

Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)

**Marcelo Almeida de Oliveira Junior**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba  
2021

Marcelo Almeida de Oliveira Junior  
Engenheiro Agrônomo

Cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro  
(*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientador:

Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba  
2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Oliveira Junior, Marcelo Almeida de

Cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) / Marcelo Almeida de Oliveira Junior. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

142 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Cultura de tecidos 2. Frutas nativas 3. Mata Atlântica 4. Micropropagação I. Título

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, amigos e todos que me apoiaram durante o meu mestrado.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as realizações que tive na minha vida até o momento. Agradeço aos meus pais Juliana e Marcelo pelo incentivo em toda minha trajetória e por terem acreditado sempre em tudo que pude realizar até o momento.

À minha querida avó Jurema por ter acreditado em mim e em todas minhas escolhas na vida, ao meu amado avô Adair por ter me dado a oportunidade de estudar e ter feito o máximo possível sempre que precisei e que sei que olha e cuida de mim aonde quer que ele esteja.

Agradeço aos meus avós, Jorge e Zenita pelo apoio em toda minha trajetória.

Ao meu irmão, Jorge, por ter me apoiado sempre em tudo, dando sempre bons conselhos quando precisava e por sempre ter me escutado quando precisava me desabafar sobre tudo ao longo do meu mestrado.

Agradeço imensamente a meu orientador Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho e a minha querida amiga e técnica do laboratório Dra. Liliane Cristina Liborio Stipp, pela confiança em mim depositada, por todo o apoio, ensinamentos e conselhos transmitidos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a todos seus professores e funcionários. Agradeço aos meus queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (LBPH), Marcela, Michael, Matheus, Laécio e Tamires pelo apoio e companhia durante minha jornada e a todos meus amigos da pós-graduação, Walleska, Gustavo, Gabriel, Maiara, Patricia, Beatriz, Luis, Ash.

Agradeço a todos da república Central do Brasil por terem me acolhido em Piracicaba e pela companhia todos os dias, em especial ao Adriano, Fernando e Linker.

A todos meus amigos da república Nós Travamus, apesar da distância e da ausência sei que posso contar com todos sempre.

Aos meus amigos de longa data Pamela, Andrei, Adrielle, Camila. Aos Brazilian Brothers, Salvio, Pedro, Renan, Fábio, Alan.

Agradeço à Prof. Dra. Sônia Maria, Prof. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro e Prof. Dr. Rodrigo Rocha Latado, por toda ajuda e orientação na execução dos experimentos.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Por fim, a toda a família Carvalho e Oliveira! Muito obrigado por tudo!

*“Whenever someone creates something with all of their heart, then that creation is given a soul.”*

*The Baron*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
REFERÊNCIAS .....	15
<b>CAPÍTULO 1: GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CEREJEIRA- DO-RIO-GRANDE (<i>EUGENIA INVOLUCRATA</i> DC.) .....</b>	<b>21</b>
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAL E MÉTODOS .....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
CONCLUSÕES .....	66
REFERÊNCIAS .....	67
<b>CAPÍTULO 2: CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CEREJEIRA-DO-RIO-GRANDE (<i>EUGENIA INVOLUCRATA</i> DC.), A PARTIR DE EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS MANTIDAS EM ESTUFA .....</b>	<b>78</b>
INTRODUÇÃO .....	79
MATERIAL E MÉTODOS .....	81
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
CONCLUSÕES .....	101
REFERÊNCIAS .....	101
<b>CAPÍTULO 3: CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CAMBUCIZEIRO (<i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> (O. BERG) LANDRUM) A PARTIR DE EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS MANTIDAS EM ESTUFA .....</b>	<b>107</b>
INTRODUÇÃO .....	108
MATERIAL E MÉTODOS .....	110
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	118
CONCLUSÕES .....	135
REFERÊNCIAS .....	135

## RESUMO

### **Cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)**

A biodiversidade brasileira é uma das mais ricas do mundo, apresentando, nos diferentes biomas que compõe sua flora, diversas espécies frutíferas com grande valor de exploração comercial. A Mata Atlântica, terceiro maior bioma do país, é considerada um *hotspot* mundial de conservação e diversidade biológica, contendo um grande número de frutas nativas, entre elas, espécies da família Myrtaceae, a exemplo da cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e do cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum). Essas espécies apresentam grande potencial para uso comercial, além de extrema importância ao reflorestamento e arborização urbana. A cerejeira-do-Rio-Grande e o cambucizeiro produzem frutos de alta riqueza nutricional, podendo serem comercializados *in natura* ou processados, contribuindo com a diversificação de produção de fruticultores brasileiros. A multiplicação comercial dessas fruteiras é realizada por sementes, e é dificultada devido ao baixo potencial de armazenamento das sementes. Os métodos convencionais de multiplicação assexuado em ambas fruteiras são ineficientes, e estudos visando as suas otimizações são escassos. A micropropagação, multiplicação de plantas através de técnicas de cultivo *in vitro*, vem a ser uma alternativa na produção de mudas comerciais em larga escala dessas fruteiras. Frente ao exposto, buscou-se, com a realização desse trabalho, estabelecer protocolos de germinação e multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande utilizando-se de explantes nodais advindos de plântulas germinadas em condições assépticas e avaliar os diferentes processos e componentes do meio de cultura para estabelecimento e multiplicação *in vitro* de explantes nodais e foliares de cerejeira-do-Rio-Grande e de cambucizeiro, provenientes de plantas cultivadas em estufa. As melhores condições de germinação e desenvolvimento das plântulas de cerejeira-do-Rio-Grande são quando cultivadas em meio MS suplementado com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a partir de sementes sem tegumento, e cultivadas no escuro; na indução de brotação é indicado o uso de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) em meio de cultura JADS; no subcultivo os melhores resultados foram obtidos pela adição de 1,0 a 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP; finalmente, é possível se obter altas taxas de enraizamento das brotações quando utilizados os meios de cultura WPM, ½ WPM, ¼ WPM e JADS sem adição de reguladores. A aclimatização das mudas propagadas é obtida pelo uso de substrato comercial (a base de casca de pinus, turfa e vermiculita) em mistura com vermiculita na proporção 1:1. Para o cultivo *in vitro* de explantes de plantas mantidas em estufa de cerejeira-do-Rio-Grande, para menor taxa de contaminação, oxidação e maior sobrevivência de explantes nodais, deve-se realizar a coleta no outono, realizando-se a assepsia com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% de cloro ativo. A adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na presença de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético) e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP auxiliam o alongamento das brotações, os meios de cultura ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS e SP apresentaram os melhores resultados na indução e desenvolvimento de brotações. Para explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande, a assepsia com NaClO a 0,75% de cloro ativo foi eficiente, não foi sendo identificada morfogênese em discos foliares. No cultivo *in vitro* de explantes de origem de plantas mantidas em estufa de cambucizeiro, explantes nodais devem ser coletados no outono, e a assepsia deve ser realizada com NaClO a 1,25% de cloro ativo; no estabelecimento do cultivo *in vitro*, deve se adicionar ao meio de cultura 2,0 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e realizar troca do meio de cultura aos 20 dias. A adição de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu maior obtenção de brotações; os meios MS,

$\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{1}{4}$  MS, WPM,  $\frac{1}{2}$  WPM, JADS e SP Modificado apresentaram os melhores resultados na indução e desenvolvimento das brotações. O subcultivo das brotações foi dificultado pelo amarelecimento e senescência. Em explantes foliares, a melhor assepsia foi obtida pelo uso de NaClO a 0,75% e o estabelecimento dos discos foliares necessitou da adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de polivinilpirrolidona (PVP). Não houve respostas morfogênicas em discos foliares de cambucizeiro.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; Frutas nativas; Mata Atlântica; Micropropagação

## ABSTRACT

### ***In vitro* cultivation of cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) and cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)**

Brazilian biodiversity is one of the richest in the world with different biomes that comprise its flora and fruit species with great commercial exploitation value. The Atlantic Forest, the third-largest biome in the country, is considered a global hotspot for conservation and biological diversity, with numerous native fruits, including species of the Myrtaceae family, such as the cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) and the cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum). These species have great potential for commercial use, in addition to being extremely important for reforestation and urban afforestation. The cerejeira-do-Rio-Grande and cambucizeiro fruits have high nutritional value, being commercialized fresh or processed, contributing to the diversification of production of Brazilian fruit growers. The commercial multiplication of these fruit trees is carried out through the seminal route and is hampered due to the low storage potential of the seeds. Conventional methods of asexual multiplication in both fruit trees are inefficient, and scientific studies willing to optimize them are scarce. Micropropagation, multiplication of plants through *in vitro* culture techniques, is an alternative method for large-scale production of commercial seedlings of these fruit trees. Therefore, this work aimed to establish protocols of germination and *in vitro* multiplication of cerejeira-do-Rio-Grande using nodal explants from seedlings germinated in aseptic conditions and to evaluate the different processes and culture medium components for the establishment and multiplication of nodal and leaf explants of cerejeira-do-Rio-Grande and cambucizeiro, originated from plants grown in the greenhouse. The best conditions for seed germination and seedling development of cerejeira-do-Rio-Grande are when they are cultivated in an MS medium supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose, removing the tegument and cultivating in the dark; for in shoot induction and development, the use of 2.5 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP) and JADS culture medium is recommended; in the subculture, the best results were obtained when adding 1.0 to 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP; finally, it is possible to obtain high rates of rooting of shoots when using WPM, ½ WPM, ¼ WPM, and JADS culture media without any growth regulators. The seedling acclimatization is achieved by using a commercial potting mix (based on pine bark, peat, and vermiculite) mixed with vermiculite in a 1:1 ratio. For the *in vitro* culture of cerejeira-do-Rio-Grande, explants from plants kept in the greenhouse, the lowest contamination rate, oxidation, and greater survival rate of nodal explants, the collection must be carried out in the autumn, performing the asepsis with sodium hypochlorite (NaClO) containing 1.25% of active chloride. The addition of 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP in the presence of 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ANA (naphthalene acetic acid) and 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP elongates the shoots, the culture media ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, and SP present the best results for shoot induction and development. For leaf explants of cerejeira-do-Rio-Grande, asepsis with 0.75% active chlorine of NaClO was efficient, no morphogenesis was identified in the leaf discs. In the *in vitro* culture of explants from cambucizeiro kept in the greenhouse, nodal explants must be collected in the autumn and performed asepsis with NaClO containing 1.25% of active chlorine; in the establishment phase, 2.0 mg L<sup>-1</sup> of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) must be added to the medium, renewing the medium at 20 days after introduction. The addition of 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP promoted the great number of shoots; the MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, JADS, and Modified SP media present the best results in the induction and development of shoots. The subcultured shoots are hampered by yellowing and senescence. In leaf explants, the

best asepsis is obtained by using 0.75% NaClO and the establishment of leaf discs required the addition of 1 g L<sup>-1</sup> of polyvinylpyrrolidone (PVP). There were no morphogenic responses in cambucizeiro leaf discs.

Keywords: Atlantic Forest; Micropropagation; Native fruits; Tissue culture

## INTRODUÇÃO

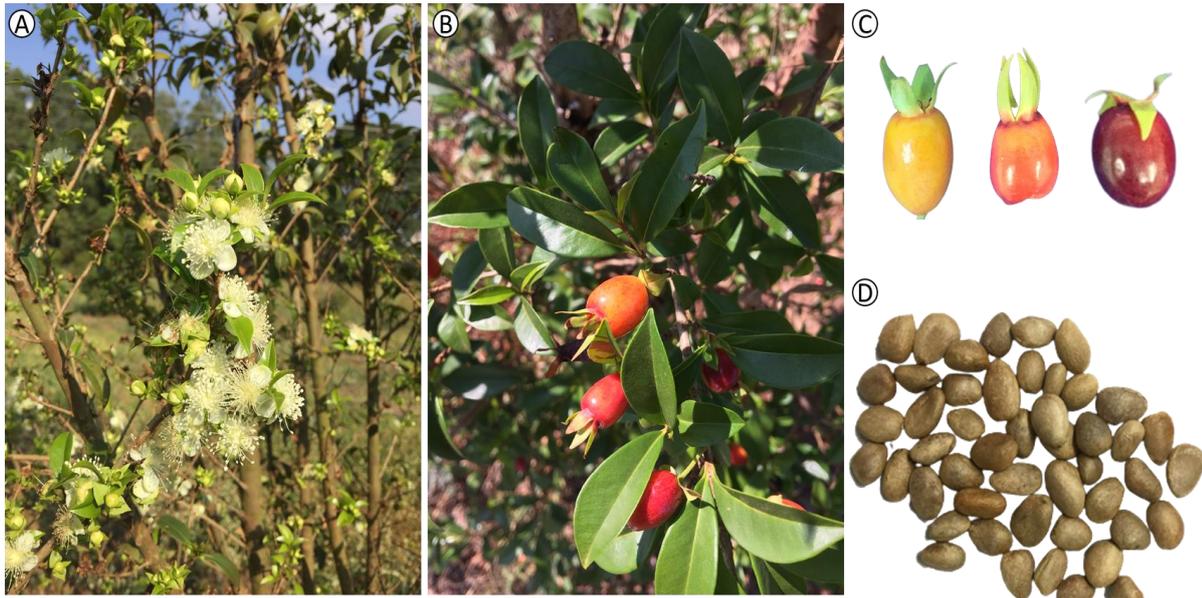
O Brasil é rico em biodiversidade, sendo relatados diversos trabalhos que listam cerca de 3.000 espécies nativas com potencial alimentício no país. O aproveitamento da diversidade vegetal brasileira depende de vários fatores, entre eles, da existência de técnicas de cultivo, de industrialização dos produtos e, principalmente, da divulgação do conhecimento para a comunidade, que ainda priorizam culturas exóticas, deixando muitas vezes de lado os próprios recursos naturais brasileiros (KINUPP; LORENZI, 2014).

Fruteiras nativas brasileiras apresentam grande importância no que se diz respeito à diversificação e à produção sustentável. A preocupação da população com uma alimentação de elevado valor nutritivo é um incentivo para o emprego de frutas nativas, tanto no mercado *in natura* quanto na fabricação de produtos processados, pois, apresentam compostos bioativos os quais as classificam como alimentos funcionais, tendência no mercado atual. O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), fruta nativa da Amazônia, é um exemplo deste potencial. Segundo o IBGE (2021), a produção da fruta atingiu, aproximadamente, 1,4 milhão de toneladas no ano de 2019, 7% a mais que no ano anterior. É importante destacar também o potencial de exploração destas espécies pelas indústrias farmacêuticas e a sua utilização no reflorestamento (LEITE; CORADIN, 2011; BARDIVIESSO et al., 2011; KÖHLER; BRACK, 2016; NEGRI et al., 2016).

Apesar de sofrer com a ação antrópica, o bioma Mata Atlântica se destaca pela quantidade de espécies nativas que a compõe. A família das mirtáceas, presente na Mata Atlântica, exibe grande potencial para exploração. Algumas espécies já conhecidas, tais como a goiabeira, a pitangueira e a jabuticabeira, são exemplos de frutas nativas exploradas comercialmente, com expressão econômica considerável. Além das espécies mais conhecidas pelos consumidores, a família Myrtaceae possui um número elevado de frutíferas ainda com exploração comercial restrita, tais como o cambucizeiro e a cerejeira-do-Rio-Grande (GRESSLER et al., 2006; MORAIS et al., 2014; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2018).

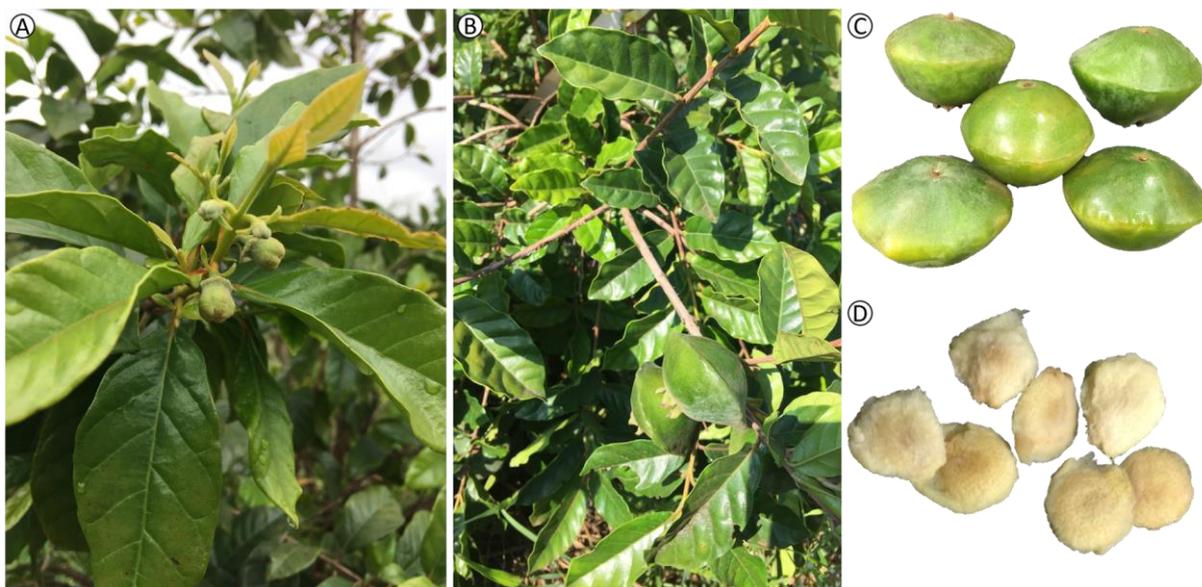
*Eugenia involucrata* DC., conhecida popularmente como cerejeira-do-Rio-Grande, é uma espécie arbórea de ocorrência em floresta estacional semidecidual. Cultivada em pomares domésticos da região sul e sudeste, apresenta frutos geralmente consumidos *in natura* ou para elaboração de geleias e doces. Além do sabor adocicado e agradável da fruta, a concentração de antioxidantes e a sua ação anti-inflamatória despertam o interesse comercial para esta espécie

(DEGENHARDT et al., 2007; LORENZI, 2015; INFANTE et al., 2016; NICÁCIO et al., 2017) (Figura 1).



**Figura 1** – Cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). Floração (A), frutificação (B), frutos (C) e sementes (D). Piracicaba-SP, Brasil, 2019. Fonte: Marcelo Almeida de Oliveira Junior.

A espécie *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum, fruteira nativa da Mata Atlântica, registrou risco de extinção sendo considerada uma espécie vulnerável pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) das espécies ameaçadas (IUCN, 2021). Porém, por meio de ações de resgate histórico-cultural, esse cenário vem sendo revertido, tendo sido incluída na categoria “menos preocupante” (LC) pela Lista Vermelha Oficial do Brasil (CNCFLORA, 2021). Produz frutos com alta acidez, ideais para produção de doces, licores, cachaças e sucos, muito valorizados na alta gastronomia. A espécie é considerada uma excelente fonte de vitamina C, antioxidantes, fibras e pectina, apresentando grande potencial para industrialização e comercialização de frutos (ANDRADE et al., 2011; KINUPP; LORENZI, 2014; LORENZI, 2015; BIANCHINI et al., 2016; TOKAIRIN et al., 2018) (Figura 2).



**Figura 2** – Cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum). Floração (A), frutificação (B), frutos (C) e sementes (D). Piracicaba-SP, Brasil, 2019. Fonte: Marcelo Almeida de Oliveira Junior.

A maior parte das espécies arbóreas nativas do Brasil é multiplicada por meio de sementes. Isso ocorre devido à falta de estudos para otimização de outros métodos que possibilitariam uma alternativa aos entraves existentes na propagação seminal convencional (SOUZA et al., 2006; DIAS et al., 2012). A multiplicação comercial do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) e da cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata*) também se concentram pela via seminal, como a maioria das espécies arbóreas nativas do Brasil. A coleta das sementes para produção de mudas é dificultada pela produção de frutos em época determinada e pelo baixo potencial de armazenamento das sementes.

Os métodos convencionais de multiplicação assexuada dessas frutíferas apresentam baixa taxa de enraizamento, fato frequentemente observado para espécies lenhosas. A fim de avaliar o método de multiplicação por estaquia de cerejeira-do-Rio-Grande, Inoue e Putton (2007) obtiveram apenas 27,3% de enraizamento, quando utilizados 3.000 mg.kg<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB). Baixas porcentagens de sucesso na propagação por enxertia também foram observadas por Lattuada et al (2010), na qual a combinação de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) apresentou-se ineficiente, e, quando utilizado cerejeira-do-Rio-Grande como enxerto e porta-enxerto, registrou-se 15% de sobrevivência do enxerto. O método da alporquia, empregado muitas das vezes em espécies de difícil multiplicação por outros métodos, também não apresentou resultados satisfatórios para a cerejeira-do-Rio-Grande (HOSSEL et al., 2017).

Estudos visando o aprimoramento dos métodos de multiplicação convencionais para o cambucizeiro são escassos. Segundo Santoro (2019), os métodos de alporquia e estaquia são

ineficientes para multiplicação do cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), enquanto que a enxertia por garfagem de fenda lateral é indicada apenas como um possível método de seleção de genótipos-elite, por apresentar somente 6% de fixação dos enxertos de cambucizeiro em combinação com a mesma espécie.

O sucesso na multiplicação assexuada das espécies vegetais está atrelado a diversos fatores, sendo esses intrínsecos ao material utilizado, como, por exemplo, idade da planta mãe, sanidade, condições fisiológicas, além dos fatores exógenos, tais como as condições ambientais dispostas no processo de formação das mudas (HARTMANN, et al., 2014).

Em mirtáceas, destacam-se dois principais fatores no insucesso da utilização de técnicas de multiplicação vegetativa, sendo eles a lignificação do lenho e a oxidação de compostos fenólicos, os quais agem como dificultadores de cicatrização e na formação de calos, e, conseqüentemente, na formação de raízes adventícias (FACHINELLO et al., 2005; DANNER et al., 2006; FRANZON et al., 2010). Zhang et al. (2009) destacaram que o baixo enraizamento de estacas de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) pode estar atrelado à sua anatomia, por apresentar impedimento físico de faixas de esclerênquima. Já para o cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), a grande presença de compostos fenólicos nos tecidos pode estar interferindo no sucesso da produção de mudas pelos métodos convencionais de multiplicação assexuada (SANTORO, 2019).

A utilização da micropropagação, termo utilizado para a multiplicação de plantas via cultivo *in vitro*, tem como objetivo a produção em larga escala de mudas assépticas a partir de gemas pré-existentes pela indução de crescimento (segmento nodal), regeneração de tecidos via embriogênese somática ou pela organogênese (HARTMANN, et al., 2014), sendo considerado um método alternativo viável à multiplicação convencional.

Em espécies da família Myrtaceae nativas do Brasil, estudos de cultivo *in vitro* vêm sendo conduzidos com o objetivo de entender o comportamento de cada espécie quando dispostas aos mais diversos componentes do meio de cultura e aprimorar o uso da técnica. São encontrados na literatura relatos promissores do uso da cultura de tecidos para essas espécies, como, por exemplo, a indução de embriogênese somática em camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) (ARAÚJO et al., 2015); jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts) (SILVEIRA et al., 2020); pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (STEFENON et al., 2020); e goiabeira serrana (STEFANELLO et al., 2005; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; FRAGA et al., 2012); de micropropagação de explantes provenientes de plantas adultas em pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (FREIRE et al., 2018); camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) (ARAUJO et al., 2016); e araçazeiro (*Psidium cattleianum*) (SOUZA et

al., 2006) e de multiplicação por explantes provenientes de plântulas germinadas *in vitro* em guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand (SOUZA et al., 2011; SOUZA et al., 2020); pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (SILVA et al., 2014); araçazeiro do campo (*Psidium schenckianum* Kiaersk) e araçazeiro verdadeiro (*Psidium guineense* Swartz) (SANTOS et al., 2021); casaqueira (*Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied) (SANT'ANA et al., 2018); gabirobeira (*Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg) (ROSSATO et al., 2019); guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) (MACHADO et al., 2020); e cambucizeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg.) (LÉDO et al., 2014).

Para a cerejeira-do-Rio-Grande, estudos têm sido realizados a fim de avaliar diferentes aspectos do processo de cultivo *in vitro* da espécie, como, por exemplo, o efeito do tipo de luz sobre o cultivo de explantes nodais (STEFANEL et al., 2020); os tipos de explantes utilizados e os diferentes meios de cultura (GOLLE et al., 2012); as diferentes combinações dos reguladores ácido naftalenoacético (ANA) e thidiazuron (TDZ) no cultivo de explantes nodais (GOLLE et al., 2017) e a indução de calogênese em explantes foliares (GOLLE; REINIGER, 2013; GOLLE et al., 2020). Já para o cambucizeiro, há apenas um único trabalho descrito na literatura, descrevendo o processo de multiplicação *in vitro* da espécie a partir de explantes advindos de plântulas germinadas *in vitro* (DEMÉTRIO et al., 2021). No entanto, em ambas espécies, há necessidade do desenvolvimento de maior número de trabalhos avaliando-se os processos de cultivo *in vitro*, na busca de maiores avanços do uso da técnica em tais fruteiras.

Face ao exposto, este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* (micropropagação) de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum).

## Referências

- STEFANEL, C. M.; REINIGER, L. R. S.; SILVA, L. D.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Diodos emissores de luz (LEDs) usado no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. **Pesqui. Florest. Bras.**, v. 40, p. 1-5, 2020.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo do explante e do meio nutritivo. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S. Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução a calogênese em cerejeira-do-mato. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1759-1762, 2013.

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 898-906, 2020.

DEMÉTRIO, C. A.; JACOB, J. F. O.; AMBROSANO, G. B.; OLIVEIRA, Ê. T.; RODRIGUES, P. H. V. In vitro propagation of cambuci (*Campomanesia phaea*): An endangered exotic fruit and ornamental plant from Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 145, p. 203-208, 2021.

ANDRADE, B. A. G. F.; FONSECA, P. Y. G.; LEMOS, F. **Cambuci – o fruto, o bairro, a rota: história, cultura, sustentabilidade e gastronomia**. São Paulo: Ourivesaria da Palavra, p. 176, 2011.

ARAÚJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; GARCIA, M. I. R.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; FILHO, A. B. M.; SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 15, n. 33, p. 1771-1780, 2016.

ARAÚJO, M. C. R.; VENDRAME, W. A.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; VILACA, R. Preliminary studies on in vitro propagation of camu-camu (*Myrciaria dubia*), an important medicinal plant. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, n. 128, p. 52-54, 2015.

BARDIVIESSO, D. M.; MARUYAMA, W. I.; REIS, L. L.; MODESTO, J. H.; REZENDE, W. E. Diferentes substratos e recipientes na produção de mudas de Guabioba (*Campomanesia pubescens* O. Berg). **Rev. Cient. Elet. de Agronomia**, Garça, v. 18, n. 1, p. 52-59, 2011.

BIANCHINI, F. G.; BALBI, R. V.; PIO, R.; SILVA, D. F.; PASQUAL, M.; VILAS BOAS, E. V. B. Caracterização morfológica e química de frutos de cambucizeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 1, p. 10-18, 2016.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VESCO, L. L. D.; STEINMACHER, D.; TORRES, A. C.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Sci. Hort.**, v. 111, n. 3, p. 228-234, 2007.

CNCFlora. *Campomanesia phaea* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em

<[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia\\_phaea](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia_phaea)>. Acesso em 20 jul. de 2021.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JUNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; DONAZZOLO, J.; SASSO, S. A. Z. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 28, n. 3, p. 530-532, 2006.

DEGENHARDT, J.; FRANZON, R. C.; COSTA, R. R. **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 211, p. 22, 2007.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesqui. Florest. Bras**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds) **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, 2005, 221p.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G. A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep.*, v. 31, p. 2165-2176, 2012.

FRANZON, R. C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J. C. S. **Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras**. Planaltina, Embrapa cerrados, documentos, 283, 2010, 56p.

FREIRE, C. G.; SCHVEITZER, B.; OLIVEIRA, L. P.; VIEIRA, R. L. Efeitos da coloração dos explantes e da quantidade de compostos fenólicos totais na introdução in vitro de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **InterfacEHS**, v. 13, n. 2, 2018.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Ver. Bras. Bot.**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2014. 880p.

HOSSEL, C.; WAGNER JÚNIOR, A.; HOSSEL, J. S. A. O.; FABIANE, K. C.; CITADIN, I. ‘Cerejeira da mata’ and ‘guabijuzeiro’ propagation by air layering. **Comun. Sci.**, v. 8, n. 4, p. 581-586, 2017.

IBGE. **Área destinada a colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes: quantidade produzida de açaí**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 18 de jul. de 2021.

INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, Curitiba, v. 37, n. 1, p. 55-61, 2007.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2021. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 20 de jul. de 2021.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014

KÖHLER, M.; BRACK, P. Frutas nativas no Rio Grande do Sul: Cultivando e valorizando a diversidade. **Agriculturas**, v. 13, n. 2, p. 6-15, 2016.

LATTUADA, D. S.; SOUZA, P. V. D.; GONZATTO, M. P. Enxertia herbácea em Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1285-1288, 2010.

LÉDO, A. S.; BARIN, L. B.; SILVA, A. V. C.; SÁ, F. P.; MACHADO, C. A. In vitro germination and acclimatization of cambui tree type seedlings. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1355-1359, 2014.

LEITE, L. L.; CORADIN, L. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA, p.934, 2011.

LORENZI, H.; LACERDA, M. T. C.; BACHER, L. B. **Frutas no Brasil nativas e exóticas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, p.768, 2015.

MACHADO, J. S.; DEGENHARDT, J.; MAIA, F. R.; QUOIRIN, M. Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Trees**, v. 34, p. 791-799, 2020.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 317-346, 2014.

NEGRI, T. C.; BERNI, P. R. A.; BRAZACA, S. G. C. Valor nutricional de frutas nativas e exóticas do Brasil. **Biosaúde**, Londrina, v. 18, n. 2, p. 82-96, 2016.

NICÁCIO, A. E.; ROTTA, E. M.; BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; KIMURA, E.; VISENTAINER, J. V.; MALDANER, L. Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from *Eugenia involucrata* DC. fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Anal. Methods**, v. 10, n. 8, p. 2718-2728, 2017.

- ROSSATO, M.; SCHUMACHER, P. V.; NETTO, A. P. C.; STEIN, V. C.; REIS, E. F.; VILELA, M. S. P.; PAIVA, L. V. Embryogenic potential of the callus of gabirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. **Act. Sci., Biol. Sci.**, v. 41, n. 1, e46358, 2019.
- SANT'ANA, C. R. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; SILVA, D. P. C.; SILVA, L. C. In vitro propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciênc. Agrotec.**, v. 42, n. 4, p. 372-380, 2018.
- SANTORO, M. B. **Multiplicação do cambucizeiro (*Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum) espécie nativa da Mata Atlântica**. 2019. 99f. Dissertação (Mestre em Ciências, área de concentração Fitotecnia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- SANTOS, M. A. C.; RÊGO, M. M.; QUEIRÓZ, M. A.; CRUZ, A. C. F.; SILVA, T. C. R.; PINHEIRO, M. V. M.; BATISTA, D. S.; ROCHA, D. I., OTONI, W. C. Evaluation of root-to-shoot de novo organogenesis in wild guava species, *Psidium schenckianum* and *P. guineense* (Myrtaceae). **Vegetos**, v. 34, p. 68-76, 2021.
- SILVA, A. P. G.; TOKAIRIN, T. O.; ALENCAR, S. M.; JACOMINO, A. P. Characteristics of the fruits of two uvaia populations grown in Salesópolis, SP, Brazil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 40, n. 2, 2018.
- SILVA, N. A.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z.; ROSSO, V. V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic Forest. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014.
- SILVA, P. R. D.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO, M. M.; JOBIM, L. H. JUNGES, M.; STEFENON, V. M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through in vitro germination and micropropagation. **Ann. For. Res.**, v. 57, n. 1, p. 39-45, 2014.
- SILVEIRA, M. J.; HARTHMAN, V. C. Anatomia foliar de *Eugenia involucrata* DC. e *E. Bracteata* VELL. (Myrtaceae). **INSULA**, Florianópolis, n. 39, p. 47-58, 2010.
- SILVEIRA, S. S.; ANNA-SANTOS, B. F. S.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). **Acta Sci. Agron.**, v. 42, 2020.
- SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido a planta matriz no estabelecimento in vitro de araçazeiro "Irapuã". **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1920-1922, 2006.

SOUZA, L. S.; CAMPOS, S. S.; AVRELLA, E. D.; FIOR, C. S.; SCHWARZ, S. F. In Vitro Rooting and Multiplication of *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand. **Floresta Ambient.**, v. 27, n. 1, 2020.

SOUZA, L. 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 (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Rev. Bras. Fruti.**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.

STEFANELLO, S.; VESCO, L. L. D.; DUCROQUET, K. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Sci. Hort.**, v. 105, p. 117-126, 2005.

STEFENON, V. M.; PINHEIRO, M. V. M.; FREITAS, F. R.; SILVA, V. J. B.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, D. D.; GUERRA, M. P. In vitro callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. **Biotecnol. Veg.**, v. 20, n. 2, p. 135-146, 2020.

TOKAIRIN, T. O.; NETO, H. B.; JACOMINO, A. P. Cambuci – *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. In: RODRIGUES, S.; SILVA, E. O.; BRITO, E. S. (Ed.). **Exotic Fruits Reference Guide**. Academic Press. p. 91-95, 2018.

ZHANG, M.; TANG, H.; WANG, D.; REN, S.; LIU, R. A study of rooting characteristics and anatomical structure of feijoa cuttings. **Agric. J.**, v. 4, n. 2, p. 86-90, 2009.

## CAPÍTULO 1: GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CEREJEIRA-DO-RIO-GRANDE (*Eugenia involucrata* DC.).

