrageiro e ornamental).

Além de sua importância ambiental, o cerrado tornou-se capaz de gerar riquezas, particularmente as frutíferas do cerrado têm se destacado por seu grande potencial de utilização agrícola. Tais frutíferas são espécies de diferentes famílias, que produzem frutos comestíveis, com diversas formas, cores e sabores característicos. Estes frutos são consumidos pelas populações locais e constituem uma importante fonte de alimento para animais silvestres e domesticados, (CHAVES, 2003).

A variabilidade genética de uma espécie é essencial para sua adaptação e sobrevivência às mudanças do seu habitat; a diferenciação das populações é fator relevante para a conservação genética (GRIBEL, 2001).

A gabirobeira pertence à família *Myrtaceae*. Do ponto de vista taxonômico é uma das famílias mais complexas, tanto pelo número de espécies quanto pela escassez de estudos taxonômicos (SOUZA; LORENZI, 2005).

Segundo Manica et al.,(2000), entre as fruteiras nativas quatro gêneros se destacam como os mais importantes do ponto de vista do interesse econômico: *Feijoa*, *Eugenia*, *Myrciaria* e *Psidium*. A espécie frutífera mais estudada e difundida é a goiabeira (*Psidium guajava* L.), mas diversas outras espécies apresentam potencial semelhante, embora dependam de domesticação, sendo comercializadas apenas em pequena escala.

Este é o caso da jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg), da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), da cabeludinha (*Plinia glomerata* (O. Berg) Amshoff), do Cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), da gabiroba (*Campomanesia* spp.), do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da cereja-nacional (*Eugenia cerasiflora* Miq.). As *Myrtaceae* aparecem entre as famílias mais comuns na maioria das formações vegetais da flora brasileira. Nas áreas abertas, especialmente no cerrado, ganham importância os gêneros *Psidium* e *Campomanesia* (CASTRO; LORENZI, 2005).

A gabirobeira (*Campomanesia* spp.) é uma planta caducifólia. Seu florescimento ocorre de modo bem intenso, por um curto período de tempo, de agosto a novembro, com pico em setembro (ALMEIDA et al., 1998). Frutifica de setembro a novembro (SILVA et al., 2001). Espécie final de sucessão (secundária tardia ou clímax), suporta inundação, sendo uma espécie importante para a reposição de mata ciliar (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990).

Os frutos são utilizados na alimentação in natura, na forma de sucos, geléias, doces, sorvetes, pudins e pavês. São utilizados também como matéria prima para a fabricação de licor e vinho. Planta considerada medicinal, possui propriedades anti-diarréicas, sendo suas cascas e suas folhas usadas sob a forma de chás (FERREIRA, 1972). Além disso, a planta é melífera, sendo importante para o pasto apícola. É explorada por extrativismo e, também, cultivada em pequenos pomares familiares, sendo uma fonte de renda para muitas famílias. A comunidade da cidade de Bonito, Mato Grosso do Sul, promove todo ano no mês de novembro, época de frutificação da espécie, o Festival da Guavira (*Campomanesia* spp.), com o intuito de resgatar a cultura e história da comunidade (REIS, 2005). O processamento do fruto é feito de modo semelhante ao da Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), os frutos depois de lavados e

escorridos são cortados ao meio e as sementes são retiradas. A polpa deve ser macerada e espremida na peneira sobre um vasilhame de boca larga. Na peneira ficam retidas as cascas e sementes e no vasilhame, o suco que pode ser imediatamente utilizado ou acondicionado em sacos plásticos e conservado em refrigeração. O transporte dos frutos maduros requer cuidado. Como eles possuem mais de 90% de suco e têm película muito delicada, sugere-se processamento ou congelamento rápido (ALMEIDA, et al., 1998).

No estado do Goiás, uma caixa com frutos de gabirola é comprada pela pequena empresa de sorvetes e picolés de frutas nativas do cerrado, “Sabor do Cerrado”, ao custo de R\$ 30,00 (LIMA, 2004).

2.2 Características botânicas da gabirola

A classificação botânica corresponde ao:

Reino: *Plantae*,

Filo: *Magnoliophyta*,

Classe: *Dicotyledoneae*,

Ordem: *Myrtales*,

Família: *Myrtaceae*,

Gênero: *Campomanesia*.

Espécies e nomes populares:

Campomanesia adamantium - gabirola branca,

Campomanesia dura - gabirola do campo,

Campomanesia corymbosa – gabirola,

Campomanesia cyanea – gabirola,

Campomanesia desertorum - gabirola do sertão

Campomanesia dichotoma – ubucaba,

Campomanesia fenzliana – gabirola,

Campomanesia grandiflora – gabirola,

Campomanesia guavirola – gabirola,

Campomanesia guazumifolia - sete copas, gabirola da mata,

Campomanesia klotezschiana - gabirola do campo,

Campomanesia lineatifolia – gabirola,

Campomanesia phae – cambuci,

Campomanesia pubescens – gabirola,

Campomanesia reticulata – gabioba,

Campomanesia rivularis – gabioba,

Campomanesia rufa – gabioba,

Campomanesia xanthocarpa - gabioba do campo.

Origem: Brasil (MENDES; FERRAO, 1999; LORENZI, et al., 2006).

A gabiobeira apresenta 25 espécies distribuídas do México à Argentina, sendo 15 delas nativas do Brasil. São encontradas em diversos tamanhos que variam de pequenos arbustos até árvores de 15 m de altura, porém no cerrado figuram mais como arbustos.

A Figura 1 apresenta os estágios de desenvolvimento de *Campomanesia xanthocarpa*, ou gabioba do campo, A — início do desenvolvimento; B — emissão da raiz primária e do hipocótilo em plântulas com três a quatro dias; C — emergência dos paracotiledones seis a sete dias após a protrusão da raiz primária; D — plântula com 30 dias, com paracotiledones totalmente expandidos e início do desenvolvimento dos eófilos; E — plântula com cerca de 60 dias, no início da fase de tirodendro. (cl: colo; d: diásporo; ef: eófilo; ep: epicotilo; hp: hipocotilo; pc: paracotiledone; r: raiz principal: rp: raiz primária; rs: raiz secundária).

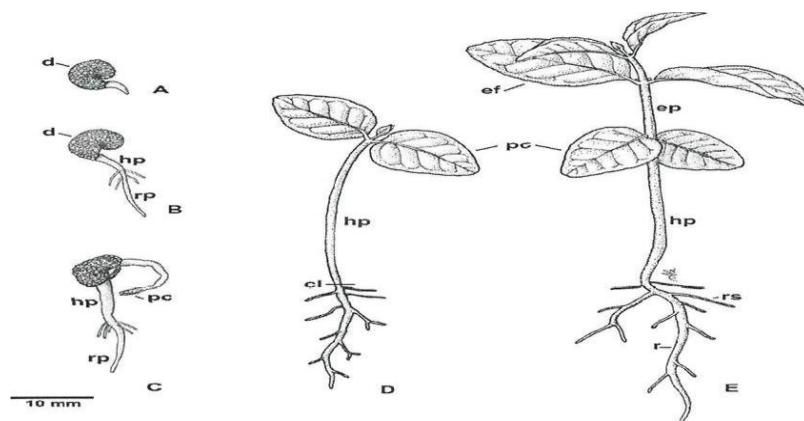


FIGURA 1. Estágios de desenvolvimento da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (*Myrtaceae*). Fonte: Acta bot. bras. 24(3): 613-623. 2010.

A gabiobeira possui tronco tortuoso e ramificado de casca amarelada e descamante em placas finas, e copa desorganizada, conforme Figura 2. Na Figura 3 pode-se ver que suas folhas são opostas, simples, inteiras, pecioladas, ovais ou oblongas,

arredondadas na base e de ápice acuminado, com nervação muito saliente na parte inferior, algumas coriáceas.



FIGURA 2. Exposição da gabirobeira no cerrado da Fazenda Água Limpa/UFU. Uberlândia-MG. 2011.



FIGURA 3. Exposição da folha e do fruto da gabirobeira, Uberlândia – MG. 2011.

Apresenta coloração desde o branco com pelos até castanho avermelhado, alternando com a idade. As folhas são simples, opostas, crespas no caso da *C. schlechtendaliana* var; rugosas, glabras no caso da *C. adamantium*; estreitas e duras no caso da *C. áurea*; pubescentes na face inferior no caso da *C. pubescens*; largas ou oblongas (forma de ovo

invertido) e coriáceas ou grossas no caso da *C cambessedeanae* e com margem onduladas no caso da *C. xanthocarpa* var. *litoralis*. (MENDES; FERRÃO, 1999; LORENZI, et al., 2006).

Na Figura 4, observam-se as flores, de corola esbranquiçada, com cinco a seis pétalas, de ovário ínfero, em geral são solitárias, mas podem aparecer pedúnculos com uma a duas flores, muito aromáticas, arredondadas ou truncadas. As flores nascem em racemos dicásios (duas flores, terminando em uma) agrupadas em pedúnculos (haste ou suporte) longos ou curtos, e medindo cada uma de 1 a 1,5 cm de comprimento; são actinomorfas (vários planos passando num mesmo eixo), com cálice (invólucro externo) com cinco lobos ou recortes agudos, e corola (invólucro interno com cinco pétalas brancas livres). O androceu (órgão masculino) contém em média 90 a 130 estames filiformes (tubos longos em forma de fio) de 0,8 a 1,3 cm de comprimento.



FIGURA 4. Apresentação da flor de gabirobeira, Uberlândia-MG. 2011.

A Figura 5, na qual o fruto em geral é uma baga sub esférica, semelhante a uma cereja, com cerca de 1 cm de diâmetro, podendo chegar a 5 cm em *C. phae*, de cinco a oito lóculos, (algumas como a *C. rufa* chegam a treze lóculos) sendo sua coloração do verde amarelado até o verde escuro, mudando sua cor quando maduro para amarelado ou alaranjado. Os frutos contêm em seu interior uma polpa mole da cor do epicarpo, com sabor a mirtilo segundo uns, a morango segundo outros. Essa polpa é açucarada, comestível como alimento de sabor muito agradável (MENDES; FERRÃO, 1999). As

sementes são de coloração creme, arredondadas, semelhantes a uma ferradura e recalcitrantes (perdem o poder germinativo em quatro dias). Depois de plantadas germinam em 10 a 40 dias. Cada fruto possui de seis a oito sementes, Figura 6.



FIGURA 5. Apresentação do fruto de gabirobeira colhido na Fazenda Água Limpa/UFU. Uberlândia-MG. 2011.

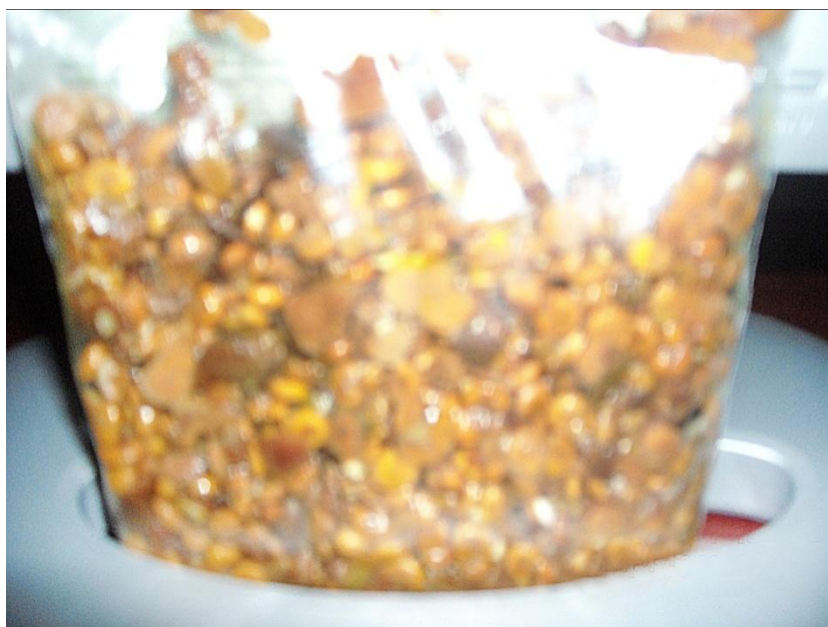


FIGURA 6. Semente extraída do fruto da gabirobeira para os ensaios, Uberlândia-MG. 2011.

Para a extração das sementes do fruto, Macedo (1998) recomenda a maceração e o despolpamento dos frutos sobre peneira, a lavagem das sementes em água corrente e a

secagem à sombra, Figura 7. Devido à curta viabilidade das sementes, elas devem ser colocadas para germinar imediatamente após a colheita (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003). Foi observada taxa de germinação de 65% em um período de 40 a 60 dias (SILVA et al., 2001). As sementes são classificadas como recalcitrantes, não tolerando o armazenamento a baixa temperatura e nem a dessecação, sendo que o armazenamento em frasco de vidro fechado a 25°C mantém a germinação em 0% por 30 dias (MELCHIOR et al., 2006).



FIGURA 7. Extração da semente do fruto de gabirobeira colhido para os experimentos, Uberlândia-MG. 2011.

2.3 Propagação de frutíferas nativas

A fruticultura no cerrado brasileiro é de baixa atividade econômica. Os frutos encontrados nas feiras livres, mercados e supermercados das cidades são, em geral, provenientes do extrativismo dos nativos que os colhem das árvores silvestres que nascem nessas regiões ou de pequenos pomares residenciais de baixa produtividade.

A produção comercial destas frutíferas do cerrado é baixa, já que seu cultivo agrícola carece de técnicas agrônomicas adequadas ainda não desenvolvidas, por isso é importante considerar o tipo de propagação.

A propagação consiste em um conjunto de práticas destinadas a perpetuar as espécies de forma controlada, com o objetivo de aumentar a quantidade de plantas, garantindo a manutenção das características agronômicas essenciais das cultivares.

Os métodos de propagação podem ser sexuada (sementes) e assexuada (estruturas vegetativas).

A propagação por sementes de plantas frutíferas ocorre de forma natural e no cultivo da maioria das plantas para produção de mudas.

A propagação assexuada é mais utilizada na produção comercial de mudas e mais eficaz e rápida que a propagação por sementes, pois possui período improdutivo mais curto, além de permitir a produção de plantas idênticas à planta-mãe, sendo importante na preservação das características agronômicas das espécies desejáveis.

A opção pela reprodução sexuada ou assexuada é definida conforme: a facilidade de germinação da semente, quantidade de plantas produzidas e importância das características agronômicas das cultivares (FACHINELLO et al., 2005).

2.3.1 Propagação sexuada da gabirola (*Campomanesia* spp.)

Existem informações sobre algumas espécies serem cultivadas enquanto outras somente são encontradas nativas. Em geral propagam-se facilmente por sementes ou por estacas (assexuada).

A gabirola é uma planta rústica, pouco exigente de cuidados, nascendo naturalmente mesmo em terrenos pobres. Ocorre de forma nativa nas regiões de mata. Multiplica-se por sementes, preferindo climas quentes, porém com poucas chuvas.

No caso da gabirola, vem sendo realizados estudos para propagação por sementes, mas o desenvolvimento lento das plântulas e a predação intensa de frutos estão entre as principais limitações ao cultivo (LEITÃO; MARTINS, 1981)

O início da germinação ocorre com a embebição da semente, mas, em muitas espécies, a exemplo da gabirola, a presença de mucilagem impede que esse processo ocorra. A eliminação da mucilagem em várias espécies consiste em sua fermentação.

Esta operação, além de livrar as sementes, pode ajudar no controle de doenças transmissíveis por elas. O tempo de fermentação varia conforme a espécie e a temperatura, sendo por volta de seis dias para maracujá. Para guabirola, Lorenzi (2002) indicou a fermentação das sementes por três dias. A semente da gabirola deve ser plantada em pleno sol, em lugares livres de encharcamento na época de chuvas. O espaçamento

médio indicado para todas as espécies desta pesquisa é de 3 x 3 m ou de 2 x 2 m para terrenos virgens do cerrado. As covas devem ser preenchidas com 1 kg de cinzas e 4 litros de matéria composto orgânico (a maior parte de capim ou folhas apodrecidas) e 20 g de N-P-K (10-10-10). Depois de prontas devem ficar curtindo por no mínimo 3 ou 4 meses antes do plantio definitivo, que deve ser feito a partir de novembro. Irrigar a cada quinze dias nos primeiros 3 meses, depois somente se faltar água na época da florada. A planta cresce lentamente e não necessita de cuidados especiais, apenas deve-se cobrir a superfície com pó de cerra e eliminar qualquer erva daninha que possa sufocá-la. Adubar com composto orgânico feito de folhas apodrecidas + 20% de esterco de galinha curtido e 20 g de N-P-K (10-10-10). Distribuir os nutrientes a 5 cm superficialmente a 20 cm do caule, de preferência no mês de outubro, quando a planta inicia nova brotação. As gabirobeiras são arbustos de crescimento lentos, porém resistentes a geadas inferiores a zero grau, vegetam bem em qualquer altitude. O solo pode ser profundo, de drenagem rápida, ácido com pH entre 5, 0 a 6,5, com constituição arenosa ou argilosa (solo vermelho) e até pedregoso. A guabiroba rasteira e a guabiroba rugosa frutificam dois anos após o plantio, enquanto as outras espécies levam de três a cinco anos para iniciar a frutificação. (MUNIZ, 2009)

As mudas crescem lentamente, apreciam substrato arenoso com pouca matéria orgânica e que drenem bem as águas de chuvas e regas. As mudas apreciam local arejado onde pegue sol até às 13:00 horas da tarde, para um bom desenvolvimento. A planta é polinizada por abelhas do gênero *Bombus*, embora seja comum encontrar grande quantidade de outros insetos visitando suas flores, o que contribui para o aumento da produção de gabiroba (ALMEIDA, et al., 2000), Figura 8 .

A formação de mudas é efetuada em sacos plásticos com 2 a 3 sementes por saco, com profundidade de semeadura de 2 cm - foi observada produtividade de 30 a 100 frutos por planta, a partir do 1º ou 2º ano após o plantio (SILVA et al., 2001).

Algumas sementes de espécies do cerrado apresentam comportamento recalcitrante, como a gabiroba (*Campomanesia adamantium* Cambess), a cagaita, a mangaba e a pinha do brejo. As sementes recalcitrantes, em geral, apresentam tamanho grande e são caracterizadas por não sofrerem dessecação natural na planta-mãe ao longo do processo de maturação, sendo dispersas com elevados teores de água que, se reduzidas a um nível considerado crítico, levarão à rápida perda da viabilidade e até a morte (ROBERTS, 1973).



FIGURA 8. Muda da gabirobeira desenvolvida na casa de vegetação da Fazenda Água Limpa/UFU, Uberlândia- MG. 2012.

Melchior (2006) mostrou que a semente de gabiroba (*Campomanesia adamantium*) é recalcitrante e deve ser usada para semeadura imediatamente após extração dos frutos, e que o ponto de colheita de frutos, para obtenção de sementes, foi determinado como sendo a partir de 15,75° Brix de polpa.

Segundo Costa (2009) não existe ainda um método disponível para a conservação em longo prazo de sementes recalcitrantes, por isto técnicas destinadas a ampliar seu período de conservação têm sido estudadas. Qualquer método a ser desenvolvido deve evitar a perda de água e manter suprimento adequado de oxigênio às sementes, ao mesmo tempo em que deve prevenir a proliferação de microrganismos e a germinação durante o armazenamento. A criopreservação de sementes e embriões isolados também representa um método promissor visando à conservação, em bancos de gemoplasma, de espécies que apresentam sementes recalcitrantes (FAIAD et al., 2005; MARCOS FILHO, 2005).

A criopreservação é o armazenamento de sementes em botijões criogênicos contendo nitrogênio líquido a uma temperatura de -170° C. A vantagem do emprego da criopreservação em bancos de germoplasma consiste em que as sementes podem ser mantidas no perfil genético original, sem risco de multiplicação e de contaminação. (STANWOOD; ROOS, 1979; GONZALEZ et al., 1999)

Um dos problemas da gabioba é a falta de resistência às pragas e doenças. Os frutos de gabioba são repositórios naturais de moscas das frutas nos cerrados do estado de Goiás, principalmente para os gêneros *Anastrepha*, com grande potencial para criação e multiplicação de inimigos naturais dessas moscas. *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha sororcula* e *Ceratitis capitata*, por exemplo, são espécies de mosca-da-fruta, que atacam a *Campomanesia adamantium* O. Berg. A *A. sororcula* é a espécie de mosca das frutas mais frequente no estado de Goiás e pode ser considerada praga potencial desta frutífera. A gabioba é hospedeira natural da mosca da fruta, inseto que causa grandes danos à agricultura mundial (FELIPE et al., 2002). Os frutos danificados apresentam geralmente uma mancha circular marrom, ocorrendo o apodrecimento junto à área da picada (CORSATO, 2004).

2.3.2. Propagação assexuada da gabiobeira

A propagação assexuada, vegetativa ou agâmica é o processo de multiplicação que ocorre por mecanismos de divisão e diferenciação celular, por meio da regeneração de partes da planta-mãe. Este tipo de propagação baseia-se nos princípios da totipotencialidade, em que as células da planta contêm toda informação genética necessária para a perpetuação da espécie, e da regeneração de células ou tecidos que apresentam a capacidade de reconstrução de órgãos adventícios.