### Resumo

A cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.), espécie nativa da Mata Atlântica, apresenta uso potencial dos frutos no consumo *in natura* e no processamento industrial, além de se destacar por apresentarem propriedades medicinais e uso na arborização urbana e reflorestamento. A multiplicação da espécie é realizada por sementes; entretanto, apresenta entraves, com destaque para a rápida queda de viabilidade durante armazenamento, e disponibilidade restrita de sementes a épocas específicas do ano por conta de período curto de frutificação. Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande e desenvolver um protocolo eficiente de micropropagação utilizando-se explantes nodais de plântulas assépticas a partir de sementes germinadas *in vitro*. Foram utilizadas sementes de cerejeira-do-Rio-Grande coletadas de uma árvore adulta da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP. Experimentos para verificação do melhor desenvolvimento das plântulas avaliaram os efeitos da retirada do tegumento da semente, condição luminosa (luz e escuro) durante a germinação; concentrações de sais MS (MS, ½ MS e ¼ MS) e sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultura, e fracionamento da semente (intactas, fracionadas em duas ou quatro partes). No processo de multiplicação *in vitro*, foram realizados os ensaios de indução de brotação em explantes nodais pela combinação de 6-benzilaminapurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>); efeito da adição de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) no alongamento das brotações; efeito dos meios de cultura na indução e subcultivo das brotações (MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, SP Mod e SP); otimização do processo de indução inicial de brotações (MS + 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e JADS + 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); a combinação de BAP (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) no primeiro subcultivo das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande, e aclimatização das mudas enraizadas em diferentes composições de substratos (substrato à base de casca de pinus ou mistura de substrato à base de casca de pinus e de vermiculita, na proporção 1:1). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (LBPH) do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP), em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Os resultados levaram ao estabelecimento de um protocolo completo de germinação e multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande. As melhores condições de germinação e desenvolvimento *in vitro* das plântulas foram obtidas quando as sementes foram cultivadas em meio MS suplementado de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com a retirada do tegumento na ausência de luminosidade. Sementes fracionadas revelaram potencial germinativo; entretanto, o desenvolvimento da parte aérea das plântulas é afetado negativamente pelo fracionamento, não sendo, portanto, indicado na multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande. A indução de brotações é favorecida pela adição de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de ANA, e otimizado quando utilizado o meio JADS. A adição de GA<sub>3</sub> não induziu alongamento nas brotações. O meio de cultura JADS foi o mais indicado no cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande e altas porcentagens de enraizamento foram obtidas em meio WPM, ½ WPM, ¼ WPM e JADS, sem adição de reguladores. No subcultivo, a adição de 1,0 a 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou os melhores resultados na multiplicação. Por fim, o sucesso da aclimatização foi obtido pelo uso do substrato comercial misturado com vermiculita na proporção 1:1.

Palavras-chave: Micropropagação; Myrtaceae; Protocolo; Reguladores vegetais

## Abstract

The cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.), an Atlantic Forest native species, presents potential use of its fruits for fresh consumption and industrial processing, besides their medicinal properties and their use for afforestation and reforestation. The multiplication of this species is carried out by seeds; however, this method has some obstacles, including its rapid loss of viability during storage, and the restricted availability of seeds at specific times of the year due to a short period of fruiting. Therefore, this work aimed to evaluate the *in vitro* germination of cerejeira-do-Rio-Grande seeds and to develop an efficient micropropagation protocol using nodal explants from aseptic *in vitro* germinated seedlings. Seeds of cerejeira-do-Rio-Grande were collected from a mature tree at the Luiz de Queiroz College of Agriculture ESALQ/USP. Experiments to verify the best seedling development conditions included the evaluation of the effects of removing the seed tegument and light conditions (dark and light) during the germination, MS salt (MS, ½ MS and ¼ MS) and sucrose (15 and 30 g L<sup>-1</sup>) concentration in the culture medium, and the seed cuttings (intact, cut in two or in four parts). In the process of *in vitro* multiplication, tests were conducted to induce shoot proliferation in nodal explants by using the combination of 6-benzylaminapurine (BAP) (0.0; 1.0; 2.5 and 5.0 mg L<sup>-1</sup>) with naphthalene acetic acid (ANA) (0.0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>); effects of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.0; 1.0; 2.0 mg L<sup>-1</sup>) on shoot elongation; effects of culture media (MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, Modified SP and SP) on the shoot induction and development; optimization of initial shoot induction and development (MS + 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP and JADS + 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP); the combination of BAP (0.0; 1.0; 2.5 and 5.0 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0.0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>) in the first subculture of cerejeira-do-Rio-Grande shoots and micropropagated rooted seedlings acclimatization in different substrates (pine bark based potting mix and the mix of pine bark based potting mix with vermiculite, on the ratio 1:1). All the experiments were conducted in the Horticultural Plant Biotechnology Laboratory (LBPH) of the Department of Plant Production of Luiz de Queiroz College of Agriculture (USP), in Piracicaba, São Paulo, Brazil. According with the results, it was possible to establish an efficient and complete *in vitro* germination and multiplication protocol of cerejeira-do-Rio-Grande. The best conditions of *in vitro* germination and development of the seedlings were obtained by cultivating in MS culture media supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose, removing the seeds tegument and keeping the seeds in the dark. The cut seeds are able to germinate; however, it affects the areal part formation, not being indicated the use of seed cuttings for *in vitro* multiplication of cerejeira-do-Rio-Grande. The shoot induction is supported by the adding of 2.0 mg<sup>-1</sup> of BAP without ANA, and optimized when used JADS culture medium. The adding of GA<sub>3</sub> does not elongate the shoots. It is indicated the use of JADS culture medium in the *in vitro* culture of cerejeira-do-Rio-Grande and high rooting rates were obtained with the use of WPM, ½ WPM, ¼ WPM and JADS culture medium, without any growth regulators. For the first subculture, the addition of 1.0 to 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP provided the best results for multiplication. Lastly, the success of acclimatization was obtained with the use of commercial potting mix in combination with vermiculite in the 1:1 ratio.

Keywords: Growth regulators, Micropropagation, Myrtaceae, Protocol

## Introdução

A biodiversidade brasileira é uma das maiores do mundo, incluindo um grande centro de diversidade genética de espécies frutíferas. Embora tenha se registrado drástica redução da área coberta pela Mata Atlântica, este é considerado ainda o terceiro maior bioma brasileiro, sendo considerado um *hotspot* de biodiversidade e de conservação mundial (MITTERMIEER et al., 2011; WAGNER et al., 2020).

Devido ao elevado número de espécies (cerca de 3600) e aos seus 150 gêneros, a família Myrtaceae é uma das principais representantes da Mata Atlântica, apresentando um enorme potencial nos seus mais diversos aspectos, tais como, reflorestamento, e usos alimentício, madeireiro e medicinal. O gênero *Eugenia* é um dos representantes de maior importância dentro da família Myrtaceae, detendo cerca de 1000 espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central, sendo 350 nativas do Brasil (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; GUERRA et al., 2016).

Espécie nativa da Mata Atlântica, a cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) possui ocorrência no Brasil desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. A cerejeira-do-Rio-Grande apresenta potencial de exploração por apresentar madeira de alta qualidade, frutos para consumo *in natura* e para o processamento industrial, diversificando a produção de frutas no Brasil, além de apresentar potencial medicinal, por suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas e antioxidantes (CRIPA et al., 2014; GOLLE et al., 2017; GOLLE et al., 2020).

Embora apresente grande atratividade pelo potencial da espécie, sua propagação comercial se limita ao método seminal, o qual ainda é dificultado devido à biologia da espécie, incluindo dificuldade de coleta de suas sementes, pois sua frutificação é limitada em apenas uma vez ao ano no período de outubro a novembro (DANNER et al., 2010). Suas sementes são recalcitrantes, sensíveis à dessecação, e apresentam rápida queda de viabilidade, limitando ainda mais a produção de mudas comerciais. Em geral, sementes desta espécie são armazenadas em sacos plásticos, à temperatura de 5 a 10°C por até 180 dias, ou em temperatura ambiente por 30 dias, mantendo-se viáveis nestas condições (MALUF et al., 2003; DELGADO; BARBEDO, 2012; ALEGRETTI et al., 2015). Estudos visando os métodos de propagação da espécie são escassos. Além disso, no que se diz respeito à multiplicação assexuada, a cerejeira-do-Rio-Grande não apresenta respostas eficientes de produção de mudas (INOUE; PUTTON, 2007; LATTUADA et al., 2010; HOSSEL et al., 2017).

Técnicas visando o aprimoramento da produção de mudas de espécies da família Myrtaceae se fazem necessárias e vêm sendo estudadas por diversos autores. A cerejeira-do-Rio-Grande, assim como algumas outras espécies do gênero *Eugenia*, possuem potencial de regeneração de novas raízes e plântulas a partir do fracionamento de suas sementes. Essa característica permite uma ampliação na produção de mudas (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2005; AMADOR; BARBEDO, 2011; GOMES et al., 2016).

O uso de ferramentas biotecnológicas, tais como o cultivo *in vitro* de espécies nativas é uma técnica de extrema importância, com múltiplos objetivos, com destaque para a produção em massa de mudas direcionadas ao reflorestamento; a preservação de germoplasma de espécies ameaçadas; o melhoramento genético; e a produção de mudas clonais em escala comercial. No entanto, a multiplicação clonal *in vitro* de espécies nativas, tais como as lenhosas, apresentam diversas limitações. A utilização de explantes oriundos de plantas matrizes adultas apresentam grande taxa de contaminação e produção de compostos fenólicos que contribuem para a oxidação do material vegetal, dificultando seu estabelecimento *in vitro* (ANDRADE et al., 2000; PASQUAL et al., 2012; PIJUT et al., 2012; SILVA et al., 2014).

O estabelecimento de plântulas germinadas *in vitro* como fonte de explantes para produção comercial em massa de mudas vem a ser uma alternativa aos problemas encontrados na micropropagação clonal de espécies lenhosas. A germinação *in vitro* permite a obtenção de plântulas livres de patógenos, com germinação uniforme e com maiores taxas de germinação dos que as sementes germinadas em viveiros, permitindo a formação de um lote de mudas jovens, as quais, geralmente, pelo seu estado fisiológico, apresentam maiores respostas às condições aplicadas *in vitro* (CASTRO et al., 2014; LÉDO, et al., 2014; BRAMHANAPALLI et al., 2017; SOUZA et al., 2017). Machado et al. (2020), ao utilizarem-se da técnica de germinação *in vitro*, estabeleceram, pela primeira vez, um protocolo de micropropagação de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.), fruteira nativa do Brasil de ocorrência nos biomas Cerrado e Mata Atlântica.

Trabalhos visando o desenvolvimento de protocolos de multiplicação a partir de sementes germinadas *in vitro* de espécies lenhosas nativas do Brasil são encontrados na literatura, apresentando resultados positivos para algumas espécies, tais como *Eugenia uniflora* L. (SILVA et al., 2014; STEFENON et al., 2020); *Campomanesia rufa* (SANT'ANA et al., 2018); *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg (ROSSATO et al., 2019); *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (MACHADO et al., 2020); *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum (DEMÉTRIO et al., 2021); *Myrciaria tenella* O. Berg. (LÉDO et al., 2014); *Bowdichia virgilioides* (MOURA et al., 2014); *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze.

(ARAGÃO et al., 2017). Entretanto, para a cerejeira-do-Rio-Grande, não há informações disponíveis.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e aprimorar o processo de germinação *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) para obtenção de plântulas livres de contaminações, e avaliar os diferentes componentes do meio de cultura visando a obtenção de um protocolo completo de multiplicação *in vitro* da espécie a partir de segmentos nodais.

## **Material e Métodos**

### **Germinação *in vitro***

#### **Obtenção do material vegetal**

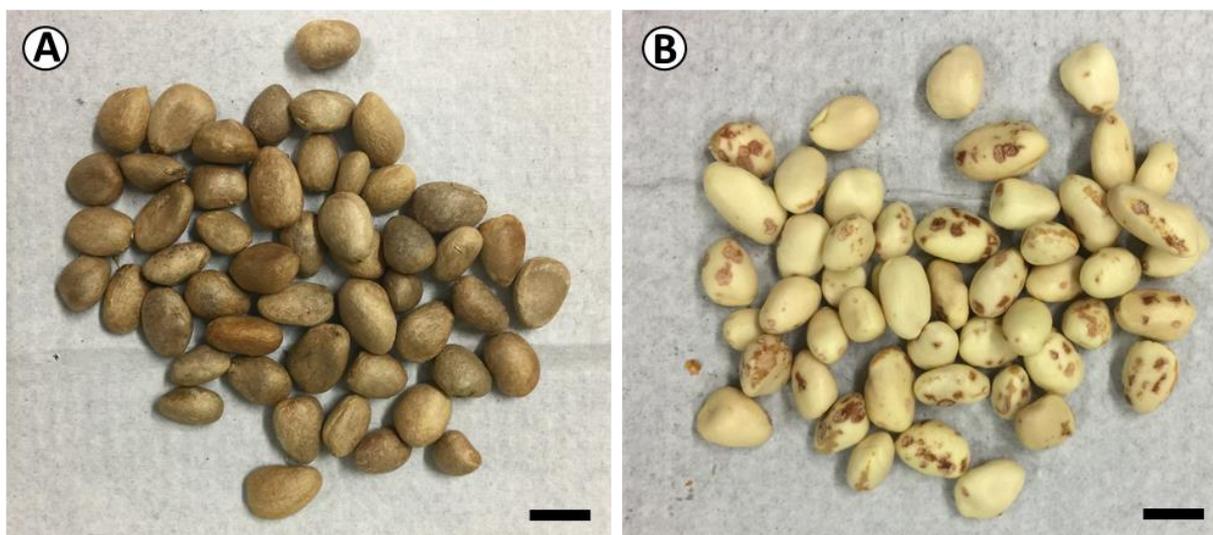
Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (LBPH) do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP), em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Frutos maduros, de coloração avermelhada, foram coletados de uma planta adulta, localizada no parque da ESALQ/USP. Após a coleta, os frutos foram levados ao Laboratório para extração das sementes onde foram despulpados com auxílio de uma faca. As sementes foram lavadas em água corrente e, em seguida, secas para armazenamento em geladeira  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  até o momento de execução dos trabalhos.

#### **Desinfestação**

Antes de serem introduzidas em meio de cultura para execução dos experimentos de germinação *in vitro*, as sementes de cerejeira-do-Rio-Grande foram submetidas ao tratamento de desinfestação, constituído por imersão em álcool 70% (v:v) por 1 minuto, seguida de três enxagues com água destilada por cerca de 50 segundos e, em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio, 1,25% de cloro ativo, com adição de 3 gotas de detergente neutro (Tween 20<sup>®</sup>). Em câmara de fluxo laminar, foram realizados cinco enxagues para remoção dos produtos com água destilada autoclavada, por 50 segundos em cada enxague.

#### **Germinação *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande em função da retirada do tegumento e da condição luminosa**

Após secas, as sementes foram selecionadas, excluindo-se as sementes pequenas, ou seja, aquelas menores do que 8 mm de comprimento. Os tratamentos constituíram em: T1 – Sementes com tegumento na luz ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); T2 – Sementes com tegumento no escuro (BOD); T3 – Sementes sem tegumento na luz ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e T4 – Sementes sem tegumento no escuro (BOD). A remoção do tegumento foi realizada com o auxílio de um bisturi (Figura 1).



**Figura 1** – Sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) com presença do tegumento (A) e com a retirada do tegumento (B). Barras = 1 cm (A e B). Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

O meio de cultura utilizado na execução deste experimento foi o Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na concentração de 100% de sais, suplementado com  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $2\text{g L}^{-1}$  de Phytigel™ (Sigma-Aldrich), e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem ( $120^{\circ}\text{C}$  e uma atmosfera de pressão, por 20 minutos). Após cinco enxagues em câmara de fluxo laminar, por cerca de 50 segundos cada enxágue, as sementes foram introduzidas com auxílio de uma pinça, em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo, aproximadamente, 10 mL de meio de cultura, seguido da vedação com tampa plástica e plástico filme PVC. Os tratamentos na presença de luz foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . Os tratamentos no escuro foram mantidos em BOD ( $26^{\circ}\text{C}\pm 1$ ).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), seguindo esquema fatorial 2x2 (tegumento x condição luminosa), com 5 repetições, sendo cada repetição representada por 10 tubos de ensaio, totalizando-se 50 tubos por tratamento e 200 sementes na realização do experimento.

Os tratamentos foram avaliados a cada 7 dias até o 35º dia após introdução das sementes. As variáveis observadas a cada 7 dias foram: porcentagem de germinação (%), levando-se em consideração a protrusão da raiz; e porcentagem de formação da parte aérea (%). Aos 35 dias, foram também mensurados o comprimento da parte aérea (CPA) e o número médio de nós. Após obtenção dos valores de porcentagem, foi realizado o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de velocidade de emergência (IVE), conforme descrito por Maguire (1962) sendo IVG:  $G1/N1+G2/N2+...+Gn/Nn$ , onde  $Gn$  = número de sementes germinadas em cada avaliação e  $Nn$ = número de dias até a realização da avaliação e IVE:  $E1/N1+E2/N2+...+En/Nn$ , onde  $En$  = número de plântulas que emergiram (formaram parte aérea) em cada avaliação e  $Nn$ = número de dias até a realização da avaliação.

### **Germinação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande em função da concentração de sais de MS e de sacarose**

Procedeu-se a retirada do tegumento com auxílio de um bisturi e, em seguida, as sementes foram submetidas à desinfestação para introdução *in vitro*. O experimento foi constituído de seis tratamentos (Tabela 1), suplementados com Phytigel™ (Sigma-Aldrich) (2g L<sup>-1</sup>), e pH ajustado a 5,8, e conduzido em BOD com 24 horas de escuro e 26°C±1.

**Tabela 1** - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados no experimento de germinação *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). T1 (MS + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose), T2 (MS + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose), T3 (½MS + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose), T4 (½MS + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose), T5 (¼MS + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose) e T6 (¼MS + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose).

Meio de cultura	MS	MS	½ MS	½ MS	¼MS	¼MS
<b>Componentes</b>						
	mg L <sup>-1</sup>					
<b>Macronutrientes</b>						
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	440	220	220	110	110
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	85	85	42,5	42,5
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	950	950	475	475
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	185	185	92,5	92,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650	825	825	412,5	412,5
<b>Micronutrientes</b>						
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,0125	0,0125	0,00625	0,00625
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,0125	0,0125	0,00625	0,00625
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	3,1	3,1	1,55	1,55
KI	0,83	0,83	0,415	0,415	0,2075	0,2075
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	11,15	11,15	5,575	5,575
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,125	0,125	0,0625	0,0625
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	4,3	4,3	2,15	2,15
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	13,9	13,9	6,95	6,95
NaEDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	18,65	18,65	9,325	9,325
<b>Orgânicos</b>						
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,25	0,25	0,125	0,125
Glicina	2	2	1	1	0,5	0,5
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,25	0,25	0,125	0,125
Tiamina HCl	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025
Sacarose	30000	15000	30000	15000	30000	15000

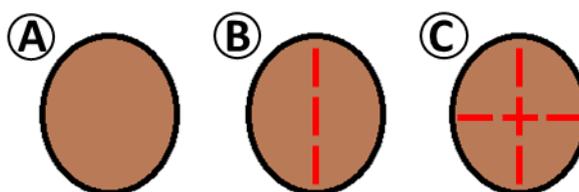
MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962)

Foram registradas, semanalmente, a porcentagem de germinação (%); porcentagem de formação da parte aérea (%) e, aos 35 dias, o comprimento da parte aérea (CPA); número de nós e morte apical da plântula (MAP). Ao final do experimento, realizaram-se os cálculos de IVG e IVE.

O trabalho foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x2 (concentração de sais do meio MS x concentração de sacarose) utilizando-se 50 sementes em cada tratamento, sendo 5 repetições por tratamento e 10 tubos por repetição, em um total de 300 sementes utilizadas no experimento.

## Germinação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande em função do fracionamento da semente

Procedeu-se a retirada do tegumento e a desinfestação das sementes para posterior introdução *in vitro*. Em câmara de fluxo laminar, após cinco enxágues de 50 segundos cada, as sementes foram fracionadas com auxílio de um bisturi e uma pinça para instalação do experimento de acordo com os seguintes tratamentos: T1 – sementes intactas, sem fracionamento; T2 – sementes fracionadas ao meio no hilo, seguindo a marca da cicatriz placentária, com descrito por Silva et al. (2005) e T3 – sementes fracionadas em 4, corte transversal e longitudinal (Figura 2).



**Figura 2** - Esquema dos tratamentos utilizados na realização do experimento de fracionamento da semente de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). Semente intacta (A); semente fracionada em duas partes (seguindo cicatriz placentária) (B); semente fracionada em quatro partes (corte transversal e longitudinal) (C).

O meio de cultura utilizado foi o MS com 100% da concentração de sais suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2g L<sup>-1</sup> de Phytigel™ (Sigma-Aldrich), e pH ajustado a 5,8. As sementes foram introduzidas em recipientes Magenta™ (77 x 77 x 97 mm) contendo, aproximadamente, 20 mL de meio de cultura, seguido da vedação com tampa plástica envolto por plástico filme PVC e acondicionadas em BOD, e mantidas 24 horas no escuro a 26°C±1.

As variáveis porcentagem de germinação (%) e porcentagem de formação da parte aérea (%) foram coletadas semanalmente, até 35 dias após o início do experimento. Após este período, os tratamentos foram transferidos para sala de crescimento, e submetidos a um fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a 25°C até completarem 60 dias de cultivo *in vitro*. Ao final do experimento, foram analisados porcentagem de germinação (%); porcentagem de formação da parte aérea (%); comprimento da parte aérea (CPA); fator de incremento de germinação (FIG) e fator de produção de produção de plântulas completas (FIP), como descrito por Silva (2003), calculando-se, para FIG, o número médio das frações que iniciaram a germinação a partir do fracionamento de uma semente (FIG= nfg.ns<sup>-1</sup>), sendo nfg o número de frações germináveis e ns o número de sementes colocadas para germinar, e calculando-se para FIP, o número médio das frações apresentando produção de plântulas completas (FIP= nfp.ns<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>), sendo n<sub>fp</sub> o número de frações produzindo plântulas completas e n<sub>s</sub> o número de sementes colocadas para germinar

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 3 tratamentos constituído por dez repetições, representadas por uma magenta com 5 frações, totalizando 175 sementes na execução do experimento.

### **Multiplicação *in vitro***

#### **Concentrações de BAP e ANA na indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro***

Após 35 dias de escuro, as plântulas obtidas da germinação *in vitro* foram transferidas para sala de crescimento e mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 25°C, até os 60 dias de cultivo, quando, posteriormente, foram utilizadas como fonte de explantes para a execução do experimento.

O meio de cultura utilizado foi o MS completo suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6g L<sup>-1</sup> de ágar e com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e de ácido naftalenoacético (ANA), conforme os tratamentos, a seguir: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T2 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T5 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T6 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T7 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T8 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Os meios de cultura foram autoclavados a 120°C e uma atmosfera de pressão, por 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar e com auxílio de um bisturi, foram retiradas as folhas das plântulas, e os explantes nodais, separados com 2 nós (4 gemas), e, em seguida, foram introduzidos verticalmente nos meios de cultura conforme os tratamentos descritos. Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 25°C. Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as variáveis comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB) e número de brotações por explante (NBPE).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x4 (presença e ausência de ANA x concentrações de BAP), com 5 repetições representadas por 8 tubos em cada repetição, totalizando 320 explantes.

#### **Concentrações de GA<sub>3</sub> no crescimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande**

Brotações obtidas a partir de segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro*, com cerca de 1 cm de comprimento, foram utilizadas para a realização deste experimento. O meio utilizado foi o MS completo, suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) de acordo com os tratamentos: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup>; T2 – 0,5 mg L<sup>-1</sup>; T3 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> e T4– 2,0 mg L<sup>-1</sup>, seguido por autoclavagem a 120 C° e uma atmosfera de pressão por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e 25°C até o momento da avaliação, sendo realizada a troca do meio de cultura aos 30 dias para os mesmos meios iniciais. Aos 60 dias, registrou-se o comprimento das brotações.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo 4 tratamentos com 9 repetições, sendo cada repetição representada por um tubo azeitona contendo 3 brotos, totalizando-se 108 brotações neste experimento.

#### **Diferentes meios de cultura na indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro***

Foram utilizadas plântulas germinadas *in vitro* com 60 dias como fontes de explantes para execução do trabalho. As folhas foram retiradas em câmara de fluxo laminar, e os explantes nodais foram separados para introdução em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com os diferentes meios de cultura. Cada explante foi constituído por 2 nós (4 gemas). Os diferentes tratamentos utilizados na execução do experimento foram os diferentes tipos de meio de cultura apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados no experimento de indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). T1 (MS), T2 (½MS), T3 (¼MS), T4 (WPM), T5 (½WPM), T6 (¼WPM), T7 (JADS), T8 (SP Modificado) e T9 (SP).

Meio de cultura	MS	½ MS	¼MS	WPM	½WPM	¼WPM	JADS	SP Mod	SP
<b>Componentes</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
<b>Macronutrientes</b>									
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	220	110	96	48	24	-	220	220
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	556	278	139	1181	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	42,5	170	85	42,5	408	85	85
KNO <sub>3</sub>	1900	950	475	-	-	-	809	950	950
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	990	495	247,5	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185	92,5	370	185	92,5	739,5	185	185
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	412,5	400	200	100	324	825	825
<b>Micronutrientes</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,00625	-	-	-	-	0,0125	0,0125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,00625	0,25	0,125	0,0625	1,25	0,0125	0,0125
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,1	1,55	6,2	3,1	1,55	3,1	3,1	3,1
KI	0,83	0,415	0,2075	-	-	-	-	0,415	0,415
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	11,15	5,575	22,3	11,15	5,575	12,8	11,15	11,15
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,125	0,0625	0,25	0,125	0,0625	0,15	0,125	0,125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	4,3	2,15	8,6	4,3	2,15	4,3	4,3	4,3
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8	13,9	6,95	27,8	13,9	6,95	55,6	6,95	6,95
NaEDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	18,65	9,325	37,3	18,65	9,325	74,5	9,325	9,325
<b>Orgânicos</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
Ácido nicotínico	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	3	3
Glicina	2	1	0,5	2	1	0,5	-	-	-
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100	100	100	50
Piridoxina HCl	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	3	3
Tiamina HCl	0,1	0,05	0,025	1	0,5	0,25	5	3	3
Pantotenato de Ca <sup>+2</sup>	-	-	-	-	-	-	2,4	3	3
L- Glutamina	-	-	-	-	-	-	146	146	146
L- Císteina	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-
L- Arginina	-	-	-	-	-	-	7	-	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	10000

MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), JADS (CORREIA et al., 1995), SP (CID et al., 1999).

Os meios de cultura foram suplementados com 6g L<sup>-1</sup> de ágar, e, a seguir autoclavados a 120°C e uma atmosfera de pressão por 20 minutos. Após introdução *in vitro*, os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento até o momento da avaliação, sendo realizada aos 40 dias a transferência dos explantes para tubos contendo mesmo meio inicial, de acordo

com os mesmos tratamentos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e  $25^\circ\text{C}$  até o momento da avaliação.

Aos 60 dias de cultivo, foram analisadas as porcentagens de sobrevivência do explante (%SOB); o comprimento das brotações (CPB); a porcentagem de gemas brotadas (%GB); o número de brotações por explante (NBPE); o número de folhas por brotação (NFPB) e o número de folhas senescentes por brotação (NFS). Logo após as avaliações, as brotações foram excisadas e subcultivadas em tubos contendo o mesmo meio inicial. Aos 30 dias de cultivo, foram avaliados CPB; NFPB; NSF; porcentagem de formação de raiz (%FR) e número de raiz por brotação (NRB).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos constituídos por 5 repetições de 6 tubos por repetição contendo um explante por tubo, totalizando 270 explantes neste experimento.

### **Otimização da indução e desenvolvimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro***

Após a obtenção do melhor meio de cultura e melhor dose de BAP na indução e desenvolvimento das brotações, foi realizado o experimento para aprimoramento dessa fase.

Em câmara de fluxo laminar e com auxílio de um bisturi, foram retiradas as folhas das plântulas e os explantes nodais com 2 nós (4 gemas) foram separados e introduzidos verticalmente nos tratamentos: T1 – MS completo +  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e T2 – JADS +  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e  $25^\circ\text{C}$ .

Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as variáveis comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB) e número de brotações por explante (NBPE).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 2 tratamentos constituídos por 10 repetições e 8 tubos por repetição, totalizando 160 explantes.

### **Concentrações de BAP e ANA no subcultivo das brotações de cerejeira-do-Rio-grande germinadas *in vitro***

Brotações de cerejeira-do-Rio-Grande, com cerca de 0,6 a 1,0 cm e 40 dias de cultivo, foram obtidas a partir da segmentação de plântulas germinadas *in vitro* introduzidas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com meio de cultura JADS suplementado de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

As brotações foram dispostas horizontalmente no meio de cultura. O meio utilizado foi o JADS suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e os reguladores vegetais conforme os tratamentos: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T2 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T5 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T6 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T7 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T8 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e 25°C até o momento da avaliação.

Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as variáveis porcentagem de sobrevivência (%SOB); número de brotações por explante (NBPE); número de brotações adventícias por explante (NBAPE); comprimento das brotações (CPB) e oxidação dos explantes, foram distribuídas notas para a avaliação da oxidação dos explantes, sendo elas 0 (explante sem oxidação); 1 (explante com 25% de oxidação); 2 (explante com 50% de oxidação); 3 (explante com 75% de oxidação) e 4 (explante com 100% de oxidação). O experimento foi conduzido pelo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 8 tratamentos constituídos por 2 repetições de 1 pote azeitona por repetição e 2 explantes por pote, totalizando 64 explantes.

#### **Aclimatização de mudas de cerejeira-do-Rio-Grande provenientes de plântulas germinadas *in vitro***

Brotações de cerejeira-do-Rio-Grande obtidas pela multiplicação *in vitro* de segmentos nodais e enraizados em meio de cultura JADS, sem adição de reguladores, foram utilizados para execução do experimento. Os tratamentos constituíram-se de S1 – Substrato comercial (a base de casca de pinus, turfa e vermiculita) e S2 – Substrato comercial (a base de casca de pinus, turfa e vermiculita) em mistura com vermiculita na proporção 1:1, autoclavados a 120°C e uma atmosfera de pressão, por 20 minutos. Foram utilizados copinhos plásticos de café (50 mL) com 4 furos (0,3 cm de diâmetro) no fundo para drenagem. Sacolas plásticas (16 x 25 cm) foram utilizadas para manter a umidade da região a parte aérea das plantas em aclimatização. Os copinhos foram colocados na sala de luz (Figura 3). Semanalmente, por um período de 90 dias, foi realizada a manutenção da umidade, borrifando-se água destilada no interior das sacolas plásticas e no substrato, e retirada da sacola plástica, aumentando a frequência ao passar dos dias até as mudas serem aclimatizadas ao ambiente e não precisarem da sacola plástica.



**Figura 3** - Aclimatização de mudas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). Barra = 3 cm. Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2020.

Aos 90 dias de cultivo, foi analisada a porcentagem de sobrevivência das mudas de cerejeira-do-Rio-Grande. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 2 tratamentos constituídos de 3 repetições e 5 mudas por repetição, em um total de 30 plantas.

### **Análises estatísticas**

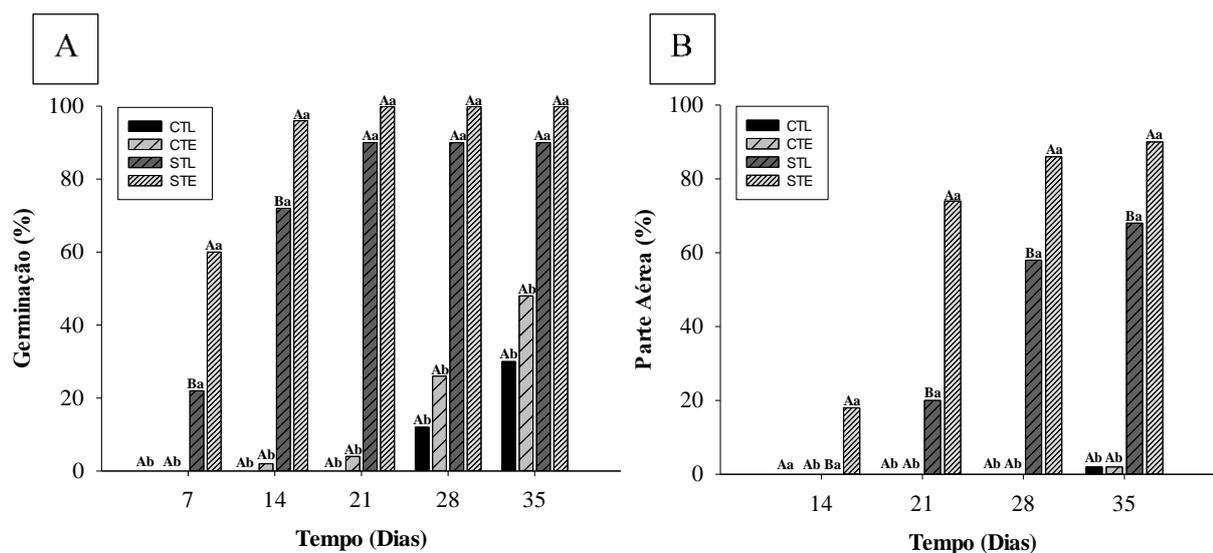
Os dados obtidos foram submetidos a transformação por  $\arcsen\sqrt{p}$  e  $\sqrt{x+1}$  quando necessários e as médias submetidas a teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade pelo software SAS<sup>®</sup> v.9.4.

### **Resultados e Discussão**

Em todos os experimentos realizados com sementes e segmentos nodais provenientes de plântulas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) estabelecidas em condições *in vitro*, não foram observadas contaminações.

## Germinação *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande em função da retirada do tegumento e da condição luminosa

Aos 7 dias após introdução *in vitro*, observou-se que 60% das sementes sem tegumento e mantidas no escuro germinaram, alcançando 96% logo aos 14 dias após a introdução. Nas avaliações subsequentes, aos 21, 28 e 35 dias, os tratamentos envolvendo sementes sem tegumento e no escuro e sementes sem tegumento na luz se mantiveram iguais estatisticamente, apresentando 100 e 90% de sementes germinadas, respectivamente (Figura 4A).



**Figura 4** – Germinação (%) aos 7, 14, 21, 28, 35 dias após a introdução de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) *in vitro* (A) e Formação da parte aérea (%) aos 14, 21, 28 e 35 dias após introdução *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (B) em função da interação da retirada do tegumento e condição luminosa. (CTL – com tegumento na luz; CTE – com tegumento no escuro; STL – sem tegumento na luz; STE – sem tegumento no escuro). Médias, para mesma data, seguidas de mesma letra maiúscula (efeito da condição luminosa) e minúscula (retirada do tegumento) não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

Duas semanas após o início do experimento, 18% do lote de sementes sem tegumento e mantidas no escuro apresentaram formação da parte aérea. Já aos 21 dias, o tratamento de sementes sem tegumento e mantidas no escuro apresentou 74% de formação da parte aérea se mantendo superior em comparação aos demais tratamentos até o último dia de avaliação, sendo que 90% das sementes introduzidas apresentaram a formação da parte aérea (Figura 4B). Os melhores resultados obtidos pelo tratamento constituído por sementes sem tegumento no escuro, para as variáveis porcentagem de germinação e formação da parte aérea se confirmaram ao serem analisados o índice de velocidade de germinação (IVG) e o índice de velocidade de emergência (IVE), os quais foram superiores comparados aos demais tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Comprimento da parte aérea (CPA); número médio de nós (N° Nós); índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função da retirada do tegumento e condição luminosa aos 35 dias após introdução *in vitro*. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

Tegumento/ Condição luminosa	CPA		N° Nós		IVG		IVE	
	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro
Com	0,08 Ab	0,4 Ab	0,2 Ab	0,8 Ab	0,09 Ab	0,17 Ab	0,006 Ab	0,008 Ab
Sem	2,1 Ba	5,8 Aa	3,7 Ba	6,2 Aa	0,75 Ba	1,13 Aa	0,26 Ba	0,45 Aa
Média	2,1		2,7		0,53		0,18	
CV (%)	26,36		35,46		18,11		27,35	
Valor p	<.0001*		<.0001*		0,0039*		0,0006*	

\* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si na coluna, pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

A retirada do tegumento da semente de cerejeira-do-Rio-Grande favoreceu a sua germinação e, conseqüentemente, a formação da parte aérea de mudas *in vitro*, independentemente da condição luminosa, sendo observados valores superiores durante todos os períodos de avaliação (Figura 4). Os resultados corroboram com os descritos por Martinotto et al. (2007), nos quais a retirada do tegumento de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica*) resultou em uma melhor e mais homogênea germinação *in vitro* de sementes daquela espécie, indicando uma certa dormência pela impermeabilidade do tegumento, que, quando retirado, facilita as trocas gasosas e a embebição da semente (SUN et al., 2006; RODRÍGUEZ-ELIZALDE et al., 2019).

O atraso da germinação e a menor porcentagem de formação da parte aérea observados no tratamento envolvendo sementes sem tegumento e na luz podem estar relacionados à exposição do tecido de reserva diretamente à luz, onde observou-se um esverdeamento do mesmo (Figura 5C). Embora sem relatos na literatura referentes a espécies florestais, o mesmo fenômeno foi registrado em batatas expostas a luz direta, quando ocorre a conversão dos amiloplastos em cloroplastos, mudando também sua função celular (ZHU et al., 1984; SADALI et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Já é conhecido que a presença de clorofila afeta a germinação e o vigor de sementes de importância agrônômica, em que os produtos da oxidação da clorofila possuem efeitos prooxidantes ou fotooxidativos, acarretando em perda de qualidade da semente (JALINK et al., 1998; ZORATO et al., 2007). Guimarães et al. (2018), ao desenvolverem trabalho de germinação de cabeludinha (*Myrciaria glazioviana*) em diferentes sombreamentos, destacaram como um fator adicional ao efeito negativo da luz na germinação a oxidação e alterações de substâncias presentes nas sementes.



**Figura 5** – Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos diferentes tratamentos (T1 – Sementes com tegumento na luz (A); T2 – sementes com tegumento no escuro (B); T3 – sementes sem tegumento na luz (C) e T4 – sementes sem tegumento no escuro (D)), aos 35 dias após a introdução *in vitro*. Barra = 2 cm. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

Os resultados referentes ao comprimento da parte aérea (CPA) e ao número médio de nós (N<sup>o</sup> Nós) apresentaram significância na interação dos fatores analisados (Tabela 3). As sementes submetidas ao tratamento sem tegumento e mantidas no escuro responderam melhor para ambas as variáveis, apresentando, em média, 5,8 cm de comprimento e 6,2 nós. Tal fato está, provavelmente, associado ao estiolamento das plântulas (Figura 5D), desenvolvimento denominado escotomorfogênese, na ausência de luz, o qual ocasiona um crescimento prolongado e formação de etioplastos, que, quando expostos à luz, alteram seu desenvolvimento para fotomorfogênico, convertendo etioplastos em cloroplastos (ARMAREGO-MARRIOTT et al., 2020). A utilização do estiolamento vem sendo aplicada no processo de micropropagação de algumas espécies, permitindo a obtenção de maiores números de brotações, tamanho de brotos e plântulas, número de nós, diminuição de oxidação (BALLESTER et al., 1989; CARVALHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2017; OSORIO et al., 2018). Resultados semelhantes foram identificados por Silva et al. (2016) na germinação *in vitro* de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) submetidas a luz ou escuro.

#### **Germinação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande em função da concentração de sais de MS e de sacarose**

Não foram observadas diferenças significativas na interação dos fatores em nenhuma das variáveis avaliadas no experimento. As diferentes concentrações de sais de MS e de sacarose no meio de cultura não alteraram a capacidade de germinação nem a formação da parte aérea da espécie estudada, apresentando, na última avaliação, porcentagens acima de 96% em todos os tratamentos para as variáveis porcentagem de germinação e formação de parte aérea. O resultado obtido é sustentado pelo fato de que a espécie apresenta grande quantidade de amido presente no cotilédone, comum em espécies do gênero *Eugenia*, a exemplo da uvaieira

(*Eugenia pyriformis* Cambess), que contém cerca de 70% de amido na matéria seca de suas sementes desprovidas do tegumento (WYK; BOTHA, 1984; JUSTO et al., 2007).

Analisando o fator concentração de sais do meio MS, independentemente da quantidade de sacarose utilizada, observou-se que os meios de cultura contendo  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  da concentração de sais do meio MS apresentaram melhores resultados quanto às porcentagens de formação da parte aérea aos 14, 21 e 28 dias após introdução das sementes *in vitro*, e consequentemente, maior índice de velocidade de emergência (IVE) em comparação ao meio MS completo (Tabela 4). Por outro lado, aos 35 dias, todos os tratamentos envolvendo todas as concentrações de sais do meio MS apresentaram porcentagens de formação de parte aérea acima de 96%. Esse atraso e, consequentemente, diferença do índice de velocidade de emergência (IVE) pode ser explicado, provavelmente, pela concentração de sais presente no meio MS completo, que pode ter afetado negativamente a absorção de água pela plântula devido ao aumento do potencial osmótico do meio (REIS et al., 2008). Para o estabelecimento *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata*) a diminuição da concentração de sais do meio MS favoreceu a formação de plântulas (PINHAL et al., 2017). Resultados semelhantes foram encontrados para a germinação e formação de plântulas completas de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), sendo que a utilização de meios mais concentrados resultou em menores porcentagens de plântulas completas no final do experimento (ALMEIDA et al., 2013).

**Tabela 4** – Porcentagem de formação da parte aérea (FPA) aos 14, 21 e 28 dias após introdução *in vitro* e índice de emergência (IVE); comprimento da parte aérea (CPA); número médio de nós (N° Nós) e porcentagem de morte apical (MAP) aos 35 dias após introdução *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função da concentração de sais do meio MS. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

<b>Meio de cultura</b>	<b>FPA 14</b>	<b>FPA 21</b>	<b>FPA 28</b>	<b>IVE</b>	<b>CPA</b>	<b>N° Nós</b>	<b>MAP</b>
<b>MS</b>	49 b	87 b	92 b	0,55 b	4,9 a	6,1 a	23 a
<b>1/2 MS</b>	61 ab	94 ab	100 a	0,62 a	4,7 a	5,3 b	29 a
<b>1/4 MS</b>	70 a	95 a	98 a	0,63 a	4,2 b	4,7 b	57 b
<b>Média</b>	60	92	97	0,60	4,6	5,4	36
<b>CV (%)</b>	18,90	7,56	4,63	6,52	8,02	11,85	38,92
<b>Valor p</b>	0,0175*	0,0334*	0,0015*	0,0005*	0,0005*	0,0001*	<.0001*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

O meio MS completo afetou positivamente o comprimento da parte aérea, em comparação ao tratamento correspondente a  $\frac{1}{4}$  de sais do meio MS, influenciando também no número médio de nós (N° Nós), diferindo dos tratamentos com  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  da concentração de sais do meio MS (Tabela 4). Tal fato se deve, provavelmente, à maior disponibilidade de nutrientes presentes no meio MS, concordando com os resultados obtidos por Reis et al. (2008), nos quais

o maior comprimento de parte aérea, e conseqüentemente, o maior número de nós de plântulas germinadas de *Melissa officinalis* L. foi obtido em meio MS suplementado com 100% da concentração dos sais.

Ao final do experimento, observou-se necrose apical das plântulas em todos os tratamentos (Figura 6), sendo que, quando utilizados  $\frac{1}{4}$  da concentração dos sais de MS, 57% das plântulas apresentaram escurecimento apical e morte (Tabela 4). Essa anormalidade pode estar relacionada à concentração de cálcio presente no meio de cultura, levando a deficiência em relação ao rápido crescimento do efeito de estiolamento, resultante da diluição da concentração dos sais. Embora não tenham sido localizados trabalhos relacionados a este tema envolvendo espécies florestais, Helms (1971), em seu trabalho com germinação e estiolamento *in vitro* de feijão, constatou o mesmo problema e afirmou ser devido à deficiência de cálcio no meio de cultura.



**Figura 6** – Fenômeno de necrose e morte apical de mudas de cereja-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) germinadas *in vitro*, aos 35 dias de cultivo. Barra = 1 cm. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

A utilização de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose favoreceu o crescimento *in vitro* das plântulas de cerejeira em comparação a concentração mais alta de  $30 \text{ g L}^{-1}$  (Tabela 5). Resultados semelhantes aos obtidos no experimento foram constatados em trabalhos envolvendo sementes de melissa (*Melissa officinalis* L.), as quais quando germinadas *in vitro* em altas concentrações de sacarose produziram plântulas com menor comprimento final, devido, provavelmente, à maior pressão osmótica sobre a semente (REIS et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados na formação de plântulas *in vitro* de Atroveran (MONFORT et al., 2015). No presente trabalho, o potencial osmótico do meio de cultura suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de

sacarose pode também ter interferido negativamente no índice de velocidade de emergência (IVE), resultando em um certo atraso na formação da parte aérea das plântulas (Tabela 5).

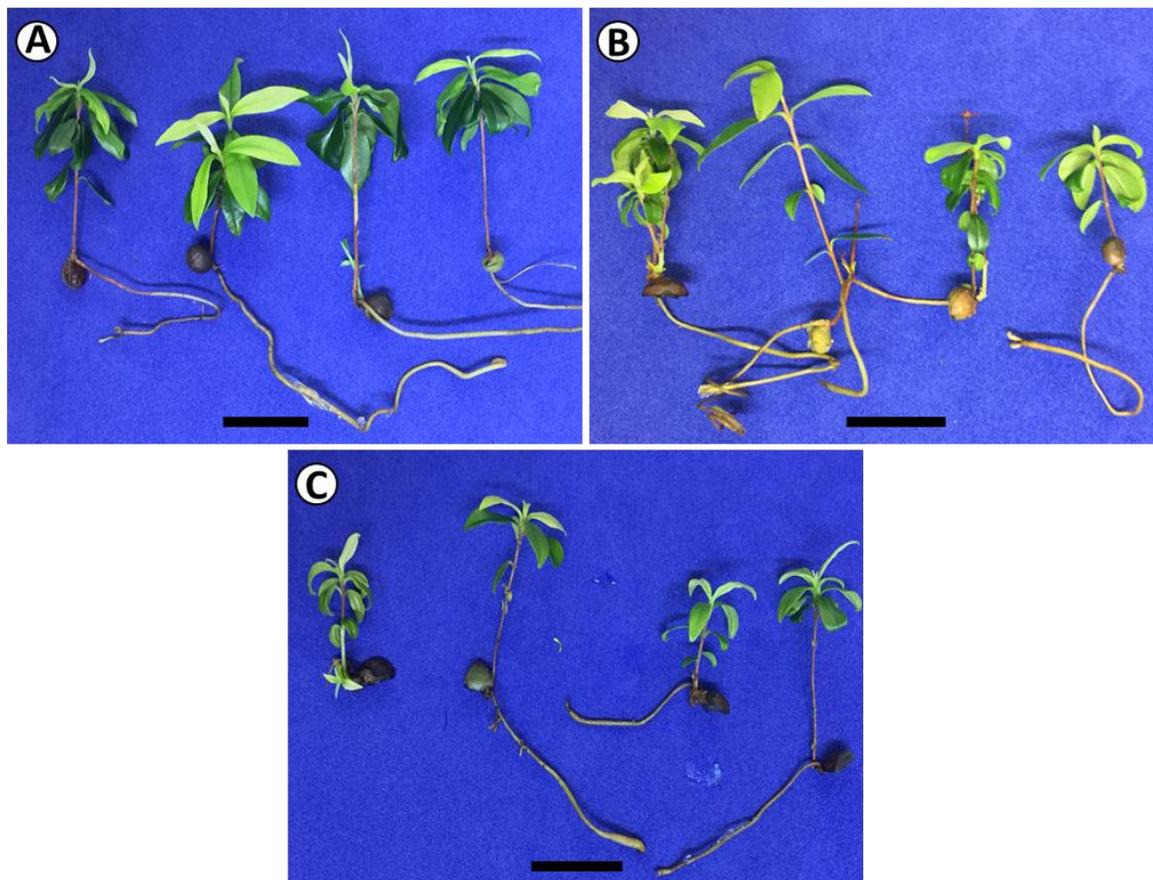
**Tabela 5** – Índice de velocidade de emergência (IVE) e comprimento da parte aérea (CPA) aos 35 dias após introdução *in vitro* de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função da concentração de sacarose. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>IVE</b>	<b>CPA</b>
<b>15</b>	0,62 a	4,9 a
<b>30</b>	0,59 b	4,3 b
<b>Média</b>	0,60	4,6
<b>CV (%)</b>	6,52	8,02
<b>Valor p</b>	0,0423*	0,0002*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

### **Germinação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande em função do fracionamento da semente**

Constatou-se o potencial germinativo e a formação de plântulas completas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) *in vitro* a partir de sementes fracionadas (Figura 7B e 7C).

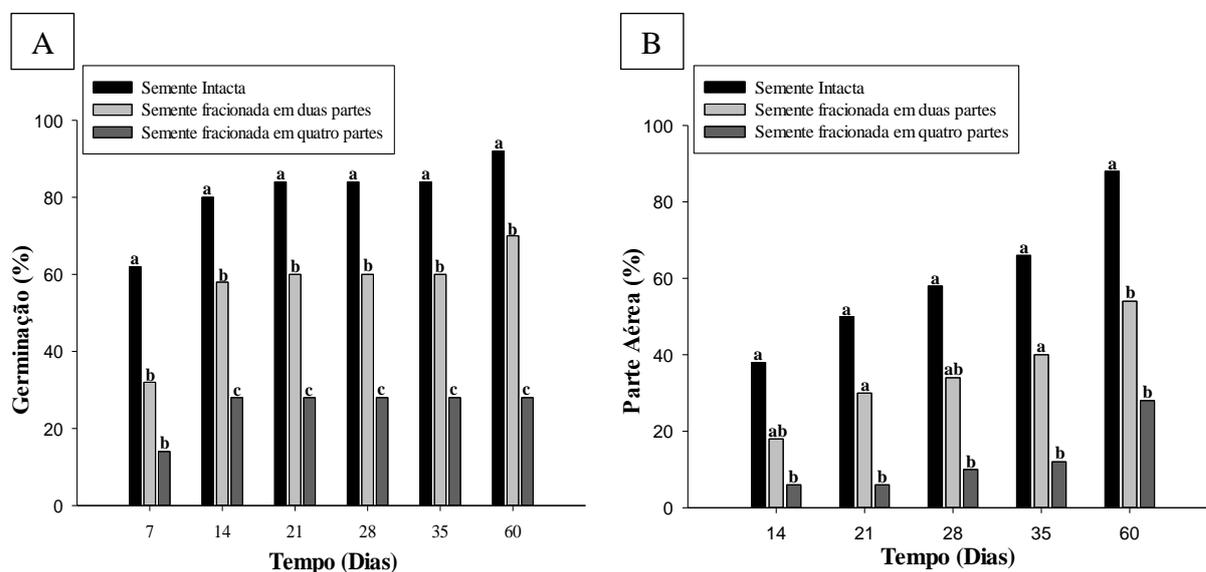


**Figura 7** – Desenvolvimento *in vitro* de Plântulas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos diferentes tratamentos (T1 - Semente intacta (A); T2 - Semente fracionada em duas partes (segundo cicatriz placentária) (B); T3 - Semente fracionada em quatro partes (corte transversal e longitudinal) (C)), aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 2cm Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

Espécies do gênero *Eugenia* vêm sendo bastante investigadas pelo seu potencial de formação de plântulas pelo fracionamento de suas sementes, possibilitando ampliar a produção de mudas comercialmente, diversos autores citam essa capacidade regenerativa e a associam à uma possível poliembrião (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2005; DELGADO et al., 2010; TEIXEIRA; BARBEDO, 2012; PRATAVIERA et al., 2015; ALONSO et al., 2019). Entretanto, Delgado et al. (2010) destacaram que, embora apresentem esta capacidade de regeneração, as sementes das eugenias são monoembriônicas, tendo a produção de novas plântulas a partir da desdiferenciação das células pertencentes ao tecido perivascular da região apical cotiledonar. Esse potencial de regeneração está ligado a um mecanismo de sobrevivência das espécies contra herbivoria (TEIXEIRA; BARBEDO, 2012).

No sétimo dia após a instalação do experimento, as sementes intactas apresentaram 62% de germinação, enquanto que sementes fracionadas em duas ou em quatro partes apresentaram taxas de germinação de 32 e 14%, respectivamente (Figura 8A). Aos 35 e 60 dias, sementes intactas se mantiveram superiores em porcentagem de germinação quando

comparadas àquelas dos demais tratamentos. Sementes fracionadas em duas partes, seguindo a cicatriz placentária, apresentaram 60 e 70% de germinação, diferindo daquelas fracionadas em quatro partes (corte transversal e longitudinal), onde as frações germinadas alcançaram apenas 28% em ambas as datas de avaliação (Figura 8A).



**Figura 8** – Germinação (%) aos 7, 14, 21, 28, 35 e 60 dias após a introdução de sementes e frações de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) *in vitro* (A) e Formação da parte aérea (%) aos 14, 21, 28, 35 e 60 dias após introdução de sementes e frações de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande *in vitro* (B). Médias, para mesma data, seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade. Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

Em relação à formação da parte aérea, as sementes intactas obtiveram as melhores respostas em todas as datas de avaliações, diferindo-se estatisticamente do tratamento de semente fracionada em duas partes apenas aos 60 dias após introdução, apresentando 88% de formação de parte aérea em comparação ao T2, onde foi observado apenas 54% de formação de parte aérea (Figura 8B). Quando as sementes foram fracionadas em quatro partes, as frações obtidas mantiveram baixa porcentagem de germinação e, conseqüentemente, baixa formação da parte aérea (Figura 8).

Embora com resultados inferiores aos do tratamento de sementes intactas, a germinação de sementes fracionadas em duas partes se manteve elevada, atingindo 70% nos 60 dias de cultivo (Figura 8A). O fator de incremento de germinação para as sementes fracionadas na metade foi de 1,40, apresentando um ganho de 48% em germinação quando comparado à utilização de sementes sem fracionamento (Tabela 6). Resultados semelhantes foram constatados por Silva et al (2005), nos quais sementes fracionadas pela metade mantiveram o potencial germinativo e seu fator de incremento de germinação (FIG) superior aos de sementes

intactas, principalmente, se separadas de forma que mantivessem o hilo em ambas as frações, alcançando 1,50 no valor de FIG.

**Tabela 6** – Fator de incremento de germinação (FIG); fator de incremento de produção de plântulas completas (FIP); comprimento de parte aérea (CPA) e número médio de nós (N° Nós) aos 60 dias após introdução de sementes e frações de sementes de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

<b>Cortes</b>	<b>FIG</b>	<b>FIP</b>	<b>CPA</b>	<b>N° Nós</b>
<b>Semente Intacta</b>	0,92	0,88	3,3 a	4,0 a
<b>Fracionada em duas partes</b>	1,40	1,08	2,4 b	2,5 b
<b>Fracionada em quatro partes</b>	1,12	1,12	1,4 c	1,4 b
<b>Média</b>	1,15	1,02	2,4	2,6
<b>CV (%)</b>	18,57	23,11	22,24	38,24
<b>Valor p</b>	0,2185ns	0,7995ns	0,0003*	<.0001*

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

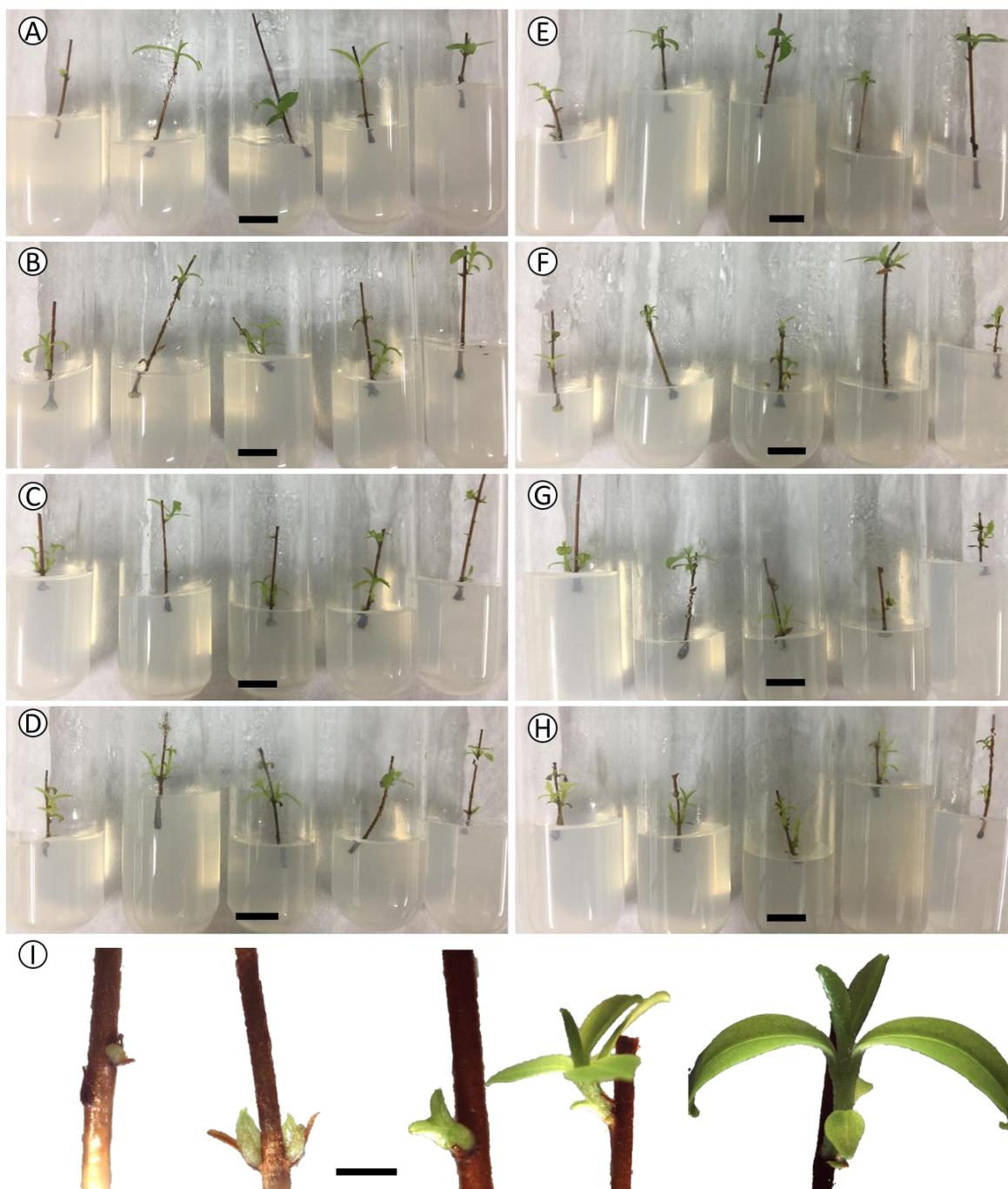
Entretanto, a formação da parte aérea foi afetada negativamente em sementes fracionadas na metade, apresentando apenas 54% de plântulas completas, 20% em ganho de produção de plântulas quando comparado ao tratamento de sementes intactas, devido à redução de reserva das sementes (GOMES et al., 2016). A formação de plântulas completas em sementes fracionadas decai, não sendo garantida pela presença do processo germinativo a partir de frações, por apresentar menor quantidade de reservas disponíveis no seu desenvolvimento (SILVA et al., 2003; TEIXEIRA; BARBEDO, 2012; ALONSO et al., 2019; DELGADO; BARBEDO, 2020).

A disponibilidade limitada de reservas pelo fracionamento das sementes levou ao menor desenvolvimento da parte aérea das plântulas aos 60 dias de cultivo, apresentando menor comprimento das plântulas obtidas nos tratamentos com sementes fracionadas em duas partes e em quatro partes, em comparação ao tratamento utilizando sementes intactas (Tabela 6). Os maiores valores de comprimento de plântulas no tratamento de sementes intactas proporcionaram, conseqüentemente, um maior número médio de nós presentes nas plântulas a serem utilizadas como fonte de explantes na multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (Tabela 6). Sementes maiores, ou seja, com maior disponibilidade de reservas, originam plântulas com maior vigor e tamanho (VANZOLINI; NAKAGAWA, 2007). Em espécies florestais frutíferas, tais como, a cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), o tamarindeiro (*Tamarindus indica* L.) e a jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), são encontrados resultados similares, nos quais sementes maiores proporcionaram uma

produção final de mudas de maior porte e maior qualidade (NIETSCHE et al., 2004; KLEIN et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2010).

**Concentrações de BAP e ANA na indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro***

Aos 40 dias de cultivo *in vitro*, observou-se indução de brotação das gemas dos explantes utilizados no experimento. Não foram observadas hiperhidricidade e oxidação dos explantes para nenhuma das concentrações de reguladores utilizadas (Figura 9).



**Figura 9** – Desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de BAP e presença ou ausência de ANA aos 40 dias de cultivo. T1 – 0,0 BAP + 0,0 ANA (A); T2 – 1,0 BAP + 0,0 ANA (B); T3 – 2,5 BAP + 0,0 ANA (C); T4 – 5,0 BAP + 0,0 ANA (D); T5 – 0,0 BAP + 0,1 ANA (E); T6 – 1,0 BAP + 0,1 ANA (F); T7 – 2,5 BAP + 0,1 ANA (G); T8 – 5,0 BAP + 0,1 ANA (H). Esquema de desenvolvimento das gemas e brotações de explantes nodais de cerejeira (I). Barras = 1 cm (A - H); 0,2 cm (I). Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Das variáveis analisadas, apenas o comprimento das brotações (CPB) apresentou significância da interação dos reguladores BAP x ANA (Tabela 7).

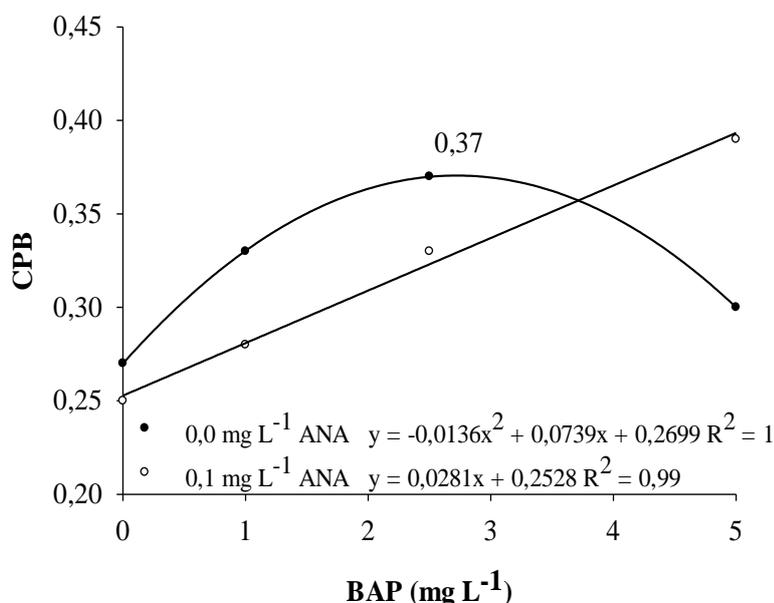
**Tabela 7** – Comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB) e número de brotações por explante (NBPE) aos 40 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função das concentrações de BAP e ANA. Piracicaba – SP, Brasil, 2019.

BAP/ ANA (mg L <sup>-1</sup> )	CPB		%GB		NBPE	
	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
0,0	0,27 Ab	0,25 Ab	24	28	1,0	1,1
1,0	0,33 Aab	0,28 Ab	34	31	1,4	1,3
2,5	0,37 Aa	0,33 Aab	45	46	1,8	1,8
5,0	0,30 Bab	0,39 Aa	47	37	1,9	1,5
<b>Média</b>	0,31		36		1,5	
<b>CV (%)</b>	17,37		14,25		23,98	
<b>Valor p</b>	0,0294*		0,3428ns		0,3765ns	

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si na coluna, pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

A adição de reguladores de crescimento é essencial na fase inicial de indução de brotações *in vitro*. Respostas morfogênicas, tais como taxa de multiplicação e alongamento das brotações, são dependentes do balanço hormonal pela adição dos reguladores no meio de cultura. Os mais utilizados nessa fase são as citocininas e as auxinas. A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais aplicada na micropropagação de espécies lenhosas, que, além de trazer bons resultados, apresenta o menor custo, podendo ser também utilizada em combinações com auxinas, como o ácido naftalenoacético (ANA) em baixas concentrações (ARAGÃO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; HARTMANN et al., 2014).

A curva da variável comprimento das brotações (CPB) exibiu um padrão quadrático positivo com a utilização de BAP na ausência de ANA, alcançando, na concentração de 2,7 mg L<sup>-1</sup>, o ponto máximo de 0,37 centímetro de comprimento, a partir desse ponto, o aumento na concentração da citocinina ocasionou efeito negativo no desenvolvimento das brotações (Figura 10).



**Figura 10** – Comprimento das brotações (CPB) de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função das concentrações de BAP e adição de ANA. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Dentre os efeitos positivos do BAP no cultivo *in vitro*, o aumento do comprimento das brotações tem sido observado em diversas culturas (ARRUDA et al., 2019). Entretanto, as altas concentrações da citocinina adicionadas ao meio de cultura podem apresentar efeito inverso, com a diminuição do tamanho das brotações devido à toxicidade (GUTIÉRREZ et al., 2013). Resultados similares foram descritos por Soares et al. (2007), nos quais o comprimento das brotações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) foi influenciado pela concentração de BAP, sendo que, os melhores resultados foram obtidos com a adição de 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> desta citocinina, sendo que, concentrações mais elevadas da citocinina prejudicaram o desenvolvimento das brotações, com diminuição do comprimento médio.

Em espécies da família Myrtaceae, o efeito positivo da adição de BAP no incremento do comprimento das brotações até certa concentração, e posterior efeito inibitório pela toxidez em altas concentrações, também foram relatados, a exemplo da uvaeira (*Eugenia pyriformis* Cambess) (NASCIMENTO et al., 2008); do cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) (DEMÉTRIO et al., 2021) e da casaqueira (*Campomanesia rufa* (Berg.) Nied) (SANT'ANA et al., 2018).

Por outro lado, neste estudo, a adição de ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) combinada com as concentrações de BAP, a variável analisada (comprimento das brotações) se ajustou a um modelo linear crescente, apresentando a maior média na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 10). Os resultados obtidos na interação dos reguladores corroboram com o trabalho realizado por Stein et al. (2007), no qual os autores, ao verificarem a interação de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.),

relataram que o comprimento das brotações sofreu efeito inibitório com o aumento da concentração de BAP na ausência auxina, enquanto que, na presença de ANA houve efeito positivo de aumento do comprimento das brotações. A interação dos reguladores vegetais no cultivo *in vitro* pode atuar de forma sinérgica ou antagônica, dependendo de fatores relacionados ao efeito do regulador na biossíntese e metabolismo do outro, alterando os níveis da substância e modificando as respostas esperadas ou até mesmo inativando-as (STADEN et al., 2008).

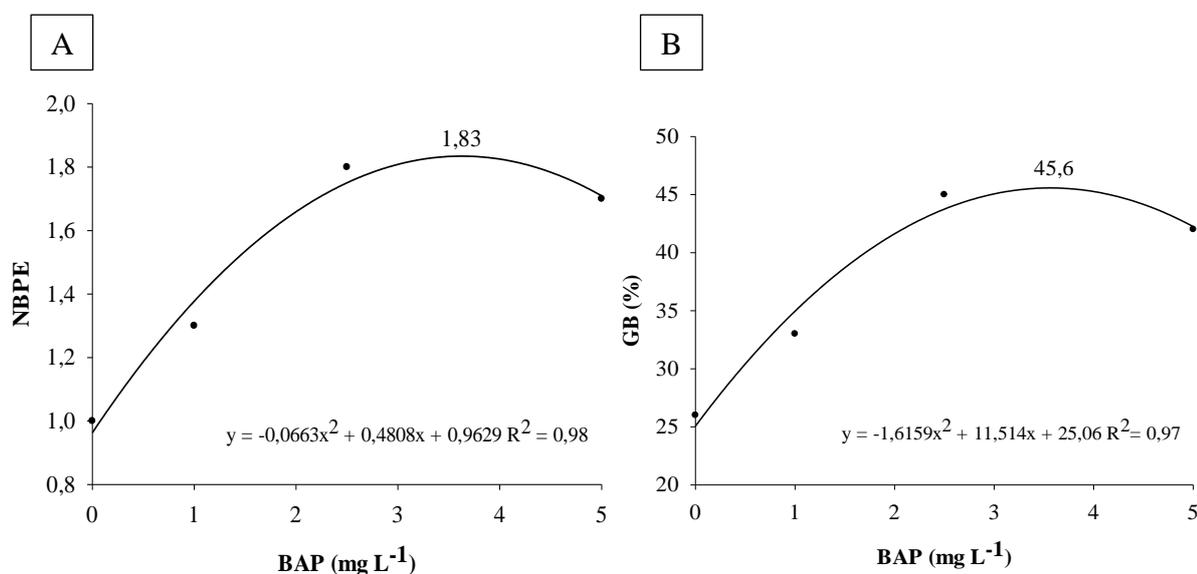
As concentrações de BAP avaliadas influenciaram significativamente as variáveis número de brotações por explante (NBPE) e porcentagem de gemas brotadas (GB%) (Tabela 8).

**Tabela 8** – Porcentagem de gemas brotadas (%GB) e número de brotações por explante (NBPE) aos 40 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função das concentrações de BAP. Piracicaba – SP, Brasil, 2019.