A reprodução assexuada consiste na produção de novos indivíduos, usando partes ou órgãos da planta matriz, tais como ramos, gemas, estacas, folhas, células, raízes e outras. Envolvem técnicas - frequentemente utilizadas na floricultura, fruticultura e na silvicultura - capazes de multiplicar em massa genótipos previamente selecionados.

O uso econômico dessas formas de propagação é justificado quando o suprimento de genótipos de alta produtividade e/ou sementes são insumos limitados.

Nestas condições, o uso da reprodução assexuada pode distribuir com maior rapidez e eficiência os resultados dos programas de melhoramento genético, reduzindo seus custos finais (MALAVASI, 1994).

2.4 Cultura de tecidos de frutíferas do cerrado

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura, pela qual pequenos fragmentos de tecidos vivos chamados explantes são isolados de um

organismo vegetal, desinfetados e cultivados assepticamente por determinados períodos em um meio de cultura apropriado.

A biotecnologia, em um conceito amplo, inclui técnicas que usam organismo vivo ou parte dele para fazer ou modificar produtos, melhorar plantas e animais, ou desenvolver micro-organismos para uso específico. Ela consiste no cultivo *in vitro* de plantas ou parte delas em um meio nutritivo artificial asséptico, podendo ser cultivadas: sementes, embriões, órgãos, tecidos, células e protoplastos das diversas espécies frutíferas. As técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais compõem um importante grupo da biotecnologia em plantas.

O cultivo *in vitro* de tecidos vegetais constitui uma importante ferramenta, envolvendo técnicas de manipulação e controle, para a propagação de plantas frutíferas que apresentam dificuldade para multiplicar-se vegetativamente. Permitem controlar os processos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento da planta como a: divisão celular, germinação, brotação, enraizamento, floração e frutificação. Além disso, a cultura *in vitro* desempenha um papel importante na produção de mudas frutíferas para o plantio.

O cultivo *in vitro* permite o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais (iluminação e temperatura) controladas. Esta técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões que originarão uma planta inteira (embriogênese somática) em um meio de cultivo favorável (CARVALHO, 1994).

Este tipo de cultivo tem sido usado para: superar dormência de sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma; estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; testar a viabilidade de sementes; recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis e como fonte de explantes devido à elevada totipotência.

Melo et al., (2001) realizaram a avaliação do cultivo *in vitro* da guarirobeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc) em diferentes combinações de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com Tidiazuron (TDZ) e Benzilaminopurina (BAP), e testaram diferentes antioxidantes, observando a germinação e desenvolvimento das

plântulas na cultura *in vitro*. O explante utilizado foi o embrião zigótico extraído do fruto maduro da guabirobeira.

Existem possibilidades de viabilizar essa técnica de cultura de embrião utilizando como explante o embrião semente do fruto da guabirobeira. Conforme mostra Scutti (2000), a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) é uma *Myrtaceae* frutífera lenhosa, nativa da região Sul do Brasil, cuja exploração comercial pode ser fomentada por estudos sobre sua propagação vegetativa. Foram empregadas diversas técnicas de propagação vegetativa com o objetivo de estudar o comportamento da espécie.

Já para Bonga (1985), a mangabeira, espécie nativa do cerrado, destaca-se por possuir um grande potencial como planta frutífera e produtora de borracha. No entanto, suas sementes apresentam recalcitrância, dificultando sua propagação, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas por via assexuada. Nesse contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada para propagação vegetal.

O Araticum ou marolo (*Annona crassiflora* Mart.) é uma fruta típica de cerrado de grande importância socioeconômica e medicinal. Ribeiro et al., (2009) analisaram os efeitos do Ácido giberélico (GA³) associado ao Ácido Naftaleno Acético (ANA) sobre a germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* do marolo.

Frazom et al.,(2006) estudaram a germinação *in vitro* da guabirobeira (*Campomanesia Xanthocarpa* Berg) e observaram a possibilidade de armazenamento em freezer (-18°C). Tiveram boas médias de germinação *in vitro* em 3 horas de germinação a 25°C, em meio de cultura padrão. O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação.

Anacardium humile St. Hill, conhecido como cajuzinho-do-cerrado é uma espécie pertencente à família *Anacardiaceae*, de ocorrência natural em campo sujo e no cerrado do Brasil. Londe et al., (2007) realizaram estudos para verificar a contaminação, por ser um dos principais problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento *in vitro* de explantes, e a utilização de fungicidas no meio de cultura para controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. Esse trabalho teve por objetivo identificar os fungos em meio MS na micropropagação do *Anacardium humile* e analisar os efeitos da adição de Benomyl em meio de cultura, para controle da contaminação *in vitro*.

2.4.1 A micropropagação *in vitro* de frutíferas nativas

Uma das muitas aplicações da cultura *in vitro* é a micropropagação, que consiste na propagação maciça de plantas superiores, pois, geralmente, a propagação convencional é um processo lento durante o qual doenças e problemas com patógenos podem diminuir a produção.

Segundo Fachinello et al., (2005), um aspecto fundamental para se fazer a micropropagação de uma frutífera é o domínio da tecnologia de propagação em laboratório, chamada de protocolo, que se fundamenta em resultado de estudos realizados com os fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, e compreende as seguintes fases: Estabelecimento das culturas *in vitro*, Multiplicação *in vitro*, Enraizamento *in vitro*, Aclimatização.

Para que ocorra a micropropagação *in vitro* é necessário estabelecer a cultura *in vitro*, ou seja, obter plantas livres de contaminantes visíveis e bem adaptadas às condições *in vitro*, a fim de que possa ocorrer a multiplicação. O estabelecimento em laboratório das frutíferas, no caso de espécies lenhosas, deve superar o problema de contaminação e oxidação.

A multiplicação da espécie vegetal estabelecida *in vitro* inicia-se quando as brotações são cultivadas com o objetivo de aumentar o número de plantas sadias. Os subcultivos são realizados até se obter o número de brotações desejadas para serem enraizadas.

Após a multiplicação, a etapa seguinte é o enraizamento, cujo propósito é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas na multiplicação, para assim atingir a constituição de uma planta completa que posteriormente será aclimatada às condições *ex vitro*.

Logo a seguir as brotações enraizadas serão transferidas para casa de vegetação onde ocorrerá uma nova fase de adaptação às condições ambientais. Nesta fase as plantas propagadas passam de uma situação controlada *in vitro* para um ambiente *ex vitro* ou natural. O sucesso na micropropagação das frutíferas depende dos diversos fatores que influenciam todas as etapas às quais os explantes são submetidos, para serem obtidas plantas sadias desenvolvidas e adaptadas às condições de campo.

A micropropagação tem sido a técnica alternativa mais utilizada nos últimos anos, com a finalidade de obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano (BORTHAKUR et al., 1998).

Ela oferece o potencial para produzir milhares, ou, às vezes, bilhões de plantas, em relativo curto espaço de tempo. Existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (qual espécie, cultivar ou variedade que está sendo utilizada); a fonte de explantes (folha, raiz, caule, e meristema) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura e vasilhame). O sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende da decisão correta no estabelecimento desses fatores (CALDAS et al., 1998).

2.4.2 Germinação *in vitro*

Segundo Labouriau (1983), a germinação, de um ponto de vista fisiológico, é considerada como o crescimento do embrião, com o rompimento do tegumento pela radícula.

O início da germinação se dá pelo desenvolvimento de um novo indivíduo vegetal ou plântula normal, a partir de uma semente em condições favoráveis, e começa com a entrada de água na semente ou embebição que irá ativar o metabolismo, terminando com o crescimento do eixo embrionário. Para que ocorra a germinação *in vitro*, existem etapas que devem ser superadas pelas sementes, tais como: a embebição, que é um processo físico no qual ocorre a absorção da água pelos tecidos, devido ao potencial hídrico entre a semente e o meio externo; e a extensão radicular, que consiste em complexas transformações metabólicas iniciadas com a embebição e finalizadas com o crescimento da radícula através das estruturas envoltórias da semente e determinando, propriamente dito, o término da germinação e o crescimento da plântula (KERBAUY, 2008).

A germinação é afetada pelas condições externas ou internas, cujo conjunto é essencial para que o processo seja normal. Assim, ao suprir as necessidades externas e internas de um embrião em estado de dormência ou quiescência de uma semente viável, ele germinará (BORGES; RENA, 1993).

A germinação *in vitro* da semente é influenciada por fatores tais como: luz, umidade, temperatura, oxigênio e a formação química do meio de cultura *in vitro*.

O meio de cultura compõe-se de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, as vitaminas e as substâncias reguladoras de crescimento. Os outros componentes, que podem ser importantes, incluem aminoácidos e aminas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas.

É possível fazer-se a germinação *in vitro* e obter-se fontes de explantes a partir das plantas germinadas e desenvolvidas *in vitro*. É uma forma de se obter material asséptico para iniciar a micropropagação (TERMIGNONI, 2005).

A germinação *in vitro* possibilita tal processo em condições assépticas e controladas em qualquer época do ano, permite diminuir o tempo de germinação, assim como obter plântulas em condições fitossanitárias apropriadas para o trabalho de cultivo *in vitro*.

Entretanto, para obter o estabelecimento das espécies com êxito, faz-se necessário prevenir e controlar a contaminação microbiana e oxidação fenólica, já que constituem um dos problemas mais graves na micropropagação de frutíferas lenhosas (HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ, 2010).

2.5 Contaminação microbiana na micropropagação de frutíferas nativas

A contaminação microbiana é um dos problemas mais graves na micropropagação de espécies vegetais, responsável por grandes perdas de material, tanto na investigação científica como na micropropagação comercial.

Existem duas origens de contaminação: a) microrganismos que colonizam a superfície ou o interior do explante (endófitos) e b) microrganismos introduzidos na manipulação no laboratório (DEBERGH; ZIMMERMAN, 1991).

Os contaminantes mais comuns são fungos, bactérias e leveduras, denominados “vitropatógenos” (GEORGE, 1993). Este termo tem sido utilizado para denominar aqueles organismos que são prejudiciais às células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, enquanto o termo patógenos é utilizado para descrever os organismos que provocam doenças nas plantas cultivadas em campo (LEIFERT et al., 1989).

Entre as principais fontes de contaminação encontram-se os explantes, o ambiente de trabalho, os operadores e as técnicas deficientes de esterilização utilizadas no laboratório. Como contaminantes *in vitro* de plantas tem-se isolado espécies de bactérias pertencentes aos gêneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*,

Mycobacterium, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, entre outros (BARRETT; CASSELLS, 1994).

Entre os fungos mais comuns introduzidos no cultivo de tecidos citam-se os gêneros: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* e *Fusarium*. O êxito da propagação de plantas *in vitro* depende em grande medida do controle e da prevenção da contaminação microbiana (ALVARADO, 1998).

Existem diversas estratégias para efetuar esse controle, entre elas pode-se citar: a prevenção na escolha e tratamento da planta matriz, desinfestação do explante, identificação dos microrganismos contaminantes, controle da contaminação pelo uso de substâncias antimicrobianas e o cultivo de meristemas (NIEDZ; BAUSHER, 2002).

A presença de microrganismos é observada na fase do estabelecimento, principalmente quando a planta mãe cresce no campo, onde está exposta a doenças, pragas e outros agentes, sem controle ambiental (RAMIREZ; SALAZAR, 1997).

Uma das técnicas para controlar o risco da contaminação *in vitro* dos explantes consiste no uso de fungicidas, durante o ciclo de crescimento da planta doadora do explante (ALVARADO, 1998). Porém, um dos problemas que pode ocorrer no uso desta técnica é a produção de injúrias nos tecidos ou a permanência de resíduos tóxicos na planta. Dos fungicidas sistêmicos, o grupo mais importante são os benzimidazóis, incluindo os fungicidas benomil, tiofanato metílico, carbendazim (MAZELLIER et al., 2002).

Para a desinfecção do explante inicial, geralmente emprega-se soluções de hipoclorito de sódio em concentrações de 0,5 a 5% (MARTÍNEZ, 1995). As soluções de hipoclorito de cálcio (CaOCl) são tão efetivas quanto as de sódio (BENERJEE, et al, 1985). O hipoclorito de sódio (NaOCl), no entanto, provoca alterações no metabolismo celular, gera reações oxidativas com inativação enzimáticas em bactérias e a degradação de lipídios e ácidos graxos (ESTRELA et al., 2002).

2.6 Oxidação fenólica na micropropagação de frutíferas nativas

A oxidação ou escurecimento dos tecidos cultivados *in vitro* ocorre pela ação de radicais livres de diferentes componentes celulares, assim como pela oxidação de compostos fenólicos catalisados pela enzima polifenol oxidase (PPO) para produzir

quininas, as quais, são compostos químicos muito reativos, gerando danos e inclusive a morte celular (BRAY et al., 2000).

O estabelecimento *in vitro* de tecidos vegetais de algumas espécies de plantas, especialmente as frutíferas lenhosas, está limitado pelo obscurecimento letal nos explantes e no meio de cultivo. Este é um dos problemas mais sérios no cultivo *in vitro* de um tecido (GEORGE, 1996; TANG; NEWTON, 2004).

Fatores ambientais como: intensidade da luz, cortes, lesões, herbicidas, senescência, patógenos, metais pesados e substâncias abrasivas podem desencadear o estres oxidativo e nitrosativo (POMPEU et al., 2008).

Os processos de oxidação são ocasionados principalmente pelo efeito abrasivo do agente desinfetante aplicado na assepsia dos cortes do explante; pela composição química do meio de cultivo e no volume e qualidade do frasco de cultivo (VAN STADEN et al., 2006 ; ABDELWAHD et al., 2008).

A toxicidade dos exsudados está diretamente relacionada com o aumento da produção de compostos fenólicos, já que são oxidados para formar quininas, por meio da atividade de enzimas oxidativas e logo polimerizadas (TABIYEH et al., 2006).

Além do escurecimento dos explantes, o stress oxidativo tem-se relacionado com outros fatores fisiológicos, morfológicos e genéticos que ocorrem nos explantes cultivados tais como: recalcitrância, hiperhidricidade, variação somaclonal e hábitos (CASSELLS; CURRY, 2001).

2.6.1 Estratégias práticas para o manejo da oxidação *in vitro*

Uma das melhores estratégias para evitar os processos de oxidação é diminuir de forma preventiva as fontes que originaram o stress oxidativo do explante. Quando isto não é possível de se conseguir, pode-se usar, entre outras, das medidas práticas a seguir: uso de explantes em estágio juvenil, crescimento do explante no escuro ou com baixa iluminação na incubação inicial, subcultivos com frequência do explante, utilização de substâncias antioxidantes no meio de cultura ou na forma de banho (ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpolirridona-PVP, carvão ativado, entre outros), lavagem dos explantes coletados em água corrente, antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação dos compostos fenólicos, e a utilização de meios básicos mais diluídos e a redução das

concentrações de fitorreguladores (saís), principalmente citocininas (FACHINELLO et al., 2005).

Diversos pesquisadores solucionaram o problema utilizando uma das seguintes estratégias, uso de carvão ativado (HARIKRISHNAN et al., 1997), uso de PVP (CHACON; GOMEZ, 1996), troca do regulador de crescimento (JAMBOR et al., 1997).

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHD, R; HAKAM, N; LABHILILI, M; UDUPA, S. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of fababean. **African Journal of Biotechnology**, n. 7, p. 997-1002, 2008. [S.l]
- ALMEIDA, M. J. O. F.; NAVES, R. V.; XIMENES, P. A. Influência das abelhas (*Apis melífera*) na polinização da Gabiroba (*Campomanesia* spp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, GO, v 30, n. 2, p. 25-28, 2000.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado- espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1998, p. 464.
- ALVARADO, Y. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. In: J. N. PÉREZ, (Ed.) **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba, p. 81–104, 1998.
- ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. **Frutos dos Cerrados** – preservação gera muitos frutos. 2003. Disponível em: < <http://www.biotecnologia.com.br/bio15/frutos.pdf> >. Acesso em: 20 maio 2011.
- BARRETT, C.; CASSELLS, A. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelagonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. Grand Slam explants *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Holanda, NL: Kluwer Academic Publishers. v. 36, p. 169-175. 1994.
- BENERJEE, N.; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Meristem. T. P. Culture of Musa. Histo-morphological studies of shoot bud proliferation. in: WITHERS, L. A. e ALDERSON P. G. (Eds.): **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, p. 139-147, 1985.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J.M., DURZAN, D.J. (Eds.) **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 4-35, 1985.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Ed.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, p. 83-136, 1993.
- BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 231-233. 1998.
- BRAY, E; BAILEY-SERRES, J; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: **BUCHANAN, B; GRUISSEM, W; JONES, R. (Eds.) Biochemistry and molecular biology of plants**. Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists, p. 1158-1203, 2000.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 2, p. 87-132, 1998.

CARVALHO, P. E. R. *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire. In: CARVALHO, P. E.R. (Ed.) **Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA/SPI, p. 280-287, 1994.

CASSELLS, A; CURRY, R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Holanda, NL: Kluwer Academic Publishers. n. 64, p. 145-157, 2001.

CASTRO, V. S.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p. 260-261, 2005.

CHACÓN, G; GÓMEZ, L. Micropropagación de uma variedade local de mora (*Rubus* sp.) In: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, III Congreso Nacional de Fitopatología, II Congreso Nacional de Suelos. Volumen I, 1996. **Anais...** San José, Costa Rica: EUNED, EUNA, p. 303, 1996.

CHAVES, L. J. *Melhoramento e Conservação de Espécies Frutíferas do Cerrado*. Disponível em: < <http://www.sbmp.org.br/cbmp.2001/palestras/palestra.htm> >. Acesso em: 22 set. 2003.

CORSATO, C. D. A. **Moscas-das-frutas (DIPTERA: TEPHRITIDAE) em pomares de goiaba no norte de Minas Gerais**: Biodiversidade, Parasitóides e Controle Biológico. 95f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

COSTA, C. J. **Armazenamento e conservação de sementes de espécies do cerrado**. EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF. 1ª edição, p.30, 2009.

DEBERGH, P. ; ZIMMERMAN, R. **Micropropagation Technology and Application**. Dordrech: Ed. Kluwer Academic Publishers, 1991, 484 p.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. 1990. **Reposição de mata ciliar**: orientações básicas. Banco de Dados Tropical – Mata Ciliar. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/ciliar/sp/tabela> Acesso em: 10/11 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA. Cerrado). Site oficial, 2005. Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br>. Acesso em: 10/11/2010.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto, v. 13, n.2, p.113-117, 2002.

FACHINELLO, J. C. ; HOFFMANN, A. ; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 221, 2005.

FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. **Estratégias e resultados da conservação de germoplasma- semente a longo prazo**. Disponível em: www.clube dofazendeiro.com.br/cietec/artigos. Acesso em 19 agosto 2005.

FELIPE, A. F. C. L.; VELOSO, V. da R. S.; NAVES, R. V.; FERREIRA, G. A. Ocorrência de Mosca-das-Frutas (*Díptera, Tephritoidea*) em Gabiroba, *Campomanesia*

cambessedearia Berg. (Myrtaceae) nos Cerrados do estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Anais...** Belém: SBF, p. 17, 2002.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do Distrito Federal. I. Gabirobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 5, n. 18, p. 11-15. 1972.

FRAZOM, R. C.; RASEIRA, M do C. B ; JÚNIOR, A.W. Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG). **Revista Ceres**, Vicosa, UFV, v. 53, p. 129- 134, 2006.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Chapter 5, Part 1. 2nd. Ed. New York, Exegetics Ltd, p. 130-143, 1993.

GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture**; part 2. In Practice. 2 ed. England: Exegetics Limited, 1996, 1361 p.

GOGOZ, A. M.; COSMO, N. L.; BONA, C.; SOUZA, L. A. de. Morfoanatomia da plântula de campomanesia *Xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Bot. Bras.** SP, v 24, n. 3, p. 613- 623, 2010.

GONZALEZ; BENITO, M. E.; MARTÍN, C.; IRIONDO, J. M. Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. In: BENSON, E. E.(Ed.) **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor and Francis Ltd., p. 251-264, 1999.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, Brasília, DF, n. 48, p. 110-114, 2001.

HARIKRISHNAN, K; MARTIN, K; ANAND, P; HARIHARAN, M. Micropropagation of sweet flag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, Lucknow, India, n. 19, p. 427- 429, 1997.

HERNÁNDEZ, Y. ; GONZÁLEZ, C. M. E. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. **Cultura tropical**, v. 31, n. 4, 2010. [S.l.]

JAMBOR; BENCZUR, E; NEMENYI, A; SZENDRAK, E; SZAFIAN, Z.. *In vitro* propagation of *Ailanthus altissima* (Swingle) "PurpleDragon". **Horticultural Science**, London,GB. n. 29, p. 22-25, 1997.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F; PEIXOTO, J. R..Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: Lucília Maria Parron et al.. (Orgs.). **Cerrado: Desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. 1ª ed. Brasília: Embrapa Cerrados, v. 1, p. 125-163, 2008.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria da OEA, 1983, 173p.

LANDRUM, L. R. **Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae)**. New York: The New York Botanical Garden. (Flora Neotropica Monograph, 45), 1986, 178 p.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. **Flora ilustrada catarinense: Mirtáceas**. Itajaí, SC: MIRT, p. 219-330, 1977.