<b>BAP (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>%GB</b>	<b>NBPE</b>
<b>0,0</b>	26 c	1,0 c
<b>1,0</b>	33 bc	1,3 bc
<b>2,5</b>	45 a	1,8 a
<b>5,0</b>	42 ab	1,7 ab
<b>Média</b>	36	1,5
<b>CV (%)</b>	14,29	23,98
<b>Valor p</b>	0,0001*	0,0001*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

Analisando as curvas geradas, ambas apresentaram padrão quadrático positivo para as médias, sendo que, a concentração de 3,6 mg L<sup>-1</sup> de BAP propiciou o maior número de brotos por explante e a maior porcentagem de brotações das gemas de explantes nodais de cerejeira (Figura 11A e 11B).



**Figura 11** – Número de brotações por explante (NBPE) (A) e Porcentagem de gemas brotadas (GB%) (B) de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.), em função das concentrações de BAP. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Resultados similares foram relatados por Prudente et al. (2016), nos quais a utilização de 2,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu maior número de brotações aos 30 dias de cultivo *in vitro* de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish.), espécie nativa do cerrado brasileiro.

Segundo Demétrio et al. (2021), a citocinina BAP na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> foi eficiente na indução de brotações de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) *in vitro*, produzindo, em média, 2,96 brotações por explante, e, com o aumento da concentração, assim como observado no presente trabalho, houve a diminuição do número médio de brotações. Os mesmos resultados foram encontrados para a multiplicação de acessos de jenipapeiro (*Genipa americana*), nos quais a utilização de 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina favoreceu o desenvolvimento das brotações (SA et al., 2016). Por outro lado, a presença de BAP na micropropagação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é dispensável na indução de brotação de explantes nodais de plântulas germinadas *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2019).

### Concentrações de GA<sub>3</sub> no crescimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande

As giberelinas são pertencentes a um grupo de hormônios vegetais responsáveis por diversos processos fisiológicos, e é comumente utilizada no cultivo *in vitro*, sendo as três formas, GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>3</sub> encontradas em abundância em plantas superiores. Dentre essas formas, o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) é amplamente utilizado em adição ao meio de cultura, buscando-se os efeitos positivos influenciados por este regulador, tais como alongamento da parte aérea, aumento da área foliar, e germinação *in vitro* (RIBEIRO et al., 2006; HEBLING,

2007; NDAGIJIMANA et al., 2014; LEITE; SCHERER et al., 2015). A presença do regulador, na concentração de 2,7 mg L<sup>-1</sup>, na micropropagação de casaqueira (*Campomanesia rufa* (O. Berg.)) proporcionou um aumento de 33,5% na altura das plantas em comparação às brotações dispostas em meio de cultura na ausência deste regulador (SANT'ANA et al., 2018). No cultivo de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), efeitos no alongamento caulinar foram identificados na presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (SIMÕES et al., 2012).

Por outro lado, não foram identificados efeitos significativos das concentrações de GA<sub>3</sub> utilizadas no presente experimento, portanto, sem efeito no desenvolvimento das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande provenientes de explantes de plântulas germinadas *in vitro*. Resultados semelhantes foram constatados por Golle (2010), nos quais segmentos de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) advindos de plantas adultas de estufa, não obtiveram resultados positivos nas concentrações utilizadas, registrando-se, inclusive efeitos fitotóxicos nas maiores concentrações.

#### **Diferentes meios de cultura na indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro***

O meio de cultura desempenha papel fundamental no processo de micropropagação, sendo ele o responsável para o suporte do explante, quando utilizado meio sólido, e o fornecedor de macro e micro nutrientes para nutrição e desenvolvimento *in vitro* da cultura, além de fornecer também vitaminas, fonte de carbono orgânico, fonte de energia e outras substâncias adicionadas no meio, ao exemplo dos reguladores vegetais (HARTMANN et al., 2014). Dentre os meios de cultura citados na literatura, o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tem sido muito utilizado em protocolos de multiplicação *in vitro* de espécies nativas brasileiras, assim como o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), desenvolvido especialmente para o cultivo de espécies lenhosas (OLIVEIRA et al., 2013).

Novas formulações são desenvolvidas com base nas especificidades de cada espécie estudada. Para algumas espécies da família Myrtaceae, foram desenvolvidos meios que se apresentaram mais adequados em sua resposta *in vitro* comparados aos meios já existentes na literatura, podendo ser empregados na otimização dos processos de cultivo *in vitro* de espécies dentro desta família. Entre tais meios de cultura, citam-se o meio SP (CID et al., 1999), adaptado para a regeneração *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando-se de metade da concentração de sais e ¼ da concentração de FeEDTA do meio MS combinado com a vitaminas

do meio MS-B (CID et al., 1994) e o meio JADS (CORREIA et al., 1995), desenvolvido para melhoria do crescimento e desenvolvimento de gemas daquele híbrido.

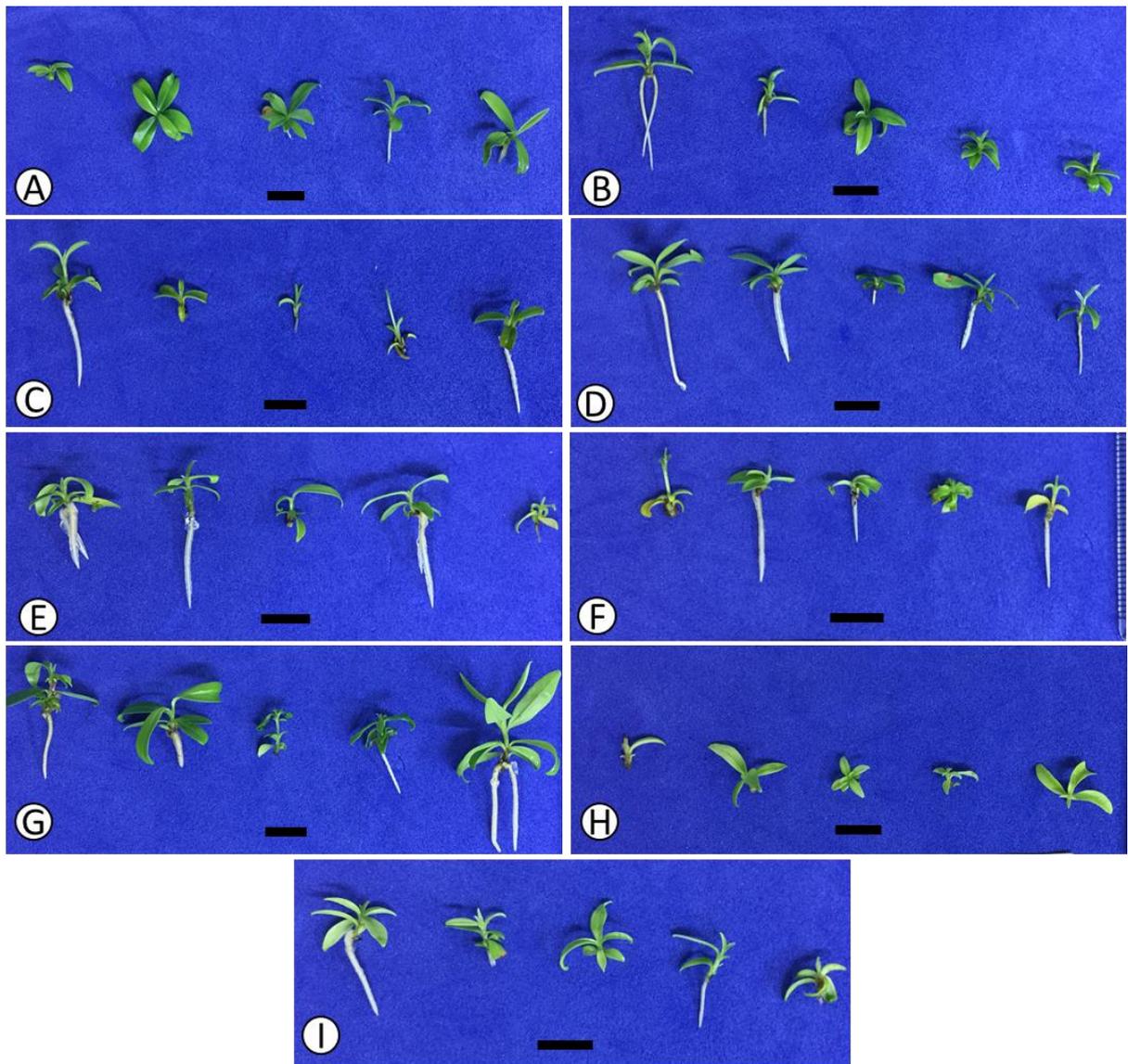
No presente experimento, após 60 dias de cultivo *in vitro*, os diferentes meios de cultura utilizados influenciaram apenas o comprimento das brotações obtidas a partir dos explantes nodais. O meio MS completo apresentou a maior média de comprimento das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande, não diferindo dos meios ½ MS, ¼ MS, WPM e JADS (Tabela 9).

**Tabela 9** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB); comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB); número de brotações por explante (NBPE); número de folhas por brotação (NFPB) e número de folhas senescentes (NFS) aos 60 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos diferentes meios de cultura. Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

<b>Meios de Cultura</b>	<b>%SOB</b>	<b>CPB</b>	<b>%GB</b>	<b>NBPE</b>	<b>NFPB</b>	<b>NFS</b>
<b>MS</b>	100	0,44 a	28	1,1	4,2	0,2
<b>1/2MS</b>	93	0,31 ab	33	1,3	4,4	0,2
<b>1/4MS</b>	93	0,35 ab	38	1,5	3,2	0,3
<b>WPM</b>	81	0,33 ab	29	1,1	5,0	0,1
<b>1/2WPM</b>	97	0,24 b	38	1,5	3,4	0,1
<b>1/4WPM</b>	95	0,23 b	38	1,5	2,8	0,0
<b>JADS</b>	91	0,36 ab	33	1,3	4,4	0,0
<b>SP Modificado</b>	85	0,26 b	33	1,3	4,1	0,0
<b>SP</b>	77	0,27 b	25	1,0	5,0	0,0
<b>Média</b>	90	0,31	33	1,3	4,0	0,1
<b>CV (%)</b>	13,41	24,83	17,03	28,69	16,30	7,16
<b>Valor p</b>	0,0730ns	0,0014*	0,2217ns	0,2437ns	0,3286ns	0,1387ns

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

Após o subcultivo, os diferentes meios de cultura utilizados no experimento interferiram no desenvolvimento das brotações de cerejeira (Figura 12).



**Figura 12** – Desenvolvimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) sobre os diferentes meios de cultura aos 30 dias após subcultivo. T1 – MS completo (A); T2 –  $\frac{1}{2}$  MS (B); T3 –  $\frac{1}{4}$  MS (C); T4 – WPM completo (D); T5 –  $\frac{1}{2}$  WPM (E); T6 –  $\frac{1}{4}$  WPM (F) e T7 – JADS (G); T8 – SP (H) e T9 – SP Mod (I). Barras = 1cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Registrou-se 100% de sobrevivência das brotações ao final do experimento, independentemente do tratamento utilizado. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, observou-se que o meio de cultura JADS, em geral, promoveu as maiores médias para as variáveis analisadas (Tabela 10).

**Tabela 10** – Comprimento das brotações (CPB); número de folhas por brotação (NFPB); número de folhas senescentes (NFS); porcentagem de formação de raízes (%FR) e número de raízes por brotação (NRB) aos 30 dias após subcultivo das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos diferentes meios de cultura. Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

<b>Meios de Cultura</b>	<b>CPB</b>	<b>NFPB</b>	<b>NFS</b>	<b>%FR</b>	<b>NRB</b>
<b>MS</b>	0,48 b	6,0 ab	0,1	10 b	0,1 c
<b>1/2MS</b>	0,40 b	5,6 b	0,0	20 b	0,2 c
<b>1/4MS</b>	0,46 b	4,9 b	0,1	37 ab	0,4 bc
<b>WPM</b>	0,47 b	6,0 ab	0,1	73 a	0,8 ab
<b>1/2WPM</b>	0,41 b	5,9 b	0,1	77 a	1,0 a
<b>1/4WPM</b>	0,35 b	4,6 b	0,0	70 a	0,9 ab
<b>JADS</b>	0,70 a	7,8 a	0,1	63 a	0,8 ab
<b>SP Modificado</b>	0,35 b	5,0 b	0,0	10 b	0,1 c
<b>SP</b>	0,42 b	5,3 b	0,0	40 ab	0,4 bc
<b>Média</b>	0,45	5,8	0,1	44	0,5
<b>CV (%)</b>	20,63	6,11	4,21	44,72	8,58
<b>Valor p</b>	<.0001*	0,0001*	0,3295ns	<.0001*	<.0001*

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

Observou-se maior comprimento das brotações (CPB) em explantes cultivados no meio de cultura JADS, enquanto que, nos demais meios utilizados, CPB variou de 0,35 a 0,48 cm. Resposta semelhante foi observada na avaliação da variável número de folhas por brotação, sendo que o meio de cultura JADS induziu maior produção de folhas nas brotações de cerejeira-do-Rio-Grande, não diferindo apenas dos meios MS e WPM completo. Além disso, no que se refere a folhas senescentes, as médias foram baixas em todos os meios de cultura utilizados (Tabela 10).

O meio JADS destacou-se como o melhor meio de cultura, por apresentar os melhores resultados no cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande. No desenvolvimento de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e araçazeiro-do-campo (*Psidium guineense* SW.), espécies frutíferas nativas brasileiras, o meio de cultura JADS também foi o mais indicado. Naquele trabalho, a alta concentração dos nutrientes cálcio, magnésio, fósforo, ferro e cobre, em comparação ao meio MS e WPM, contribuíram para o melhor desempenho das espécies *in vitro*, sendo que, esses nutrientes, quando deficientes, ocasionaram um retardamento no crescimento das plântulas (SANTOS et al., 2020). Além dos nutrientes, a presença de arginina e glutamina no meio de cultura JADS pode ter contribuído com o maior crescimento das brotações, uma vez que, quando combinados, esses aminoácidos têm o potencial de alongamento *in vitro*, assim como observado para hibisco (*Hibiscus moscheutos*) (GREENWELL; RUTER, 2018).

Resultados positivos no uso do meio JADS *in vitro* também foram relatados para espécies de eucaliptos (ANDRADE et al., 2006; BRAVO et al., 2008; CORDEIRO et al., 2014) e até mesmo no cultivo *in vitro* de urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) (FARIA et al., 2019).

Houve formação de raízes em todos os meios de cultura estudados no presente trabalho. Os melhores resultados de enraizamento foram obtidos quando utilizados os meios WPM, ½WPM, ¼ WPM, JADS, SP e ¼ MS, variando de 37% a 77%, enquanto que, os meios MS completo, ½ MS e SP modificado, apresentaram valores inferiores de formação de raízes das brotações (Tabela 10). Quanto ao número de raízes por brotações, observou-se o mesmo padrão apresentado para a variável porcentagem de formação de raízes, sendo que o meio ½ WPM apresentou maior média, não diferindo dos meios ¼ WPM, JADS e WPM, enquanto que o meio MS, ½ MS e SP modificado apresentaram as menores médias número de raízes por brotação (Tabela 10).

O processo de enraizamento *in vitro* é, geralmente, realizado pela diminuição da concentração de sais do meio de cultura pela metade e pela adição de auxinas (HARTMANN et al., 2014). É conhecido que o meio MS possui altas concentrações de sais, especialmente, de nitrogênio. De acordo com Golle et al (2012), a formação de raízes *in vitro* é favorecida pela elevação da relação C/N. Essa afirmação sustenta os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que, os meios que apresentaram menor quantidade de nitrogênio, conseqüentemente, uma menor relação C/N, em comparação ao MS, ½ MS, SP Modificado e SP apresentaram as maiores porcentagens de enraizamento e quantidade de raiz por brotação. Outro fator que colabora com a rizogênese na micropropagação é a maior relação nitrato/amônio, devido a ação inibitória de enraizamento dos íons  $\text{NH}_4^+$ , presente em grande quantidade em meio MS e suas diluições, pela adição de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (MONFORT et al., 2015).

O enraizamento em meio sem adição de auxina também foi relatado em outras espécies da família Myrtaceae, como na micropropagação da goiaba serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) (OLTRAMARI et al., 2000), do mirtilo-vermelho (*Eugenia myrtifolia* Sims.) (BLANDO et al., 2013) e da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.) (MACHADO et al., 2020). Essa maior capacidade de enraizamento pode estar relacionada à produção endógena de auxinas (MACHADO et al., 2020).

### Otimização da indução e desenvolvimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro*

Cada espécie estudada demonstra sua resposta aos diferentes meios de cultura utilizados. Isso ocorre devido às diferentes concentrações e composição do meio de cultura, afetando também cada fase da micropropagação, necessitando então da otimização do processo, utilizando-se o melhor meio de cultura para cada fase de desenvolvimento do protocolo (ARAB et al., 2017).

Para todas as variáveis analisadas, o meio de cultura JADS suplementado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi superior quando comparado ao meio de cultura MS (Tabela 11). O meio JADS + 2,5 mg L<sup>-1</sup>, aos 40 dias de cultivo, proporcionou uma melhor porcentagem de brotação de gemas dos explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande quando comparado com meio de cultura MS. Quanto ao número de brotações por explante e comprimento de brotações, o meio de cultura JADS afetou de maneira positiva ambas as variáveis, apresentando médias de 0,60 cm de comprimento por brotação e 2,8 brotações por explante, valores superiores ao meio MS + 2,5 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 11** – Comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB) e número de brotações por explante (NBPE) aos 40 dias após introdução *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos meios de cultura suplementados de 2,5 mg<sup>-1</sup> de BAP. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

<b>Meio de cultura</b>	<b>CPB</b>	<b>%GB</b>	<b>NBPE</b>
<b>MS + 2,5 BAP</b>	0,35 b	48 b	1,9 b
<b>JADS + 2,5 BAP</b>	0,60 a	71 a	2,8 a
<b>Média</b>	0,47	59	2,4
<b>CV (%)</b>	17,67	12,83	17,63
<b>Valor p</b>	<.0001*	0,0002*	0,0001*

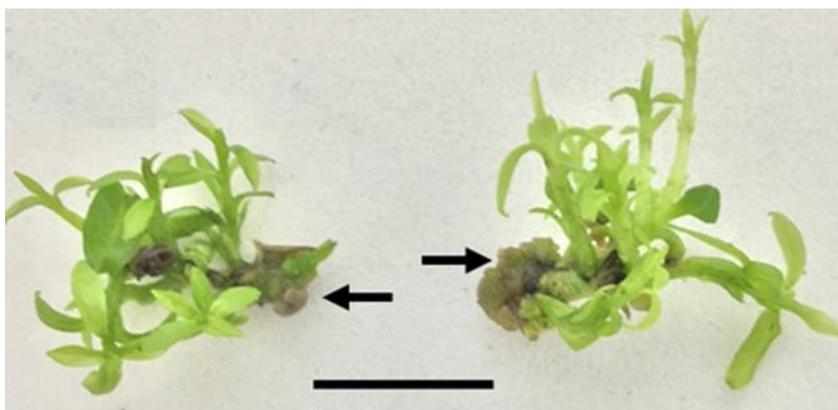
\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

### Concentrações de BAP e ANA no subcultivo das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande germinadas *in vitro*

A formação de calos na cultura de tecidos é mediada pelo balanço hormonal entre citocininas e auxinas, sendo essas endógenas ou reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura. A fase de multiplicação tem como objetivo a obtenção da maior taxa de formação de brotações, seja por indução de gemas pré-existentes ou pela produção de brotações adventícias, afetadas pela concentração dos reguladores adicionados ao meio, promovendo a organogênese nos explantes (STADEN et al., 2008). A posição do explante em relação ao meio de cultura no

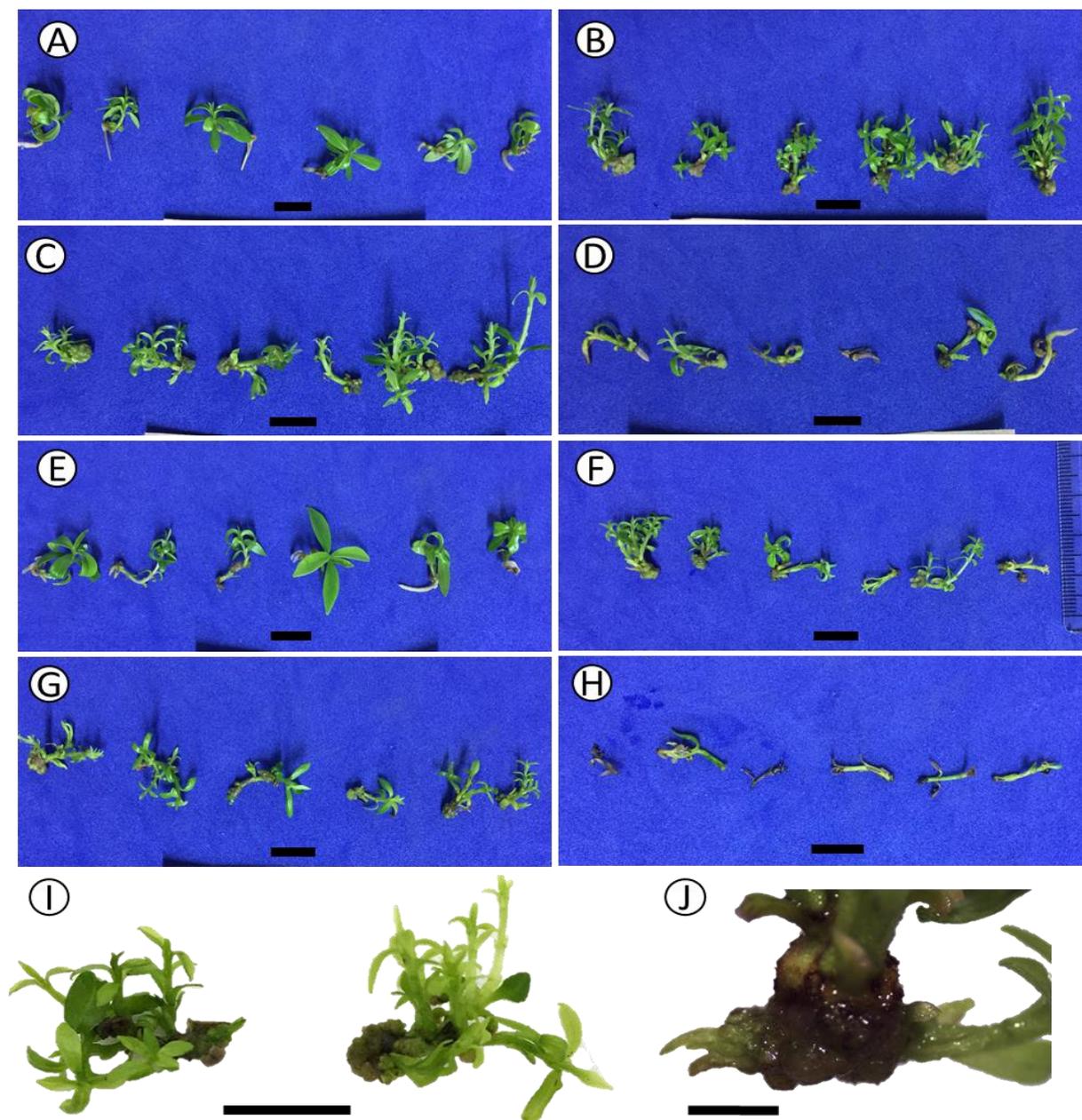
subcultivo e as respostas variam conforme a espécie a ser estudada. Geralmente, quando introduzidos horizontalmente no meio de cultura, os explantes apresentam tendência de maior formação de brotações dos que aqueles introduzidos verticalmente (FERNÁNDEZ-LIZARAZO; MOSQUERA-VÁSQUEZ, 2012; HARTMANN et al., 2014).

Os explantes de cerejeira-do-Rio-Grande apresentaram formação de calo (Figura 13), influenciado pela adição de BAP e ANA.



**Figura 13** – Detalhamento da formação de calos (setas pretas) em explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1,0 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

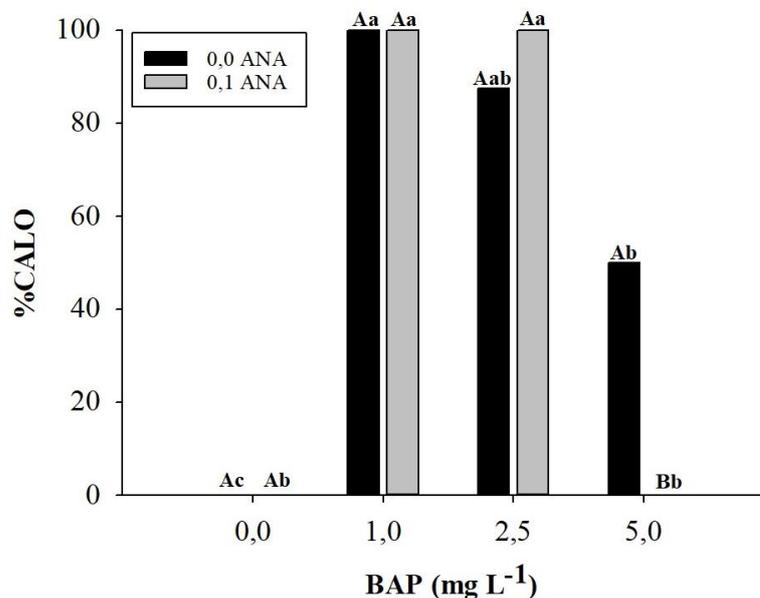
Não foi observada formação de calo em explantes na ausência de reguladores vegetais, ou mesmo quando adicionado  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, apresentando formação de raízes em ambos tratamentos (Figura 14A e 14E). Os resultados apontam a necessidade da adição de citocinina para que ocorra a desdiferenciação celular, e conseqüentemente, formação de calos e produção de brotações adventícias pela via da organogênese indireta no subcultivo de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande de origem seminal.



**Figura 14** – Desenvolvimento de brotações no subcultivo de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) sobre as diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de BAP e presença ou ausência de ANA aos 40 dias. Dispostos horizontalmente no meio de cultura: T1 – 0,0 BAP + 0,0 ANA (A); T2 – 1,0 BAP + 0,0 ANA (B); T3 – 2,5 BAP + 0,0 ANA (C); T4 – 5,0 BAP + 0,0 ANA (D); T5 – 0,0 BAP + 0,1 ANA (E); T6 – 1,0 BAP + 0,1 ANA (F); T7 – 2,5 BAP + 0,1 ANA (G); T8 – 5,0 BAP + 0,1 ANA (H). Esquema de desenvolvimento das brotações (I - J). Barras = 1 cm (A - I); 0,2 cm (J). Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Na presença de BAP em diferentes concentrações, os explantes apresentaram porcentagem de formação de calo que variaram de 50% a 100%. Entretanto, com a adição de ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) em combinação com BAP em diferentes concentrações, os tratamentos  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP apresentaram 100% de formação de calo, enquanto que,

quando utilizada a maior concentração de BAP, 5,0 mg L<sup>-1</sup>, não houve formação de calos (Figura 15).



**Figura 15** – Porcentagem de formação de calos (%) no subcultivo de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias, dispostos horizontalmente no meio de cultura em função das concentrações de BAP e ANA. Médias seguidas de mesma letra maiúscula (ANA) e minúscula (BAP) não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

A formação de calos durante a micropropagação de mangabeira foi relatada por Soares et al. (2007), os quais verificaram a formação de calos quando BAP foi adicionado ao meio de cultura, e, da mesma forma como os resultados do presente trabalho, altas concentrações foram tóxicas, e os explantes não foram responsivos à calogênese. Resultados similares foram descritos por Aragão et al. (2011) para micropropagação de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), nos quais a adição de BAP favoreceu a calogênese de explantes nodais, não afetando o desenvolvimento das brotações obtidas.

Aos 40 dias, a sobrevivência dos explantes permaneceu alta, com média de 91%. As concentrações de BAP com ausência ou presença de ANA adicionados ao meio de cultura interferiram positivamente apenas no número de brotações por explante (NBPE) (Tabela 12). Contudo, as concentrações de BAP utilizadas afetaram positivamente as variáveis número de brotações adventícias por explantes (NBAPE), comprimento das brotações (CPB) e negativamente a oxidação (Tabela 13).

**Tabela 12** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB); número de brotações por explante (NBPE); número de brotações adventícias por explante (NBAPE) e comprimento das brotações (CPB) aos 40 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) dispostos horizontalmente no meio de cultura, em função das concentrações de BAP e ANA. Piracicaba – SP, Brasil, 2020.

BAP/ ANA (mg L <sup>-1</sup> )	%SOB		NBPE		NBAPE		CPB	
	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
<b>0,0</b>	100	100	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0	0,0	0,00	0,00
<b>1,0</b>	100	100	5,3 Aa	1,6 Ba	1,1	0,4	0,61	0,72
<b>2,5</b>	87,5	100	3,6 Aa	2,5 Aa	0,5	0,4	0,60	0,51
<b>5,0</b>	62,5	75	0,5 Ab	0,0 Ab	0,4	0,0	0,16	0,00
<b>Média</b>	91		1,7		0,4		0,33	
<b>CV (%)</b>	24,76		11,16		9,14		40,29	
<b>Valor p</b>	0,9418ns		0,0329*		0,2946ns		0,5152ns	

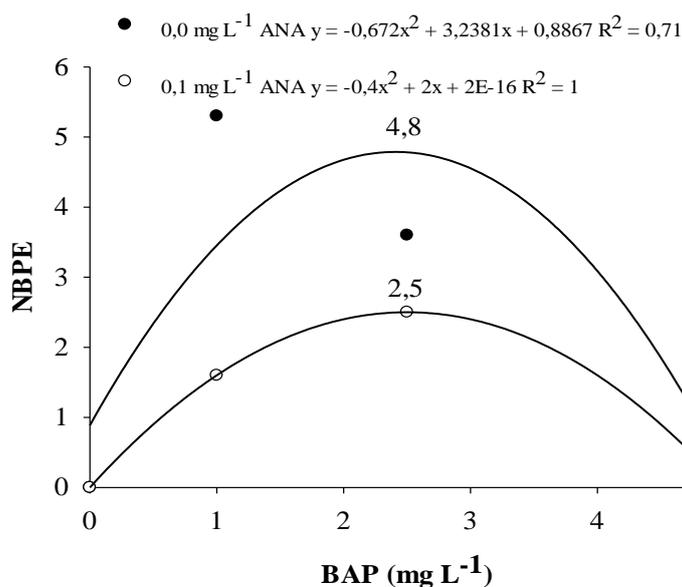
<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si na coluna, pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

**Tabela 13** – Número de brotações adventícias por explante (NBAPE); comprimento das brotações (CPB) e oxidação aos 40 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) dispostos horizontalmente no meio de cultura, em função das concentrações de BAP. Piracicaba – SP, Brasil, 2020.

BAP (mg L <sup>-1</sup> )	NBAPE	CMPB	Oxidação
<b>0,0</b>	0,0 b	0,00 b	0,00 a
<b>1,0</b>	0,8 a	0,66 a	0,00 a
<b>2,5</b>	0,4 ab	0,55 a	0,25 ab
<b>5,0</b>	0,2 ab	0,08 b	1,75 b
<b>Média</b>	0,4	0,33	0,5
<b>CV (%)</b>	9,15	40,29	22,93
<b>Valor p</b>	0,0135*	0,0002*	0,0347*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

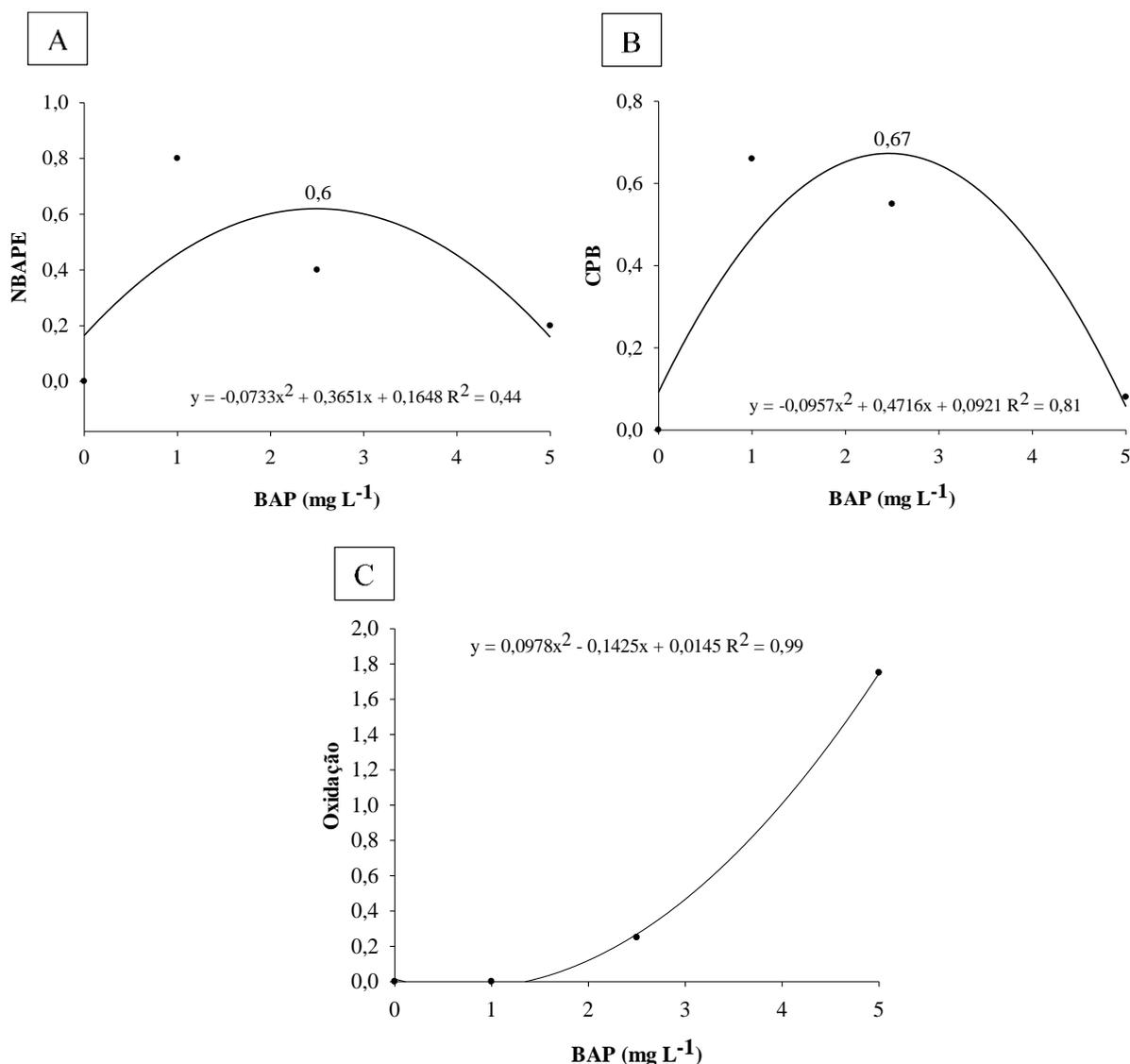
Houve aumento quadrático das brotações por explante em função das concentrações utilizadas de BAP com ou sem adição de ANA. A utilização apenas de BAP no meio de cultura proporcionou a maior média de produção de brotos quando adicionados 2,4 mg L<sup>-1</sup> deste regulador vegetal ao meio de cultura, produzindo, em média, 4,8 brotos por explante, enquanto que, a combinação de BAP com ANA acarretou na produção máxima de brotações na concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, com média de 2,5 brotos por explante (Figura 16).