LEIFERT, C. ; WAITES, W. M. ; CAMOTTA, H. ; NICHOLAS, J. R. Lactobacillus plantarum; a deleterious contaminant of plant tissue. **J. App. Bacteriology**, v. 67, p. 363-370, 1989. [S.l]

LEITAO FILHO, H. F; MARTINS, F. R. Espécies de cerrado com potencial em fruticultura. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE AMERICANA DE CIÊNCIAS HORTÍCOLAS, 29. CAMPINAS. **Resumos...** Campinas : ASHS. p. 29, 1981.

LEITE, J. B. V. **Melhoramento genético**: coleções de fruteiras e sua importância para o melhoramento genético. 2005. Disponível em: < <http://www.todafruta.com.br>> Acesso em: 15 out. 2010.

LIMA, L. Frutas do Cerrado viram picolés e sorvetes. 2004. Disponível em: <http://www.24horasnews.com.br/index.php?mat=108446>. Acesso em: 01 dez. 2010.

LONDE, L. N.; SOUSA, C. S.; VIEIRA, C. U.; BONETTI, A. M.; KERR, W. E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de Anacardium humile (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, MG, v. 23, n. 3, p. 94-100, 2007.

LORENZI, H. ;BACHER, L; LACERDA, M; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo *in natura*. São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006, 640p.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas nativas do Brasil. 3ª. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002, 368 p.

MACEDO, T. M.; SILVA, J. A.; TORRES, R. A. A.; SILVEIRA, C. E. S.; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.) **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, p. 195-243, 1998.

MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa de coníferas – perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 131-135, 1994.

MANICA, I.; ICUMA, I. M.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SALVADOR, J. O. ; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Fruticultura tropical**: goiaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000, 374 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005, 495p.

MARTÍNEZ, S. Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo in vitro e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa* sp). **Centro Agrícola**, Santa Clara , Cuba, v. 19, n. 2-3, p. 93-96, 1995.

MAZELLIER, P; LEROY, E; LEGUBE, B. Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. **J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry**, v. 153, p. 221–227, 2002.[S.l.]

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* camb. – myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MELO, B. de. ; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guaribeira. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.

MENDES ; FERRAO, J. E. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. V. I. Lisboa, 1999.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado, “Conservação e Desenvolvimento”**. 2010. Disponível em http://www.mma.gov.br/estruturas/182/arquivos/pp_cerrado_vcc1outubro182.pdf. Acesso em: 06 jan. 2011.

MUNIZ, H. J. T. **Colecionando frutas**. Editora Arte e Ciencia, p 352, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, Berne, CH, v. 15, p. 473- 497, 1962.

NAVES, R.V. **Espécies frutíferas nativas do cerrado de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos**. 206 f. Tese (Doutorado), Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse and fields grown trees. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 38, p. 468-471. 2002.[S.l.]

ONO, E. O. Interações entre auxinas e ácido bórico, no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 49, p. 23-27, 1992.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Engenharia Florestal, 1995, 40 p.

PEIXOTO, N.; SILVA, E.; TEIXEIRA, F. G.; MOREIRA, F. da M. Avaliação do crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri-GO. IV Seminário de Iniciação Científica. UEG, 2005.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, n. 2, 2001. CD-ROM.

POMPEU, G.; GRATÃO, P; VITORELLO, V; AZEVEDO, R. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agrícola** Piracicaba, SP: USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, v. 65, p. 548-552, 2008.

RAMÍREZ, M.; SALAZAR, E. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, Venezuela, VE: Universidad del Zulia, Facultad de Agronomia v. 14, p. 497-506, 1997.

REIS, G. 2005. Festival da Guavira – valorizar a cultura é a noção prioridade. Disponível em: <<http://www.ambiental.tur.br/paginas/acoes01.asp?iArea=5>>. Acesso em: 17 ago. 2005.

RIBEIRO, M de N. O.; PASQUALL, M.; VILLA, F.; PIOL, L.A.S.; HILHORST, H.W. M. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *annona crassiflora* mart. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v. 66, n. 3, p. 410-413, 2009.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Tecnology**. Zurich, v. 1, n. 2, p. 499 – 514, 1973.

SCUTTI, M. B. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, Curitiba, PR: UFPR, v.1, n. 1-2, p. 75-82. Editora da UFPR. 2000.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 78p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STAMWOOD, P. C.; ROOS, E. E. Seed of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, Alexandria, VA.,US, v. 14, p. 26-31, 1979.

TABIYEH, D; BERNARD, F; SHACKER, H. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, Holanda, NL n. 726, p. 201-204, 2006.

TANG, W; NEWTON, R. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science**, Limerick, Irlanda, IE: Elsevier n. 167, p. 621-628, 2004.

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

VAN STADEN, J; FENNELL, C; TAYLOR, N. Plant stress *in vitro*: the oleo fphyto hormones. **Acta Horticulturae**. The Hague, Holanda, NL. n. 725, p. 55-62, 2006.

CAPÍTULO 2

RESUMO

Controle da contaminação na germinação *in vitro* da semente de gabirobeira (*Campomanesia* spp.)

Com o objetivo de analisar os efeitos da desinfestação na germinação *in vitro* da semente da gabirobeira (*Campomanesia* spp.) com diversas concentrações de hipoclorito de sódio, associado ao álcool etílico 70% e ao fungicida tiofanato metílico (1 g L^{-1}), foi realizado um experimento no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais do Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, no campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia-MG. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 4×3 , sendo quatro concentrações de hipoclorito de sódio (0; 1,25; 2,5 e 5%) e três tempos de imersão das sementes (1; 5 e 10 min), com quatro repetições, gerando 48 parcelas. Cada parcela foi constituída de quatro frascos de 200 mL contendo uma semente cada e 40 mL de meio MS ajustado a pH de 5,8, autoclavado a 120°C durante 20 minutos e à pressão de 1 atm, suplementado com sacarose 1,5%, utilizando a Citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) como regulador de crescimento na concentração de 1 mg L^{-1} , e solidificado com Agar a 0,7%. Os frutos foram despolpados e a mucilagem das sementes retiradas através da escarificação química do tegumento com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 48 horas. Posteriormente, as sementes foram previamente lavadas em água corrente durante 3 horas e em seguida colocadas para secar à sombra. Após o período de secagem as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% (v/v) durante 30 segundos, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada antes do contato com o hipoclorito de sódio. Em seguida, foram lavadas novamente em água destilada e autoclavadas três vezes, logo após intumescidas numa solução de fungicida a base de tiofanato metílico (1 g L^{-1}) por cinco minutos, antes de inocular foi feita lavagem com água destilada e autoclavada por três vezes. Em seguida, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento e mantido no escuro durante sete dias para evitar a oxidação. As variáveis avaliadas foram: contaminação e germinação aos 10 e 30 dias. Aos 10 dias de crescimento ocorreu menor contaminação (4,80%), com maior germinação (94%) e com o aumento na concentração de hipoclorito de sódio até 3,50%. Porém, aos 30 dias a desinfestação da semente proporcionou 100% de germinação e nenhuma contaminação, com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio até 3,33%.

Palavras-chave: recalcitrante, desinfestação, oxidação, frutas.

ABSTRACT

Control of contamination on *in vitro* germination of gabirobeira (*Campomanesia* spp.) seeds

The effects of gabirobeira (*Campomanesia* spp.) seed disinfection on *in vitro* germination was studied with several concentrations of sodium hypochlorite, associated to ethanol 70% and to the fungicide methyl thiophanate (1 g L^{-1}), in experiments done in the Laboratory of Vegetable Tissue Culture of the Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, in Umuarama campus, at the Universidade Federal de Uberlândia, in Uberlândia, MG. The experiment was completely randomized design, as a 4×3 factorial, with four sodium hypochlorite concentrations (0, 1.2, 2.5 or 5%) and three seed immersion periods (1, 5 or 10 min), with four replications. Each replication consisted of four 200-mL flasks containing 40 mL of MS medium adjusted to pH 5.8, autoclaved at 120°C for 20 min at 1 atm pressure, and amended with 1.5% sucrose, and the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) as a growth regulator at 1 mg L^{-1} , and solidified with 0.7% agar, and one seed. Gabiroba fruits were macerated to remove the mucigel, releasing the seeds by chemical scarification with sodium 0.5% hypochlorite for 48 hours. Subsequently, the seeds were rinsed in tap water for three hours, and dried in the shade. After the drying period, the seeds were taken to the laminar flow hood and immersed in ethanol 70% (v/v) for 30 seconds, rinsed three times in sterile distilled water, and disinfested with sodium hypochlorite. Subsequently, the seeds were rinsed three times in sterile distilled water and soaked in fungicide solution (methyl thiophanate at 1 g L^{-1}) for five minutes, and rinsed three more times in sterile distilled water before seeding in the medium. Seeded flasks were transferred to the growth chamber and kept in darkness for seven days to avoid oxidation. The variables analyzed were: contamination and germination after 10 and 30 days. Ten days after seeding, the smallest amount of contamination was observed (4.80%), and greater germination (94%) with increasing sodium hypochlorite concentration to 3.50%. At the 30 days evaluation, seed disinfection resulted in 100% germination and no contamination with increasing sodium hypochlorite to 3.33%.

Key words: recalcitrant, disinfection, oxidation, fruits.

INTRODUÇÃO

As frutas nativas do cerrado representam uma fonte de reserva de substâncias nutritivas necessárias à saúde humana. A germinação de sementes de frutíferas *in vitro* é uma das técnicas que pode ser utilizada para a produção de mudas ou como ponto de partida para a obtenção de explantes saudáveis para multiplicação. Por meio da germinação *in vitro* é possível ter altas taxas de produção, independente de condições climáticas, variações estacionais e de fatores bióticos, tais como agentes polinizadores, dispersores ou patogênicos (ANDRADE et al., 2000).

A principal fonte de contaminação microbiana no início da cultura *in vitro* é o explante. Segundo Cassells, (1998), quando o processo de desinfestação dos explantes é ineficiente por causa da mucilagem, as causas podem ser a inatividade do agente desinfetante, ou porque ele não atingiu a parte interna dos tecidos vegetais dos explantes, e assim, não foram atingidos os microrganismos.

Em condições gerais, a germinação *in vitro* de sementes permite a propagação em condições assépticas e controladas em qualquer época do ano, assim como a obtenção, em menor tempo, de plântulas em condições fitossanitárias apropriadas para trabalhos de cultivo *in vitro*.

Para o estabelecimento das espécies vegetais se faz necessário prevenir e controlar a contaminação microbiana por meio da desinfestação dos explantes, utilizando diversas substâncias com ação germicida.

Um dos maiores problemas do estabelecimento está relacionado com a contaminação bacteriana e fúngica; além das contaminações superficiais é freqüente encontrar contaminações no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena, mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo.

A contaminação por bactérias sucede, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas. A contaminação por fungo ocorre em virtude da deficiência na manipulação durante o subcultivo, da presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado ou da infestação por ácaros (ABREU et al., 2002). Para minimizar essas contaminações é recomendável cultivar a planta, da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas, como casas de vegetação com cobertura plástica ou salas de crescimento.

O cultivo de planta nestes ambientes permite maior controle da irrigação, da adubação, das pragas e doenças (TEIXEIRA, 2005).

Como as pesquisas atuais do cultivo *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.) são escassas, foram realizadas nesta pesquisa inicialmente diversas tentativas de propagação de vários explantes da gabirobeira, procurando escolher a melhor técnica para sua propagação *in vitro*.

Nesta pesquisa, testou-se diferentes fungicidas e várias concentrações, mais não foi possível conseguir o estabelecimento do explante. Como não foi achado um caminho positivo para controlar a contaminação dos diversos explantes testados, inclusive daqueles parcialmente controlados em casa de vegetação, foi necessário optar pela germinação *in vitro* da semente de gabirobeira (*Campomanesia* spp.), a qual apresentou um bom resultado.

Algumas sementes de espécies do cerrado apresentam comportamento recalcitrante, como a gabioba (*Campomanesia adamantium* Cambess), cagaita, mangaba e pinha do brejo. Melchior (2006) mostrou que a semente de gabioba (*Campomanesia adamantium* camb.,) é recalcitrante e que devem ser usadas para germinação sementes removidas imediatamente dos frutos.

As sementes recalcitrantes, em geral, apresentam tamanho grande e são caracterizadas por não sofrerem dessecação natural na planta-mãe ao longo do processo de maturação, sendo dispersas com elevados teores de água que, se reduzidos a um nível considerado crítico, levarão à rápida perda da viabilidade e até à morte (ROBERTS, 1973)

Para garantir a viabilidade comercial do sistema de produção de mudas de gabirobeira, é importante o desenvolvimento da técnica de cultivo *in vitro* a fim de obter-se cultivares domesticadas de boa qualidade agronômica.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar o estabelecimento *in vitro* da semente da gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em quatro concentrações de hipoclorito de sódio e três tempos de imersão, durante os períodos de dez e trinta dias, com o intuito de obter a maior quantidade de propágulos sem contaminação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para ter sucesso no estabelecimento da cultura de células, órgãos ou tecidos *in vitro* é fundamental considerar a seleção do explante (CARVALHO, 2001). Isto porque o material cultivado *in vitro* tem que estar isento de microrganismos que possam prejudicar o processo de estabelecimento. Um dos maiores problemas no estabelecimento de tecidos vegetais *in vitro* é a contaminação por microrganismos, principalmente quando se trabalha com espécies lenhosas (BONGA, 1982).

O nível de desinfestação do explante pode variar conforme o material usado. O cultivo *in vitro* é um processo importante na propagação de diferentes espécies. Na micropropagação da mangabeira destacam-se como agentes de contaminação as bactérias e os fungos, presentes em explantes obtidos de plantas adultas, que geram problema para o estabelecimento de protocolos de micropropagação (LEMOS et al., 2006).

O estabelecimento de espécies lenhosas com explantes colhidos de plantas germinadas *in vitro* é mais viável sob o aspecto fisiológico e experimental, a multiplicação ocorre com maior resposta devido a juvenilidade, gerando a condução de diversos experimentos (GRATAPAGGLIA; MACHADO, 1998).

A germinação de sementes *in vitro* é maior do que em viveiros ou casas de vegetação, devido às condições mais ajustadas aos processos de germinação e crescimento inicial da plântula (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

Teoricamente existem três técnicas para evitar a contaminação na propagação: o uso de meristemas como explantes de plantas de campo (este método não é muito prático), utilização de compostos químicos (hipoclorito de sódio, antibiótico, fungicida etc), método geralmente muito utilizado para descontaminar o explante e permitir seu estabelecimento, ou usar plantas germinadas *in vitro* para colher explantes .

A camada que envolve as sementes chamada de tegumento e o fruto chamado pericarpo possuem muita importância para evitar a desidratação das sementes após sua dispersão de forma natural, funcionando como barreira mecânica (MORENO et al., 2006). Os inibidores da germinação nos tegumentos impõem a latência fisiológica das sementes, deixando-as em estágio de baixa atividade metabólica e menos susceptíveis ao deterioro (BASKIN; BASKIN, 2000).

Os tecidos que rodeiam o embrião (endospermo e perispermo) são escassos para muitas espécies arbóreas (KAINER et al., 1999); estes tecidos podem dificultar a germinação das sementes ao atuar como barreiras mecânicas e restringir o crescimento do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994).

A qualidade fisiológica das sementes tem sido caracterizada pela germinação e pelo vigor, sendo este último definido como a soma de atributos que conferem à semente potencial para germinar, emergir e resultar rapidamente em plântulas normais sob ampla diversidade de condições ambientais (HOFS et al., 2004).

O processo germinativo requer a participação ativa da complexa maquinaria de síntese da célula, consistindo assim em uma série de enzimas, de fatores e co fatores, de reguladores hormonais, de ácidos nucléicos e de caminhos outros ainda não identificados completamente (VIEIRA, 2001).

Para que uma semente germine, é necessário que o meio forneça água suficiente, permitindo a ativação das reações químicas relacionadas ao metabolismo e, com isto, a retomada do processo do desenvolvimento do embrião (BARROS, 2006).

Dentre os fatores que regulam o processo germinativo, a presença de hormônios e o equilíbrio entre estes promotores e inibidores de crescimento exercem papel fundamental (MORAES et al., 2002).

O uso de reguladores vegetais na fase de germinação melhora o desempenho das plântulas, acelerando a velocidade de emergência e realçando o potencial das sementes de várias espécies. O uso de compostos químicos biologicamente ativos, como reguladores e estimulantes vegetais, pode cessar ou diminuir o impacto de fatores adversos na qualidade e desempenho das sementes (ARAGÃO et al., 2003).

A germinação inicia-se com a embebição e termina com a emergência. A embebição consiste na absorção de água pela semente seca, sem preocupar-se com a viabilidade desta. A emergência consiste no processo pelo qual o eixo embrionário, nas espécies dicotiledôneas, e a radícula, nas monocotiledôneas, cresce e perpassa as estruturas que o rodeiam (AZCÓN; TALON, 2003).

A absorção de água pela semente é diretamente influenciada pela presença do tegumento e sua permeabilidade. O tecido de reserva absorve umidade a uma velocidade intermediária até que ela fique totalmente hidratada. O papel do tegumento é fundamental na absorção de água pela semente, e sua permeabilidade está relacionada com a troca (BEWLEY; BLACK, 1994). O efeito do tegumento pode ser químico, com

a presença de compostos fenólicos, (SELLE et al., 1983) ou mecânico, impedindo o fluxo de água e oxigênio para que ocorra a germinação (KELLY et al., 1992).

Sob condições naturais, as sementes com coberturas muito forte na superfície germinam somente quando o tegumento é abrandado. Isto é possível devido à degradação bioquímica durante a digestão dos animais ou microrganismos que fazem parte naturalmente do ambiente que tem contato com a semente, e também ao efeito físico ao ser pisada (SÁNCHEZ et al., 1983).

Um dos procedimentos utilizados para reduzir os riscos de contaminação no estabelecimento dos explantes consiste na aplicação de fungicidas, combinados ou separados, durante o ciclo de crescimento das plantas doadoras (PEREZ, 1998).

Alguns estudos sugerem que nas plantas doadoras de *Eucalyptus grandis* mais de 50% dos fungos filamentosos que faziam parte de sua microbiota foram eliminados com a aplicação de fungicidas comerciais, combinando fungicidas preventivos de contato Mancozeb pH 8 (10 kg m^{-3}) e oxicleto de cobre (10 kg m^{-3}) com fungicida curativo de ação sistêmica Benomil pH 5 (2 kg m^{-3}) (ACOSTA et al., 2005).

Outros investigadores, com o uso do complexo carbendazimb- ciclodextrina, em concentrações variáveis, mostraram que era possível inibir o crescimento micelial dos contaminantes do cultivo *in vitro* de plantas que pertencem aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Fusarium*, *Pestalotia* e *Colletotrichum* (CRUZ et al., 2002).

Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000).

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. As mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e o de cálcio (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As combinações dos princípios ativos desinfetantes podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária a adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

Um fungicida é uma substância que mata fungos, sendo que, dependendo de sua especificidade e mecanismo de ação, alguns matam mais que outros.

Desta forma, os fungicidas estão destinados a proteger as plantas contra pragas e doenças. Esta proteção pode ser realizada de duas maneiras. Uma delas é a destruição do inóculo antes que se espalhe e forme micélio pela planta generalizando a doença

(prevenção). A outra forma, é o bloqueio da doença quando já instalada na planta, seja local ou sistêmica (terapia ou cura).

Portanto, as citocininas são compostos que, além de serem essenciais à citocinese, também promovem alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, indução de formação de órgãos, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos, retardamento da senescência de tecidos e órgãos e formação de cloroplastos (KERBAUY, 2004).

A porcentagem de germinação de sementes de mangaba em condições de viveiro, em geral, é baixa não só devido à presença de inibidores na polpa, mas também ao fato de as sementes serem recalcitrantes (LORENZI, 2000).

Neste estudo, taxas de germinação acima de 95% foram obtidas, provavelmente devido à remoção da polpa do fruto e à rápida inoculação das sementes, evitando a desidratação e mantendo sua viabilidade (LÉDO et al., 2007).

O meio MS contém concentrações relativamente altas de macronutrientes, o que favorece e explica os elevados índices de contaminação considerando a pequena exigência nutricional desses patógenos (JABOR et al. 2003).

Rizzini (1971) comenta sobre a demora na germinação de sementes de cagaiteira com tegumento intacto, e sobre a importância de eliminá-lo com a escarificação. Comenta ainda que mesmo o tegumento sendo coriáceo, ele não prejudica a absorção de umidade, porém, torna-se impermeável com a embebição, diminuindo o aporte de oxigênio ao embrião e retardando seu desenvolvimento. Desta forma, o cultivo *in vitro* dessas sementes escarificadas apresenta-se como uma alternativa de propagação da espécie e como possível fonte asséptica de explantes para experimentos posteriores de micropropagação.

Martinotto et al., (2007) trabalharam com sementes de cagaiteira desprovidas do tegumento e estas apresentaram germinação superior aos 31 dias (86,25%) e 71 dias (88,25%) de cultivo em relação às sementes intactas.