**Figura 16** – Número de brotações por explante (NBPE) no subcultivo de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) dispostos horizontalmente no meio de cultura aos 40 dias, em função das concentrações de BAP e adição de ANA. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Os efeitos da adição de reguladores vegetais na morfogênese variam conforme a espécie estudada e as concentrações dos hormônios endógenos, resultando em diferentes respostas quando os reguladores são adicionados no meio de cultura. Segundo Santana (2003), o balanço positivo da concentração de citocinina em relação a auxina promove uma maior formação de brotações e gemas. Os resultados corroboram com aqueles obtidos na micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), nos quais a adição de 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA no meio de cultura atuou positivamente na indução de brotações em pequenas concentrações. No entanto, quando dobrada a concentração, o efeito sinérgico passa a ser antagônico, observando-se, portanto, uma diminuição na produção de novos brotos (SANTOS et al., 2006).

Em relação ao número de brotações adventícias (NBAPE) e ao comprimento das brotações (CPB), verificou-se que as concentrações crescentes de BAP utilizadas promoveram acréscimo nas médias obtidas para ambas as variáveis até o ponto máximo de 2,5 mg L<sup>-1</sup> do regulador, possibilitando a obtenção de 0,6 brotação adventícia por explante e comprimento médio de 0,67 cm por brotação (Figura 17A e 17B), sendo que, o BAP em concentrações superiores a 2,5 mg L<sup>-1</sup>, para ambas as variáveis, houve efeito negativo. A medida em que a concentração de BAP adicionada ao meio de cultura aumentou, a oxidação aumentou concomitantemente, apresentando na concentração máxima utilizada uma nota média de oxidação de 1,8 (Figura 17C).



**Figura 17** – Número de brotações adventícias por explante (A); comprimento das brotações (CPB) (B) e oxidação (B) no subcultivo de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) dispostos horizontalmente no meio de cultura aos 40 dias, em função das concentrações de BAP. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Assim como observado para cerejeira-do-Rio-Grande, Machado et al. (2020) destacaram a importância da adição de BAP no subcultivo de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.), fruteira nativa da Mata Atlântica, sendo que, em meio de cultura sem adição de reguladores vegetais, apenas as duas gemas axilares pré-existentes se desenvolveram, sem produção de gemas adventícias, e quando suplementado com 0,5 ou 1,0 mg L<sup>-1</sup> da citocinina, houve um incremento no desenvolvimento de brotações adventícias por explante, produzindo, em média, 3,6 e 3,7 brotos no final do primeiro subcultivo.

No presente estudo, os resultados obtidos indicaram que as concentrações de BAP afetaram o comprimento das brotações de maneira positiva crescente até a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> da citocinina BAP, sendo que, concentrações maiores que essa se apresenta tóxico para

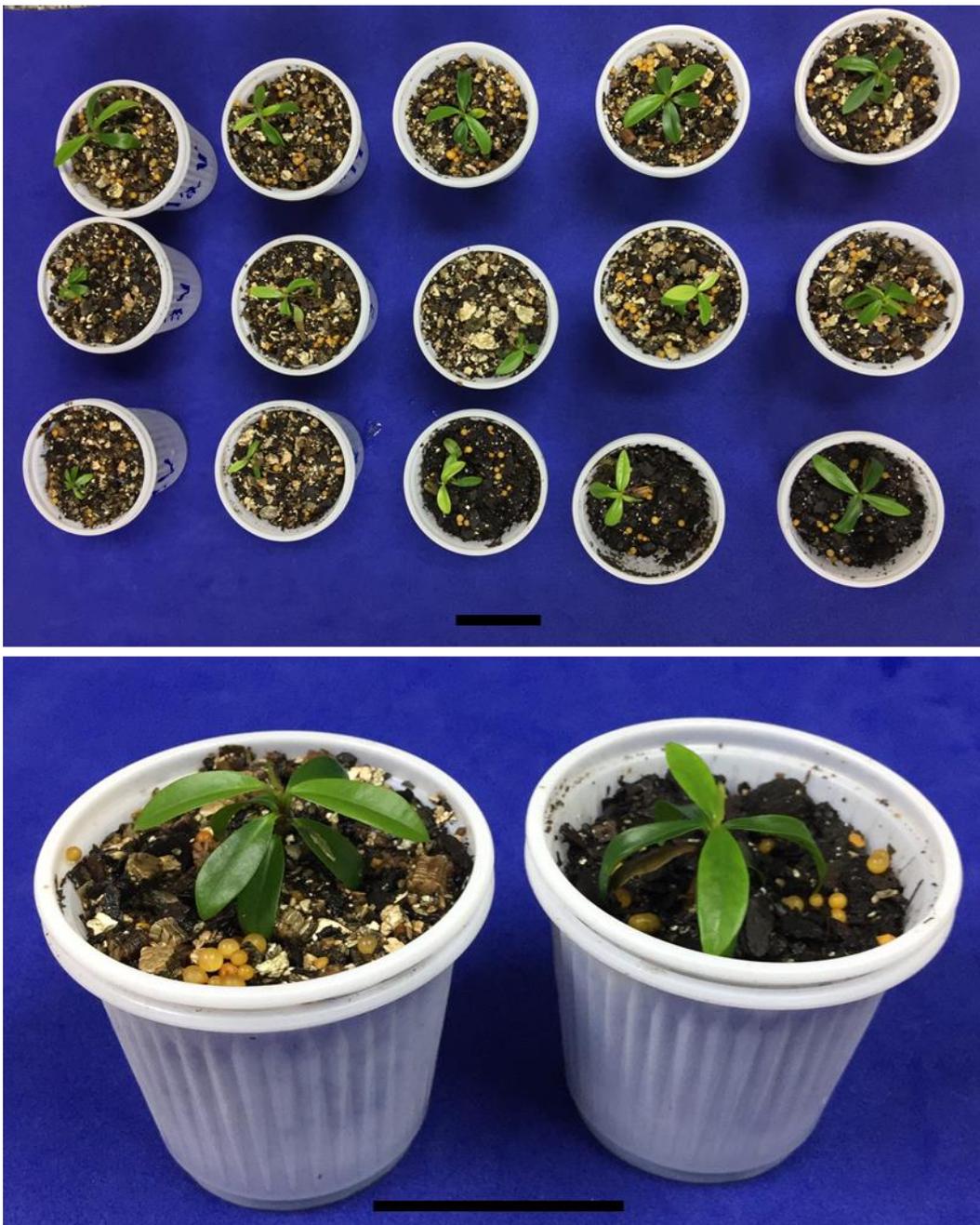
os explantes. Esse efeito negativo das altas concentrações da citocinina 6-benzylaminopurina no comprimento das brotações já foram relatadas em diversos trabalhos envolvendo espécies lenhosas, tais como o pau-pombo (*Tapirira guianensis* Aubl.) (GUTIÉRREZ et al., 2013); o ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) (STEIN et al., 2007); o pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.) (SILVA et al., 2018); a casaqueira (*Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied) (SANT'ANA et al., 2018); a umburana de cheiro (*Amburana cearenses* A.C. Smith.) (CAMPOS et al., 2013); e a cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith) (FIRMINO JUNIOR; SCHERWINSKI, 2012).

### **Aclimatização de mudas de cerejeira-do-Rio-Grande provenientes de plântulas germinadas *in vitro***

O processo de aclimatização de mudas produzidas em condições *in vitro* é, muitas vezes, dificultada, por apresentar alta mortalidade pela transferência de um ambiente controlado para as condições *ex vitro*. Entre as razões para esta maior dificuldade na aclimatização, citam-se a presença de sistema radicular fraco ou não desenvolvido, estômatos não funcionais e cutículas finas ou não desenvolvidas, sendo necessário submeter as mudas a um processo de mudança gradual do ambiente *in vitro* para *ex vitro* (LÉDO et al., 2007; MATHUR et al., 2008). A aclimatização deve ser realizada de modo gradual, mantendo-se alta umidade ao redor das mudas e expondo-as, gradativamente, às condições do ambiente, evitando-se a dessecação, e favorecendo as adaptações fisiológicas e morfológicas necessárias (CHANDRA et al., 2010; HARTMANN et al., 2014).

Além do controle da umidade, o substrato é um fator de extrema importância para o sucesso da aclimatização, apresentando atributos físicos e químicos necessários para desenvolvimento das plantas (ROCHA et al., 2008; SOUZA et al., 2015). A mistura de mais de dois tipos de substrato pode influenciar positivamente o desenvolvimento da muda, pela combinação de diferentes características encontradas nos mais variados substratos (OLIVEIRA et al., 2013).

Ao final dos 90 dias de aclimatização das mudas, foi possível obter plantas de cerejeira-do-Rio-Grande através da multiplicação *in vitro* (Figura 18).



**Figura 18** – Mudanças aclimatizadas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) com 90 dias. Barras = 3 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Em relação a aclimatização, observou-se que, o substrato comercial a base de casca de pinus misturado com vermiculita, na proporção de 1:1, proporcionou as maiores médias de sobrevivência, apresentando 80% das mudas aclimatizadas, valor superior a utilização apenas do substrato comercial, o qual apresentou apenas 20% (Tabela 14).

**Tabela 14** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB) de plântulas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 90 dias, em função dos diferentes substratos utilizados na aclimatização. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

<b>Substrato</b>	<b>%SOB</b>
<b>Substrato comercial</b>	20 b
<b>Substrato comercial + Vermiculita (1:1)</b>	80 a
<b>Média</b>	50
<b>CV (%)</b>	12,01
<b>Valor p</b>	0,0026*

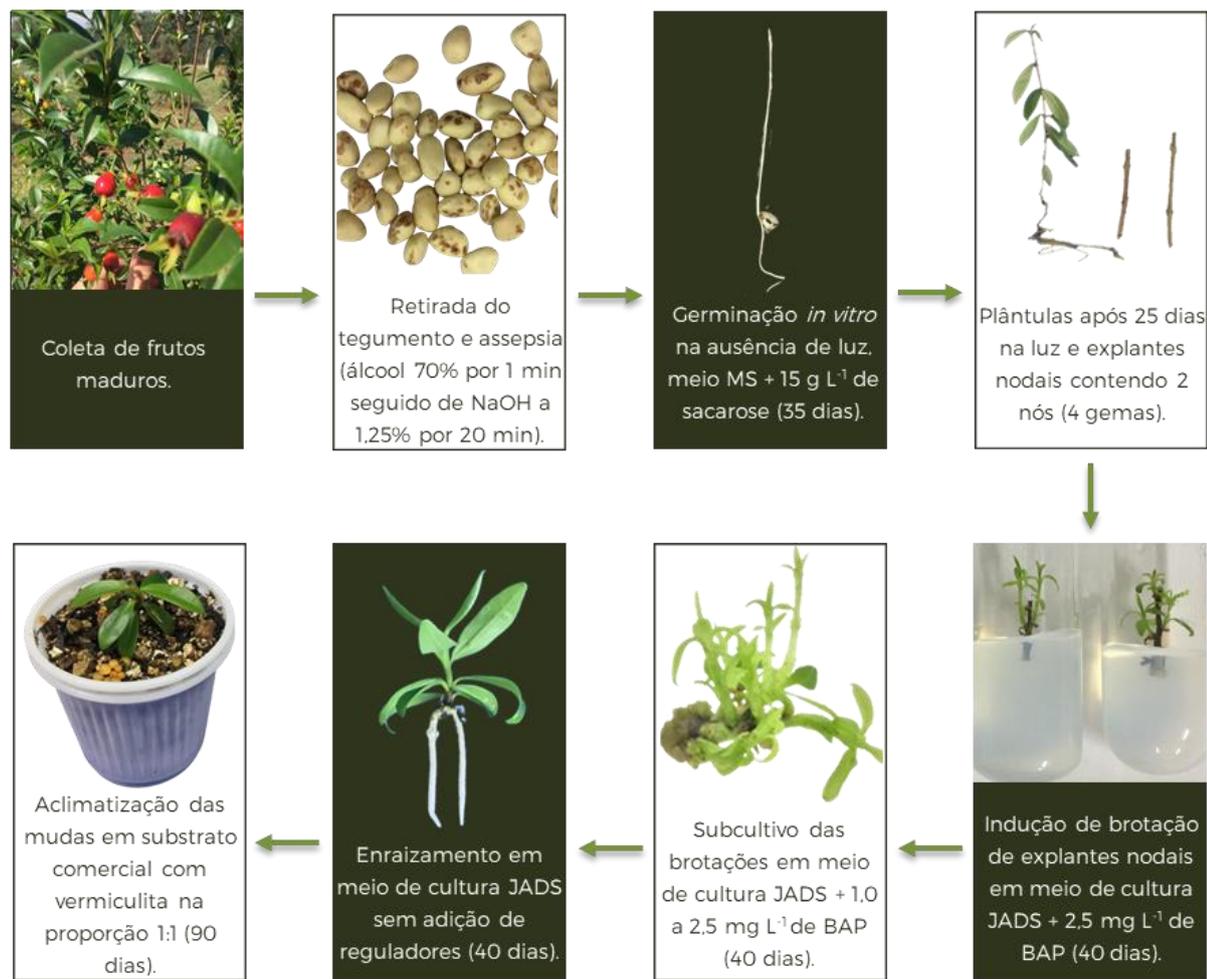
\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

Substratos comerciais, a base de casca de pinus, têm sido utilizados no processo de aclimatização de mudas micropropagadas apresentando altas taxas de sobrevivência para diferentes genótipos de gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) (SÁ et al., 2016; COUTO; ARAUJO, 2018) e genótipos de jenipapo (*Genipa americana* L.). No entanto, o substrato comercial utilizado isoladamente para aclimatização de mudas de cerejeira-do-Rio-Grande não apresentou bons resultados, devido, provavelmente, à sua drenagem deficiente, acarretando em podridão radicular e favorecendo a proliferação de fungos, levando as mudas à morte durante o processo de aclimatização.

Segundo Machado et al. (2020), na aclimatização de mudas micropropagadas de guabiroba, a mistura de substrato comercial com vermiculita na proporção de 1:1 proporcionou 52% de sobrevivência final das mudas, diferenciando do uso de somente substrato comercial na composição, o qual apresentou 19% de mudas vivas aos 60 dias, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, em cerejeira-do-Rio-Grande.

### **Resumo do protocolo completo de germinação e multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.)**

Ao final do trabalho realizado, foi possível estabelecer um protocolo completo para germinação e micropropagação de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) a partir de explantes derivados de sementes germinadas *in vitro*, contribuindo assim para o desenvolvimento do processo de multiplicação dessa espécie frutífera nativa brasileira. Este protocolo é apresentado, resumidamente, em um fluxograma, a seguir (Figura 19).



**Figura 19** – Fluxograma representativo das etapas de germinação e multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.).

## Conclusões

Este trabalho resultou no desenvolvimento de um protocolo completo de germinação e multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.), importante espécie frutífera nativa da Mata Atlântica.

Os melhores resultados dos parâmetros germinação, formação de parte aérea, comprimento médio da plântula e maior número de nós foram obtidos com a retirada do tegumento das sementes, cultivando-as na ausência de luz. O meio de cultura MS e a suplementação com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionaram o melhor desenvolvimento *in vitro* das plântulas derivadas das sementes. As frações das sementes de cerejeira-do-Rio-Grande possuem potencial germinativo; entretanto, o desenvolvimento da parte aérea é afetado negativamente com o fracionamento, não sendo indicado o uso deste procedimento no cultivo *in vitro*.

Na fase de indução de brotações de explantes nodais, a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de ANA promoveu os melhores resultados referente ao número de brotações, porcentagem de gemas brotadas e comprimento médio das brotações. O uso de giberelina (GA<sub>3</sub>) foi dispensável no alongamento das brotações. O meio de cultura mais indicado no cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande a partir de explantes derivados de plântulas germinadas *in vitro* foi o JADS. Foi possível a obtenção de altas porcentagens de formação de raízes sem adição de reguladores em brotações cultivadas em meio WPM, ½ WPM, ¼ WPM e JADS. A otimização da fase inicial de indução de brotação pode ser realizada em meio de cultura JADS suplementado de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

No primeiro subcultivo das brotações, houve formação de calos quando adicionados reguladores ao meio de cultura. A adição de 1,0 a 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP resultou nas maiores médias de brotações, quantidade de brotações adventícias e comprimento médio das brotações, altas concentrações da citocinina afetaram negativamente o processo de multiplicação e o uso da auxina (ANA) no meio de cultura foi dispensável. É indicado o uso do substrato comercial (a base de pinus, turfa e vermiculita) misturado com vermiculita, na proporção 1:1, para aclimatização das mudas micropropagadas.

### Referências

- ALEGRETTI, A. L.; WAGNER JÚNIOR, A.; BORTOLINI, A.; HOSSEL, C.; ZANELA, J.; CITADIN, I. Armazenamento de sementes de cereja-do-mato (*Eugenia involucrata*) DC. submetidas ao recobrimento com biofilmes e embalagem a vácuo. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 1, p. 124-127, 2015.
- ALMEIDA, C. S.; LÉDO, A. S.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F.; SANTOS, J. E.; RIBEIRO, M. M. J.; VILANOVA NETA, J. L. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* do jenipapeiro. **Scientia Plena**, v. 9, n. 10, 2013.
- ALONSO, C. R.; ASPERTI, L. M.; GUARDIA, M. C.; BARBEDO, C. J. Cutting and regeneration of roots and seedlings from seeds of *Eugenia candolleana* DC. at different maturity stages. **J. Seed Sci.**, v. 41, n. 2, p. 160-167, 2019.
- AMADOR, T. S.; BARBEDO, C. J. Potencial de inibição da regeneração de raízes e plântulas em sementes germinantes de *Eugenia pyriformis*. **Pesq. Agropecu. Bras.**, v.46, p.814-821, 2011.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesq. Agropecu. Bras.**, v. 41, p. 1715-1719, 2006.

ARAB, M. M.; YADOLLAHI, A.; EFTEKHARI, M.; AHMADI, H.; AKBARI, M.; KHORAMI, S. S. Modeling and optimizing a new culture medium for in vitro rooting of GxN15 *Prunus* rootstock using artificial neural network-genetic algorithm. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 9977, 2018.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explante de Pau-Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.

ARAGÃO, V. P. M.; NAVARRO, B. V.; SILVA, A. T.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, na endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell Cult. & Micropropag.**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 41-50, 2017.

ARMAREGO-MARRIOTT, T.; SANDOVAL-IBAÑEZ, O.; KOWALEWSKA, L. Beyond the darkness: recent lessons from etiolation and de-etiolation studies. **J. Exp. Bot.**, v. 71, n. 4, p. 1215-1225, 2020.

ARRUDA, A. L.; BUSS, M.; NERBASS, F. R.; RUFATO, L. Concentrações de citocinina influenciam a multiplicação *in vitro* de kiwizeiro. **Evidência**, Joaçaba, v. 19, n. 1, p. 45-56, 2019.

BALLESTER, A.; SÁNCHEZ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Etiolation as a pretreatment for in vitro establishment and multiplication of mature chestnut. **Physiol. Plant.**, v. 77, p. 395-400, 1989.

BLANDO, F.; ONLU, S.; COLELLA, G.; KONCZAK, I. Plant regeneration from immature seeds of *Eugenia myrtifolia* Sims.. **In vitro Cell. Dev. Biol-Plant**, v. 49, p. 388-395, 2013.

BRAMHANAPALLI, M.; THOGATABALIJA, L.; GUDIPALLI, P. Efficient in vitro plant regeneration from seedling-derived explants and genetic stability analysis of regenerated plants of *Simarouba glauca* DC. by RAPD and ISSR markers. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 53, p. 50-63, 2017.

BRAVO, V. C. D.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; VENCOSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciênc. Rural**, v. 38, p. 2181-2185, 2008.

- CAMPOS, V. C. A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. V. Micropropagação de umburana de cheiro, **Ciênc. Rural**, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Hortic. Bras.**, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; BARROS, L. M. **Estiolamento In Vitro: Uma Alternativa para a Produção de Mudanças Micropropagadas de Antúrio**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011, 8p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica, 36).
- CASTRO, T. C.; SIMÕES-GURGEL, C.; RIBEIRO, I. G.; COELHO, M. G. P.; ALBARELLO, N. Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and in vivo and in vitro germination of species of the genus *Cleome*. **J. Seed Sci.**, v. 36, n. 3, p. 326-335, 2014.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnol. Lett.**, v. 32, p. 1199-1205, 2010.
- CID, L. P. B.; ILLG, R. D.; PIEDRABUENA, A. E. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., CV. "Chonan") via cell culture in liquid medium. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 30, p. 150-155, 1994.
- CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 56, p. 17-23, 1999.
- CORDEIRO, G. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação in vitro de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Sci. For.**, v. 42, p. 337-344, 2014.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- COUTO, T. R.; ARAUJO, J. S. P. Aclimatização de mudas micropropagadas de genótipos de gérbera. **Rev. Agr. Acad.**, v. 1, n. 4, p. 52-63, 2018.
- CRIPA, F. B.; FREITAS, L. C. N.; GRINGS, A. C.; BORTOLINI, M. F. Tetrazolium test for viability estimation of *Eugenia involucrata* DC. and *Eugenia pyriformis* Cambess. Seeds. **J. Seed Sci.**, v. 36, n. 3, p. 305-311, 2014.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; AMBRÓSIO, R. Fenologia da floração e frutificação de mirtáceas nativas da floresta com araucária. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 291-295, 2010.

DELGADO, L. F. **Fracionamento, maturação e origem da capacidade regenerativa de sementes de algumas espécies brasileiras de Eugenia (Myrtaceae)**. 2010. 92f. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, São Paulo, 2010.

DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J. Regeneração de raízes e plântulas de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) de diferentes estádios de maturação. **Hoehnea**, São Paulo, v. 47, 2020.

DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.55, n.4, p.583-590, 2012.

DEMÉTRIO, C. A.; JACOB, J. F. O.; AMBROSANO, G. B.; OLIVEIRA, Ê. T.; RODRIGUES, P. H. V. In vitro propagation of cambuci (*Campomanesia phaea*): An endangered exotic fruit and ornamental plant from Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 145, p. 203-208, 2021.

FARIA, D. V.; CORREIA, L. N. F.; MATOS, E. M.; SOUZA, M. V. C.; BATISTA, D. S.; COSTA, M. G. C.; NETO, V. B. P.; XAVIER, A.; ROGALSKI, M.; OTONI, W. C. Wounding and medium formulation affect de novo shoot organogenic responses in hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.**, v. 55, p. 277-289, 2019.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise na diversidade genética em acessos de Eugenia involucrata DC.** 2010. 159f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 898-906, 2020.

- GOMES, J. P.; DE OLIVEIRA, L. M.; FERREIRA, P. I.; BATISTA, F. Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes de myrtaceae. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 285-293, 2016.
- GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, K. M.; FERREIRA, P. I.; DACOREGIO, H. M. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia involucrata*. **Rev. Ciênc. Agrovet.**, Lages, v. 15, p. 118-123, 2016.
- GREENWELL, Z. L. I.; RUTER, J. M. Effect of glutamine and arginine on growth of *Hibiscus moscheutos* "in vitro". **Ornam. Hortic.**, v. 24, n. 4, p. 393-399, 2018.
- GUERRA, D.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; WERLANG, C. A.; VEIT, P. A. Genetic and cytological diversity in cherry tree accesions (*Eugenia involucrata* DC) in Rio Grande do Sul. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, v. 16, p. 219-225, 2016.
- GUIMARÃES, L. A. O. P.; DARIVA, M. D.; OLIVEIRA, S. B.; BELLON, A. A.; MENDONÇA, G. C. Germinação de sementes e vigor de plântulas de *Myrciaria glazioviana* submetidas a sombreamentos. **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 2237-2243, 2018.
- GUTIÉRREZ, I. E. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SILVA, T. S.; FONSECA, P. T.; CAMPOS, V. C. A.; ALVIM, B. F. M.; CARNEIRO, F. S.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; SANTANA, J. R. F. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 143-151, 2013.
- HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2014. 880p.
- HELMS, K. Calcium deficiency of dark-grown seedlings of *Phaseolus vulgaris* L.. **Plant Physiol.**, v. 41, p. 799-804, 1971.
- HOSSEL, C.; WAGNER JÚNIOR, A.; HOSSEL, J. S. A. O.; FABIANE, K. C.; CITADIN, I. 'Cerejeira da mata' and 'guabijuzeiro' propagation by air layering. **Comun. Sci.**, v. 8, n. 4, p. 581-586, 2017.
- INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**. Curitiba, v. 37, n. 1, p. 55-61, 2007.
- JALINK, H.; FRANDAS, A.; SCHOOR, R. V. D.; BINO, J. B. Chlorophyll fluorescence of the testa of *Brassica oleracea* seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. **Sci. Agr.**, Piracicaba, v. 55, n. especial, p. 88-93, 1998.

- JUSTO, C. F.; ALVARENGA, A. A.; ALVES, E.; GUIMARÃES, R. M.; STRASSBURG, R. C. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb.. **Acta. Bot. Bras.**, v. 21, n. 3, p. 539-551, 2007.
- KLEIN, J.; ZUCARELI, V.; KESTRING, D.; CAMILLI, L.; RODRIGUES, J. D. Efeito do tamanho da semente na emergência e desenvolvimento inicial de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Rev. Bras. Biociênc.**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 861-863, 2007.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: na illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508-536, 1997.
- LATTUADA, D. S.; SOUZA, P. V. D.; GONZATTO, M. P. Enxertia herbácea em Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1285-1288, 2010.
- LÉDO, A. S.; BARIN, L. B.; SILVA, A. V. C.; SÁ, F. P.; MACHADO, C. A. In vitro germination and acclimatization of cambui tree type seedlings. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1355-1359, 2014.
- LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.
- LEITE, V. C. A.; HEBLING, S. A. Efeito do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore.. **Natureza on line**, v. 5, n. 2, 2007.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Comb. Proc. - Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MACHADO, J. S.; DEGENHARDT, J.; MAIA, F. R.; QUOIRIN, M. Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Trees**, v. 34, p. 791-799, 2020.
- MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, J. C. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. **Sci. Agric.**, v. 60, n. 3, p. 471-475, 2003.
- MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; 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.**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, 2007.
- MATHUR, A.; MATHUR, A. K.; VERMA, P.; YADAV, S.; GUPTA, M. L.; DAROKAR, M. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n. 8, p. 1046-1053, 2008.
- MITTERMIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: The critical role of hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J.

- C. (Org.). **Biodiversity hotspots: Distribution and protection of conservation priority areas**. 1ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 3-22. doi:10.1007/978-3-642-20992-5.
- MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; LIMA, A. F.; SILVA, S. T.; DA SILVA, G. M. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atroveran. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 2, p. 215-223, 2015.
- MOURA, L. C.; TITON, M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTANA, R. C. Germinação *in vitro* e aclimatização de plântulas de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Biosci. J.**, Uberlandia, v. 30, n. 2, p. 678-687, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-493, 1962.
- NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Rev. Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26, 2008.
- NDAGIJIMANA, V.; KAHIA, J.; ASIIMWE, T.; SALLAH, P. Y.; WAWERU, B.; MUSHIMIYIMANA, I.; NDIRIGWE, J.; KIRIMI, S.; SHUMBUSHA, D.; NJENGA, P.; KOUASSI, M.; KOFFI, E. *In vitro* effects of gibberellic acid and sucrose concentration on micropropagation of two elite sweet potato cultivars in Rwanda. **Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.
- NIETSCHE, S.; GONÇALVES, V. D.; PEREIRA, M. C. T.; SANTOS, F. A.; ABREU, S. C.; MOTA, W. F. Tamanho da semente e substratos na germinação e crescimento inicial de mudas de cagaiteira. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1321-1325, 2004.
- OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M.; ALOUFA, M. A. I. Influência de reguladores de crescimento e do tipo de explante na morfogênese *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Rev. Desafio**, v. 6, n. 4, 2019.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesqui. Florest. Bras.**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 445-460, 2013.
- OLTRAMARI, A. C.; VESCO, L. L. D.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiaba serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciênc. Rural**, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000.
- OSORIO, C. R.; VELÁSQUEZ, F. A. G.; CORREAL, A. G.; BONILLA, J. M. T.; TRUJILLO, A. I. U. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Hass through morphogenesis. **Acta Agron.**, v. 67, n. 1, p. 160-167, 2018.

PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A. Tissue culture techniques for native amazonian fruit trees. In: LEVA, A.; RINALDI, L. (Org.). **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. 1ed. IntechOpen, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/52211>.

PEREIRA, P. C.; FREITAS, R. S.; MELO, B.; FRANZÃO, A. A.; PEREIRA, A. P.; SANTANA, J. G.; LUZ, J. M. Q.; MARTINS, M. Influência do tamanho de sementes na qualidade de mudas de tamarindeiro. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 73-79, 2008.

PIJUT, P. M.; BEASLEY, R. R.; LAWSON, S. S.; PALLA, K. J.; STEVENS, M. E.; WANG, Y. In vitro propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001-2011). **Propag. of Ornam. Plants**, v. 12, n. 1, p. 25-51, 2012.

PINHAL, H. F.; ARARUNA, E. C.; CARNEIRO, P. A. P.; ASMAR, S. A.; MELO, B.; LUZ, J. M. Q. Concentration of MS medium and cutting of seeds on in vitro establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). **Bioci. J.**, Uberlândia, v. 33, n. 2, p. 306-313, 2017.

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; PAIVA, R.; GOULART, V. L. A.; ANSELMO, A. C. N. Micropropagação de candeia, uma espécie nativa do cerrado brasileiro. **Sci. Agrar. Parana.**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 3, p. 305-311, 2016.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L.. **Rev. Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; ALBUQUERQUE, K. S. Efeitos do AIB e GA3 na micropropagação de *Zantedeschia aethiopica*.. **Rev. Ceres**, v. 53, n. 309, p. 568-573, 2006.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, N. J.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. O.; TAKANE, R. J.; DE CARVALHO, A. C. P. P. Artificial light and growth regulators on the in vitro etiolation of *Cattleya labiata*. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 296-302, 2017.

RODRÍGUEZ-ELIZALDE, M. L. A.; FERRERA-CERRATO, R.; HERNÁNDEZ, M. V.; LEÓN, M. T. B. C.; GONZÁLEZ, A. M.; ALARCÓN, A. Towards micropropagation of *Euphorbia cyathophora* Murray: a wild plant species with medicinal and ornamental potential. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 9, 2019.

- ROSSATO, M.; SCHUMACHER, P. V.; NETTO, A. P. C.; STEIN, V. C.; REIS, E. F.; VILELA, M. S. P.; PAIVA, L. V. Embryogenic potential of the callus of gabirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. **Act. Sci., Biol. Sci.**, v. 41, n. 1, e46358, 2019.
- SÁ, F. P.; LEDO, A. S.; AMORIM, J. A. E.; SILVA, A. V. C.; PASQUAL, M. In vitro propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciênc. Agrotec.**, v. 40, n. 2, p. 155-163, 2016.
- SADALI, N. M.; SOWDEN, R. G.; LING, Q.; JARVIS, R. P. Differentiation of chromoplasts and other plastids in plants. **Plant Cell Rep.**, v. 38, p. 803-818, 2019.
- SANT'ANA, C. R. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; SILVA, D. P. C.; SILVA, L. C. In vitro propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciênc. Agrotec.**, v. 42, n. 4, p. 372-380, 2018.
- SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, P. C.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, D. P. C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. P. Micropropagação de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.
- SANTOS, M. A. C.; RÊGO, M. M.; QUEIRÓZ, M. A.; CAPRONI, D. T. R.; DIETRICH, O. H. S.; SANTOS, A. F.; ROCHA, D. I.; BATISTA, D. S.; OTONI, W. C. In vitro growth performance of *Psidium guajava* and *P. guineense* plantlets as affected by culture medium formulations. **Vegetos**, v. 33, p. 435-445, 2020.
- SCHERER, R. F.; HOLDERBAUM, D. F.; GARCIA, A. C.; SILVA, D. A.; STEINMACHER, A.; GUERRA, M. P. Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, v. 15, p. 66-71, 2015.
- SILVA, C. V.; BILIA, A.C.; MALUF, A. M.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 26, p. 213-221, 2003.
- SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de Eugenia. **Rev. Bras. Sementes**, v. 27, n. 1, p. 86-92, 2005.
- SILVA, D.; IMAKAWA, A. M.; BRUNO, F. M. S.; COSTA, S. S.; SAMPAIO, P. T. B. In vitro propagation and seedling acclimatization of *Caesalpinia ferrea* Mart., a valuable medicinal

plant in the Amazon (Fabaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Cienc. Nat.**, Belém, v. 13, n. 1, p. 57-65, 2018.

SILVA, F. J.; HISATUGO, E. Y.; SOUZA, J. P. Efeito da luz na germinação e desenvolvimento de plântulas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) de distintas procedências. **Hoehnea**, v. 43, n. 1, p. 195-202, 2016.

SILVA, K. S.; MENDONÇA, V.; MEDEIROS, L. F.; FREITAS, P. S. C.; GÓIS, G. B. Influência do tamanho da semente na germinação e vigor de mudas de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). **Rev. Verde**, Mossoró, v. 5, n. 4, p. 217-221, 2010.

SILVA, P. R. D.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO, M. M.; JOBIM, L. H.; JUNGES, M.; STEFENON, V. M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through in vitro germination and micropropagation. **Ann. For. Res.**, v. 57, n. 1, p. 39-45, 2014.

SIMÕES, M. A.; VASCONCELOS, J. M.; OLIVEIRA, J. P.; BELTRÃO, R. T.; MANFIO, C. E.; JUNIOR, P. C. P. F.; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) no alongamento in vitro de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) durante a micropropagação. **Amazônia: Ci. & Desenv.**, Belém, v. 7, n. 14, p. 35-41, 2012.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOUSA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Hortic. Bras.**, v. 33, n. 2, p. 208-215, 2015.

SOUZA, R. A.; DANTAS, P. V. P.; CAVALCANTE, P. F.; TENÓRIO, R. R.; HOULLOU, L. M. Basic procedure for the in vitro propagation of Brazilian trees for reforestation purposes. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, n. 2, p. 107-114, 2017.

STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture**. 3ed., Springer, 2008, p. 205-226.

STEFENON, V. M.; PINHEIRO, M. V. M.; FREITAS, F. R.; SILVA, V. J. B.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, D. D.; GUERRA, M. P. In vitro callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. **Biotecnol. Veg.**, v. 20, n. 2, p. 135-146, 2020.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; RODRIGUES, M.; NOGUEIRA, G.; SOARES, F. P.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (*Inga vera*

- Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). **Rev. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 723-725, 2007.
- SUN, Y. C.; ZHANG, Y. J.; WANG, K. NaOH scarification and stratification improve germination of *Iris lactea* var. *chinensis* seed. **HortScience**, v. 41, n. 3, 2006.
- TEIXEIRA, C. C.; BARBEDO, C. J. The development of seedlings from fragments of monoembryonic seeds as an important survival strategy for *Eugenia* (Myrtaceae) tree species. **Trees**, v. 26, p. 1069-1077, 2012.
- VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.17, v. 1, n. 3, 2007.
- WAGNER, F. H.; SANCHEZ, A.; AIDAR, M. P. M.; ROCHELLE, A. L. C.; TARABALKA, Y.; FONSECA, M. G.; PHILLIPS, O. L.; GLOOR, E.; ARAGÃO, L. E. O. C. Mapping Atlantic rainforest degradation and regeneration history with indicator species using convolutional network. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, 2020.
- WYK, A. E.; BOTHA, R. The genus *Eugenia* (Myrtaceae) in Southern Africa: ontogeny and taxonomic value of seed. **S. Afr. J. Bot.**, v. 3, n. 1, p. 64-80, 1984.
- ZHANG, H.; ZHAO, Z.; SONG, B.; DU, P.; LIU, X. Light-induced ultrastructure changes of amyloplasts and effect of nitrogen fertilization on greening in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **Postharvest Biol. Tec.**, v. 168, 2020.
- ZHU, Y. S.; MERKLE-LEHMAN, L.; KUNG, S. D. Light-induced transformation of amyloplast into chloroplasts in potato tubers. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 142-145, 1984.
- ZORATO, M. F.; PESKE, S. T.; TAKEDA, C.; NETO, J. B. F. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Rev. Bras. Sementes**, v. 29, n. 1, p. 11-19, 2007.

## CAPÍTULO 2: CULTIVO *IN VITRO* DE CEREJEIRA-DO-RIO-GRANDE (*Eugenia involucrata* DC.), A PARTIR DE EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS MANTIDAS EM ESTUFA

### Resumo

A produção comercial de mudas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) é realizada por sementes, o que dificulta a obtenção de pomares homogêneos, com características comerciais padronizadas. A multiplicação clonal se faz necessária para a fixação de genótipos selecionados desta espécie; entretanto, é dificultada pelo baixo índice de sucesso na produção de mudas, necessitando de aprimoramento das técnicas. A multiplicação *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande vem a ser uma via alternativa à produção de mudas. Frente ao exposto, buscou-se, nesse trabalho, avaliar a resposta *in vitro* de explantes nodais e foliares de cerejeira-do-Rio-Grande. Os explantes foram coletados de plantas de dois anos de idade mantidas em estufa telada, sob tratamento de fungicida e bactericida. Para explantes nodais, foram realizados experimentos avaliando-se soluções na assepsia (NaClO e Ca(ClO<sub>2</sub>) a 2,5% e 1,25% de cloro ativo) e épocas de coleta do explante (verão e outono). Avaliou-se também a indução de brotação inicial pela combinação dos reguladores 6-benzilaminapurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>), e os efeitos dos diferentes meios de cultura (MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, SP Modificado e SP) na indução e desenvolvimento de brotações e no subcultivo das brotações. A partir explantes foliares, foram avaliadas as diferentes soluções na assepsia (NaClO e Ca(ClO<sub>2</sub>) a 0,75% e 1,25% de cloro ativo) e o efeito da posição (adaxial e abaxial) e adição de reguladores BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>), e a combinação dos reguladores BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,0; 0,01 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) na morfogênese. Explantes nodais coletados no outono apresentaram menor porcentagem de contaminação e de oxidação e maior sobrevivência; o uso do hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo foi indicado. A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na presença de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP sem adição de auxina auxiliaram no alongamento das brotações. Os meios de cultura ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS e SP Modificado na indução de brotações e desenvolvimento dos brotos apresentaram os melhores resultados. Indica-se o uso de 0,75% de cloro ativo na assepsia de explantes foliares. Não foi observada morfogênese *in vitro* de discos foliares.

Palavras-chave: Meio de cultura; Micropropagação; Myrtaceae; Reguladores vegetais

### Abstract

The commercial seedling production of cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) is carried out by seeds, making it difficult to obtain homogeneous orchards with standardized commercial traits. The clonal multiplication is necessary to fix selected genotypes of this species; however, this process is difficult due to the low rate of success in the seedlings production, requiring optimization of these techniques. *In vitro* multiplication of cerejeira-do-Rio-Grande might be an alternative method for seedling production. Therefore, this work aimed to evaluate the *in vitro* response of nodal and foliar explants of cerejeira-do-Rio-Grande. The explants were collected from two-year old plants kept in a greenhouse, which had been treated with fungicide and bactericide. For the nodal explants, tests were conducted to evaluate asepsis solutions (NaClO and Ca(ClO<sub>2</sub>) with 2.5% and 1.25% of active chloride) and the season collection of explants (summer and autumn). Shoot induction was also evaluated the by the combination of 6-benzylaminopurine (BAP) (0.0, 1.0, 2.5 and 5.5 mg L<sup>-1</sup>) and naphthalene acetic acid (ANA) (0.0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>), the effects of different culture media (MS, ½ MS, ¼

MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, Modified SP, and SP) in the shoot induction and development and the subculture of the shoots. For the leaf explants, different asepsis solutions were tested (NaClO and Ca(ClO<sub>2</sub>) with 0.75% and 1.25% of active chloride) and also the effect of foliar disc position (adaxial and abaxial) and the addition of growth regulators BAP (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>), and the combination of BAP (0.0, 1.0 and 2.2 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0.0; 0.01 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>) in morphogenesis. Nodal explants collected in the autumn had the lowest contamination and oxidation rates and the greatest survival rate; the use of sodium hypochlorite with 1,25% of active chloride was indicated. The concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP with 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ANA and 2.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP without adding ANA provided greater shoot elongation. The culture media ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, and Modified SP revealed to be the best for shoot induction and development. In the asepsis of leaf explants, the use of 0.75% of active chloride is indicated. There was no *in vitro* morphogenesis in leaf discs.

Keywords: Culture medium; Growth regulators; Micropropagation; Myrtaceae.

## Introdução

A biodiversidade brasileira faz do país um dos mais importantes do mundo em termos de conservação e fonte de recursos naturais, contendo entre 15 a 20% da flora mundial, distribuída nos mais diversos biomas, dos quais destacam-se a Amazônia, o Cerrado e a Mata Atlântica. O Brasil apresenta uma ampla diversidade de espécies vegetais. Em números, são 46.653, sendo 33.223 espécies de angiospermas, as quais necessitam de investimentos e pesquisas para que possam ser exploradas economicamente (CORADIN et al., 2011; FLORA DO BRASIL 2020, 2020).

A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros mais ricos em diversidade biológica, e já contou com uma área de 1.315.460 km<sup>2</sup>. Porém, atualmente, só restam 12,4% da área original, se somados os fragmentos de mata remanescente, presentes em 17 estados do Brasil (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2019). Este bioma é considerado um *hotspot* de conservação, com aproximadamente 20.000 espécies de plantas, sendo 8.000 endêmicas (MYERS et al., 2000).

A família Myrtaceae é considerada uma das mais importantes da flora brasileira, e se faz presente na Mata Atlântica, podendo também serem encontradas espécies no sudeste asiático, australiano e na América do Sul. Contém 140 gêneros com, aproximadamente, 5800 espécies catalogadas (FRAUCHES et al., 2016). No Brasil, são encontradas cerca de 1034 espécies, entre 23 gêneros, sendo que 797 das espécies são endêmicas (SOBRAL et al., 2020). O gênero *Eugenia*, grande representante desta família, apresenta importante valor econômico para ser explorado devido à numerosa variedade de espécies que o compõe. Possui como característica o uso diversificado, podendo ser empregada na fabricação de fármacos, madeira,

comercialização dos frutos e utilização no paisagismo (QUEIROZ et al., 2015). No Brasil, encontram-se cerca de 388 espécies pertencentes ao gênero (SOBRAL, et al., 2020).

A cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) é uma frutífera arbórea decídua, de porte alto, nativa do sudeste e do sul brasileiro, de ocorrência nos biomas Cerrado e Mata Atlântica, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, onde é encontrada em pomares domésticos, pequenas propriedades rurais e, espontaneamente, na mata (CELLI et al., 2011; GOLLE et al., 2017). Além do Brasil, a cerejeira-do-Rio-Grande compõe a flora de outros países da América do Sul, a exemplo da Argentina e do Paraguai (LATTUADA et al., 2010).

Embora apresente um grande potencial para exploração econômica, o cultivo comercial da cerejeira-do-Rio-Grande ainda é escasso. O formato da copa desta espécie a torna um atrativo para o uso ornamental e a sua utilização para recuperação de áreas degradadas é considerada adequada. Muito apreciado no consumo *in natura*, os frutos da cerejeira-do-Rio-Grande podem ser processados para fabricação de doces e geleias. Essa espécie também é utilizada na medicina popular para problemas como reumatismo e diarreia, pelo consumo do chá de suas folhas. (GOLLE et al., 2012; HOSSEL et al., 2017). Estudos recentes mostram o grande potencial dos frutos da cerejeira-do-Rio-Grande como fonte de antioxidantes, trazendo benefícios à saúde humana (MARIN et al., 2008; INFANTE et al., 2016; NICÁCIO et al., 2017).

A multiplicação da espécie se dá, principalmente, por via seminal. Entretanto, por apresentar baixa densidade de ocorrência, a obtenção de sementes visando produção de pomares comerciais é dificultada. As sementes de cerejeira são classificadas como recalcitrantes não permitindo dessecação e armazenamento por longos períodos (SILVA et al., 2005; GOLLE et al., 2013; MOROZESK et al., 2014).

Para a espécie *Eugenia involucrata*, estudos visando o aprimoramento dos métodos convencionais de multiplicação são ainda escassos. Mesmo com adição do regulador vegetal (AIB), estacas desta espécie apresentaram baixa porcentagem de enraizamento (INOUE; PUTTON, 2007). O mesmo foi observado na enxertia por garfagem em fenda cheia, obtendo-se 15% de sobrevivência quando se realizou enxertia sobre a mesma espécie (LATTUADA et al., 2010). O método da alporquia em cerejeira-do-Rio-Grande também se mostrou ineficiente, pois, apenas 1,86% sobreviveram ao transplântio (HOSSEL et al., 2017).

Como alternativa aos métodos convencionais de multiplicação, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vem sendo estudadas em diversas espécies, incluindo aquelas nativas do país (DIAS et al., 2012; SOUZA et al., 2006). Essas ferramentas da biotecnologia possibilitam o cultivo de células, tecidos e órgãos isolados de uma planta matriz, em meio de cultura, em

condições controladas e assépticas, baseando-se na totipotência celular, respondendo a estímulos e a fatores, tais como reguladores vegetais em diversas concentrações, meios de cultura, tipos de explante, e o próprio genótipo (GEORGE et al., 2008; ZIMMERMANN, 2010).

Embora escassos, alguns trabalhos a fim de analisar o comportamento da espécie *Eugenia involucrata* DC. *in vitro* são encontrados na literatura. As contribuições dos autores são diversas, variando desde comparações de melhores segmentos a serem utilizados na multiplicação até a respostas dos explantes, nodais e foliares, aos reguladores de crescimento adicionados e efeitos de diferentes meios de cultura utilizados (GOLLE et al., 2020a; GOLLE et al., 2020b; GOLLE et al., 2017; GOLLE; REINIGER, 2013a; GOLLE et al., 2013b; GOLLE et al., 2012). De qualquer forma, ainda não foram estabelecidos protocolos eficientes visando o cultivo *in vitro* desta espécie.

Diante o exposto, buscou-se, nesse trabalho, avaliar as respostas morfogênicas de explantes nodais herbáceos e explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande a diferentes componentes do meio de cultura, a fim de desenvolver um protocolo de multiplicação e regeneração *in vitro* da espécie visando contribuir para trabalhos futuros de clonagem de genótipos selecionados.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção e manutenção do material vegetal**

Mudas de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.), com cerca de dois anos de idade, foram obtidas de um viveiro comercial no município de Limeira-SP, e transferidas para vasos de 30 L contendo substrato comercial a base de casca de pinus, e mantidas em estufa telada do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, SP. O manejo das plantas foi realizado por irrigações periódicas, podas, e fertirrigações semanais, alternando-se entre 0,8 g L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio (CaNO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e 0,5 g L<sup>-1</sup> de fertilizante comercial (YaraTera<sup>TM</sup> Kristalon) (17-6-18 + 2MgO + micronutrientes). As matrizes utilizadas como doadoras de explantes nos experimentos foram tratadas previamente com aplicações semanais de bactericida Kasumin® (casugamicina) (3 ml L<sup>-1</sup>) e aplicações quinzenais de fungicida Nativo® (tebuconazol + trifloxistrobina) (0,2 ml L<sup>-1</sup> do produto comercial).

## **Desinfestação de explantes foliares e nodais herbáceos de cerejeira-do-Rio-Grande**

Para a realização dos experimentos, ramos herbáceos, com aproximadamente um mês de idade, e com cerca de 6 segmentos nodais, foram coletados pela manhã, mantidos em sacos plásticos úmidos e levados para o Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP. Procedeu-se a lavagem dos ramos em água corrente utilizando-se detergente neutro, por cerca de 2 minutos. Em seguida, realizaram-se cinco enxagues por 50 segundos com água destilada para a retirada total do detergente.

Para a assepsia dos explantes nodais, foram avaliadas duas épocas de coleta dos ramos, verão e outono, além de diferentes composições de soluções para assepsia. Após a lavagem previamente descrita, os ramos seguiram para o preparo da assepsia com as diferentes soluções. Para os segmentos nodais, foi descartada a parte apical do ramo e as folhas foram retiradas. Os segmentos foram imersos em álcool 70%, por 1 minuto, seguido de triplo enxágue com água destilada por 50 segundos. Em seguida, foram imersos em uma das seguintes soluções: hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% de cloro ativo; hipoclorito de cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 1,25% de cloro ativo; hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% de cloro ativo ou hipoclorito de cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 2,5% de cloro ativo. O tempo de imersão foi de 15 minutos em agitação com a adição de 3 gotas de detergente neutro (Tween 20<sup>®</sup>). Em câmara de fluxo laminar, foram realizados cinco enxágues com água destilada autoclavada por 50 segundos, para retirada dos produtos. Com auxílio de um bisturi e de uma pinça, os explantes foram excisados retirando-se a parte superior e inferior exposta à solução desinfetante, sendo em seguida, introduzidos de forma aleatória no meio de cultura em tubos de ensaio vedados com tampa de plástico e plástico filme. Cada explante utilizado conteve um nó com duas gemas e cerca de 2,0 cm.

Os valores, expressos em médias, de temperatura máxima, mínima e média externa a estufa durante as épocas de coleta dos explantes nodais foram obtidos da base de dados do Posto Meteorológico “Professor Jesus Marden dos Santos” ESALQ-USP, pertencente ao Departamento de Engenharia de Biossistemas (Tabela 1).

**Tabela 1** – Temperatura máxima, mínima e média externa a estufa das épocas de coletas de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Época	Temperatura (C°)		
	Máxima	Mínima	Média
<b>Verão</b>	31,5	20,1	25,0
<b>Outono</b>	28,5	15,9	21,5

\*Médias calculadas a com base nos dados a partir da duração de cada época do ano. Verão (de 21 de dezembro de 2018 a 20 de março de 2019) Outono (21 de março de 2019 a 20 de junho de 2019).

No experimento de desinfestação de explantes foliares, as folhas da porção mediana dos ramos herbáceos, com cerca de um mês de idade, foram retiradas, imersas em álcool 70% por um minuto, sofreram enxágue com água destilada e, em seguida, foram imersas em uma das soluções a seguir: hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,75% de cloro ativo; hipoclorito cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 0,75% de cloro ativo; hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% de cloro ativo ou hipoclorito de cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 1,25% de cloro ativo. O tempo de imersão foi de 15 minutos em agitação adicionando-se 3 gotas de detergente neutro (Tween 20<sup>®</sup>). Em câmara de fluxo laminar, foram realizados cinco enxágues por 50 segundos com água destilada autoclavada, para retirada dos produtos. Utilizou-se um cortador cilíndrico metálico de 0,8 cm de diâmetro para confecção dos explantes que seguiram para introdução em meio de cultura em placas de Petri (100 x 15 mm) descartáveis vedadas com plástico filme.

O meio de cultura utilizado para realização dos experimentos, em ambos os tipos de explantes, foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) completo, suplementado de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich), para melhor visualização das contaminações, e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C. As unidades experimentais referentes à desinfestação de explantes nodais foram armazenadas em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e a 25°C, enquanto que os de desinfestação de explantes foliares foram colocados em BOD com 24 horas na ausência de luz, a 26°C±1, para condução do experimento.

Aos 40 dias de cultivo, as variáveis porcentagem de contaminação geral (%CG), contaminação bacteriana (%CB), contaminação fúngica (%CF), sobrevivência (%SOB) e oxidação foram avaliadas. Foram distribuídas notas para a avaliação da oxidação dos explantes, sendo elas 0 (explante sem oxidação); 1 (explante com 25% de oxidação); 2 (explante com 50% de oxidação); 3 (explante com 75% de oxidação) e 4 (explante com 100% de oxidação) (Figura 1).



**Figura 1** – Escala de notas de oxidação dos explantes nodais herbáceos e foliares de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) (0 quando não apresentava oxidação; 1 quando apresentava 25% de oxidação; 2 quando apresentava 50% de oxidação; 3 quando apresentava 75% de oxidação e 4 quando apresentava 100% de oxidação). Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

O delineamento utilizado no experimento de assepsia de segmentos nodais foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x4 (época de coleta x solução para assepsia) constituído de 8 tratamentos, 5 repetições e 6 tubos por repetição, totalizando 240 explantes. O trabalho de desinfestação de segmentos foliares constituiu-se de 4 tratamentos, 5 repetições de 8 explantes por placa de Petri, totalizando 160 explantes.

#### **Concentrações de BAP e ANA na indução e desenvolvimento de brotações em explantes nodais de cerejeira-do-Rio-grande *in vitro***

Ramos herbáceos de cerejeira-do-Rio-Grande foram coletados no período da manhã, levados ao laboratório, onde efetuou-se a lavagem em água corrente com detergente neutro seguido de enxague para retirada do detergente. As folhas dos ramos foram retiradas e os segmentos nodais seguiram para o processo de assepsia em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Após triplo enxague utilizando-se água destilada por 50 segundos, os segmentos foram imersos em solução desinfetante de 1,25% de NaClO (v/v) por 15 minutos em agitação com a adição de 3 gotas de detergente neutro (Tween 20®).

O meio de cultura utilizado no experimento foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em sua concentração total de sais acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar. Foram adicionados os reguladores citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA), em diferentes concentrações, conforme os tratamentos: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T2 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0

mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T5 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T6 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T7 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T8 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C e uma atmosfera, por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, após cinco enxágues com água destilada autoclavada por 50 segundos, os segmentos nodais foram excisados com auxílio de um bisturi, com cerca de 1,5 cm e introduzidos aleatoriamente nos tubos de ensaio (25 x 150 mm). Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e 25°C.

Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as variáveis porcentagem de sobrevivência do explante (%SOB), comprimento das brotações (CPB), porcentagem de gemas brotadas (%GB), número de brotações por explante (NBPE); número de brotações adventícias por explante (NBAPE) e oxidação (notas de 0 a 4).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x4 (presença e ausência de ANA x concentrações de BAP), com 8 tratamentos, 4 repetições, e 5 tubos por repetição, totalizando 160 tubos.

#### **Diferentes meios de cultura na indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio Grande *in vitro***

Segmentos nodais foram coletados e desinfestados utilizando-se 1,25% de NaClO por 15 minutos, realizando cinco enxágues por 50 segundos com água destilada autoclavada. Em seguida, foram introduzidos em tubos de ensaio (25 x 150 mm), segundo os tratamentos (meios de cultura) descritos a seguir (Tabela 2).

**Tabela 2** - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados no experimento de indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.). T1 (MS), T2 (½MS), T3 (¼MS), T4 (WPM), T5 (½WPM), T6 (¼WPM), T7 (JADS), T8 (SP Modificado) e T9 (SP).

Meio de cultura	MS	½ MS	¼MS	WPM	½WPM	¼WPM	JADS	SP Mod	SP
<b>Componentes</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
<b>Macronutrientes</b>									
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	220	110	96	48	24	-	220	220
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	556	278	139	1181	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	42,5	170	85	42,5	408	85	85
KNO <sub>3</sub>	1900	950	475	-	-	-	809	950	950
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	990	495	247,5	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185	92,5	370	185	92,5	739,5	185	185
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	412,5	400	200	100	324	825	825
<b>Micronutrientes</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,00625	-	-	-	-	0,0125	0,0125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,00625	0,25	0,125	0,0625	1,25	0,0125	0,0125
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,1	1,55	6,2	3,1	1,55	3,1	3,1	3,1
KI	0,83	0,415	0,2075	-	-	-	-	0,415	0,415
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	11,15	5,575	22,3	11,15	5,575	12,8	11,15	11,15
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,125	0,0625	0,25	0,125	0,0625	0,15	0,125	0,125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	4,3	2,15	8,6	4,3	2,15	4,3	4,3	4,3
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8	13,9	6,95	27,8	13,9	6,95	55,6	6,95	6,95
NaEDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	18,65	9,325	37,3	18,65	9,325	74,5	9,325	9,325
<b>Orgânicos</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
Ácido nicotínico	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	3	3
Glicina	2	1	0,5	2	1	0,5	-	-	-
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100	100	100	50
Piridoxina HCl	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	3	3
Tiamina HCl	0,1	0,05	0,025	1	0,5	0,25	5	3	3
Pantotenato de Ca <sup>+2</sup>	-	-	-	-	-	-	2,4	3	3
L- Glutamina	-	-	-	-	-	-	146	146	146
L- Císteina	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-
L- Arginina	-	-	-	-	-	-	7	-	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	10000

MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), JADS (CORREIA et al., 1995), SP (CID et al., 1999).

Os meios de cultura foram suplementados com 6g L<sup>-1</sup> de ágar e autoclavados a 120°C e uma atmosfera por 20 minutos. Após introdução dos explantes *in vitro*, os tubos de ensaio foram colocados em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e 25°C até o momento da avaliação. Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as porcentagens de

sobrevivência do explante (%SOB), comprimento das brotações (CPB), número de brotações por explante (NBPE), porcentagem de gemas brotadas (%GB), número de folhas por brotação (NFPB), número médio de folhas senescentes por brotação (NFS) e oxidação (notas de 0 a 4). Logo após as avaliações, as brotações foram excisadas e subcultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo o mesmo meio inicial. Trinta dias após o início do cultivo, foram avaliadas as variáveis CPB; NFPB; NFS. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído por 9 tratamentos e 6 repetições composto por 6 explantes cada, totalizando 324 explantes na realização do experimento.

### **Posição do disco foliar e adição de reguladores no cultivo *in vitro* de explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande**

Folhas da porção mediana de ramos herbáceos foram coletados para realização dos experimentos, as quais foram lavadas em água corrente com detergente neutro e enxaguadas com água destilada para remoção do detergente. As folhas doadoras de explantes foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de enxágue em água destilada e desinfestadas com 1,25% de NaClO com adição de 3 gotas de Tween 20<sup>®</sup> em agitação por 15 minutos. Logo após, procederam-se, em câmara de fluxo laminar, cinco enxagues com água destilada autoclavada.

Foram realizados dois experimentos, no primeiro, os tratamentos constituíram-se da posição do disco foliar em relação ao meio de cultura e concentrações de BAP: T1 – Adaxial + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T2 – Adaxial + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3 – Adaxial + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T4 – Adaxial + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T5 – Abaxial + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T6 – Abaxial + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7 – Abaxial + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T8 – Abaxial + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. No segundo experimento foram testadas as diferentes concentrações de BAP e ANA, conforme o seguinte: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; T2 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; T3 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; T4 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA; T5 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA; T6 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA; T7 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T8 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T9 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA.

Em ambos os experimentos, foram utilizados o meio de cultura MS completo suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Utilizou-se um cortador cilíndrico metálico de 0,8 cm de diâmetro para confecção dos explantes, que seguiram para introdução em meio de cultura em placas de Petri (100 x 15 mm) descartáveis vedadas com plástico filme e armazenados em BOD com 24 horas na ausência de luz a 26°C±1 para condução dos

experimentos. Aos 20 dias foi realizado a troca do meio de cultura pelo mesmo inicial. Quarenta dias após o início dos experimentos, registrou-se a porcentagem de explantes responsivos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo o experimento de posição do disco foliar em relação ao meio de cultura e concentrações de BAP composto por 8 tratamentos constituído de 5 repetições contendo 8 explantes cada repetição, totalizando 320 discos foliares. Já, o experimento de diferentes concentrações de BAP e ANA, foi constituído de 9 tratamentos com 5 repetições de 8 explante cada repetição, totalizando 360 discos foliares.

### Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a transformação por  $\arcsen\sqrt{p}$  e  $\sqrt{x+1}$  quando necessários e as médias submetidas a teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade pelo software SAS<sup>®</sup> v.9.4.

## Resultados e Discussão

### Desinfestação de explantes foliares e nodais herbáceos de cerejeira-do-Rio-Grande

Não foram observadas diferenças significativas entre as variáveis analisadas no experimento das diferentes épocas de coleta e soluções de assepsia utilizadas (Tabela 3).

**Tabela 3** – Contaminação geral (%); contaminação fúngica (%); contaminação bacteriana (%); sobrevivência e oxidação de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro* em função da época de coleta e soluções para assepsia. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Assepsia/ Época	Cont. Geral		Cont. Fúngica		Cont. Bacteriana		Sobrevivência		Oxidação	
	Verão	Outono	Verão	Outono	Verão	Outono	Verão	Outono	Verão	Outono
1,25 HC	73	47	30	10	63	40	20	50	3,2	2,3
1,25 HS	63	33	30	10	40	23	7	67	3,3	2,4
2,5 HC	73	50	20	17	67	37	13	50	2,5	2,5
2,5 HS	53	30	23	10	47	20	30	70	2,9	2,4
<b>Média</b>	53		19		42		38		2,7	
<b>CV (%)</b>	30,47		75,59		40,91		42,48		6,43	
<b>Valor p</b>	0,9776ns		0,7781ns		0,9188ns		0,2453ns		0,1144ns	

<sup>ns</sup> Não significativo. Data da coleta dos explantes nodais = 27/02/2019 (verão) e 17/05/2019 (outono). Legenda: Contaminação (Cont.), Hipoclorito de cálcio (HC) e Hipoclorito de sódio (HS).

No entanto, as variáveis estudadas foram afetadas pelas épocas de coleta, independentemente das soluções utilizadas no processo de assepsia (Tabela 4).

**Tabela 4** – Contaminação geral (%); contaminação fúngica (%); contaminação bacteriana (%); sobrevivência e oxidação de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro* em função da época de coleta. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

<b>Época</b>	<b>Cont. geral</b>	<b>Cont. Fúngica</b>	<b>Cont. Bacteriana</b>	<b>Sobrevivência</b>	<b>Oxidação</b>
<b>Verão</b>	66 b	26 b	54 b	17 b	3,0 b
<b>Outono</b>	40 a	12 a	30 a	59 a	2,4 a
<b>Média</b>	53	19	42	38	2,7
<b>CV (%)</b>	30,47	75,59	40,91	42,48	6,43
<b>Valor p</b>	0,0003*	0,0101*	0,0023*	<.0001*	0,0005*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade. Data da coleta dos explantes nodais = 27/02/2019 (verão) e 17/05/2019 (outono). Legenda: Contaminação (Cont.), Hipoclorito de cálcio (HC) e Hipoclorito de sódio (HS).

No estabelecimento *in vitro*, a contaminação por microrganismos endógenos e exógenos apresenta um dos maiores entraves nessa etapa da cultura de tecidos, pela facilidade desses organismos em crescer em condições *in vitro*, afetando o tecido dos explantes e inviabilizando as etapas seguintes (XAVIER et al., 2013; AL GHASHEEM et al., 2018). O sucesso na desinfestação dos explantes, e, posteriormente, no estabelecimento da cultura estudada, dependem da escolha da planta doadora, a qual deve estar em boas condições fitossanitárias, influenciando diretamente na desinfestação do explante em laboratório (PINHAL et al., 2011). No caso de espécies lenhosas, o processo é ainda mais dificultado, devido ao alto potencial de contaminação, mesmo quando as plantas matrizes são mantidas em estufas sob maior controle do ambiente, necessitando-se, portanto, de um protocolo de assepsia laboratorial eficiente para o cultivo *in vitro* (PASQUAL et al., 2012).

Existem diversos produtos aplicados para a desinfestação dos explantes na introdução *in vitro*. Entre eles, destacam-se os antibióticos, álcool etílico, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio (TAGHIZADEH et al., 2016; AL GHASHEEM et al., 2018; TAGHIZADEH; DASTJERDI, 2021). Golle et al. (2013), ao compararem métodos de assepsia de explantes herbáceos de cerejeira-do-Rio-Grande, afirmaram que, a melhor assepsia é obtida a partir de uma imersão prévia em bicloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ) a 0,05% (p/v) por 10 minutos, seguido do uso de hipoclorito de sódio ( $NaOCl$ ) a 1,5% (v/v). Entretanto, vale destacar que, no presente trabalho, foi possível a obtenção de explantes nodais livres de contaminação sem a utilização de bicloreto de mercúrio, o qual apresenta alta toxidez e perigos ao manuseador (MAHMOUD; AL-ANI, 2016).

A oxidação do tecido é outro problema encontrado durante o estabelecimento inicial de espécies no cultivo *in vitro*, especialmente, de espécies lenhosas. Esse fenômeno é decorrente da produção e exsudação de compostos fenólicos na região dos cortes realizados nos explantes ou injúrias no processo de desinfestação. Tais compostos sofrem ação de enzimas polifenases, acarretando em oxidação, a qual é responsável pela dificuldade no desenvolvimento do explante *in vitro*, levando ao escurecimento e, conseqüentemente, à morte do tecido (MARTINI; PAPAFOU, 2013; SINGH; PATEL, 2016; MEZIANI et al., 2016; TAGHIZADEH; DASTJERDI, 2021).

Entre tantas variáveis que afetam a intensidade da contaminação e a oxidação de explantes na multiplicação *in vitro*, a época de coleta, tanto em campo ou em estufa, apresenta grande impacto no processo de estabelecimento *in vitro*. Entretanto, estudos avaliando diferentes épocas de coleta e suas respostas quanto aos entraves iniciais da micropropagação são escassos para espécies nativas brasileiras, sendo relatados apenas alguns trabalhos com espécies lenhosas exóticas (SIWACH et al., 2011; MARTINI; PAPAFOU, 2013; SINGH; SINGH, 2018; KUMAR et al., 2019).

No presente estudo, os explantes coletados no verão apresentaram porcentagens de contaminação geral, fúngica e bacteriana superiores aos obtidos de explantes coletados no outono. Maiores médias também foram obtidas para oxidação dos explantes coletados no período do verão, diferindo da nota de oxidação de explantes obtidos no outono. A mesma resposta foi observada no referente à porcentagem de sobrevivência dos explantes introduzidos. A coleta dos explantes nodais no verão proporcionou apenas 17% de sobrevivência aos 40 dias, enquanto que, aqueles coletados no período do outono apresentaram sobrevivência ao redor de 60% (Tabela 4).

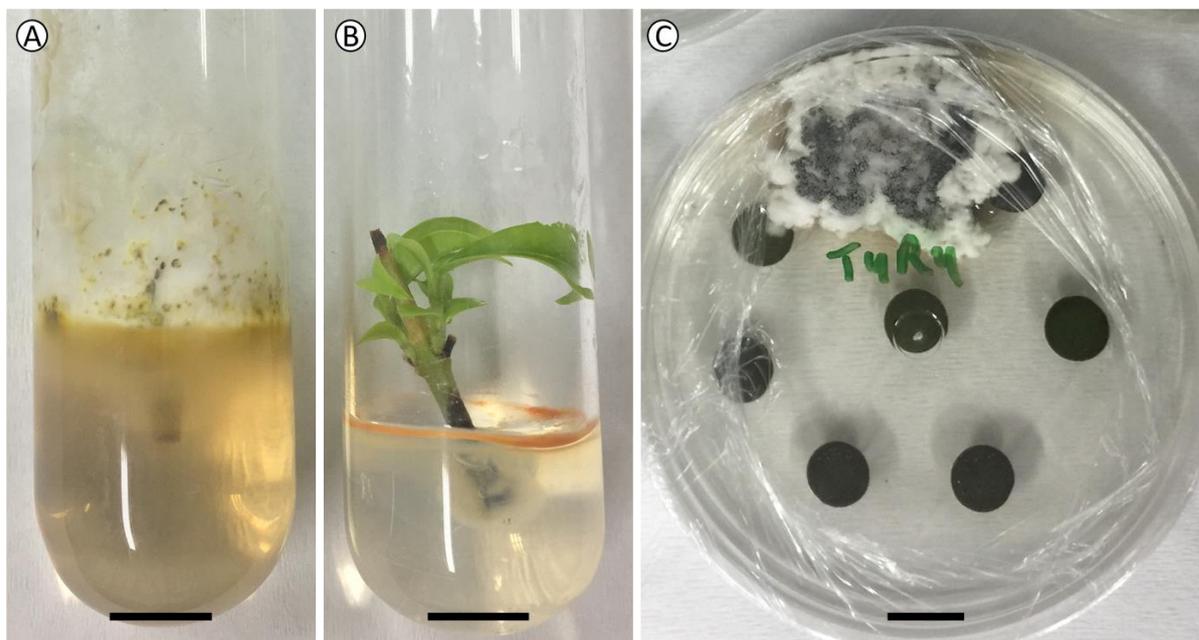
Segundo Rosa et al. (2006), a época de coleta de explantes nodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) afetou as porcentagens de contaminação fúngica, bacteriana e sobrevivência final dos explantes, sendo que, quando coletados no inverno, os explantes apresentaram melhores resultados. A baixa temperatura pode influenciar na flutuação na concentração de microrganismos contaminantes, o que pode variar de acordo com a época do ano, principalmente, os microrganismos endofíticos. No que se refere à oxidação, os mesmos autores relataram que, nas épocas de coleta com temperaturas mais baixas, a porcentagens de oxidação diminuíram em comparação com as coletas no verão. Este fato pode ser explicado pela menor atividade fisiológica da planta matriz e menor produção de compostos fenólicos, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Na assepsia de explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande, as soluções utilizadas não apresentaram diferenças entre si. Aos 40 dias de cultivo, foi possível obterem-se explantes viáveis por cultivo *in vitro* da espécie estudada com, aproximadamente, 27% de sobrevivência dos explantes derivados de discos foliares (Tabela 5). Estes resultados sugerem que, independentemente da concentração e do tipo de produto utilizado, é possível obterem-se explantes foliares assépticos. Golle (2010) recomenda o uso de 1,5% (v/v) de hipoclorito de sódio na assepsia de discos foliares de cerejeira-do-Rio-Grande, diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho, nos quais foi possível obterem-se discos foliares assépticos com menores concentrações das soluções de hipoclorito de sódio e de cálcio.