Por outro lado, o meio de cultivo influencia a germinação das sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes): os meios WPM 100% e MS com 50% da força iônica garantiram a máxima germinação (SOARES et al., 2009).

Rivero (2001) ao analisar o efeito do tipo de explante (ápice caulinar e segmentos nodais) sob o estabelecimento *in vitro* da *Annona muricata* L, observou que

a porcentagem de contaminação por fungos aumentava como tendência geral na medida em que a posição se distanciava do ápice.

De acordo com George (1993), a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal, e a resposta varia de acordo com a sensibilidade dos tecidos.

Durante a desinfestação do explante, geralmente, tem-se empregado soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) em concentrações compreendidas entre 0,50 e 5% (MARTINEZ, 1995). As soluções de hipoclorito de cálcio (CaOCl) são tão eficientes quanto as de sódio (BENERJEE, et al., 1985). Em geral, a excisão do explante é recomendada depois da desinfestação para eliminar tecidos que possam ter sido prejudicados pela solução de hipoclorito.

Durante a germinação sexuada das sementes de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), Nogueira et al., (2004) observaram que ocorrem dificuldades referentes a baixa germinação e emergência lenta das plântulas no campo.

Observaram também que frutos maduros coletados de populações naturais, dos quais sementes e embriões foram excisados e utilizados como explantes para germinação *in vitro* no meio MS e WPM (50%), sem sacarose, apresentaram 60% e 100% de emergência, respectivamente.

O cultivo *in vitro* é um procedimento significativo na propagação de diferentes espécies. No entanto, alguns problemas têm sido identificados na micropropagação da mangabeira, destacando-se dentre eles os contaminantes fúngicos e bacterianos presentes em explantes oriundos de plantas adultas, que dificultam o estabelecimento de protocolos de micropropagação (LEMOS et al., 2006).

Outro aspecto a ser considerado é que a germinação de sementes *in vitro* permite, freqüentemente, uma maior germinabilidade das sementes do que em viveiros, provavelmente porque as condições *in vitro* são mais adequadas aos processos de germinação e desenvolvimento inicial da plântula (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no dia 05/12/2011 no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais do Instituto de Ciências Agrárias-ICIAG, no campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU – localizada no município de Uberlândia-MG. Vinte matrizes de gabirobeira (*Campomanesia* spp) foram selecionadas e marcadas na Fazenda “Água Limpa” da Universidade Federal de Uberlândia- UFU - para coleta, no período de novembro e dezembro de 2011, de frutos maduros das plantas com maior vigor.

O experimento foi instalado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de hipoclorito de sódio (0; 1,25; 2,50 e 5%) e três tempos de imersão das sementes (1, 5, 10 min), com quatro repetições, gerando 48 parcelas. Cada parcela foi constituída de quatro frascos de 200 mL contendo uma semente cada e 40 mL de meio MS ajustado a pH de 5,80, autoclavado a 120 °C durante 20 minutos e à pressão de 1 atm (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 1,5%, utilizando a Citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) como regulador de crescimento na concentração de 1 mg L⁻¹, e solidificado com Agar a 0,7%.

Os frutos colhidos foram despulpados e a mucilagem das sementes retiradas através da escarificação química do tegumento com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 48 horas. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água corrente durante 3 horas e na sequência colocadas para secar à sombra.

Após o período de secagem as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em álcool etílico 70% (v/v) durante 30 segundos, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada antes do contato com o hipoclorito de sódio. Em seguida, foram lavadas novamente em água destilada e autoclavada três vezes, logo depois intumescidas numa solução de fungicida a base de tiofanato metílico (1 g L⁻¹) por cinco minutos. Antes de inocular foram lavadas com água destilada e autoclavada por três vezes.

Em seguida, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C e mantido no escuro durante sete

dias para evitar a oxidação. As características avaliadas foram: contaminação das sementes (%) e germinação das sementes (%) aos 10 e 30 dias após a inoculação.

Todos os dados foram transformados para arco seno raiz quadrada de $X/100$ (BANZATTO; KRONKA, 2006), analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008), efetuando-se análise de regressão para as concentrações de hipoclorito de sódio, teste de F, teste de Tukey ao nível de 5% de significância para o fator tempo de exposição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação aos dez dias

O resumo das análises de variância para as variáveis contaminação e germinação *in vitro* das sementes de gabirobeira em dez dias encontra-se na Tabela 1. Pode-se verificar que houve diferença significativa na contaminação e na germinação durante a desinfecção da semente *in vitro* com hipoclorito de sódio em dez dias. Para os tempos de imersão das sementes no hipoclorito na variável contaminação não houve diferença significativa, entretanto para a germinação houve diferença significativa. A interação entre os fatores (%) hipoclorito de sódio x tempo (min) não teve diferença significativa para nenhuma das características em estudo.

TABELA 1. Resumo das análises de variância para contaminação e germinação *in vitro* das sementes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em dez dias, obtidas sobre efeitos de diferentes concentrações de hipoclorito (%) em diversos tempos (min). Uberlândia-MG.2012.

Fatores de variação	GL	Quadrados médios	
		Contaminação (%)	Germinação (%)
Concentrações de hipoclorito	3	14487, 50 *	17212, 50 *
Tempo de imersão	2	229, 68 NS	1518,75 *
Hipoclorito x Tempo	6	260, 93 NS	318, 75 NS
Resíduo	36	440, 62	184, 38
CV(%)		52, 48	24, 14

NS, não significativo a 5% de probabilidade ($P > 0,05$) pelo teste de F. * significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste de F.

Na Figura 9 pode-se verificar a instalação do experimento no laboratório. A equação de regressão para a variável contaminação em níveis de hipoclorito de sódio (%) apresentou um efeito quadrático negativo significativo. Ocorreu uma tendência de redução quadrática da contaminação nas sementes de control-testemunha (90%), que foram somente imersas em fungicida tiofanato metílico (1 g L^{-1}), em comparação com as sementes que receberam o tratamento de hipoclorito de sódio. À medida que se aumentaram as doses de hipoclorito a contaminação foi reduzida até um valor mínimo de 4,80% a uma concentração

correspondente de hipoclorito de sódio de 3,01%, conforme mostra a Figura 10, com R^2 de 83%.



FIGURA 9. Germinação *in vitro* da semente de gabirobeira em função das concentrações de hipoclorito de sódio (%) durante dez dias. Uberlândia-MG. 2012.

Estes resultados mostram eficiência quando comparados aos valores próximos encontrados por Picolotto et al., (2007) na germinação das sementes de jabuticabeira (*Myrciaria* spp.), ao reduzir a contaminação a 5% em comparação com 2,5% de concentração de hipoclorito.

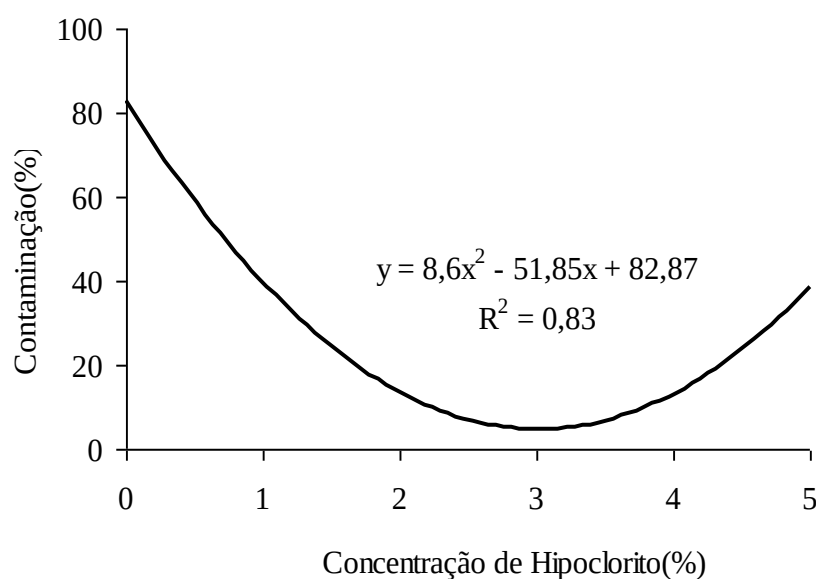


FIGURA 10. Contaminação *in vitro* das sementes de gabiropa aos 10 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG. 2012.

Logo a seguir ocorre a tendência de aumento na contaminação até 38,62 (%) na concentração de 5% do hipoclorito de sódio, depois do aumento da concentração de 3,01%. O tempo de imersão não teve efeito significativo na avaliação da contaminação

Na Figura 11, observa-se que houve um efeito quadrático positivo significativo. A equação de regressão para a variável germinação *in vitro* da gabirobeira em diferentes níveis de hipoclorito de sódio. Conforme os dados obtidos mostram uma tendência quadrática de aumento máximo na germinação da semente (94%) à medida que houve aumento na concentração de hipoclorito de sódio até 3,50% , para o R^2 de 95%, após o aumento da concentração de hipoclorito 5% ocorre redução da germinação (77,48%).

Provavelmente o efeito sinérgico das concentrações de álcool etílico (70%, 30 s), tiofanato metílico (1 g L⁻¹, 5 min) e hipoclorito de sódio reduziram a contaminação das sementes. No entanto, na desinfestação de semente de guabijuzeiro, os tratamentos de 4 e 6% de hipoclorito influenciaram positivamente a germinação, concentrações acima de 8% de hipoclorito prejudicaram a fisiologia da semente provocando efeito fitotóxico e prejudicando a germinação, como explica Souza et al., (2011).

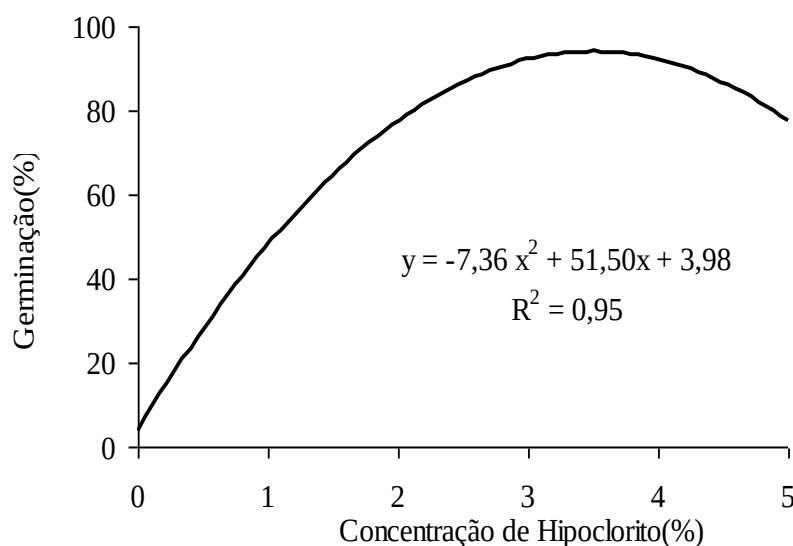


FIGURA 11. Germinação *in vitro* das sementes de gabirobeira aos 10 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG.2012.

A oxidação não prejudicou o estabelecimento da semente de gabirobeira. A estratégia de mantê-la no escuro durante os primeiros sete dias proporcionou um bom resultado.

Na Tabela 1, para a germinação *in vitro* da gabirobeira durante dez dias em diferentes níveis de tempo de imersão das sementes (1; 5; e 10 min) no hipoclorito de sódio, verifica-se que houve uma diferença significativa entre os tratamentos de imersão.

Como mostra a Figura 12, durante os tratamentos de 5 e 10 minutos não houve diferença significativa e nota-se que ocorreu maior germinação *in vitro* em comparação com 1 minuto de imersão. O maior tempo de imersão (5 e 10 min) na solução em dez dias foi favorável a uma maior germinação.

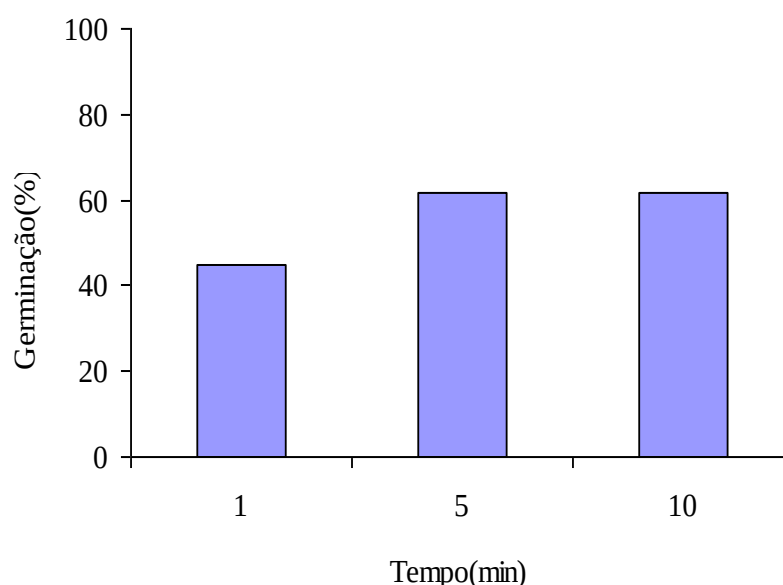


FIGURA 12. Germinação das sementes de gabiropa aos 10 dias em função dos diferentes tempos de imersão na solução de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG.2012.

De acordo com Emmanuel et al.,(2004), o hipoclorito de sódio é um potente agente oxidante, possui um amplo espectro de atividade como biocida contra bactérias, fungos e vírus, além de ser mais econômico. O hipoclorito de sódio provoca alterações no metabolismo celular dos vegetais, destruindo fosfolipídios e formando cloraminas.

Provavelmente a ação do hipoclorito pode ter contribuído para o aumento da porcentagem de germinação ao facilitar a entrada de nutrientes e oxigênio no embrião da semente de gabiropa. Conforme explica Rocha (2005), o hipoclorito de sódio é um poderoso oxidante, e sua ação resulta em alterações nas propriedades das membranas

celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente, aumentando, dessa forma, a porcentagem de germinação.

4.2 Avaliação aos 30 dias

O resumo das análises de variância para as variáveis contaminação e germinação *in vitro* das sementes de gabirobeira aos 30 dias encontra-se na Tabela 2. Pode-se verificar que houve uma diferença significativa na contaminação e na germinação durante a desinfecção da semente *in vitro* com hipoclorito de sódio. Para os tempos de imersão das sementes no hipoclorito, nas variáveis analisadas, não houve diferença significativa. A interação entre os fatores % hipoclorito de sódio x tempo (min) não provocou diferença significativa para nenhuma das características em estudo. A Figura 13 mostra a instalação do experimento.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para contaminação (%) e germinação (%) *in vitro* das sementes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em 30 dias, obtidas sobre efeitos de diferentes concentrações de hipoclorito (%) em diversos tempos de imersão (min). Uberlândia-MG. 2012.

Fatores de variação	GL	Quadrados médios	
		Contaminação	Germinação
Concentração de hipoclorito	3	15856,25 *	21917,00 *
Tempo de imersão	2	393,75 NS	314,06 NS
Hipoclorito x Tempo	6	368,75 NS	101,56 NS
Resíduo	36	428,12	98,44
CV(%)		58,08	15,49

NS, não significativo a 5% de probabilidade ($P > 0,05$) pelo teste de F. * Significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste de F.

Ao observar-se a Figura 14, verifica-se que a contaminação sofreu um efeito quadrático significativo negativo para uma equação de regressão com R^2 de 88%, reduzindo-se a contaminação de 90% na testemunha de controle a um valor mínimo de (0 %), na medida que a concentração de hipoclorito de sódio aumentou até um valor de 3,26%, e aumentando a partir daí até a concentração de 5% de hipoclorito. Na Figura 15 vê-se que a germinação apresentou um efeito quadrático positivo, com R^2 de 87%, ocorreu aumento da germinação em um valor “máximo” de 100% à medida que aumentou a concentração de hipoclorito de sódio (3,33%), a partir daí iniciou-se o declínio da

germinação até a concentração de hipoclorito de sódio (5%). Conforme mostra a Figura 14, ocorreu aumento da contaminação a partir da concentração de hipoclorito de sódio (3,26%).



FIGURA 13. Germinação *in vitro* da semente de gabirobeira em 30 dias sobre efeito de hipoclorito de sódio, Uberlândia - MG. 2012.

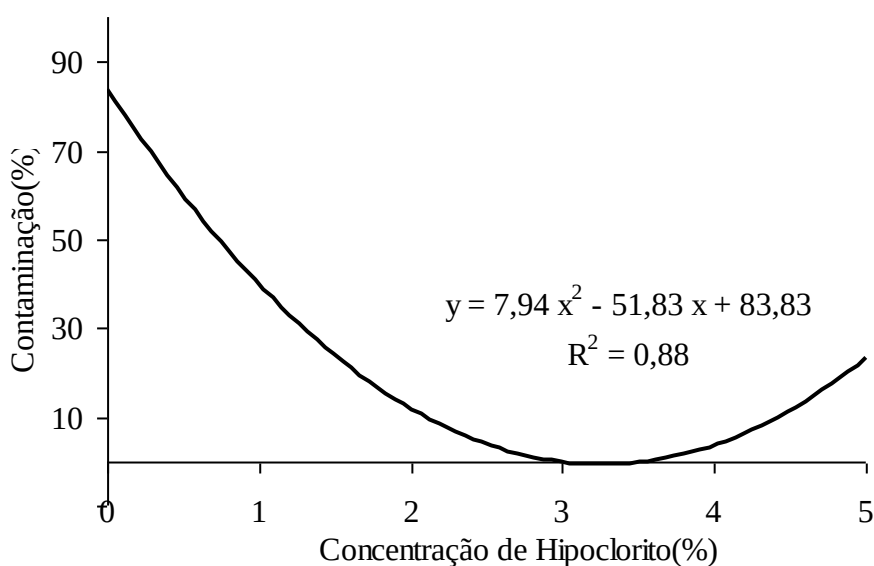


FIGURA 14. Contaminação *in vitro* das sementes de gabiropa aos 30 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Uberlândia-MG. 2012.

Observa-se nas Figuras 14 e 15 que ocorre uma relação inversamente proporcional, entre a contaminação e a germinação. À medida que aumenta a germinação aos 30 dias, a

contaminação é reduzida para o mesmo valor em média de efeito da concentração de hipoclorito de sódio (3,33%).

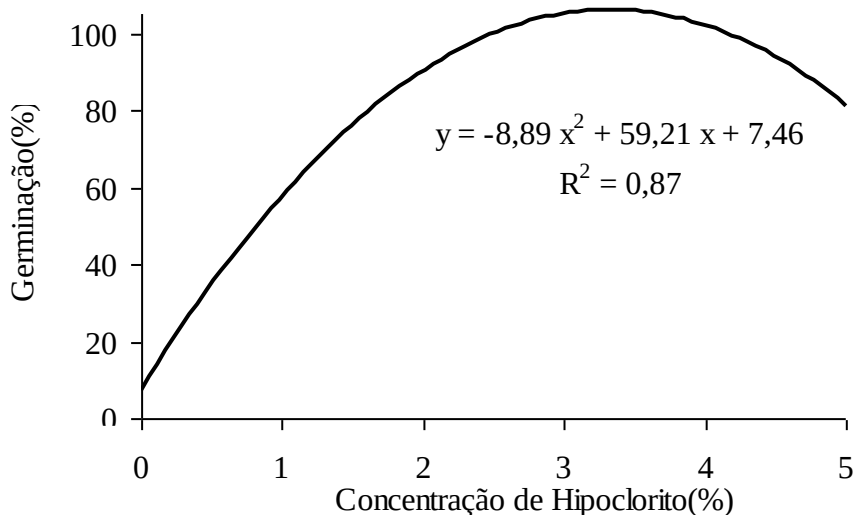


FIGURA 15. Germinação *in vitro* das sementes de gabioba aos 30 dias em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio Uberlândia-MG.2012.

A presença de concentração baixa de reguladores de crescimento como a citocinina BAP (1 mg L^{-1}), no meio MS suplementado com sacarose 1,5%, facilitou, conforme mostra a Figura 13, a embebição e a germinação de sementes.

Segundo Soares et al., (2009), a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura foi importante na regulação da germinação, e a maior percentagem de germinação de sementes de mangabeira foi possível pelo uso do meio MS/2 (50% de meio básico) em relação ao MS completo (100%).

Provavelmente isto foi devido à diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações dos macro e micro nutrientes do meio referido. Vale para este trabalho sobre a gabioba a observação de Nogueira et al., (2004) de que o meio sem acréscimo de sacarose é o mais adequado para germinação *in vitro* ou que coincide com a estratégia de suplementar o meio MS somente com 15 g L^{-1} de sacarose, conforme feito nesta experiência.

5 CONCLUSÕES

Durante o período de dez dias o crescimento no meio MS utilizado e a desinfestação realizada proporcionou maior germinação e menor contaminação *in vitro* da gabirobeira, para os tempos de imersão da semente no hipoclorito aos 5 e 10 min.

O uso de Hipoclorito de sódio possibilitou maior % de germinação e menor% de contaminação *in vitro* da gabirobeira durante a avaliação realizada nos períodos de 10 e 30 dias.

O meio MS suplementado com sacarose 15 g L⁻¹, BAP (1 mg L⁻¹) e a desinfestação proporcionada pelo álcool etílico (70%), tiofanato metílico (1 g L⁻¹) e hipoclorito de sódio proporcionaram um maior nível de germinação *in vitro* da gabirobeira no período de 10 e 30 dias.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A.; SANTOS, L. de F.; SOUZA, G. A. B. de; MENDES, R. A. O uso de benomil em cultura de tecidos. In: ENCONTRO DE TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 7., Brasília, DF. **Anais de Resumos...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 7, 2002, 28 p.
- ACOSTA, M.; ALVARADO, Y.; CRUZ, M.; LEIVA, M.; DELGADO, L. Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de *Eucalyptus grandis*. **Manejo integrado de plagas y agroecología**, Turrialba, Costa Rica, CR, n. 75, p. 60-63, 2005.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**. Lavras: v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARAGÃO, C. A. et al. Atividade aminolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 25, n. 1, p. 43-48, 2003.
- AZCÓN, J. B.; TALÓN, M. **Fundamentos de fisiologia vegetal**. 3ª edición. McGraw-Hill Interamericana, 2003, 450 p.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal, 4ª edição, Funep, SP, 2006, 237 p.
- BARROS, T. F. **Ação de giberelina líquida na germinação de sementes**, vigor de plântulas e crescimento inicial de plantas. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2006.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. Ecology and evolution of specialized seed dispersal, dormancy and germination strategies. 2, **Plant Species. Biology, Issue**. New York, US, p. 95-96, 2000.
- BENERJEE, N.; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Meristem. T. P. Culture of Musa. Histo-morphological studies of shoot bud proliferation. In: WITHERS, L. A. and ALDERSON P. G. (Eds.) **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butter worth's, p. 139-147, 1985.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994, 445 p.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.) **Tissue culture in forestry**. 2nd ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 4-35, 1982.
- CARVALHO, J. M. F. C. **Manual do laboratório de cultivo de tecido**. Campina Grande: Embrapa Algodão. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 46), 2001, 33 p.

CASELLS, A. C. *In vitro* production of pathogen and contaminant-free plants. In: ALTMAN, A. (Ed.) **Agricultural biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 43-56, 1998.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. de P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia Macrophilla King*). **Revista Arvore**, Viçosa, v.28, n. 005, p. 633-642, 2004.

CRUZ, M.; ACOSTA, M.; LEIVA, M.; ALVARADO, Y.; LEZCANO, M. Evaluación del efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos. Contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. **Biotecnología Vegetal**, v. 2, n. 2, p. 73-76. 2002. [S.l.]

EMMANUEL, E; KECK, G; BLANCHARD, J; VERMANDE, P; PERRODIN Y. Toxicological effects of disinfection using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Cumbria, v. 30, p. 891-900, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Edington: Exegetics Limited. (v.1), 1993, 574 p.

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

HÖFS, A. et al. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta á qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 92-97, 2004.

JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; RODRIGUES, S. B.; MARQUES-SILVA, G. G.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta. Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 8, p. 497-501, julho, 2003.

KAINER, K.; DURYEAA, M.; MALAVASI, M.; SILVA, E. R. DA.; HARRISON, J. Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, NL, n. 116, p. 207-217, 1999.

KELLY, K. M.; STADEN, J. V.; BELL.; W. E. Seed coat structure and dormancy. **Plant Growth Regulation**. New York, US, n. 11, p. 201-209, 1992.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

LÉDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios

de germinação *in vitro*. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v.31, n.4, p. 989-993, 2007.

LEMOS, E. E. P. de; COSTA, M. A. P. de C.; ALOUFA, M. A. I.; LEDO, A. da S. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LEDO, A. da S. (Eds.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, 2000, 352 p.

MARTÍNEZ, S. Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo *in vitro* e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa* sp). **Centro Agrícola**, Santa Clara, Cuba, CU, v. 19, n. 2-3, p. 93-96, 1995.

MARTINOTTO, C; PAIVA, R.; SANTOS, B. G.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciênc. agrotec.** v.31 n. 6, Lavras, 2007.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* camb. – myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p.141-150. 2006.

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

MORAES, C. R. A.; MODOLO, V. A.; CASTRO, P. R. C. Fisiologia da germinação e dominância apical. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. (Eds.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: UEM, p. 159-178. 2002.

MORENO, F.; PLAZA, G.; MAGNITSKIY, Y. S. Efecto de la testa sobre la germinación en semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). **Agron. Colomb.** 25 (1), 290-295, 2006. [S.]

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-479, 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H. de; VIEIRA, V. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 109-120, 2004.

PÉREZ, J. N. **Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología**. Santa Clara, Cuba: Editorial GEO, 1998, 390 p.

PICOLOTTO, L. et al. Efeito do hipoclorito, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2007.

RIVERO, G.; RAMÍREZ, M.; LEÓN, S. Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.), **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, Maracaibo, Venezuela, v. 18, p. 258-265. 2001.

RIZZINI, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do Cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3., 1971, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: E. Blucher, p. 61-64. 1971.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, Suíça, CH, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SÁNCHEZ, B. **Factores que influyen en la fisiología de germinación de la *Urtica urens* L.** Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1983.

SOARES, F.P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA 3 e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1847-1852, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v33nspe/25.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2011.

SOUZA, L. de S.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.3, p. 691- 697, 2011.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.

VIEIRA, E. L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oriza sativa* L.)**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001, 122 p.

CAPÍTULO 3

RESUMO

Utilização de antioxidantes no controle da oxidação na micropropagação de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) obtidos de plântulas de sementes germinadas *in vitro*

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes antioxidantes na oxidação, durante a micropropagação de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) obtidos de plântulas de sementes germinadas *in vitro*. O experimento foi conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia-MG. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 5 repetições, totalizando 25 parcelas, sendo cada parcela constituída de 4 frascos e um explante / frasco. Os tratamentos foram: MS no claro; MS no escuro, 15 dias; MS + PVP (1 g L⁻¹); MS + carvão ativado (3 g L⁻¹); MS + ácido ascórbico (100 mg L⁻¹). O meio foi suplementado com sacarose 1,5% e com BAP (1 mg L⁻¹), solidificado com agar a 0,7%. Ao final do trabalho foram analisadas as seguintes características: oxidação (%), em 15 dias e número de brotos em 30 dias. Obtiveram-se os seguintes resultados: para a característica oxidação (%), não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo o meio MS + PVP o menos oxidante. Já para o número de brotos ocorreu diferença significativa entre os tratamentos com substâncias antioxidantes e a presença ou ausência de luz, sendo que nos tratamentos MS + PVP, MS + carvão ativado, MS + ácido ascórbico e MS no escuro não houve diferença significativa. Portanto, os tratamentos MS + PVP e MS + carvão ativado, apresentam-se como melhores alternativas para controlar a oxidação e gerar maior número de brotos dos explantes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) na sua propagação *in vitro*.

Palavras-chave: antioxidante, brotação, regulador, carvão ativado.

ABSTRACT

Use of antioxidants to control oxidation in micropropagation of gabirobeira (*Campomanesia* spp.) nodal segments, obtained from seed plantlets germinated *in vitro*

This study evaluated the effect of different antioxidants on oxidation, during the micropropagation of nodal segments of gabirobeira (*Campomanesia* spp.) plantlets obtained from *in vitro* germinated seeds. The experiment was done in the Laboratory of Vegetable Tissue Culture at the Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. The experimental design was completely randomized, with 5 treatments, and 5 replications, and each experimental unit consisted of 4 flasks containing one explant each. The treatments were: MS under lighting, MS in darkness for 15 days, MS + PVP (1 g L^{-1}), MS + activated charcoal (3 g L^{-1}), MS + ascorbic acid (100 mg L^{-1}). The medium was amended with 1.5% sucrose and with BAP (1 mg L^{-1}), solidified with 0.7% agar. At the end of the experiment the following characteristics were analyzed: oxidation (%) after 15 days and number of sprouts after 30 days. The following results were obtained: no significant differences were observed for oxidation among the treatments, and the medium MS + PVP was the least oxidizing. In contrast, significant differences were found for the number of sprouts among the anti oxidant substances and the presence or lack of light, and the treatments MS + PVP, MS + activated charcoal, MS + ascorbic acid, and MS in darkness were similar to each other. Therefore, the treatments MS + PVP and MS + activated charcoal are the best alternatives for controlling oxidation and generating more sprouts in the explants of gabirobeira (*Campomanesia* spp.) *in vitro* propagation.

Key words: anti oxidant, shoots, regulator, active charcoal.

INTRODUÇÃO

A gabirobeira (*Campomanesia* spp.) é uma espécie frutífera do cerrado que ganha destaque devido a sua importância social, econômica e comercial. Os problemas encontrados na propagação valorizam a pesquisa *in vitro* para a produção de mudas domesticadas. A germinação *in vitro* de sementes facilitou estabelecer plântulas em condições assépticas e controladas.

A oxidação do explante na fase de estabelecimento das frutíferas lenhosas é considerado um dos problemas mais difíceis relacionados com a propagação *in vitro* das frutíferas do cerrado pertencente à família das Myrtaceae (FACHINELLO et al., 2005).

A gabirobeira propaga-se por meio de sementes, mergulhia e mudas extraídas da touceira. Há, no entanto, poucas pesquisas relativas à sua propagação *in vitro*. Sua propagação comercial apresenta dificuldades relacionadas à recalcitrância, contaminação microbiana e oxidação fenólica.

A oxidação fenólica é fortemente influenciada pela espécie, genótipo e tipo do explante utilizado. Em geral, essa oxidação representa um dos mais sérios problemas, especialmente na fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas. Menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação ou a adição de compostos antioxidantes, como cisteína, ácido ascórbico e adsorventes, como carvão ativado e PVP, podem ser decisivos na prevenção à oxidação, que é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (TEIXEIRA, 2005).

O forte escurecimento na região do corte do explante, ocasionado pela oxidação de compostos fenólicos, pode dificultar o crescimento de algumas espécies, como a gabirobeira. A presença de compostos fenólicos nos tecidos inicia reações com oxigênio, produzindo compostos tóxicos no tecido.

Os problemas encontrados na propagação valorizam a pesquisa *in vitro* na produção de mudas domesticadas. A germinação *in vitro* de sementes facilita estabelecer plântulas em condições assépticas e controladas. Entretanto, para o estabelecimento das frutíferas lenhosas se faz necessário controlar preventivamente o problema relacionado à oxidação fenólica. Este experimento teve como objetivo avaliar os diferentes antioxidantes na oxidação durante a micropropagação de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) obtidos de plântulas de sementes germinadas *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A oxidação é um processo químico por meio do qual um átomo, ou grupo de átomos, perde um ou mais elétrons (oxida) e os cede a outro átomo (considerado reduzido). O escurecimento de tecidos cultivados *in vitro* se define como oxidação por radicais livres de diferentes componentes celulares, sendo que a maioria dos radicais livres se produzem a partir do metabolismo do oxigênio e são denominados espécies reativas de oxigênio - ROS (AZOFEIFA, 2009).

O fenômeno de escurecimento ocorre por ação de enzimas tipo oxidases e tirosinases, liberadas ou sintetizadas quando os tecidos sofrem lesões. As enzimas atuam sobre os polifenóis e a tirosina formando quinonas com potencial fitotóxico. As quinonas podem polimerizar-se afetando as proteínas e conseqüentemente inibindo o crescimento e a viabilidade dos explantes (READ; ECONOMOU, 1987).

Segundo Azofeifa (2009), existem diversas estratégias para evitar a oxidação. Dentre elas, menciona-se a seguir: uso do explante em estágio juvenil, crescimento do explante sob baixa luminosidade ou no escuro, crescimento do explante em temperaturas baixas, cultivo em meio líquido, subcultivos frequentes, uso de adsorventes na preparação do explante para seu cultivo ou no meio de cultivo, uso de antioxidantes na preparação do explante para seu cultivo ou no meio de cultivo, escolha do meio de cultivo, escolha dos reguladores de crescimento, mudança do potencial osmótico, pH do meio de cultivo baixo e inativação de enzimas.

Peñuela et al., (1988) comentam sobre o uso de água corrente de 14 a 24 horas para remoção de compostos fenólicos produzidos por sementes de *Corylus* sp. e *Juglans* sp., respectivamente, antes de sua desinfecção ou como pré-tratamento de explantes.

A oxidação fenólica tem sido controlada em diferentes espécies lenhosas pela redução da intensidade luminosa, pela diminuição na concentração de sais no meio de cultura e notadamente pela adição de antioxidantes ao meio (CALDAS et al., 1998).

Em determinadas situações utiliza-se a imersão e agitação do explante em água destilada estéril, com ou sem antioxidante, durante um certo tempo antes do cultivo definitivo (GEORGE, 1996).

Grattapaglia e Machado (1998) sugerem, para controlar a oxidação, as seguintes alternativas: lavagem de explantes antes da desinfestação em água corrente, lixiviando os compostos fenólicos; utilização de antioxidantes: ácido ascórbico,

polivinilpirrolidone (PVP) e carvão ativado (CA); incubação inicial dos explantes no escuro.

A adição de carvão ativado ao meio de cultivo pode ser usada para remover os compostos fenólicos, evitando o deterioro do explante. O efeito positivo do seu uso se deve a sua capacidade de remover substâncias tóxicas ou inibitórias que são produzidas no autoclavado do meio ou liberadas pelo explante. As concentrações de carvão ativado verificadas na literatura oscilam de 0,50 a 10 g L⁻¹, sendo 2 e 3 g L⁻¹ as doses mais utilizadas.

O emprego de carvão ativado favoreceu o desenvolvimento e enraizamento de plantas de mangabeira (*H. speciosa*) germinadas em tubos de ensaio nos experimentos realizados por Ledo et al., (2007). O carvão ativado é também muito utilizado na cultura *in vitro* de diferentes tipos de palmeiras que apresentam problemas com oxidação.

O PVP é uma poliamida muito usada atualmente na técnica da cromatografia gasosa, como adsorvente de compostos ácidos, aromáticos, aldeídos e fenóis. Esta substância tem sido administrada como tratamento do explante no momento de sua remoção da planta doadora (AMIN; JAISWAL, 1988) ou como pré-tratamento anterior ou posterior ao processo de desinfestação (FIGUEREDO et al., 2001).

O PVP geralmente é adicionado ao meio de cultura em concentrações que oscilam de 0,01 a 4%, porém adição a 1 g L⁻¹ não foi eficiente para o controle de oxidação em explantes de coqueiro *Cocos nucifera* L. (SIQUEIRA; INOUE, 1991).

Segundo George (1996) a oxidação do explante pode ser evitada ou reduzida se este é seccionado de plantas doadoras que cresceram de forma estioladas ou sob obscuridade total.

Zavaleta et al.,(2007) comentam que em dias com alta irradiação, a energia luminosa recebida pelos cloroplastos é maior que a necessária para fixação de CO₂ durante a fotossíntese, sendo o excesso de energia captado por aceptores de elétrons alternados, que estimulam a formação de ROS.

De acordo com Melo et al., (2001) o ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação (3,37%) e o que proporcionou a maior porcentagem de germinação (93,30%) dos embriões de guarirôbeira, seguido pelo carvão ativado (7,09% de oxidação e 90,45% de germinação).

O ácido ascórbico, entretanto, apresenta vantagens em relação ao carvão ativado, tais como: manuseio prático, não precipita e facilita a visualização do explante *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Agrárias-ICIAG, no campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU – localizada no município de Uberlândia-MG. Vinte matrizes de gabirobeira (*Campomanesia* spp) foram marcadas na Fazenda “Água limpa”, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU-, para coleta de frutos maduros das plantas com maior vigor.

Os frutos foram despulpados e a mucilagem das sementes retiradas através da escarificação do tegumento com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 48 horas. Posteriormente, as sementes foram previamente lavadas em água corrente durante 3 horas e em seguida colocadas para secar à sombra. Após o período de secagem, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% (v/v) durante 30 segundos, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada antes do contato com o hipoclorito de sódio.

Em seguida foram lavadas novamente em água destilada e autoclavada três vezes e logo depois intumescidas numa solução de fungicida a base de tiofanato metílico (1 g L⁻¹) por cinco minutos. Antes de inocular foram lavadas com água destilada e autoclavada por três vezes. Na sequência, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C e mantido no escuro durante sete dias. Após a germinação *in vitro* das sementes e crescimento das plântulas propagadas, foram colhidos explantes de segmentos nodais para este experimento.

O experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado, tendo-se como tratamentos cinco antioxidantes, cinco repetições, totalizando 25 parcelas, sendo cada parcela constituída de quatro frascos, e um explante / frasco. Os tratamentos foram: MS no claro; MS no escuro, 15 dias; MS+ PVP (1 g L⁻¹); MS + carvão ativado (3 g L⁻¹); MS + ácido ascórbico (100 mg L⁻¹).

O meio MS foi suplementado com sacarose 1,5% e com BAP (1 mg L⁻¹), solidificado com agar a 0,7%. Depois da inoculação, o material foi mantido na sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C, Figura 16 .

Ao final do trabalho foram analisadas as seguintes características: oxidação (%), em 15 dias e número de brotos em 30 dias. Os dados foram transformados por arco seno raiz quadrada de $X/100$ e raiz quadrada de X (BANZATTO; KRONKA, 2006) e analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999), efetuando-se teste de Tukey a 0,05 de significância pelo teste de F para os tratamentos.



FIGURA 16. Apresentação do experimento com antioxidantes na sala de crescimento, Uberlândia-MG. 2012.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância para as características oxidação e número de brotos de segmentos nodais da gabirobeira *in vitro* é mostrado na Tabela 3. Observa-se que não houve diferença significativa para a característica oxidação (%) analisada nos tratamentos; já para a variável número de brotos, houve diferença significativa.

TABELA 3. Resumo das análises de variância para oxidação (%) e número de brotos de segmentos nodais de gabirobeira cultivados *in vitro* submetidos a diferentes meios de MS combinados com antioxidantes. Uberlândia- MG. 2012.

Fatores de variação	GL	Quadrados médios	
		Oxidação	Número de brotos
Tratamentos	4	166,50 NS	0,09 *
Resíduo	20	454,50	0,02
CV(%)		77,24	15,04

NS, não significativo a 5% de probabilidade ($P > 0,05$) pelo teste de F. *significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste de F.

A Tabela 4 mostra os seguintes resultados: para a característica oxidação (%), não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que o meio MS + PVP é o menos oxidante. Já para o número de brotos ocorreu diferença significativa entre os tratamentos de substâncias antioxidantes e a presença e ausência de luz, sendo que nos tratamentos MS+ PVP, MS + carvão ativado, MS + ácido ascórbico e MS no escuro não houve diferença significativa.

Amin e Jaiswal (1988), estudando a propagação de segmentos nodais de goiabeira, observaram excessiva oxidação fenólica, causando necrose dos explantes e sua morte em 4 dias. O problema foi resolvido na fase de estabelecimento, agitando-se os explantes em uma solução de PVP concentrada a 0.5% e realizando lavagem com uma solução de antioxidante formada por ácido cítrico e ascórbico.

Segundo Costa et al., (2006) a adição de carvão ativado (3 g L^{-1}) ao meio de cultura MS reduz significativamente a taxa de multiplicação e o nível de oxidação de brotações de bananeira, cultivar Grande Naine, enquanto as brotações mais altas, vigorosas e com maior número de raízes são obtidas em meio MS acrescido de carvão ativado. Observou-se neste experimento que a multiplicação com carvão ativado facilita o crescimento de raízes.

TABELA 4. Porcentagem de oxidação (%) e número de brotos do explante de segmentos nodais de gabirobeira em função dos tratamentos de antioxidantes. Uberlândia-MG. 2012.

Tratamento com antioxidantes	Oxidação	Número de brotos
MS no claro	27,00 a	0,82 b
MS no escuro	36,00 a	0,97 a b
MS+ PVP	21,00 a	1,14 a
MS + Carvão ativado	24,00 a	1,14 a
MS + Ácido ascórbico	30,00 a	1,03 a b
CV (%)	77,24	15,04

Médias seguidas por letras distintas, e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Neste trabalho, como se verifica na Figura 17, para a variável número de brotos, o meio MS com carvão ativado e o PVP foram os antioxidantes que se comportaram de forma mais eficaz, seguido pelo ácido ascórbico.

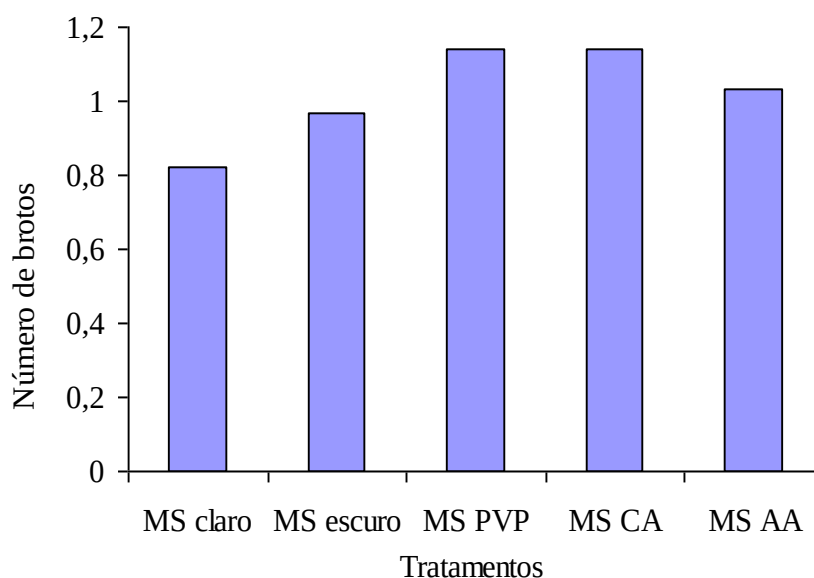


FIGURA 17. Número de brotos do explante de segmentos nodais de gabirobeira em função dos tratamentos de antioxidantes. Uberlândia-MG. 2012.

Devido ao fato do carvão ativado ser mais econômico optou-se pela multiplicação in vitro com este antioxidante, Figura 18



FIGURA 18. Propagação in vitro de segmentos nodais de gabirobeira utilizando-se carvão ativado como antioxidante. Uberlândia-MG. 2012.

5 CONCLUSÕES

Os tratamentos MS+ PVP e MS + Carvão ativado apresentam-se como melhores alternativas para controlar a oxidação dos segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) na sua propagação *in vitro*.

Os tratamentos MS+ PVP e MS + Carvão ativado proporcionaram o maior número de brotos de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) na sua propagação *in vitro*.

No tratamento MS no escuro ocorreu maior número de brotos de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em comparação com o tratamento MS no claro.

REFERÊNCIAS

- AMIN, M. N.; JAISWAL, V. S. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 36, p. 89-95, 1988.
- AZOFEIFA, A. Problemas de oxidação e escurecimento de explantes cultivados *in vitro*. **Agronomia Mesoamericana**, San José, Costa Rica, v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, p. 87-132, 1998.
- COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand naine (aaa). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- FACHINELLO, J. C. ; HOFFMANN, A. ; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 221, 2005.
- FERREIRA, D. F. **Sistema Para Análise De Variância Para Dados Balanceados (SISVAR)**. Lavras: UFLA, 1999. 92 p.
- FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) BAILL. **In vitro Cellular and Development Biology Plant**, Wallingford, v. 37, p. 471-475, 2001.
- GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture: in Practice**. Part 2. Exegetics, Westbury, UK, 1996, 1361 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA- CNPq, p.183-260, 1998.
- LEDO, A.S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 5, n. 4, p. 989-993, 2007.
- MELO, B. de et al. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento de plântulas na cultura *in vitro* de embriões da Guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.
- PEÑUELA, R.; GARAVITO, C.; SANCHEZ-TAMES, R.; RODRÍGUEZ, R. Multipleshoot - but stimulation and rhizogenesis of embryogenic and juvenile explants of walnut. **Acta Horticulturae**, The Hague, Holanda, NL. v. 227, p. 457- 459, 1988.

READ, P.; ECONOMOU, A. Stock plant influence on tissue culture success. **Acta Horticulturae**, The Hague, Holanda, NL. v. 212, p. 111. 1987.

SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M.T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n.7, p. 949-953, 1991.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa – **Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, 2005.

ZAVALETA-MANCERA, H.; LÓPEZ-DELGADO, H.; LOZA-TAVERA, H.; MORA-HERRERA, M.; TREVILLA-GARCÍA, C.; VARGAS-SUÁREZ, M.; OUGHAM, H. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, Alemanha, DE, v. 164, p. 1572-1582, 2007.

CAPÍTULO 4

RESUMO

Desenvolvimento da plântula de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) *in vitro* em meio MS com BAP

Com o objetivo de analisar o desenvolvimento da plântula de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) *in vitro* em meio MS com BAP, durante a desinfestação em diversas concentrações de hipoclorito de sódio, associado ao álcool etílico (70%) e ao fungicida tiofanato metílico (1 g L⁻¹), foi realizado um experimento no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia-MG. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de hipoclorito de sódio (0; 1,25; 2,5 e 5%) e três tempos de imersão das sementes (1; 5 e 10 min), com quatro repetições, e 48 parcelas. Cada parcela foi constituída de quatro frascos de 200 mL contendo uma semente cada e 40 mL de meio MS ajustado a pH de 5,8, autoclavado a 120 °C durante 20 minutos e à pressão de 1 atm, suplementado com sacarose 1,5%, utilizando a Citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) como regulador de crescimento na concentração de 1 mg L⁻¹, e solidificado com Agar a 0,7%. Os frutos foram despolpados e a mucilagem das sementes retirada através da escarificação química do tegumento com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 48 horas. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água corrente durante 3 horas e em seguida colocadas para secar à sombra. Após o período de secagem as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em álcool etílico 70% (v/v) durante 30 segundos, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada antes da imersão no hipoclorito de sódio. Em seguida, foram lavadas novamente em água destilada e autoclavada três vezes, logo a seguir intumescidas numa solução de fungicida a base de tiofanato metílico (1 g L⁻¹) por cinco minutos, antes de inocular foi feita lavagem com água destilada e autoclavada por três vezes. Em seguida, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento e mantido no escuro durante sete dias para evitar a oxidação. As características avaliadas foram: número médio de brotos, número médio de folhas e altura de plantas (mm), realizadas aos 60 dias de idade da plântula de gabirobeira. Conforme os dados coletados mostraram, o efeito da concentração de hipoclorito (3,6%) em sinergia com álcool, e fungicida, aliado à presença de BAP (1 mg L⁻¹) no meio MS, influenciaram de forma ótima o estabelecimento fisiológico das plântulas aos 60 dias, com número médio de brotos, número de folhas e altura máxima das plantas obtidos (1,4; 5,52; 17,67 mm), independentemente do tempo de imersão. Isto promoveu boas condições na multiplicação *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.)

Palavras-chave: crescimento, desinfestação, estabelecimento.

ABSTRACT

Development of gabirobeira (*Campomanesia* spp.) plantlets from *in vitro* germinated seed in MS medium amended with BAP

Gabirobeira (*Campomanesia* spp.) development *in vitro* in MS medium amended with BAP was studied after disinfestation with several concentrations of sodium hypochloride associated with ethanol (70%) and the fungicide methyl thiophanate (1 g L^{-1}), in the Vegetable Tissue Culture laboratory at the Universidade Federal de Uberlândia, in Uberlândia, MG. The experimental design was completely randomized, as a 4×3 factorial, with four concentrations of sodium hypochloride (0, 1.25, 2.5 and 5%) and three seed immersion periods (1, 5 or 10 min), with four replications. Each experimental unit consisted of four 200-mL flasks containing 40 mL of MS medium adjusted to pH 5.8, autoclaved at 120°C for 20 min at 1 atm pressure, and amended with 1.5% sucrose, and the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) as a growth regulator at 1 mg L^{-1} , and solidified with 0.7% agar, and one seed. Gabiroba fruits were macerated to remove the mucigel, releasing the seeds by chemical scarification with sodium 0.5% hypochloride for 48 hours. Subsequently, the seeds were rinsed in tap water for three hours, and dried in the shade. After the drying period, the seeds were taken to the laminar flow hood and immersed in ethanol 70% (v/v) for 30 seconds, rinsed three times in sterile distilled water, and disinfested with sodium hypochloride. Subsequently, the seeds were rinsed three times in sterile distilled water and soaked in fungicide solution (methyl thiophanate at 1 g L^{-1}) for five minutes, and rinsed three more times in sterile distilled water before seeding in the medium. Seeded flasks were transferred to the growth chamber and kept in darkness for seven days to avoid oxidation. Sixty days after transfer to the medium the following variables were evaluated: average number of shoots, average number of leaves, and plantlet height (mm). According to the results, the effect of sodium hypochloride (3.6%) associated with ethanol and fungicide, and the presence of BAP (1 mg L^{-1}) in the MS medium, positively affected plantlet establishment after 60 days, as seen by the average number of shoots and leaves, and plantlet height (1.4, 5.52, and 17.67 mm, respectively), regardless of immersion period, promoting good conditions for *in vitro* multiplication of gabirobeira (*Campomanesia* spp.).

Key words: development, disinfestation, establishment.

INTRODUÇÃO

A gabirobeira é uma frutífera tropical muito apreciada pelas populações do bioma cerrado. Segundo Teixeira et al., (2005), ela apresenta grande possibilidade de ser introduzida ao cultivo, principalmente por ser de porte pequeno e entrar em consórcios com outras frutíferas arbóreas. O método mais utilizado para sua propagação ainda é via sementes, existindo poucas pesquisas sobre a propagação via vegetativa.

Pesquisas vêm sendo realizadas visando a propagação sexuada desta espécie com resultados bastante satisfatórios (CARMONA et al., 1994; MELCHIOR et al., 2006, PEIXOTO et al., 2005). Entretanto, o desenvolvimento muito lento das plântulas, associado à intensa predação dos frutos, representam limitação ao cultivo da gabirobeira (LEITÃO FILHO; MARTINS, 1981).

Uma maneira simples de se obter explantes sem contaminantes para trabalhos de cultura de tecidos, é retirá-los de plântulas germinadas *in vitro*, em condições assépticas. A propagação da gabirobeira por métodos tradicionais – via semente - é dificultada pelo fato de suas sementes apresentarem características recalcitrantes, além de possuírem alta variabilidade genética.

Embora a variabilidade seja importante para programas de melhoramento, não é interessante para o cultivo econômico e racional da cultura. Diante disto, é de fundamental importância desenvolver métodos de propagação vegetativa para multiplicar genótipos com características superiores.

A maioria das frutíferas do cerrado é considerada lenhosa, e apresenta diversas dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente devido a sérios problemas como a contaminação e a oxidação. A contaminação é provavelmente um dos maiores problemas da cultura de células e tecidos de plantas (LEIFERT; CASSELLS, 2001).

A assepsia de explantes e sementes, a esterilização do meio de cultura, da vidraria e do ambiente são condições necessárias para o sucesso da implantação de culturas *in vitro*. A contaminação tem prejudicado os experimentos, reduzindo o número de explantes ou sementes estabelecidas (PASQUAL, 2001).

A contaminação por diversos microorganismos, como fungos e bactérias, é considerada como o mais importante fator para as perdas durante a cultura *in vitro*, (LEIFERT; WAITES, 1990). Para reduzir este problema de contaminação, diversas tentativas têm sido realizadas utilizando-se fungicida e/ou bactericida no tratamento do

material a ser propagado, ou no meio (RAMOS, 1994). Para controlar a contaminação existem vários pré-tratamentos que são aplicados na planta - mãe doadora do material vegetal utilizado *in vitro*.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar o desenvolvimento da plântula de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) *in vitro* em meio MS com BAP, em diversas concentrações de hipoclorito de sódio, associado ao álcool etílico e ao fungicida tiofanato metílico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A germinação *in vitro* de fruteiras nativas do cerrado vem facilitar a sua propagação fora do seu habitat natural, principalmente quando se deseja a domesticação destas plantas lenhosas. Um dos maiores problemas no estabelecimento de tecidos vegetais *in vitro* é a contaminação por microrganismos, principalmente quando se trabalha com espécies lenhosas (BONGA, 1982). Uma das maneiras de facilitar a obtenção de material vegetal sem contaminação é a germinação *in vitro*, para isto é necessário realizar uma desinfestação eficiente das sementes.

Na cultura de tecidos existem diversas técnicas que podem contribuir para controlar a contaminação dos explantes. A principal delas consiste em manter a planta-matriz em ambiente higienizado, como casa de vegetação ou câmara de crescimento, evitando a exposição às intempéries, e a entrada de microrganismos.

Substâncias com ação bactericida, fungicida e inseticida podem ser utilizadas antes do estabelecimento *in vitro*. Durante este estabelecimento, várias substâncias com ação germicida podem ser utilizadas para a desinfestação dos explantes. As mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e o de cálcio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O álcool está entre os mais efetivos agentes antibacterianos que agem desnaturando proteínas e incrementam a permeabilidade da membrana. Os alcoóis são também solventes de lipídios, alterando estruturas lipídicas da membrana de células microbianas. Parte da sua ação como desinfetante é produto de sua eficiência como agente de limpeza na remoção mecânica de microrganismos.

Os fungicidas sistêmicos inibem seletivamente processos metabólicos específicos, presentes em grupos restritos de fungos, atuando somente contra os patógenos visados. Dos fungicidas sistêmicos, os benzimidazóis são o grupo mais importante utilizado comercialmente; desse grupo o tiofanato metílico é um dos mais empregados, já que o benomil foi proibido no Brasil (MAZELLIER et al., 2002).

O princípio de ação do tiofanato metílico é a tubulina que afeta o processo da mitose. O tiofanato atua nos fungos inibindo as proteínas a e b tubulinas, que mediante polimerização constituem os microtubulos.(LEROUX, 2003). Quando as proteínas entram em contato com o fungicida, a formação dos microtúbulos é inibida, levando o fungo à morte.

O hipoclorito de sódio é um produto químico utilizado para esterilizar superfícies, frutas e hortaliças, água, entre outros. Conforme Emmanuel et al., (2004), sua utilização resulta de sua atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além de ser econômico. O hipoclorito de sódio causa alterações biossintéticas no metabolismo celular e a destruição de fosfolipídios, formando cloraminas que interferem no metabolismo celular. Sua ação gera reações oxidativas com inativação enzimática irreversível em bactérias e a degradação de lipídios e ácidos graxos (ESTRELA et al., 2002).

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas (ERIG et al., 2002), podendo ser alcançado na fase de multiplicação *in vitro*. É muito importante a observação de fatores como meio de cultura, tipo e concentração de citocininas nesta fase (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A citocinina é indispensável na multiplicação *in vitro* e para a quebra da dominância apical e a indução da proliferação de gemas axilares (HU; WANG, 1983). Segundo Schuch e Erig (2005), as concentrações de citocininas estão entre 0,1 e 5,0 mg L⁻¹ e entre as citocininas comercialmente disponíveis a benzilaminopurina (BAP), geralmente apresenta melhores resultados.

Figueiredo et al., (2003) propagaram sementes *in vitro* do abacaxi do cerrado (*Ananas ananassoides*), viabilizando a produção de mudas em grande quantidade em estágio comercial.

Na recuperação de áreas degradadas a germinação *in vitro* é uma técnica de cultivo *in vitro* que ajuda na escolha de espécies selecionadas, para isto é importante garantir a manutenção da diversidade genética das espécies micropropagadas ao escolher explantes provenientes de sementes. A coleta das sementes deve, assim, ser realizada em diversas plantas matrizes (ANDRADE et al., 2000).

A dormência e a presença de microrganismos são os principais fatores a serem contornados no estabelecimento de plantas a partir da germinação *in vitro*, para evitar a morte ou o crescimento anormal das plântulas (COUTO et al., 2004). Como exemplo, cita-se a mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES), na qual a germinação *in vitro* de sementes é importante para a obtenção de explantes livres de contaminação e para a formação de plântulas normais.

Foi elaborado um protocolo que utiliza sementes colhidas de frutos de vez, com tegumentos removidos para que ocorra a germinação, e desinfetadas com os seguintes

tratamentos: lavagem com detergente, enxágüe para remover o detergente, lavagem com fungicida (5 g L^{-1} por 5 minutos) em câmara de fluxo laminar, três lavagens com água destilada estéril, imersão em álcool etílico (70%, 10 segundos), imersão em solução de hipoclorito de sódio (10%, 10 minutos) e, finalmente, três enxágües com água destilada estéril (LEMOS, 2003).

Segundo Bisognin (2008), a imersão de sementes de Porongo (*Lagenaria siceraria*) sem tegumento em álcool etílico, (70% por 1 minuto) e em solução de 3 a 4% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, possibilitou a produção de plântulas germinadas *in vitro* sem contaminação.

A desinfestação de segmentos de brotos, de folhas e de botões florais pode ser feita com álcool etílico comercial na concentração de 70%, por um período de 1 a 3 minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio 0,5% a 2% (p/v) por 5 a 20 minutos e de 3 a 5 lavagens com água destilada autoclavada por um período mínimo de 5 minutos (TEIXEIRA, 2004).

Sementes de jabuticabeira (*Myrciaria* SPP.) foram desinfetadas com 5% de hipoclorito de sódio. O hipoclorito de sódio é muito utilizado na desinfestação de explantes para propagação *in vitro*, inclusive em fruteiras da família Myrtaceae. A utilização do hipoclorito de sódio a 5% foi mais eficiente na desinfestação de sementes de jabuticabeira do que a 2,5%, com tempo de exposição de 20 minutos (PICOLOTTO et al., 2007).

Zaniolo e Zanette (2002), visando protocolo de micropropagação de erva-mate, desenvolveram mudas de dois anos em casa de vegetação, com pulverizações semanais com benomyl a 2 g L^{-1} . Dessas mudas retiraram brotações que foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,50 e 0,75%, verificando que as menores taxas de contaminação fúngica (5,70%) e bacteriana (15,70%) foram obtidas com a desinfestação dos explantes com 0,75% de NaOCl por 10 minutos.

Trabalho semelhante foi desenvolvido por Ribeiro et al., (2009), que utilizaram a germinação *in vitro* como método para fornecer elementos que superassem a dormência em sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Os melhores resultados foram obtidos em meio WPM suplementado com $25\text{-}32 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido giberélico.

Sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) sem tegumentos, removidos antes do cultivo *in vitro* em meio MS, apresentaram maior uniformidade e velocidade de

germinação e menor percentual de plântulas anormais do que as sementes com tegumento (MARTINOTTO et al., 2007).

Segundo Almeida et al., (2008) na desinfestação de segmentos nodais pertencentes à espécie *Eucalyptus dunnii*, foram realizados tratamentos com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0%; 0,50%; 1%; 1,50% e 2% de cloro ativo. Avaliou-se nos tratamentos: contaminações fúngicas e bacterianas; oxidações; sobrevivência e estabelecimento dos explantes. Foi observado que os níveis de contaminações diminuíram quando submetidos às diferentes variações de concentração de (NaClO) em relação ao tratamento testemunha. Os explantes submetidos às concentrações de 1,5% e 2% de (NaClO) obtiveram melhores resultados quando comparados aos demais tratamentos.

Na desinfestação de camu-camu, caçari, ou araçá-d'água (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) - arbusto pertencente à família *Myrtaceae* – Silva et al., (2012) verificaram que os tratamentos em que as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 0,50% de cloro ativo por 20 minutos, 0,50% por 60 minutos e 1% por 20 minutos, foram os que apresentaram maiores taxas de desinfestação ao final de 35 dias após a inoculação, alcançando 0% de contaminação. Por outro lado, maiores porcentagens de contaminações foram obtidas nos tratamentos utilizados como controle em que não se utilizou hipoclorito de sódio, ou seja, em que as sementes ficaram imersas em água destilada. Esse resultado evidencia a eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação e controle da sanidade do material introduzido *in vitro*.

Para Nogueira et al., (2004), os valores observados na germinação de sementes de murici-pequeno podem estar associados ao tegumento, o qual parece retardar o processo germinativo, ocasionando a baixa porcentagem de germinação. Ele pode ter servido como uma barreira para a entrada de água, inibindo, assim, a ativação de enzimas responsáveis pela germinação.

Embora a citocinina atue na quebra do efeito do ácido abscísico (ABA), inibidor do processo germinativo, isto não foi observado nos experimentos realizados com tegumento, uma vez que a presença de BAP não potencializou a germinação. Neste experimento a remoção do tegumento colaborou com o crescimento do embrião, facilitando a absorção dos nutrientes necessários, sendo o BAP importante para potencializar a germinação, segundo Schuch e Erig (2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no dia 05/12/2011 no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais do Instituto de Ciências Agrárias-ICIAG, no campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU – localizada no município de Uberlândia-MG. Vinte matrizes de gabirobeira (*Campomanesia* spp) foram marcadas na Fazenda Água Limpa da Universidade Federal de Uberlândia – UFU-, para coleta, no período de novembro e dezembro de 2011, de frutos maduros das plantas com maior vigor.

O experimento foi instalado utilizando o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de hipoclorito de sódio (0; 1,25; 2,50 e 5%) e três tempos de imersão das sementes (1, 5 e 10 min), com quatro repetições, gerando 48 parcelas. Cada parcela foi constituída de quatro frascos de 200 mL contendo uma semente cada e 40 mL de meio MS ajustado a pH de 5,8, autoclavado a 120 °C durante 20 minutos e à pressão de 1 atm (MURASHIGE ; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 1,50%, utilizando a Citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) como regulador de crescimento na concentração de 1 mg L⁻¹, e solidificado com Agar a 0,70%.

Os frutos foram despolpados e a mucilagem das sementes retirada através da escarificação química do tegumento com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,50% durante 48 horas. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água corrente durante 3 horas e, em seguida, colocadas para secar à sombra. Após o período de secagem as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% (v/v) durante 30 segundos, e lavadas três vezes em água destilada autoclavada antes do contato com o hipoclorito de sódio.

Em seguida, foram lavadas novamente em água destilada e autoclavada três vezes, logo na sequência intumescidas numa solução de fungicida a base de tiofanato metílico (1 g L⁻¹) por cinco minutos, antes de inocular foi feita lavagem com água destilada e autoclavada por três vezes. A seguir, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C e mantidas no escuro durante sete dias.

As características avaliadas foram realizadas aos 60 dias de idade da plântula de gabirobeira: número médio de brotos (contagem visualmente das gemas), número médio

de folhas (contagem visual das folhas ate o ápice) e altura de plantas (a altura de cada planta foi medida usando uma régua graduada em milímetros, considerando a distância entre a base do caule da planta, em contato com o substrato e a última folha no ápice do caule).

Todos os dados foram transformados para raiz quadrada de X (BANZATTO; KRONKA, 2006), e analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008), efetuando-se análise de regressão para as concentrações de hipoclorito de sódio, teste de F, teste de Tukey ao nível de 5% de significância para o fator tempo de exposição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de gabirobeira germinaram *in vitro* após 10 dias e obtiveram crescimento e desenvolvimento satisfatório aos 60 dias, ou seja, estágio ótimo fisiológico *in vitro* para as plântulas serem micropropagadas, proporcionado pela desinfestação com hipoclorito de sódio na inoculação no meio MS suplementado com BAP (1 mg L^{-1}). De acordo com Melo et al.,(1979), tratamento de sementes com citocininas pode promover a germinação.

O resumo das análises de variância para as variáveis analisadas: número médio de brotos, número de folhas, e altura de planta na germinação *in vitro* das sementes de gabirobeira em 60 dias, encontra-se na Tabela 5.

Verifica-se que houve diferença significativa nas variáveis: número de brotos, número de folhas, e altura de planta para o fator principal concentração de hipoclorito de sódio (%). Nos outros tratamentos não houve diferença significativa, tempo (min) e hipoclorito de sódio (%) x tempo (min).

TABELA 5. Resumo das análises de variância para número médio de brotos, folhas e altura da plântula (mm) obtidas no experimento aos 60 dias, sobre efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, em diversos tempos, na germinação *in vitro* da semente de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) Uberlândia-MG.2012.

Quadrados médios				
Fatores de variação	GL	Nº de brotos	Nº de folhas	Altura de planta
Concentração de				
hipoclorito	3	3,64 *	57,10 *	701,33 *
Tempo de imersão	2	0,12 NS	4,50 NS	29,38 NS
Hipoclorito x Tempo	6	0,04 NS	1,22 NS	12,16 NS
Resíduo	36	0,08	2,51	32,34
CV(%)		34,15	49,00	51,25

NS, não significativo a 5% de probabilidade ($P > 0,05$) pelo teste de F. * significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste de F.

Na Figura 19, o número de brotos apresenta um efeito quadrático positivo, com R^2 de 91%, ocorreu aumento do número de brotos à medida que aumentou a concentração de

hipoclorito de sódio (3,60%), gerando um valor máximo de 1,4 número médio de brotos. A partir daí ocorre a diminuição do número de brotos até a concentração de hipoclorito de sódio (5%), provavelmente por injúrias ocasionadas pela concentração de hipoclorito de sódio.

Segundo Ribeiro et al., (2010), sessenta dias após a inoculação das plântulas provenientes das sementes de goiabeira *paluma* desinfetadas durante 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,50%, e inoculadas no tratamento com meio MS e BAP 1 mg L⁻¹, foram coletados os dados referentes ao número e comprimento médio dos brotos de explantes, sendo que o maior número médio de brotos significativo foi de 2,38.

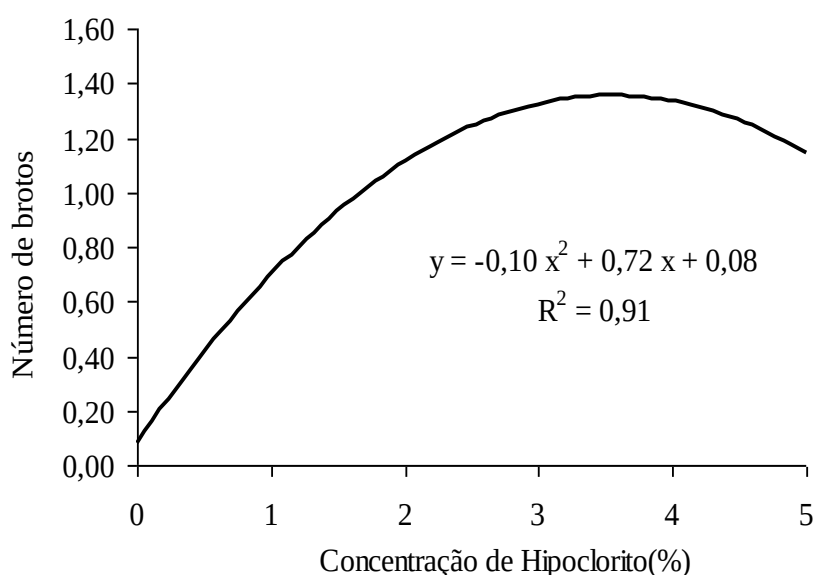


FIGURA 19. Número de brotos da germinação *in vitro* das sementes de gabirobeira em função da concentração de hipoclorito de sódio (%), Uberlândia - MG. 2012.

Na Figura 20 observa-se que o número de folhas apresenta um efeito quadrático positivo, com R² de 95% o número de folhas das plântulas germinadas aumenta (5,52) com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio até um valor máximo (3,26%). A partir deste ponto ocorre a diminuição do número de folhas, provavelmente pela injúria ocasionada pelo aumento da concentração de hipoclorito.

A gabirobeira *ex vitro* apresenta um número de folhas próximo da fase de tirodendro (6 folhas) conforme mostra Gogosz et al., (2010). De acordo com Villa et al.,

(2005), o maior número de folhas foi observado (4,37) de segmentos nodais de amoreira-preta inoculados (*Rubus* sp.) que foram excisados de brotações pré-estabelecidas *in vitro* na concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP. Com o aumento da concentração da citocinina ocorre um declínio na produção de folhas.

De acordo com George (1993), a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e a resposta varia de acordo com a sensibilidade dos tecidos.

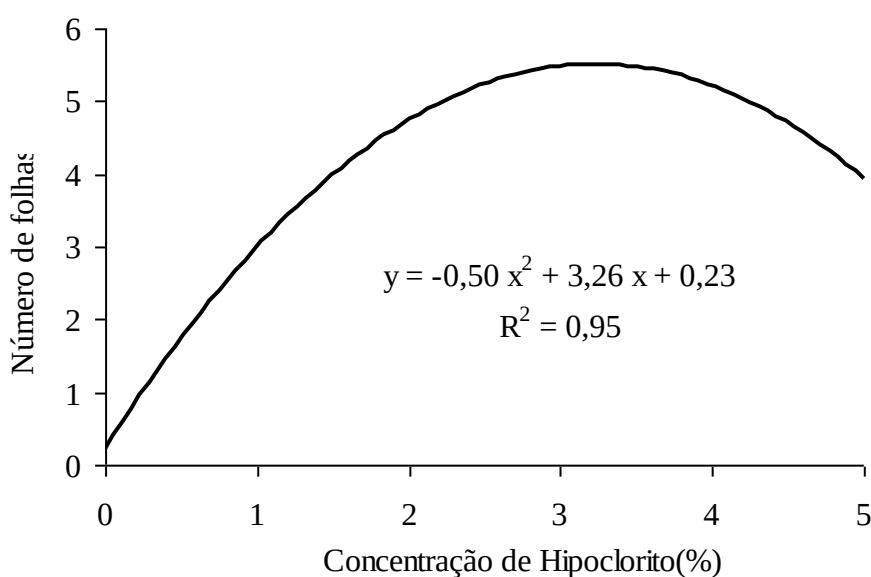


FIGURA 20. Número de folhas das plântulas de gabirobeira em função da concentração de hipoclorito de sódio (%) Uberlândia - MG. 2012.

Observa-se na Figura 21 que a altura das plântulas aumenta com o aumento das doses de hipoclorito, ocorrendo um efeito quadrático positivo para R² de 69%. Nota-se que a altura de plantas aumenta até (17,67 mm) com o aumento da concentração de hipoclorito até um valor de 3,45%.

Este resultado é confirmado no experimento de Bernardy et al.,(2012), no qual a germinação *in vitro* de araçá-vermelho para a variável altura de planta em função de concentrações de desinfetante hipoclorito de sódio, ajustou-se a um modelo quadrático de regressão polinomial com R² 99,55% , em que os pontos máximos de comprimento (15mm) foram alcançados com o uso de 3% da concentração do desinfetante.

Conforme Brum et al., (2002) sugerem, a citocinina mais utilizada em cultura de tecidos é a benzilaminopurina (BAP), que tem se mostrado fundamental para o

crescimento da altura da planta *Ficus carica*, na concentração de 4 mg L⁻¹, apresentando média de 70 mm de comprimento visto que, no geral, houve aumento de quatro vezes a concentração de BAP (1 mg L⁻¹) para a *Ficus carica*. Esta média está próxima a atingida pela gabirobeira (17,50 mm), ver Figura 22 onde mostra o crescimento da plântula.

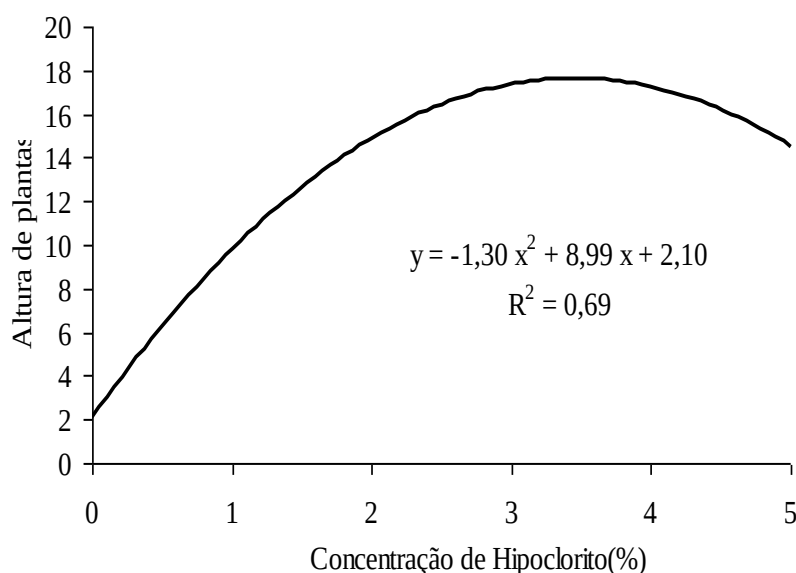


FIGURA 21. Altura das plântulas(mm) de gabirobeira em função da concentração de hipoclorito de sódio (%) Uberlândia - MG. 2012.



FIGURA 22. Apresentação de altura de plantas com aumento da concentração de hipoclorito de sódio. Uberlândia - MG. 2012.

5 CONCLUSÕES

Observou-se que o efeito das concentrações de hipoclorito em sinergia com álcool e fungicida, aliado à presença de BAP (1 mg L^{-1}) no meio MS, influenciaram de forma positiva a germinação *in vitro*.

Aos 60 dias ocorreu o melhor estabelecimento fisiológico das plântulas de gabirobeira, foram obtidos o maior número médio de brotos, número médio de folhas e altura média das plantas (1,40; 5,52; 17,67 mm), nas concentrações próximas de 3,50% de hipoclorito de sódio como desinfetante, independentemente do tempo de imersão.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. de.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal, 4ª edição, Funep, 2006, 237 p.
- BERNARDY, K.; FAGUNDES, L. S.; KOEFENDER, J.; KAIPER, C.; GOLLE, D. P. Germinação 'in vitro' de araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine var. *humile*) - *Myrtaceae*. In: XVII SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO; XV MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA; X MOSTRA DE EXTENSÃO - UNICRUZ, 2012, Cruz Alta. **Anais...** Cruz Alta: UNICRUZ, p. 1- 4, 2012.
- BISOGNIN, D. A.; SILVA, A. L. L. da.; HORBACK, M. A. ; GIROTTO, J.; BARRIQUELLO, C. J.; Germinação e propagação *in vitro* de porongo. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS: UFSM, v. 38, n. 2, p. 332-339, 2008.
- BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1403-1409, 2002.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.) **Tissue culture in forestry**. 2nd ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 4-35, 1982.
- CARMONA, R.; REZENDE, L. P.; PARENTE, T. V. Extração química de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v.16, n. 1, p. 31-33, 1994.
- COUTO, J. M. F; OTONI, W. C; PINHEIRO, A. L; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 5, p. 633- 642, 2004.
- EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Cumbria, v. 30, p. 891- 900, 2004.
- ERIG, A.C. et al. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C. E.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FIGUEIREDO, G. S. F. et al. Germinação de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker L. B. Sm.) (*Bromeliaceae*) *in vitro*. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 8., 2003, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 91, 2003, 165 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: the technology. Edington: Exegetics Limited. (v.1), 1993, 574 p.

GOGOSZ, A. M.; COSMO, N. L.; BONA, C.; SOUZA, L. A. de. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (*Myrtaceae*). **Acta Botanica Brasílica**. Porto Alegre, RS. v. 24, n. 3, p. 613-623, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-CNPH, p.183-260, 1998.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A. et al. (Eds.) **Handbook of plant cell culture**: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, p. 117-227, 1983.

LEIFERT C.; WAITES W. M. **Contaminants of plant tissue cultures**. Calgary: Internacional Association of Plant Tissue Culture: Newsletter, p. 2-13, 1990.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular Development Biology – Plant**, New York, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2001.

LEITÃO FILHO, H. F.; MARTINS, F. R. Espécies de cerrado com potencial em fruticultura. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE AMERICANA DE CIÊNCIAS HORTÍCOLAS, 29., Campinas, 1981. **Caderno de Resumos...** Campinas: ASHS, p. 29. 1981.

LEMOS, E. E. P. de. Estratégias para a multiplicação clonal da mangabeira em Alagoas. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 1 CD-ROM. Seção Palestras, 2003.

LEROUX, P. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. **Comptes Rendus Biologies**. Paris, FR, v. 326, p. 9-21, 2003.

MARTINOTTO, C. et al. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, 2007.

MAZELLIER, P.; LEROY, E.; LEGUBE, B. Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, Lausanne, Suica, CH, v. 153, p. 221-227, 2002.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; MACHADO NETO, N. B. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. - Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MELO, J. T.; RIBEIRO, J. F.; LIMA, V. L. G. F. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 1, p. 8-12, 1979.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H. de.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001, 74 p.

PEIXOTO, N.; SILVA, E.; TEIXEIRA, F. G.; MOREIRA, F. da M. Avaliação do crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri-GO. IV Seminário de Iniciação Científica. UEG, 2005.

PICOLOTTO, L. et al. Efeito do hipoclorito, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2007.

RAMOS, J.D. Caracterização fenotípica do fruto, micropropagação e germinação de sementes do porta-enxerto tangerina “sunki” (*Citrus sunki* Hort. ex.Tan.) Lavras: ESAL. (Tese- Doutorado em Fitotecnia), 1994, 85p.

RIBEIRO, J. M.; CASTRO, J. M. da C.; RESENDE, G. M. de.; BASTOS, D. C.; NALI, L. R. Micropropagação e aclimatização de goiabeira “ paluma”. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, 2010. 27 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 80).

RIBEIRO, M. de. N.; et al. O Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Annona crassiflora* Mart. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, 2009.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C. et al. (Eds.) **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 155-173, 2005.

SILVA, M. L. da.; CHAGAS, E. A.; ARAÚJO, M. da C. da ROCHA.; BRITO, N.; SOUSA, L.; SILVA, S.; da. Diferentes concentrações de hipoclorito sódio e tempos de

imersão na desinfestação de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro*. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, **Anais...** 2012. Bento Gonçalves, RS: SBF, p. 535-538, 2012

TEIXEIRA, F. G.; SILVA, E. S.; MOREIRA, F.M.; PEIXOTO, N. Avaliação de Crescimento de Plantas de *Campomanesia pubescens* em Diferentes Substratos. In: III SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E I JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 2005, Anápolis, GO. Suplemento, CD-ROM, 2005.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A. J. P. C.; MELO, R. I. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIN, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Doc. 40, 2004, 40 p.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. **EMBRAPA**. DF, 2001.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ÉBANO' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, 2005.

ZANIOLO, S. R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, USP, v. 2, n. 1, p. 6, 2002.

CAPÍTULO 5

RESUMO

Brotação de explantes obtidos na germinação *in vitro* de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em diversas combinações de meio MS com BAP

Com o objetivo de verificar o melhor meio de cultura nas diferentes combinações de MS com BAP e escolher o explante com maior número de brotos, sem oxidação, na propagação assexuada da plântula de gabirobeira, foi realizado o experimento no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais da Universidade Federal de Uberlândia-MG. Os explantes utilizados foram extraídos de quatorze plântulas de gabirobeira propagadas *in vitro* no laboratório. O experimento foi conduzido em delineamento de bloco casualizado com esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de BAP (0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹) e três meios de inoculação (MS 1/1, MS 1/2 e MS 1/4), com três repetições, e 36 parcelas. Cada parcela foi constituída de quatro frascos de 200 mL contendo um explante cada e 40 mL dos meios MS ajustados para pH de 5, 8 e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos à pressão de 1 atm. Os explantes excisados em câmara asséptica e utilizados nos experimentos foram os segmentos apicais e caulinares, folhas e raízes das plantas germinadas *in vitro*, mergulhados em água estéril e logo inoculados nos diversos meios de MS com BAP. Em seguida, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento e mantido no escuro durante sete dias. As características avaliadas foram: oxidação (%) e brotos (%) dos explantes aos 30 dias após a inoculação. A brotação foi avaliada quando da emergência do broto com cor verde, enquanto que a oxidação foi mensurada visualmente por meio de presença ou ausência de escurecimento. Conforme os dados, conclui-se que a concentração de BAP a 0,5 mg L⁻¹ permitiu um maior crescimento e desenvolvimento dos brotos do explante de segmentos nodais, acima dessa concentração ocorre oxidação do explante. Portanto, é necessário utilizar no meio um antioxidante para controlar o escurecimento ou a necrosidade do explante. O meio MS 1/4 de força total é o mais eficaz para a propagação *in vitro* dos segmentos nodais de gabirobeira.

Palavras-chave: Myrtaceas, explante, MS, BAP, gabirobeira.

ABSTRACT

Shoot explants obtained from *in vitro* germinated gabirobeira (*Campomanesia* spp.) in several combinations of MS with BAP medium

The best culture medium for mass production of gabirobeira was evaluated in different combinations of MS amended with BAP, selecting the plantlet with the greatest number of shoots, with no oxidation, in the Vegetable Tissue Culture at the Universidade Federal de Uberlândia, in Uberlândia, MG. The explants used were extracted from fourteen *in vitro* grown gabirobeira plantlets. The experimental design was randomized blocks as a 4 x 3 factorial, with four BAP concentrations (0, 1, 2 or 3 mg L⁻¹) and three inoculation media (MS 1/1, MS 1/2 or MS 1/4), with three replications. Each experimental unit consisted of four 200-mL flasks containing 40 mL of MS medium adjusted to pH 5.8, autoclaved at 120°C for 20 min at 1 atm pressure, and one explant. The explants excised in laminar flow hood and used in the experiments were nodal or apical segments, leaves and roots of *in vitro* germinated plants, soaked in sterile distilled water and plated in the treatments. Subsequently, the prepared material was transferred to the growth chamber and kept in darkness for seven days. Thirty days later the following variables were evaluated: oxidation (%) and sprouting (%) of explants. Sprouting was evaluated by the green color of shoots and oxidation was visually determined by the darkening of the explant. According to the results, it can be concluded that 0.5 mg L⁻¹ BAP resulted in greater growth and shoot development of nodal segment explants; above this concentration oxidation was observed. Therefore, the use of antioxidant is required to control explant darkening or necrosis. The medium MS 1/4 strength was the most effective for *in vitro* propagation of gabirobeira nodal segments.

Key words: Myrtaceae, explant, MS, BAP, gabirobeira.

INTRODUÇÃO

Para se ter um resultado de qualidade na aplicação dos métodos da cultura *in vitro* deve-se conhecer melhor as necessidades nutricionais e o tipo de explante em estudo. O sucesso da cultura de tecidos vegetais é influenciado pela origem do explante e pelo meio nutritivo utilizado.

A cultura de tecidos vegetais tem sido muito importante em diversas aplicações na agricultura e indústria, entre as quais pode-se citar: produção de plantas haploides, micropropagação, obtenção de plantas livres de vírus, produção de metabólitos secundários, conservação de germoplasma *in vitro* para a manutenção de bancos genéticos, dentre outras (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O meio de cultura utilizado deve conter todos os nutrientes para o desenvolvimento sadio da planta, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento. O objetivo é produzir plantas similares à original, saudáveis, vigorosas e puras (ANDRADE, 2002).

A combinação balanceada de nutrientes, associada a fatores como luz e temperatura, bem como o recipiente utilizado para o cultivo, é o fundamento da tecnologia de tecidos vegetais (KERBAUY, 1997).

Portanto, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com modificações que visam atender às necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Os reguladores vegetais são utilizados a fim de suprir os meios de cultura, na falta de hormônios, e promover o crescimento da planta durante a micropropagação. A necessidade de fitoreguladores exógenos depende do nível de endógenos na planta (WERBROUCK ; DEBERGH, 1994).

Dentre os reguladores vegetais mais utilizados, as citocininas são consideradas as de melhor rendimento na fase de multiplicação da micropropagação, pelo seu efeito na quebra da dominância apical e na indução da proliferação de gemas axilares.

As citocininas mais úteis no cultivo *in vitro* das espécies do cerrado são BAP (6-Benzilaminopurina), 2ip (Isopenteniladenina), cinetina e zeatina, promovendo múltiplas brotações em ampla faixa de concentração (SOUZA et al., 2003). Destes reguladores, e de outros encontrados no mercado, o BAP (6-benzilaminopurina) tem apresentado os

melhores resultados *in vitro* na promoção da multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em 60% dos meios de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A escolha do fitoregulador a ser testado deve considerar o custo, por isso o BAP deve ser o primeiro a ser experimentado, seguido do 2ip, e, como última opção, a zeatina em função do alto custo (WERBROUCK ; DEBERGH, 1994).

Para promover a formação de brotos é necessária uma relação alta entre citocinina-auxina, ao passo que para estimular a diferenciação da raiz um elevado teor de auxina deve ser usado. Portanto, o suplemento de citocininas no meio de cultura determina o sucesso da etapa de multiplicação. Em determinadas situações, a indução de múltiplas brotações requer a presença de citocinina e auxina, mas, isso não implica que seja necessária a presença de ambos no meio de cultura para que exista a formação de brotos (MORAES et al., 2007).

Especificamente neste trabalho objetivou-se verificar o melhor meio de cultura, a melhor concentração de BAP, e o melhor explante de plantas germinadas *in vitro* (segmentos apicais, gemas axilares, raízes e folhas) com maior número de brotos e sem oxidação, na propagação assexuada da plântula de gabirobeira.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Estudos de meios de cultura que facilitem a germinação de sementes recalcitrantes são de grande importância para a fruticultura. O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (HARTMANN et al. 2002).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez), fruteira nativa da região Nordeste do Brasil, apresenta problemas em sua propagação por via sexuada devido ao fato de suas sementes serem recalcitrantes e a polpa do fruto possuir elementos que inibem a germinação das sementes. A gabirobeira (*Campomanesia* spp.) demonstra condições parecidas que também prejudicam a germinação das sementes.

O controle do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das características da cultura de tecidos vegetais. Estes fenômenos ocorrem mantendo-se os explantes em um meio de cultura. Por isto é importante conhecer seus componentes e propriedades, ou seja: quais os meios utilizados e quais as técnicas necessárias para prepará-los (CALDAS et al., 1990).

Existem poucas pesquisas relativas à propagação *in vitro* de diversas espécies de *Myrtaceas*. Em relação à gabirobeira, além da contaminação, a oxidação ou escurecimento dos seus tecidos é um dos maiores problemas que ocorrem na propagação *in vitro*.

Em pesquisa com guarirobeira (*Syagros oleraceae*), testaram-se diferentes níveis do meio MS em combinação com diferentes concentrações de BAP, tendo sido observada uma redução gradativa no número de folhas e no peso médio da matéria seca da plântula, à medida que a concentração de BAP foi aumentada (MELO, 2000).

Portanto, a escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de multiplicação (RAMAGE ; WILLIAMS, 2002).

De acordo com Barrueto Cid (2000), o BAP é a citocinina sintética de menor custo, em relação às demais fontes deste regulador de crescimento, sendo a mais ativa e mais utilizada na multiplicação de diversas espécies.

A adição de BAP ao meio de cultivo resultou em uma tendência linear crescente, com maior resposta na concentração de 1 mg L⁻¹, com 34,80% de explantes brotados e, em média, 1,25 brotação por explante.

Rogalski et al., (2003), analisando a ameixeira ‘Santa Rosa’, obtiveram maior número de brotações com 2 mg L⁻¹ de BAP, possibilitando a formação de 3,60 brotações.

O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) apresenta um alto conteúdo de sais, enquanto o meio WPM (LOYD; MCCOWN, 1980) contém 1/4 de íons nitrato de amônio na sua composição (PASQUAL, 2001).

Jesus et al., (2010) opinam que a ação da citocinina sobre os explantes colabora com o comprimento e com a proliferação de brotos, mesmo em concentrações mais elevadas.

Lucas et al., (2006), por sua vez, afirmam que concentrações elevadas de BAP promovem o desbalanceamento endógeno dos fitormônios, reduzindo o crescimento das brotações e aumentando a vitrificação.

De acordo com Nogueira (2007), as citocininas são indispensáveis na fase de multiplicação, pois são responsáveis pela quebra de dormência apical e pela indução da proliferação de gemas axilares. A combinação de citocinina e auxina é utilizada em algumas espécies para indução de brotações, usando, em geral, níveis relativamente baixos de auxina e altos de citocinina no meio de crescimento.

Em experimentos com gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*), Faria et al., (2010) observaram que o melhor resultado obtido para todas as variáveis analisadas foi na combinação de 0,50 mg L⁻¹ de BAP com 0 de ANA. Ou seja, para a indução de brotações de gabiropa não é necessário a utilização de ANA, sendo a concentração de 1 mg L⁻¹ de BAP suficiente para a obtenção de brotações.

A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e de tecidos, sendo que este meio pode ser modificado de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (TORRES et al., 2001).

Segundo Chaves et al., (2005), maiores concentrações de BAP não promoveram resultados satisfatórios, pois à medida que se aumentou a sua concentração no meio de cultura, houve uma diminuição no número de brotos por segmento.

Costa et al., (2006) verificaram pequenas diferenças na capacidade proliferativa da bananeira entre níveis de BAP testados (2,30 brotos), levando à conclusão de que tais resultados podem estar associados à interação genótipo e citocinina. Daí a necessidade de se otimizar a cada genótipo o nível exógeno ou mesmo o tipo de citocinina a ser adicionado ao meio.

De acordo com Rodrigues et al., (2013) a adição da citocinina 6-benzilaminopurina ($1,30 \text{ mg L}^{-1}$) no meio MS com 50% dos sais foi eficiente para a multiplicação *in vitro* da *Physalis peruviana*. Esta frutífera, pertencente à família Solanacea, representa um grande potencial econômico, tendo em vista sua classificação como fruta fina, a exemplo do mirtilo, framboesa, cereja, amora e pitaya.

A pesquisa de Aires et al., (2008) com a mamona contribui para a necessidade de ajustes no meio. Eles constaram que na ausência do hormônio BAP não houve formação de múltiplos brotos, mas que concentrações na faixa de 0,15 a 0,21 mg. L^{-1} de BAP propiciaram os melhores resultados em explantes de gema apical e eixo embrionário da mamona.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos vegetais do Instituto de Ciências Agrárias- ICIAG, no campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU – localizada no município de Uberlândia-MG.

O experimento foi instalado utilizando o delineamento de bloco casualizado em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de BAP (0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹) e três meios de inoculação (MS 1/1, 100% básico; MS 1/2, 50% do meio básico e MS 1/4, 25% do meio básico), com três repetições, gerando 36 parcelas.

Cada parcela foi constituída de quatro frascos de 200 mL contendo um explante cada e 40 mL dos meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ajustados para pH de 5,8 e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos à pressão de 1 atm.

De quatorze plântulas de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) propagadas *in vitro* no laboratório foram excisados 144 explantes, os explantes excisados em câmara asséptica e utilizados nos ensaios foram os: segmentos apicais e caulinares, folhas e raízes das plântulas. Após a excisão foram lavados em água estéril e logo inoculados nos diversos meios de MS com BAP.

Em seguida, o material inoculado foi transferido para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 $\mu\text{mol m}^2 \text{S}^{-1}$, mantido na temperatura de 25 $\pm$ 2°C e no escuro durante sete dias. As características avaliadas foram: oxidação (%) e brotos (%) dos explantes aos 30 dias após a inoculação.

A brotação foi avaliada quando da emergência do broto de cor verde, enquanto a oxidação foi mensurada visualmente por meio da presença ou ausência de escurecimento. Os dados não foram transformados e analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999), efetuando-se teste de Tukey a 0,05 de significância pelo teste de F para os diversos meios MS e regressão linear para as concentrações de BAP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância para as variáveis oxidação e brotação *in vitro* dos explantes de gabirobeira encontra-se na Tabela 6. Observou-se que houve diferença significativa na oxidação e brotação para os explantes no tratamento com os diferentes meios MS.

Enquanto para a variável brotos houve diferença significativa no tratamento dos explantes com as diferentes concentrações de BAP, para a variável oxidação não houve diferença significativa. A interação entre os fatores meio MS e concentração de BAP foi significativa somente para a característica brotos em estudo.

TABELA 6. Resumo da análise de variância para brotos e oxidação *in vitro* de explantes de gabirobeira submetidos a diferentes concentrações de meio MS e BAP. Uberlândia-MG. 2012.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Brotos (%)	Oxidação (%)
MS	2	1684,03 *	1163,19 *
BAP	3	1637,73 *	925,92 NS
MS x BAP	6	943,29 *	700,23 NS
Bloco	2	9652,77	9392,36
Erro	22	353,53	320,39
CV(%)		57, 61	25,78

NS, não significativo a 5% de probabilidade ($P > 0,05$) pelo teste de F. * significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste de F.

Rocha et al., (2008) relataram que o meio suplementado com BAP estimulou maior altura das brotações em pequizeiro em presença de luz, e que a ausência de luz pode intensificar o crescimento.

Campos et al., (2013), investigando o efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de brotações laterais em gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), concluíram que após 45 dias foi possível, com o uso de 4, 4 μM (1 mg L⁻¹) de BAP, promover a formação do maior número de folhas e de brotações, e do menor número de

explantes mortos, sendo por isso recomendado para a indução de brotações em gabirobeira.

Conforme mostra a Figura 23, segundo o desdobramento de BAP no meio MS 1/4 ocorreu a tendência de diminuir a quantidade de brotos a partir da concentração de BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), verificando-se um efeito quadrático negativo para R^2 de 83%. A maior média de brotos observada foi de 64,57%, portanto pode-se concluir que concentrações de BAP acima de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ prejudicam o crescimento e desenvolvimento do explante de gabirobeira, apresentando maior oxidação e reduzindo a % de brotos.

Dos cento e quarenta e quatro (144) explantes utilizados resultaram 48 brotos, dos quais 43 eram segmentos caulinares com 2 gemas que não apresentaram oxidação; no restante dos brotos observou-se oxidação. Conforme Faria et al., (2010), para a formação de brotos, gemas e para um maior tamanho das brotações de gabirobeira somente $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP é suficiente para a indução de brotações.

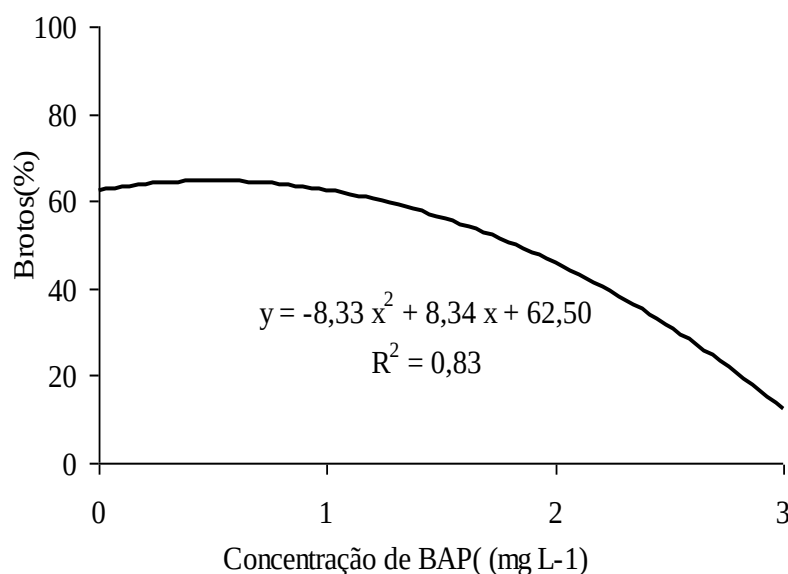


FIGURA 23. Brotos (%) dos explantes de gabirobeira após inoculação em função das diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}).Uberlândia-MG. 2012.

Os resultados observados na Tabela 7 para as características oxidação mostram que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre o tratamento do meio MS (1/1) de força total em comparação com os meios MS (1/2 e 1/4), à medida que houve

redução das concentrações de sais no meio, ocorreu incremento na brotação dos explantes e diminuição da oxidação (58,33%), Figura 24. Portanto, a baixa concentração de sais no meio influenciou a brotação dos explantes, principalmente para os segmentos caulinares. Conforme disseram Cassells e Curry (2001) o escurecimento dos tecidos ocorre com maior frequência em meio com maior concentração de sais, como o MS básico, o que está de acordo com o que foi verificado neste trabalho.

TABELA 7. Porcentagem de oxidação (%) no explante da gabirobeira em função dos diferentes concentrações de meio MS. Uberlândia – MG. 2012.

MS	Oxidação (%)
1/1	77, 08 b
1/2	72, 92 b a
1/4	58, 33 a
Médias	69, 44

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0, 05 de significância.



FIGURA 24. Brotação de explantes obtidos na germinação *in vitro* de gabirobeira em diversas combinações de meio MS com BAP. Uberlândia-MG. 2012.

Chaves et al., (2005) confirmam que meios diluídos têm possibilitado melhores resultados para multiplicação das mais diversas espécies e que a diminuição de sais e reguladores de crescimento nos meios de cultura é uma tendência mundial, uma vez que muitas pesquisas estão sendo realizadas com a finalidade de reduzir o custo final da produção da muda, possibilitando o acesso ao produtor.

5 CONCLUSÕES

A concentração máxima de BAP a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ permitiu um maior crescimento e desenvolvimento dos brotos do explante de segmentos nodais da gabirobeira (64,57%), ao passo que acima dessa concentração ocorreu oxidação do explante.

O meio MS 1/4 (25% do meio MS básico) foi mais eficaz para a propagação *in vitro* dos segmentos nodais de gabirobeira.

REFERÊNCIAS

- AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da citocinina 6-bencilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 80-85, 2008.[S.l]
- ANDRADE, S. R. M. de; Princípios da cultura de Tecidos Vegetais. Platina: **Embrapa Cerrados**, p. 7, 2002.
- BARRUETO CID, L. P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.) **Introdução aos hormônios vegetais**. 1ªed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 55-81, 2000.
- CALDAS, L. S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: **ABCTP/EMBRAPA**, 1990, 443 p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos de plantas e transformação genética de plantas**. Brasília : EMBRAPA- SPI, v.1, p. 87-132, 1998.
- CAMPOS, N. A.; PAIVA, R.; FREITAS, R. T. de.; RONY, S.; PANNIS, B. Indução de brotações laterais em gabirobeira (*Campomanesia pubescens*). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, VI CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2013, Recife, **Anais...** 2013.
- CASELLS, A.; CURRY, R. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, Holanda, NL, n. 64, p. 145-157, 2001.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* (L). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. M. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e n6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand naine (AAA). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- DE FARIA, C.V. N et al. **Indução de brotações a partir de segmentos caulinares de gabirobeira**. In: Reunião Regional da SBPC in: XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2010, Lavras-MG. Anais Reunião Regional da SBPC/ XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2010.

FERREIRA DF. **Sistema Para Análise De Variância Para Dados Balanceados (SISVAR)**. Lavras: UFLA, 92 p. 1999.

GRATTAPAGLIA, D. ; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, p. 99-170, 1998.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7^a ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002, 880 p.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. M.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 6, p. 431-436, 2010.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421- 427, 1980.

LUCAS, M. A. K.; SAMPAIO, N. V.; PEREIRA, D. D. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira Paulsen com benzilaminopurina e ácido indolbutírico. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 29-34, 2006.

MELO, B. de. **Cultivo de embriões *in vitro* da guarirubeira [*Syagrus oleracea* (Mart) Becc.]**. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MORAES, R. M. et al. Micropropagação e Banco de Germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 185-211, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473- 479, 1962.

NOGUEIRA, G. F. Aspectos do cultivo *in vitro* de Barbatimão. 2007. 42p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Lavras - Lavras, MG, 2007.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE. 2001, 74 p.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, Wallingford, Columbia, Mo., US. v. 38, p. 116-124, 2002.

ROCHA, P. S. G. **Propagação *in vitro* de portaenxertos do gênero *Prunus* spp.** 2006. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, 2006.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. da. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de Prunus SP em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2013.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': Efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

SOUZA, A. V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição especial, p. 1532-1538, 2003.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meios de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 19p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 24).

WERBROUCK, S. P. O.; DEBERGH P. C. Applied aspects of plant regeneration - Micropropagation In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A., (Orgs.). **Plant cell culture**: a practical approach. New York: Oxford University Press, p. 127-135, 1994.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As pesquisas realizadas com a gabirobeira (*Campomanesia* spp.) na propagação *in vitro* tem sido escassas, a propagação mais comum para esta frutífera tem ocorrido pela via sexuada. Assim se fez necessário um aprofundamento da investigação sobre a sua propagação *in vitro*. Durante o desenvolvimento da presente pesquisa para realizar a micropropagação *in vitro*, optou-se pela germinação *in vitro* da semente de gabirobeira (*Campomanesia* spp.), tendo em vista a ocorrência de sérios problemas com a desinfestação dos explantes naturais. A oxidação e a contaminação dos explantes são problemas que impedem a propagação *in vitro* de plantas consideradas lenhosas, como a gabirobeira. Inicialmente, para que ocorra a micropropagação *in vitro*, é necessário estabelecer a cultura *in vitro*, ou seja, obter plantas livres de contaminantes visíveis e bem adaptadas às condições *in vitro*, a fim de que possa ocorrer a multiplicação por meio de explantes das plântulas estabelecidas *in vitro*. Por meio do estabelecimento em laboratório da gabirobeira (*Campomanesia* spp.), deve-se superar o problema de contaminação e oxidação. O despulpamento dos frutos e a escarificação das sementes que foram utilizados na pesquisa, com a metodologia utilizada, garantiram o sucesso da desinfestação. Na germinação *in vitro* da gabirobeira foram avaliados diversas concentrações de hipoclorito de sódio, associado ao álcool etílico (70%) e ao fungicida tiofanato metílico (1 g L^{-1}), para controlar a contaminação, e concluiu-se que fatores como manutenção no escuro durante sete dias para evitar a oxidação e o meio MS suplementado com sacarose 15 g L^{-1} , BAP (1 mg L^{-1}) e a desinfestação proporcionada pelo álcool etílico (70%), tiofanato metílico (1 g L^{-1}) e hipoclorito de sódio (3,33%) proporcionaram uma germinação *in vitro* da gabirobeira de 100% aos 30 dias. Aos sessenta dias de idade da plântula de gabirobeira, as características avaliadas foram: número médio de brotos, número médio de folhas e altura de plantas (mm). Conforme os dados coletados mostraram, o efeito da concentração de hipoclorito de sódio (3,50%) em sinergia com álcool, e fungicida, aliado à presença de BAP (1 mg L^{-1}) no meio MS, influenciaram de forma ótima o estabelecimento fisiológico das plântulas aos 60 dias, com número médio de brotos, número de folhas e altura máxima das plantas obtidos (1,40; 5,52; 17,67 mm), independentemente do tempo de imersão. Isto promoveu boas condições na multiplicação *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.). Com o

objetivo de verificar o melhor meio de cultura nas diferentes combinações de MS com BAP e escolher o explante com maior número de brotos, sem oxidação, na propagação assexuada da plântula de gabirobeira, foram extraídos de quatorze plântulas de gabirobeira propagadas *in vitro* no laboratório, 144 explantes. Os explantes excisados em câmara asséptica e utilizados nos ensaios foram os segmentos apicais e caulinares, folhas e raízes das plantas germinadas *in vitro*, mergulhados em água estéril e logo inoculados nos diversos meios de MS com BAP. As características avaliadas foram: oxidação (%) e brotos (%) dos explantes aos 30 dias após a inoculação. A brotação foi avaliada quando da emergência do broto com cor verde, enquanto que a oxidação foi mensurada visualmente por meio de presença ou ausência de escurecimento. Concluiu-se que a concentração de BAP a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ permitiu um maior crescimento e desenvolvimento dos brotos do explante de segmentos nodais, e observou-se que acima dessa concentração ocorre oxidação do explante. Portanto, é necessário utilizar no meio um antioxidante para controlar o escurecimento ou a necrosidade do explante. O meio MS 1/4 de força total é o mais eficaz para a propagação *in vitro* dos segmentos nodais de gabirobeira, isto mostrou que meios mais diluídos produziram melhores resultados. Com o objetivo de avaliar diferentes antioxidantes durante a micropropagação de segmentos nodais de gabirobeira obtidos de plântulas de sementes germinadas *in vitro*, foram realizados os tratamentos a seguir: MS no claro; MS no escuro, 15 dias; MS + PVP (1 g L^{-1}); MS + carvão ativado (3 g L^{-1}); MS + ácido ascórbico (100 mg L^{-1}). Desta forma, os tratamentos MS + PVP e MS + carvão ativado apresentaram-se na pesquisa como melhores alternativas para controlar a oxidação e gerar maior número de brotos dos segmentos nodais de gabirobeira na sua propagação *in vitro*. Diante do observado neste trabalho pode-se definir a proposta de um protocolo inicial que permita a propagação *in vitro* da gabirobeira.