**Tabela 5** – Contaminação geral (%); contaminação fúngica (%); contaminação bacteriana (%); sobrevivência e oxidação de explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro* em função das diferentes soluções para assepsia. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

<u>Assepsia</u>	<u>Cont. Geral</u>	<u>Cont. Fúngica</u>	<u>Cont. Bacteriana</u>	<u>Sobrevivência</u>	<u>Oxidação</u>
<b>0,75 HC</b>	40	40	0	18	3,4
<b>0,75 HS</b>	11	10	1	28	3,3
<b>1,25 HC</b>	11	11	0	31	3,2
<b>1,25 HS</b>	3	1	1	31	3,4
<b>Média</b>	16	16	0,6	27	3,3
<b>CV (%)</b>	199,48	212,73	447,21	87,75	10,25
<b>Valor p</b>	0,1265ns	0,0941ns	0,578ns	0,6156ns	0,8996ns

<sup>ns</sup> Não significativo.



**Figura 2** – Contaminações de explantes nodais (A e B) e foliares (C) de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 1 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

### Concentrações de BAP e ANA na indução e desenvolvimento de brotações em explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande *in vitro*

A fase de indução das brotações *in vitro* é realizada pela adição de reguladores vegetais, buscando-se obter maior taxa de brotações e alongamento das mesmas. A citocinina 6-Benzilaminopurina é o principal regulador vegetal utilizado na micropropagação de espécies lenhosas, por sua ação de quebra de dormência apical e indução de brotações axilares, indução de gemas adventícias, além de atuar também no melhor desenvolvimento das brotações. Além disso, pode ser empregado em combinações com auxinas em baixas concentrações, favorecendo a qualidade dos brotos (RUBIN et al., 2007; STADEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; HARTMANN et al., 2014).

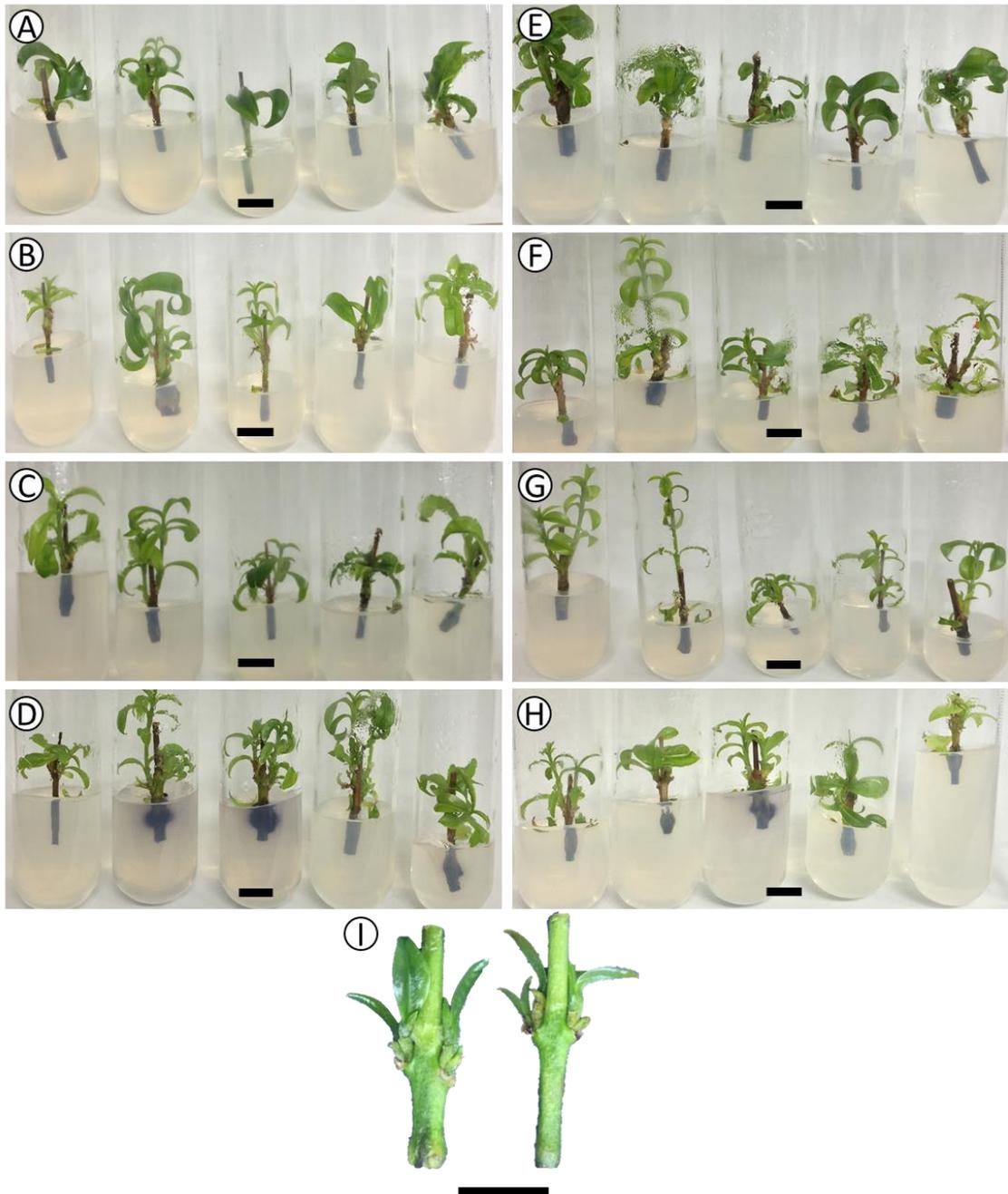
No presente estudo, as diferentes concentrações da citocinina BAP, com ou sem adição de ANA no meio de cultura, influenciaram o comprimento das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande (Tabela 6). Contudo, não foram observadas diferenças significativas para as demais variáveis analisadas, as quais, independentemente da presença dos reguladores vegetais no meio de cultura, apresentaram elevada média geral de sobrevivência e porcentagem de gemas brotadas, com presença média de, aproximadamente, duas brotações por explante introduzido (Tabela 6).

**Tabela 6** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB); comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB); número de brotações por explantes (NBPE) e oxidação de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

BAP/ ANA (mg L <sup>-1</sup> )	%SOB		CPB		%GB		NBPE		NBAPE		Oxidação	
	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
0,0	75	95	0,54 Bb	1,00 Aab	80	93	1,7	1,9	0,05	0,05	2,6	2,7
1,0	96	92	0,78 Bab	1,25 Aa	88	88	1,9	1,8	0,12	0,00	2,5	3,0
2,5	87	95	0,93 Aa	1,11 Aab	84	88	2,0	2,0	0,32	0,32	2,7	2,8
5,0	83	90	0,90 Aa	0,90 Ab	75	93	2,1	1,8	0,62	0,10	2,8	2,8
<b>Média</b>	89		0,92		85		1,9		0,2		2,7	
<b>CV (%)</b>	16,68		19,64		20,27		7,75		8,94		4,35	
<b>Valor p</b>	0,4621ns		0,0426*		0,9025ns		0,5621ns		0,1168ns		0,4766ns	

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si nas linhas e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si na coluna, pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

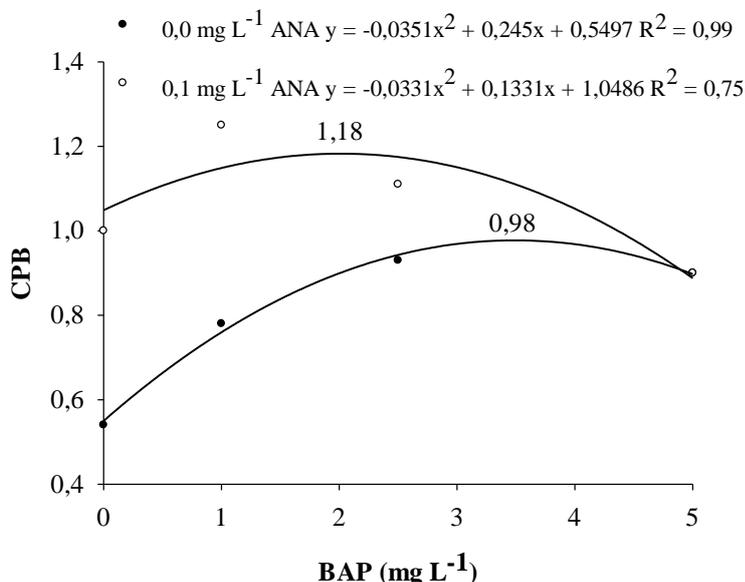
Embora tenham sido registrados casos de oxidação dos explantes, o desenvolvimento das brotações não foi significativamente afetado (Figura 3).



**Figura 3** – Desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) sobre as diferentes concentrações ( $\text{mg}^{-1}$ ) de BAP e presença ou ausência de ANA aos 40 dias de cultivo. T1 – 0,0 BAP + 0,0 ANA (A); T2 – 1,0 BAP + 0,0 ANA (B); T3 – 2,5 BAP + 0,0 ANA (C); T4 – 5,0 BAP + 0,0 ANA (D); T5 – 0,0 BAP + 0,1 ANA (E); T6 – 1,0 BAP + 0,1 ANA (F); T7 – 2,5 BAP + 0,1 ANA (G); T8 – 5,0 BAP + 0,1 ANA (H). Gemas adventícias desenvolvidas de explantes nodais de cerejeira (I); Barras = 1,0 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

A presença da auxina (ANA) no meio de cultura induziu maiores médias de comprimento das brotações, atingindo o ponto máximo quando adicionados  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, com média de comprimento das brotações de 1,18 cm. Na ausência de ANA no meio de cultura, as médias obtidas foram inferiores quando comparadas à presença do regulador vegetal para o tratamento de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, sendo que, quando adicionados  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  da citocinina, não

houve diferença em comparação à adição de ANA, atingindo o ponto máximo na concentração de 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP com comprimento médio de 0,98 cm por brotação (Figura 4).

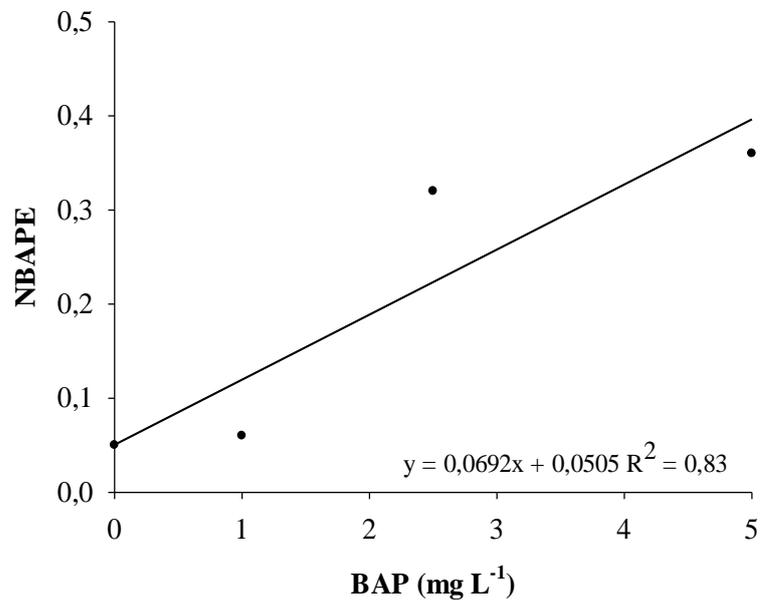


**Figura 4** – Comprimento das brotações (CPB) de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função das concentrações de BAP e adição de ANA. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Na multiplicação *in vitro* da espécie lenhosa *Rhus coriaria* L., a ação conjunta dos reguladores BAP e AIB (ácido indolbutírico) acarretou no maior comprimento das brotações em comparação àquelas cultivadas em meio sem reguladores, corroborando com os resultados obtidos para cerejeira-do-Rio-Grande no presente trabalho (AMIRI; MOHAMMADI, 2021). O sinergismo entre citocinina e auxina foi identificado por Golle (2010) em estudos envolvendo a adição de citocinina TDZ (thiadizuron) na presença da auxina ANA, os quais resultaram na mesma resposta registrada no presente trabalho. Aqueles autores relataram incremento de comprimento das brotações até a concentração de 4,36 mg L<sup>-1</sup>; entretanto, concentrações de TDZ maiores do que esta afetaram negativamente o comprimento das brotações. Resultados similares também foram relatados por Villa et al. (2007) na micropropagação do porta-enxerto de videira ‘P1103’ pela adição da citocinina BAP.

Explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande possuem capacidade de produção de gemas adventícias mesmo sem adição de reguladores vegetais (Figura 3I). Contudo, quando BAP é adicionado ao meio de cultura, o número de brotações adventícias por explante é afetado positivamente, se ajustando ao modelo linear crescente, apresentando média de 0,6 brotação por explante (Figura 5). O efeito da adição de citocinina na produção de brotações adventícias de cerejeira-do-Rio-Grande foi observado por Golle et al. (2017), alcançando a maior média de brotações quando utilizada a combinação de 7 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. No

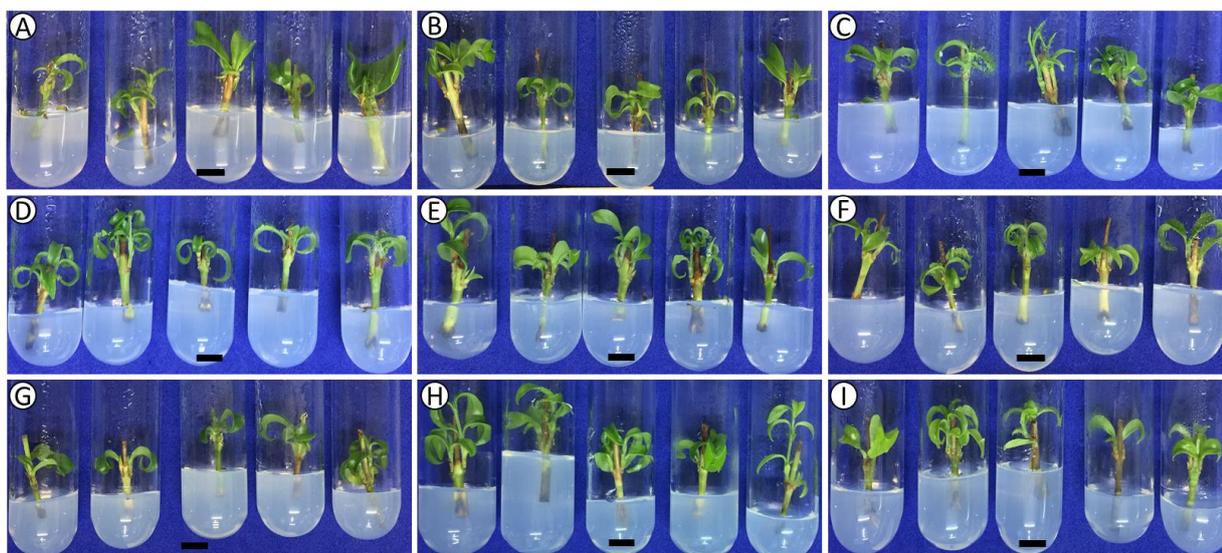
presente trabalho, apesar da capacidade de produção de brotações adventícias, as mesmas não se desenvolveram normalmente como as advindas das gemas nodais pré-formadas.



**Figura 5** – Número de brotações adventícias por explante (NBAPE) de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função das concentrações de BAP. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

### **Diferentes meios de cultura na indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio Grande *in vitro***

Os diferentes meios de cultura utilizados no estabelecimento *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande influenciaram no desenvolvimento das brotações obtidas aos 40 dias de cultivo, para a maioria das variáveis analisadas (Figura 6).



**Figura 6** – Desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) cultivados em diferentes meios de cultura aos 40 dias após introdução *in vitro*. T1 – MS completo (A); T2 – ½ MS (B); T3 – ¼ MS (C); T4 – WPM completo (D); T5 – ½ WPM (E); T6 – ¼ WPM (F); T7 – JADS (G); T8 – SP (H) e T9 – SP Mod (I). Barras = 1cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Valores médios de sobrevivência (%) e oxidação apresentaram resultados satisfatórios para a maioria dos meios de cultura utilizados, variando de 94% a 100% para sobrevivência, exceto quando cultivado em meio SP, no qual a porcentagem de sobrevivência foi de 78%, e nota de oxidação de 2,4 (Tabela 7).

**Tabela 7** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB); comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB); número de brotações por explante (NBPE); número de folhas por brotação (NFPB); número de folhas senescentes (NFS) e oxidação aos 40 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos diferentes meios de cultura. Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

Meios de Cultura	%SOB	CPB	%GB	NBPE	NFPB	NFS	Oxidação
MS	94 a	0,46	82 bc	1,6 bc	1,9	0,68 abc	1,4 a
1/2MS	100 a	0,52	99 a	2,0 a	2,2	0,85 abc	1,8 ab
1/4MS	100 a	0,45	100 a	2,1 a	2,1	0,53 ab	1,5 ab
WPM	100 a	0,53	96 a	1,9 ab	2,2	0,83 abc	1,9 ab
1/2WPM	100 a	0,48	97 a	2,0 a	2,0	1,23 abc	1,8 ab
1/4WPM	100 a	0,46	97 a	1,9 ab	2,2	1,21 abc	2,1 ab
JADS	94 a	0,55	94 ab	1,9 ab	2,0	1,58 c	1,7 ab
SP Modificado	100 a	0,55	100 a	2,0 a	2,8	0,38 a	1,8 ab
SP	78 b	0,39	75 c	1,5 c	2,2	1,33 bc	2,4 b
<b>Média</b>	96	0,49	93	1,9	2,2	0,96	1,8
<b>CV (%)</b>	7,30	22,28	7,43	2,88	8,34	13,12	8,27
<b>Valor p</b>	<.0001*	0,2046ns	<.0001*	<.0001*	0,2269ns	0,0023	0,0334*

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

No tocante à porcentagem de gemas brotadas (%GB) e número de brotações por explante (NBPE), as maiores médias obtidas para ambas as variáveis foram observadas quando utilizados os meios ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS e SP Modificado, variando de 94 a 100% para sobrevivência e médias de 1,9 a 2,1 de brotos obtidos por explante, enquanto que, os meios MS e SP apresentaram valores inferiores para ambas as variáveis (Tabela 7). Resultados similares são descritos por Golle et al (2012), nos quais os autores afirmaram que explantes de cerejeira-do-Rio-Grande se adaptaram melhor em meio com menor concentração dos sais, apresentando os melhores resultados para as variáveis citadas.

Todos os meios de cultura utilizados apresentaram folhas senescentes nas brotações aos 40 dias de cultivo *in vitro*. O menor valor médio de folhas senescentes foi obtido pela utilização do meio SP modificado, não diferindo da maioria dos meios de cultura, com exceção dos meios JADS e SP (Tabela 7). No entanto, não foi verificado efeito negativo no desenvolvimento das brotações *in vitro* pela senescência das folhas, tendo em vista que o número de folhas por brotação se manteve próximo em todos os meios de cultura utilizados.

As brotações obtidas e subcultivadas em meio de cultura com composição idêntica ao do cultivo inicial apresentaram diferenças significativas para as variáveis comprimento das brotações (CPB) e número de folhas senescentes (NFS) (Tabela 8).

**Tabela 8** – Comprimento das brotações (CPB); número de folhas por brotação (NFPB) e número de folhas senescentes (NFS) aos 30 dias após subcultivo das brotações de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) em função dos diferentes meios de cultura. Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

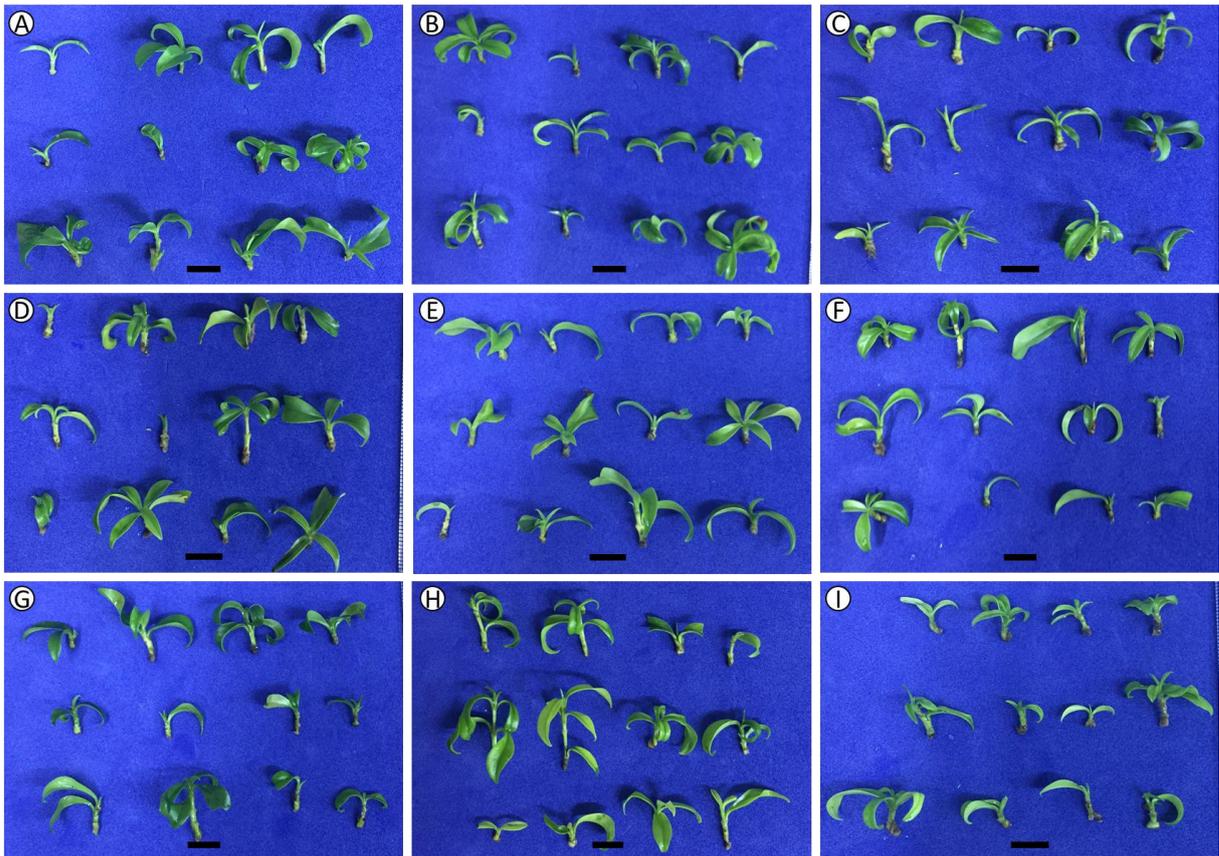
<b>Meios de Cultura</b>	<b>CPMB</b>	<b>NFPB</b>	<b>NFS</b>
<b>MS</b>	0,59 ab	3,6	1,6 abc
<b>1/2MS</b>	0,66 ab	3,4	1,9 bc
<b>1/4MS</b>	0,68 ab	3,8	1,1 abc
<b>WPM</b>	0,74 ab	3,2	2,0 c
<b>1/2WPM</b>	0,63 ab	3,1	0,8 ab
<b>1/4WPM</b>	0,61 ab	3,3	0,5 a
<b>JADS</b>	0,71 ab	3,9	0,8 ab
<b>SP Modificado</b>	0,94 a	3,7	1,4 abc
<b>SP</b>	0,53 b	3,2	1,8 bc
<b>Média</b>	0,68	3,5	1,3
<b>CV (%)</b>	29,14	8,70	15,39
<b>Valor p</b>	0,0488*	0,6173ns	0,0010*

<sup>ns</sup> Não significativo; \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

O meio de cultura SP Modificado proporcionou maior desenvolvimento das brotações, igualando-se aos dos demais meios de cultura, exceto para o meio de cultura SP, o qual apresentou o menor valor para comprimento (Tabela 8).

Na micropropagação de espécies lenhosas nativas brasileiras, resultados satisfatórios são relatados utilizando-se os meios MS, WPM, ½ MS, ½ WPM e ¼ MS (OLIVEIRA et al., 2013), assim como o meio JADS (SANTOS et al., 2020). Essas diversas formulações do meio de cultura são objeto de estudo no desenvolvimento de protocolos, sendo que, os efeitos encontrados variaram de espécie para espécie (OLIVEIRA et al., 2013).

O meio de cultura SP (CID et al., 1999), desenvolvido para a regeneração *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, apresenta em sua formulação a diminuição das concentrações de mio-inositol e sacarose, fontes de carboidratos no cultivo *in vitro*. Os resultados obtidos para cerejeira-do-Rio-Grande no presente trabalho foram inferiores a todos os meios de cultura analisados, indicando que o fornecimento de mio-inositol e sacarose em níveis inferiores ao comumente utilizados na micropropagação afetam negativamente o cultivo *in vitro* da espécie. Da mesma forma como relatado para cerejeira-do-Rio-Grande, Silva et al (2020) ressaltaram a importância da suplementação do meio de cultura com maiores concentrações de sacarose para melhor desenvolvimento das brotações na micropropagação de açoita-cavalo, espécie lenhosa nativa (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.).

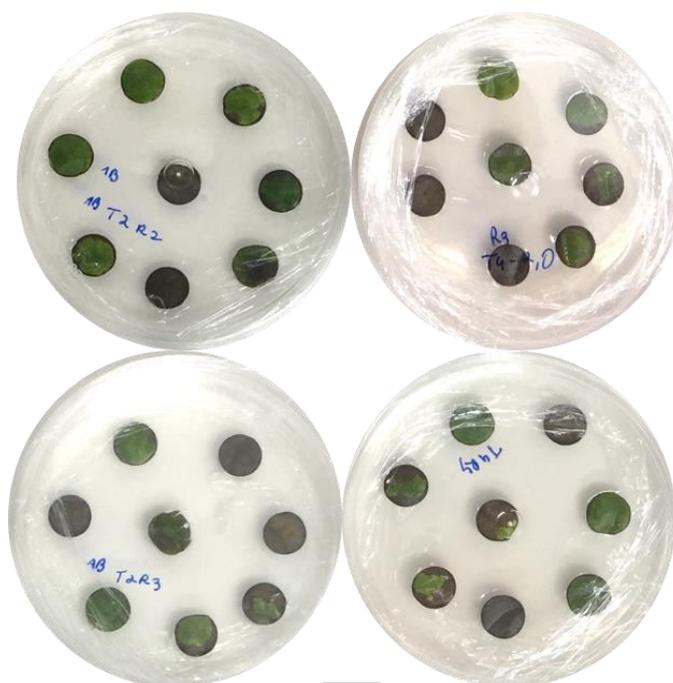


**Figura 7** – Desenvolvimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) sobre os diferentes meios de cultura aos 30 dias após subcultivo. T1 – MS completo (A); T2 – ½ MS (B); T3 – ¼ MS (C); T4 – WPM completo (D); T5 – ½ WPM (E); T6 – ¼ WPM (F) e T7 – JADS (G); T8 – SP (H) e T9 SP Mod (I). Barras = 1cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

### **Posição do disco foliar e adição de reguladores no cultivo *in vitro* de explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande**

A regeneração de plantas *in vitro* via embriogênese ou organogênese, direta ou indireta, vem sendo utilizada em suas mais diversas aplicações, e estudados por cientistas de diferentes áreas, os quais buscam desenvolver um protocolo que auxilie em outros temas de pesquisa, tais como melhoramento vegetal, conservação de germoplasma, entendimento anatômico das vias de regeneração, e multiplicação clonal em massa de espécies de interesse. Essas respostas morfogênicas são dependentes de diversos fatores, tais como tipo de explante utilizado, condições da planta doadora dos explantes, componentes do meio de cultura, idade da planta matriz, fatores do ambiente, capacidade morfogênica dos tecidos, e, principalmente, da adição dos reguladores auxina e citocinina, os quais desempenham o papel de indução para que as células se tornem competentes para a formação de embriões ou órgãos (HARTMANN et al., 2014; LIMA-BRITO et al., 2011; DAVEY, 2017; LEE; PIJUT, 2017; HESAMI; DANESHVAR, 2018).

Em ambos os experimentos realizados com a espécie *Eugenia involucrata*, após o período 40 dias de cultivo *in vitro*, não houve explantes responsivos quando submetidos a adição de BAP e ANA ao meio de cultura, indicando que a utilização dos reguladores vegetais nas concentrações testadas não apresentou capacidade de induzir a morfogênese *in vitro* de explantes foliares (Figura 8). Resultados semelhantes foram obtidos por Santos (2015), nos quais as diferentes concentrações de BA (6-benziladenina) e ANA no meio de cultura não foram capazes de induzir organogênese direta ou indireta em explantes foliares e internodais de araçá (*Psidium guineense* Swartz.).



**Figura 8** – Explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

A adição BAP na ausência e presença de ANA em meio MS induziu a formação de calos em explantes foliares de *Eugenia involucrata*, variando de 6,6 a 26,6% de discos responsivos, respectivamente. Ainda assim, os mesmos autores demonstraram, em outro experimento realizado, a formação de calos em 45,8% dos explantes foliares submetidos a 1,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 48,1% com a adição de 2,25 mg L<sup>-1</sup> de BAP sendo que, quando BAP foi adicionado em combinação com ANA, observaram-se as maiores porcentagens de formação de calos nos discos foliares, variando de 62,5 a 80,9% (GOLLE et al., 2020a; GOLLE et al., 2020b), diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho.

No entanto, não há relatos de proliferação de brotos advindos de explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande, necessitando-se da realização de novos trabalhos com a espécie.

Sugere-se que a divergência dos resultados de indução a morfogênese em cerejeira-do-Rio-Grande pode estar relacionada aos fatores externos e internos mencionados anteriormente e, principalmente, à variabilidade genética das plantas doadoras de explantes, uma vez que não existe até o momento genótipo elite selecionado, utilizando-se plantas originadas da propagação seminal.

### **Conclusões**

Explantes nodais de cerejeira-do-Rio-Grande coletados no outono apresentaram menores taxas de contaminação e de oxidação e maiores porcentagens de sobrevivência.

Não houve diferenças no tipo de solução para assepsia, sugerindo-se a utilização de hipoclorito de sódio com 1,25% de cloro ativo. Explantes foliares apresentaram baixa contaminação, sugerindo-se a utilização de hipoclorito de sódio a 0,75 % de cloro ativo na assepsia.

O comprimento das brotações foi afetado pela adição de BAP na ausência e presença de ANA, sendo indicado 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na presença de ANA para obtenção de maiores médias de comprimento. O aumento nas concentrações de BAP induziu a produção de brotações adventícias nos explantes nodais, as quais não se desenvolveram normalmente.

Os meios ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS e SP Modificado apresentaram bons resultados na indução de brotação e desenvolvimento de brotações de cerejeira-do-Rio-Grande.

Não foi registrada morfogênese em explantes foliares de cerejeira-do-Rio-Grande na com ou sem adição de BAP e ANA.

### **Referências**

SANTOS, M. A. C.; RÊGO, M. M.; QUEIRÓZ, M. A.; CAPRONI, D. T. R.; DIETRICH, O. H. S.; SANTOS, A. F.; ROCHA, D. I.; BATISTA, D. S.; OTONI, W. C. In vitro growth performance of *Psidium guajava* and *P. guineense* plantlets as affected by culture medium formulations. **Vegetos**, v. 33, p. 435-445, 2020.

SILVA, K. B.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; RABAIOLLI, S. M. S. Sucrose and substrates on the acclimatization of micropropagated *Luehea divaricata* plants. **Floresta Ambient.**, v. 27, n. 1, 2020.

AL GHASHEEM, N.; STANICA, F.; PETICILA, A. G.; VENAT, O. In vitro effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants. **Scientific Papers. Series B. Horticulture**, v. 62, 2018.

AMIRI, S.; MOHAMMADI, R. Establishment of an efficient in vitro propagation protocol for Sumac (*Rhus coriaria* L.) and confirmation of the genetic homogeneity. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 173, 2021.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit development stages. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 8, p. 2442-251, 2011.

CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 56, p. 17-23, 1999.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: MMA, p.934, 2011.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DAVEY, M. Regeneration of fruit and Ornamental Trees via Cell and Tissue Culture. In: THOMAS, B.; MURRAY, B. G.; MURPHY, D. J. **Encyclopedia of Applied Plant Science**. 2ed. Elsevier, p. 455-461, 2017.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesqui. Florest. Bras.**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

**Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 01 Dez. 2020.

FRAUCHES, N. S.; AMARAL, T. O.; LARGUEZA, C. B. D.; TEODORO, A. J. Brazilian Myrtaceae fruits: A review of anticancer properties. **Br. J. Pharm. Res.**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2016.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatórios e Balanços. Relatório anual de atividades 2019**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2020/09/Relat%C3%B3rio-Anual-SOS-Mata-Atl%C3%A2ntica-2019.pdf>>.

Acesso em 01 de Abr de 2021.

- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture 3rd edition**. 3rd ed. Springer, 2008. 479p.
- GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise na diversidade genética em acessos de Eugenia involucrata DC.** 2010. 159f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S. Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução a calogênese em cerejeira-do-mato. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1759-1762, 2013a.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; BELLÉ, R. A.; CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. **Cerne**, v. 19, p. 77-82, 2013b.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo do explante e do meio nutritivo. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; MUNIZ, M. F. B.; SILVA, K. B. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 41, n. 5, 2017.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciênc. Florest.**, v. 30, p. 898-906. 2020a.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; Fitorreguladores na calogênese e risogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesqui. Florest. Bras.**, v. 40, p. 1-9, 2020b.
- HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2014. 880p.
- HESAMI, M.; DANESHVAR, M. H. Indirect Organogenesis through Seedling-Derived Leaf Segments of *Ficus religiosa* – a Multipurpose Woody Medicinal Plant. **J. Crop Sci. Biotech**, v. 21, n. 2, p. 129-136, 2018.
- HOSSEL, C.; WAGNER JÚNIOR, A.; HOSSEL, J. S. A. O.; FABIANE, K. C.; CITADIN, I. ‘Cerejeira da mata’ and ‘guabijuzeiro’ propagation by air layering. **Comun. Sci.**, v. 8, n. 4, p. 581-586, 2017.

- INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.
- INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**. Curitiba, v. 37, n. 1, p. 55-61, 2007.
- KUMAR, K.; JS BRAR, P. K. A.; BHATIA, D.; KUMAR, A. Influence of explant collection period, antibrowning strategy and growth regulators composition on in vitro propagation of Bhagwa pomegranate. **Indian J. Hort.**, v. 76, n. 2, p. 273-278, 2019.
- LATTUADA, D. S.; SOUZA, P. V. D.; GONZATTO, M. P. Enxertia herbácea em *Myrtaceae* nativas do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1285-1288, 2010.
- LEE, J. H.; PIJUT, P. M. Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Fraxinas nigra*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 130, p. 335-343, 2017.
- LIMA-BRITO, A.; RESENDE, S. V.; LIMA, C. O. C.; ALVIM, B. M.; CARNEIRO, C. E.; SANTANA, J. R. F. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis*. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-510, 2011.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Comb. Proc. - Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MAHMOUD, S. N.; AL-ANI, N. K. Effects of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. **Int. J. Res. Stud. Biosci.**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 2016.
- MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; ZUANAZZI, J. Â. S.; HENRIQUES, A. T. Volatile components and antioxidant activity from some mystaceous fruits cultivated in southern Brazil. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 27, n. 2, p. 172-177, 2008.
- MARTINI, A. N.; PAPAFOITIOU, M. Season and explant origin affect phenolic content, browning of explants, and micropropagation of *Malosorbus Florentina* (Zucc.) Browicz. **HortScience**, v.48, n. 1, p. 102-107, 2013.
- MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; DUARTE, I. D.; ZANI, L. B.; CORTE, V. B. Longevidade de sementes nativas da Floresta Atlântica, **Natureza on line**, v. 12, n. 4, p. 185-194, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-493, 1962.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspot for conservation priorities, **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NICÁCIO, A. E.; ROTTA, E. M.; BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; KIMURA, E.; VISENTAINER, J. V.; MALDANER, L. Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from *Eugenia involucrata* DC. fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Anal. Methods**, v. 10, n. 8, p. 2718-2728, 2017.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesqui. Florest. Bras.**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 445-460, 2013.
- PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A. Tissue culture techniques for native amazonian fruit trees. In: LEVA, A.; RINALDI, L. (Org.). **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. 1ed. IntechOpen, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/52211>.
- PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- QUEIROZ, J. M. G.; SUZUKI, M. C. M.; MOTTA, A. P. R.; NOGUEIRA, J. M. R.; CARVALHO, E. M. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Rev. Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, pag. 73-159, 2015.
- ROSA, F. C.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. **Micropropagação de Erva-Mate: Efeito de Diferentes Épocas do Ano no Estabelecimento *in vitro* de Segmentos nodais**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. (Comunicado técnico n.163). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/313089/micropropagacao-de-erva-mate-efeito-de-diferentes-epocas-do-ano-no-estabelecimento-in-vitro-de-segmentos-nodais>> Acesso: 01 mar. 2021.
- RUBIN, S.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Rev. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 480-482, 2007.
- SANTOS, M. A. C. **Micropropagação de Psidium spp.**. 2015. 160f. Tese (Doutorado em Agronomia), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.
- SILVA, S. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Rev. Bras. Sementes**, v. 27, n. 1, p. 86-92, 2005.
- SINGH, K. K.; SINGH, S. P. A review: micropropagation of guava (*Psidium Spp*). **Horticult. Int. J.**, v. 2, n. 6, p. 462-467, 2018.

- SINGH, P.; PATEL, R. M. Factors affecting in vitro degree of browning and culture establishment of pomegranate. **Afr. J. Plant Sci.**, v. 10, n. 2, p. 43-49, 2016.
- SIWACH, P.; GILL, A. R.; KUMARI, K. Effect of season, explants, growth regulators and sugar level on induction and long-term maintenance of callus cultures of *Ficus religiosa* L. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 10, n. 24, p. 4879-4886, 2011.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; MAZINE, M.; LUCAS, E. **Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em 08 de Out de 2020.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10338>>. Acesso em 09 de Out de 2020.
- SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido á planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro “Irapuã”. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1920-1922, 2006.
- STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture**. 3ed., Springer, 2008, p. 205-226.
- TAGHIZADEH, M.; DASTJERDI, M. G. Inhibition of Browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L.. **Ornam. Hortic.**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 68-77, 2021.
- TAGHIZADEH, M.; SOLGI, M.; SHAHRJERDI, I. Essential oil as an alternative to chemical antimicrobial agent for the culture of strawberry in vitro. **J. Hortic. Forest. Biotechnol.**, v. 20, n. 4, p. 99-106, 2016.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; TEODORO, G. S. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação in vitro de duas espécies frutíferas de clima temperado. **Ceres**, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura Clonal: princípios e Técnicas**. Ed. UFV, Viçosa, 2013, 279p.
- ZIMMERMANN, M. J. **Embriogênese somática**. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2010, v. 1, p. 67-86.

### **CAPÍTULO 3: CULTIVO *IN VITRO* DE CAMBUCIZEIRO (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) A PARTIR DE EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS MANTIDAS EM ESTUFA**

#### **Resumo**

O cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) é uma espécie frutífera nativa da Mata Atlântica com elevado potencial para a produção de frutos para consumo *in natura* e para industrialização. A produção de mudas desta espécie é realizada por sementes, e trabalhos visando a multiplicação assexuada são inexistentes na literatura. Portanto, buscou-se nesse trabalho avaliar a resposta *in vitro* de explantes nodais e foliares de cambucizeiro. Os explantes foram coletados de plantas de dois anos de idade mantidas em estufa telada. Para explantes nodais, foram realizados experimentos para avaliação de soluções de assepsia (NaClO e Ca(ClO<sub>2</sub>) a 2,5% e 1,25% de cloro ativo) e épocas de coleta do explantes (verão e outono). Para o controle de abscisão e oxidação dos explantes, foram realizados ensaios avaliando o uso de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>), renovação do meio de cultura aos 20 dias de cultivo e o uso de antioxidantes no controle da oxidação fenólica (testemunha; 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado; 1 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) e 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico). A fim de avaliar efeitos dos componentes do meio de cultura, foram realizados experimentos de indução de brotação inicial pela combinação dos regulares 6-benzilaminapurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e diferentes meios de cultura (MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, SP Modificado e SP) na indução e desenvolvimento de brotação e no subcultivo das brotações. Em explantes foliares de cambucizeiro, foram avaliadas soluções de assepsia (NaClO e Ca(ClO<sub>2</sub>) a 0,75% e 1,25% de cloro ativo), o uso de antioxidantes no controle da oxidação fenólica (testemunha; 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado; 1 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) e 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico), o efeito da posição do explante foliar (adaxial e abaxial) combinado com BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) e a adição de reguladores BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,0; 0,01 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) na morfogênese de discos foliares. Explantes nodais coletados no outono apresentaram menor porcentagem de contaminação e oxidação, e o uso do hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo é indicado, pela eficiência e economia de produto. As novas brotações induzidas *in vitro* foram afetadas por abscisão precoce, sendo necessária a suplementação de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata para maior controle. A renovação do meio de cultura aos 20 dias contribuiu para a diminuição da abscisão e oxidação dos explantes. A citocinina BAP na concentração 2,5 mg L<sup>-1</sup> na ausência de ANA promoveu obtenção de maior número de brotações. Os meios de cultura MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, JADS e SP Modificado na apresentaram as maiores médias referentes à indução e ao desenvolvimento de brotações. O subcultivo das brotações foi prejudicado pelo amarelecimento e senescência, apresentando, em média, 17% de sobrevivência. A melhor assepsia de explantes foliares foi obtida quando utilizado o hipoclorito de sódio, com 0,75% de cloro ativo. No controle da oxidação, 1 g L<sup>-1</sup> de PVP foi mais eficiente. Não foram identificadas respostas morfogênicas em discos foliares de cambucizeiro.

Palavras-chave: Meio de cultura; Micropropagação; Myrtaceae; Reguladores vegetais

#### **Abstract**

The cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) is a native fruit species from the Atlantic Forest that has great potential for the fresh fruit market and fruit processing. The propagation of this species is carried out by seeds and scientific works exploring asexual

multiplication have not been reported in the literature. Therefore, this study aimed to evaluate the *in vitro* response of nodal and leaf explants of cambucizeiro. The explants were collected from two-year-old plants kept in a greenhouse. Regarding nodal explants, there were conducted experiments to evaluate asepsis solutions (NaClO and Ca(ClO<sub>2</sub>) with 2.5% and 1.25% active chloride) and the collecting season (summer and autumn). To control the explant abscission and oxidation, there were performed experiments to evaluate the use of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) (0.0, 2.0, 4.0, and 6.0 mg L<sup>-1</sup>), the explant transfer to a fresh culture medium after 20 days of cultivation, and the use of antioxidants to control phenolic oxidation (without antioxidant; 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal; 1 g L<sup>-1</sup> of polyvinylpyrrolidone (PVP) and 200 mg L<sup>-1</sup> of ascorbic acid). To evaluate the effects of culture medium components, there were conducted experiments to induce initial shoots combining the growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP) (0.0, 1.0, 2.5, and 5.0 mg L<sup>-1</sup>) and naphthalene acetic acid (ANA) (0.0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>) and culture media (MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, ¼ WPM, JADS, Modified SP, and SP) on the shoot induction and development and the shoots subculture. For the leaf explants of cambucizeiro, there were evaluated asepsis solutions (NaClO and Ca(ClO<sub>2</sub>) with 0.75% and 1.25% of active chloride), the use of antioxidants to control the phenolic oxidation (without antioxidant; 2 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal; 1 g L<sup>-1</sup> of polyvinylpyrrolidone (PVP) and 200 mg L<sup>-1</sup> of ascorbic acid), the effects of leaf explant position (adaxial and abaxial) combined with BAP (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) and the addition of BAP (0.0, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0.0, 0.01 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>) on the morphogenesis of leaf discs. Nodal explants collected in autumn had the lowest contamination and oxidation rate, the use of sodium hypochlorite with 1.25% of active chloride was indicated due to efficiency and lowest product waste. The new *in vitro* shoots induced were affected by premature abscission, and the addition of 2.0 mg L<sup>-1</sup> of silver nitrate was necessary. The explant transfer to a fresh culture medium contributed to lower explant abscission and oxidation. The cytokinin BAP added at the concentration of 2.5 mg L<sup>-1</sup> without ANA promoted the greatest shoot induction. The culture media MS, ½ MS, ¼ MS, WPM, ½ WPM, JADS e SP Modified on the shoot induction and development presented the best results. The shoot subculture was negatively affected by yellowing and senescence, with 17% of survival. The best asepsis solution for leaf explant was with the use of sodium hypochlorite, with 0.75% of active chloride. To control oxidation, 1g L<sup>-1</sup> of PVP was efficient. There was no morphogenesis responses in leaf discs of cambucizeiro.

Keywords: Culture medium; Growth regulators; Micropropagation; Myrtaceae

## Introdução

A família Myrtaceae é considerada uma das mais importantes da flora brasileira, e se faz presente na Mata Atlântica, podendo também serem encontradas espécies no sudeste asiático, australiano e na América do Sul. Contém 140 gêneros, com aproximadamente 5800 espécies catalogadas (FRAUCHES et al., 2016). No Brasil, são encontradas cerca de 1034 espécies, entre 23 gêneros, sendo que 797 das espécies são endêmicas (SOBRAL et al., 2018).

A utilização de fruteiras nativas é desejável na busca de diversificação da produção na agricultura familiar, podendo ser empregada como fonte de recursos, geradora de emprego e renda, a fim de melhorar a qualidade de vida das comunidades. Dependendo do mercado, a

produção em larga escala também é uma opção plausível, assim como a exploração pelo ecoturismo e a agroindústria (VIEIRA et al., 2016).

O gênero *Campomanesia*, pertence à família Myrtaceae, possui 42 espécies catalogadas, sendo que 32 são endêmicas do Brasil, com ocorrência de espécies nas quatro macrorregiões brasileiras, além da distribuição pelo nordeste da Argentina, no Peru e nos Andes (LANDRUM, 1982; FLORA DO BRASIL 2020, 2020).

O cambucizeiro (*Campomanesia phaea*) é uma árvore semidecídua, de copa densa, que pode chegar a 9 metros de altura, possui tronco descamante e ramos finos pendentes; suas folhas são simples, subcoriáceas glabras e brilhantes; a floração se dá no período de agosto a novembro, são flores solitárias, axilares e bissexuais. A frutífera apresenta autoincompatibilidade, ou seja, depende de polinizadores para a produção dos frutos, caracterizando o sistema reprodutivo de fecundação cruzada (CORDEIRO et al., 2017).

Os frutos do cambucizeiro possuem formato semelhantes a discos voadores, amadurecendo de janeiro a fevereiro. Lisos e esverdeados, mesmo quando prontos para serem consumidos, os frutos contêm polpa de sabor ácido, porém agradável (LORENZI et al., 2015). O nome da frutífera é derivado da língua indígena tupi-guarani que foi nomeada em referência ao formato do fruto, semelhante a um pote de tomar água (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Nativa da Mata Atlântica, e de ocorrência natural nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, o cambucizeiro apresenta um grande potencial de industrialização. Os produtores da fruta realizam a comercialização da polpa ou de frutos inteiros, congelados, destinados a restaurantes de grandes cidades. A produção artesanal de produtos derivados da fruta também é presente nas regiões produtoras, como geleias, licores, mousses, sorvetes entre outros (MALUF; PISCIOTTANO-EREIO, 2005; TOKAIRIN et al., 2018).

A fruta possui alto teor de ácido ascórbico, fenóis e flavonoides, importantes para a saúde humana. Contém um grande potencial antioxidante e sua utilização na dieta pode ajudar a diminuir o estresse oxidativo, além de apresentar um potencial inibidor de enzimas relacionadas com a incidência de diabetes mellitus tipo 2 (GONÇALVES et al., 2010; BIANCHINI et al., 2016; TOKAIRIN et al., 2018).

A multiplicação do cambucizeiro é realizada por meio de sementes, com coletas sendo feitas em frutos maduros, ainda na árvore, ou diretamente do chão. O índice de germinação é, geralmente, baixo, e o crescimento das plântulas é lento (LORENZI, 2015).

A espécie está ameaçada de extinção, necessitando de estudos agronômicos, os quais são incipientes (SILVA et al., 2012). Não foi possível encontrar estudos sobre a multiplicação

assexuada do cambucizeiro na literatura, o que indica que trabalhos visando a otimização das técnicas de multiplicação são necessários. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar as respostas morfogênicas de explantes nodais herbáceos e explantes foliares de cambucizeiro a diferentes componentes do meio de cultura, a fim de contribuir no desenvolvimento de protocolos de multiplicação e regeneração *in vitro* desta espécie.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção e manutenção do material vegetal**

Mudas de cambucizeiro, com cerca de dois anos de idade, foram obtidas de um viveiro comercial no município de Limeira-SP, e foram transferidas para vasos de 30 L contendo substrato comercial a base de casa de pinus e mantidas em estufa telada do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. O manejo foi realizado por regas, podas, e fertirrigações semanais, alternando-se entre 0,8 g L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio (CaNO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e 0,5 g L<sup>-1</sup> de YaraTera™ Kristalon (17-6-18 + 2MgO + micronutrientes). As matrizes utilizadas como doadoras de explantes nos experimentos foram tratadas previamente com aplicações semanais de bactericida Kasumin® (casugamicina) (3 ml L<sup>-1</sup>) e aplicações quinzenais de fungicida Nativo® (tebuconazol + trifloxistrobina) (0,2 ml L<sup>-1</sup> do produto comercial).

### **Desinfestação de explantes foliares e nodais herbáceos de cambucizeiro**

Para a realização dos experimentos, ramos herbáceos com cerca de 6 segmentos nodais, foram coletados pela manhã, mantidos em sacos plásticos úmidos e levados para o Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP. Procedeu-se a lavagem dos ramos em água corrente utilizando-se detergente neutro por cerca de 2 minutos. Em seguida, realizou-se o cinco enxagues com água destilada por 50 segundos até a retirada total do detergente.

Para a assepsia dos explantes nodais, foram avaliadas duas épocas de coleta dos ramos, verão e outono, e as diferentes soluções de assepsia. Após a lavagem previamente descrita, os ramos seguiram para o preparo da assepsia com as diferentes soluções. Para os segmentos nodais, foi descartada a parte apical do ramo e as folhas, retiradas. Os segmentos seguiram para imersão em álcool 70% por um período de 1 minuto seguida de triplo enxágue com água destilada por 50 segundos cada. A seguir, foram imersos em uma das seguintes soluções:

hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% de cloro ativo; hipoclorito de cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 1,25% de cloro ativo; hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% de cloro ativo e hipoclorito de cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 2,5% de cloro ativo, por 15 minutos em agitação adicionando-se 3 gotas de detergente neutro (Tween 20<sup>®</sup>). Em câmara de fluxo laminar, foram realizados cinco enxágues com água destilada autoclavada por 50 segundos, para retirada do produto. Com auxílio de um bisturi e de uma pinça, os explantes foram excisados retirando-se a parte superior e inferior exposta à solução desinfestante, sendo, em seguida, introduzidos de forma aleatória no meio de cultura em tubos de ensaio (25 x 150 mm) vedados com tampa de plástico e plástico filme. Cada explante utilizado apresentou um nó com duas gemas e cerca de 1,5 cm de comprimento.

Os valores, expressos em médias, de temperatura máxima, mínima e média externa a estufa durante as épocas de coleta dos explantes nodais foram obtidos da base de dados do Posto Meteorológico “Professor Jesus Marden dos Santos” ESALQ-USP, pertencente ao Departamento de Engenharia de Biosistemas (Tabela 1)

**Tabela 1** – Temperatura máxima, mínima e média externa a estufa das épocas de coletas de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum). Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Época	Temperatura (C°)		
	máxima	mínima	média
<b>Verão</b>	31,5	20,1	25,0
<b>Outono</b>	28,5	15,9	21,5

\*Médias calculadas a com base nos dados a partir da duração de cada época do ano. Verão (de 21 de dezembro de 2018 a 20 de março de 2019) Outono (21 de março de 2019 a 20 de junho de 2019).

No experimento de desinfestação de explantes foliares, as folhas da porção mediana dos ramos coletados foram retiradas, imersas em álcool 70% por um minuto, enxaguadas com água destilada e, em seguida, imersas em uma das soluções de hipoclorito citadas a seguir: hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,75% de cloro ativo; hipoclorito cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 0,75% de cloro ativo; hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,25% de cloro ativo e hipoclorito de cálcio (Ca(ClO<sub>2</sub>)) a 1,25% de cloro ativo, por 15 minutos em agitação adicionando-se 3 gotas de detergente neutro (Tween 20<sup>®</sup>). Em câmara de fluxo laminar, foram realizados cinco enxágues de 50 segundos com água destilada autoclavada, para retirada do produto. Utilizou-se um cortador cilíndrico metálico de 0,8 cm de diâmetro para confecção dos explantes os quais foram introduzidos em meio de cultura em placas de Petri (100 x 15 mm) descartáveis vedadas com plástico filme.

O meio de cultura utilizado para realização dos experimentos foi o MS completo suplementado de  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $2\text{g L}^{-1}$  de Phytigel™ (Sigma-Aldrich) para melhor visualização das contaminações e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a  $120^{\circ}\text{C}$  e uma atmosfera de pressão, por 20 minutos. As unidades experimentais referentes à desinfestação de explantes nodais foram armazenadas em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz ( $70\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) e  $25^{\circ}\text{C}$ , enquanto que os de desinfestação de explantes foliares foram colocados em BOD sob 24 horas na ausência de luz, a  $26^{\circ}\text{C}\pm 1$  para condução do experimento.

Aos 40 dias de cultivo dos explantes nodais e aos 20 dias de cultivo de explantes foliares, as variáveis porcentagem de contaminação geral (%CG), contaminação bacteriana (%CB), contaminação fúngica (%CF), sobrevivência (%SOB) e notas de oxidação foram avaliadas. Foram distribuídas notas para a avaliação da oxidação dos explantes, sendo elas 0 (explante sem oxidação); 1 (explante com 25% de oxidação); 2 (explante com 50% de oxidação); 3 (explante com 75% de oxidação) e 4 (explante com 100% de oxidação) (Figura 1).



**Figura 1** – Escala de notas de oxidação dos explantes nodais herbáceos e foliares de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) (0 sem oxidação; 1 com 25% de oxidação; 2 com 50% de oxidação; 3 com 75% de oxidação e 4 com 100% de oxidação). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2019.

O delineamento utilizado no experimento de assepsia de segmentos nodais foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial  $2\times 4$  (época de coleta  $\times$  solução de assepsia) constituído, portanto, de 8 tratamentos, 5 repetições e 6 tubos por repetição, totalizando 240 explantes. O trabalho de desinfestação de segmentos foliares constituiu-se de 4 tratamentos com 5 repetições de 8 explantes por placa de petri, totalizando 160 explantes.

### **Uso de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) no cultivo *in vitro* de explantes nodais de cambucizeiro**

Fora observado que o cultivo *in vitro* de explantes nodais de cambucizeiro é dificultado pela ocorrência de abscisão precoce das novas brotações. Em função deste conhecimento inicial, realizou-se o experimento com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a fim de minimizar o problema encontrado no estabelecimento dos explantes nodais *in vitro*.

Ramos herbáceos foram coletados e seguiram para o processo de desinfestação, e, em seguida foram introduzidos em câmara de fluxo laminar em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo as diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  seguindo os tratamentos: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup>; T2 – 2,0 mg L<sup>-1</sup>; T3 – 4,0 mg L<sup>-1</sup> e T4 – 6 mg L<sup>-1</sup>. Foi utilizado o meio MS completo suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 25°C.

Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as porcentagens de sobrevivência e oxidações dos explantes (notas de 0 – 4). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de 4 tratamentos com 5 repetições de 6 tubos por repetição, totalizando 120 explantes.

### **Troca do meio de cultura aos 20 dias de explantes nodais de cambucizeiro**

Em função das altas taxas de oxidação dos explantes nodais e da abscisão precoce de brotações de cambucizeiro, realizou-se este experimento a fim de avaliar os efeitos da renovação mais frequente do meio de cultura durante o processo de cultivo *in vitro* da espécie.

Explantes nodais de cambucizeiro foram coletados e seguiram para desinfestação pela imersão em álcool 70% por 1 minuto e 1,25% de NaClO por 15 minutos. O meio utilizado foi o MS completo suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, os tratamentos foram: T1 – sem troca de meio e T2 – troca do meio aos 20 dias de cultivo. Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 25°C. Aos 40 dias de cultivo foram analisadas as porcentagens de sobrevivência e oxidação dos explantes (notas de 0 - 4).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 2 tratamentos e 15 repetições de 6 tubos por repetição, totalizando 180 explantes utilizados no desenvolvimento do experimento.

### **Adição de antioxidantes no cultivo *in vitro* de explantes nodais e foliares de cambucizeiro**

Em ambos tipos de explantes utilizados, nodais e foliares, observou-se que o estabelecimento do cultivo *in vitro* da espécie é dificultada pelas altas taxas de oxidação fenólica. Por conta disso, foi necessária a realização deste experimento a fim de avaliar os efeitos da adição de antioxidantes no meio de cultura sobre a porcentagem de oxidação e sobrevivência dos explantes.

Ramos herbáceos de cambucizeiro foram coletados e seguiram para o processo de desinfestação, imersos em álcool 70% por um minuto, seguido por enxágue e imersos em uma solução contendo 1,25% de NaClO, por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se cinco enxagues por 50 segundos dos explantes com água destilada autoclavada. Para cultivo dos explantes, utilizou-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) completo suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e os antioxidantes conforme os tratamentos a seguir: T1 – Sem adição de oxidante; T2 – 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado; T3 – 1 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) e T4 – 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, utilizando placas de Petri (100 x 15 mm) descartáveis para os explantes foliares e tubos de ensaio (25 x 150 mm) para os explantes nodais.

As unidades experimentais envolvendo explantes nodais foram armazenadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz (70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a 25°C, enquanto que as de explantes foliares foram colocadas em BOD com de 24 horas na ausência de luz, a 26°C $\pm$ 1 para condução do experimento.

Aos 20 dias de cultivo, foram analisadas as porcentagens de sobrevivência e oxidação (notas de 0 - 4) dos explantes foliares, assim como aos 40 dias de cultivo dos explantes nodais.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de 4 tratamentos com 5 repetições contendo 8 discos foliares por repetição ou 6 explantes nodais por repetição, totalizando 160 explantes foliares e 120 explantes nodais na execução do experimento, respectivamente.

### **Concentrações de BAP e ANA na indução e desenvolvimento de brotações em explantes nodais de cambucizeiro *in vitro***

Ramos herbáceos de cambucizeiro foram coletados no período da manhã, levados para o laboratório, onde efetuou-se a lavagem em água corrente com detergente neutro seguida de enxague para sua retirada. As folhas dos ramos foram destacadas e os segmentos nodais

seguiram para o processo de assepsia em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Após triplo enxague utilizando água destilada, os segmentos foram imersos em solução desinfetante de 1,25% de NaClO (v/v) por 15 minutos em agitação com 3 gotas de detergente neutro (Tween 20<sup>®</sup>), seguido de cinco enxáguas por 50 segundos com água destilada autoclavada.

O meio de cultura utilizado no experimento foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em sua concentração total de sais acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar, com a adição das diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e auxina ácido naftalenoacético (ANA): T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T2 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T5 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T6 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T7 – 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA; T8 – 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 120°C e com uma atmosfera de pressão, por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais, com cerca de 1,5 cm, foram excisados com auxílio de um bisturi, e introduzidos aleatoriamente nos tubos de ensaio (25 x 150 mm). As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz (70 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e 25°C.

Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as variáveis porcentagem de sobrevivência (%SOB); comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB); número de brotações por explante (NBPE); número de brotações adventícias por explante (NBAPE) e notas de oxidação (notas de 0 a 4).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2 (concentrações de BAP x presença e ausência de ANA), 8 tratamentos com 5 repetições de 6 tubos por repetição, totalizando 240 tubos.

### **Diferentes meios de cultura na indução de brotação de explantes nodais de cambucizeiro *in vitro***

Segmentos nodais foram coletados, seguiram para a desinfestação utilizando 1,25% de NaClO por 15 minutos e, posteriormente, foram introduzidos em tubos de ensaio conforme os tratamentos dos meios de cultura (Tabela 2).

**Tabela 2** - Composição dos diferentes meios de cultura utilizados no experimento de indução e desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum.). T1 (MS), T2 (½MS), T3 (¼MS), T4 (WPM), T5 (½WPM), T6 (¼WPM), T7 (JADS), T8 (SP Modificado) e T9 (SP).

Meio de cultura	MS	½ MS	¼MS	WPM	½WPM	¼WPM	JADS	SP Mod	SP
<b>Componentes</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
<b>Macronutrientes</b>									
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	220	110	96	48	24	-	220	220
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	556	278	139	1181	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	42,5	170	85	42,5	408	85	85
KNO <sub>3</sub>	1900	950	475	-	-	-	809	950	950
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	990	495	247,5	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185	92,5	370	185	92,5	739,5	185	185
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	412,5	400	200	100	324	825	825
<b>Micronutrientes</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,00625	-	-	-	-	0,0125	0,0125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0125	0,00625	0,25	0,125	0,0625	1,25	0,0125	0,0125
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,1	1,55	6,2	3,1	1,55	3,1	3,1	3,1
KI	0,83	0,415	0,2075	-	-	-	-	0,415	0,415
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	11,15	5,575	22,3	11,15	5,575	12,8	11,15	11,15
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,125	0,0625	0,25	0,125	0,0625	0,15	0,125	0,125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	4,3	2,15	8,6	4,3	2,15	4,3	4,3	4,3
Fe(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8	13,9	6,95	27,8	13,9	6,95	55,6	6,95	6,95
NaEDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	18,65	9,325	37,3	18,65	9,325	74,5	9,325	9,325
<b>Orgânicos</b>									
<b>mg L<sup>-1</sup></b>									
Ácido nicotínico	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	3	3
Glicina	2	1	0,5	2	1	0,5	-	-	-
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100	100	100	50
Piridoxina HCl	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	3	3
Tiamina HCl	0,1	0,05	0,025	1	0,5	0,25	5	3	3
Pantotenato de Ca <sup>+2</sup>	-	-	-	-	-	-	2,4	3	3
L- Glutamina	-	-	-	-	-	-	146	146	146
L- Císteina	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-
L- Arginina	-	-	-	-	-	-	7	-	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	10000

MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), JADS (CORREIA et al., 1995), SP (CID et al., 1999).

Os meios de cultura foram suplementados com 6g L<sup>-1</sup> de ágar seguidos para autoclavagem a 120°C e uma atmosfera de pressão por 20 minutos. Após introdução dos explantes *in vitro*, as unidades experimentais permaneceram em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas de luz (70 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e 25°C, procedendo-se a renovação do meio

de cultura aos 20 dias. Aos 40 dias de cultivo, foram analisadas as porcentagens de sobrevivência do explante (%SOB), comprimento das brotações (CPB), número de brotações por explante (NBPE), porcentagem de gemas brotadas (%GB), número de folhas por brotação (NFPB), número médio de folhas senescentes por brotação (NFS) e oxidação (notas de 0 - 4). Logo após as avaliações, as brotações foram excisadas e subcultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo o mesmo meio inicial. Trinta dias após o início do cultivo, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das brotações (%SOB). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído por 9 tratamentos com 6 repetições composto por 6 explantes cada, totalizando 324 explantes na realização do experimento.

### **Posição do disco foliar e adição de reguladores no cultivo *in vitro* de explantes foliares de cambucizeiro**

Folhas da porção mediana de ramos herbáceos de plantas de cambucizeiro foram coletadas para realização dos experimentos, as quais foram lavadas em água corrente com detergente neutro e enxaguadas em água destilada para sua remoção. As folhas doadoras de explantes foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, enxaguadas em água destilada e imersas em solução contendo 0,75% de NaClO com adição de 3 gotas de Tween 20<sup>®</sup> em agitação por 15 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram realizados cinco enxagues com água destilada autoclavada. Em ambos os experimentos, foram utilizados o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) completo suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Foram realizados dois experimentos, no primeiro, os tratamentos constituíram-se da posição do disco foliar em relação ao meio de cultura e concentrações de BAP: T1 – Adaxial + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T2 – Adaxial + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3 – Adaxial + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T4 – Adaxial + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T5 – Abaxial + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T6 – Abaxial + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7 – Abaxial + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T8 – Abaxial + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. No segundo experimento, foram testadas as diferentes concentrações de BAP e ANA, conforme o seguinte: T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; T2 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; T3 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,0 mg L<sup>-1</sup> ANA; T4 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA; T5 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA; T6 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA; T7 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T8 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T9 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA.

Utilizou-se um cortador cilíndrico metálico de 0,8 cm de diâmetro para confecção dos explantes que foram introduzidos em meio de cultura em placas de Petri (100 x 15 mm)

descartáveis vedadas com plástico filme e armazenados em BOD com 24 horas de escuro a  $26^{\circ}\text{C}\pm 1$  para condução dos experimentos. Aos 20 dias, procedeu-se a transferência para novo meio de cultura. Aos 40 dias de cultivo, analisou-se a variável porcentagem de explantes responsivos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo o experimento de posição do disco foliar em relação ao meio de cultura e concentrações de BAP composto por 8 tratamentos constituído de 5 repetições contendo 8 explantes cada repetição, totalizando 320 discos foliares. O experimento de diferentes concentrações de BAP e ANA foi constituído de 9 tratamentos com 5 repetições de 8 explante cada repetição, totalizando 360 discos foliares.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos a transformação por  $\arcsen\sqrt{p}$  e  $\sqrt{x+1}$  quando necessários e as médias submetidas a teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade pelo software SAS<sup>®</sup> v.9.4.

## **Resultados e Discussão**

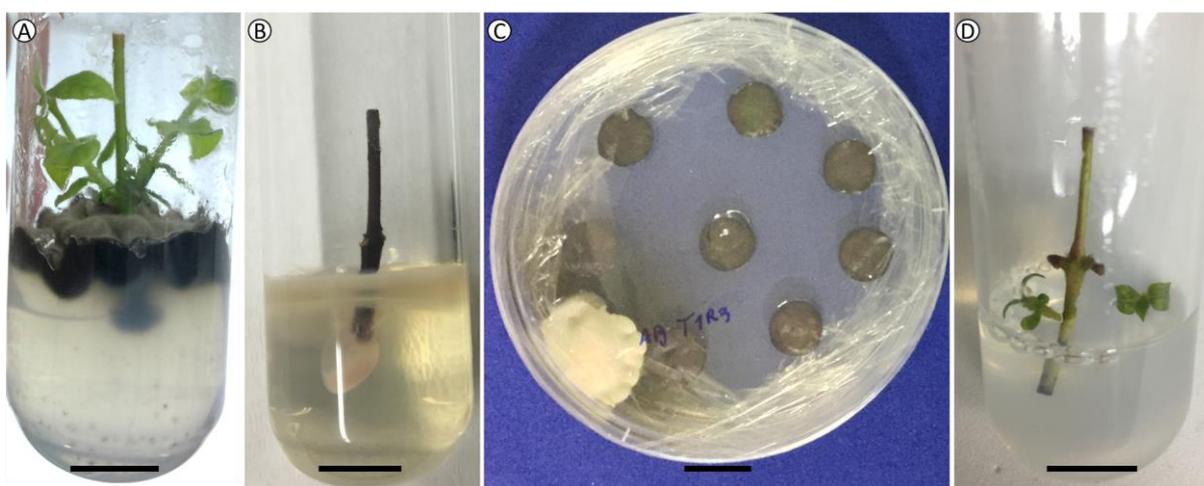
### **Desinfestação de explantes foliares e nodais herbáceos de cambucizeiro**

Não houve interação significativa entre as épocas de coleta e as soluções utilizadas para assepsia (Tabela 3). A sobrevivência final dos explantes foram baixas, com média geral de 7,5% (Tabela 3), não somente devido à contaminação inicial, bacteriana e fúngica, mas também devido às altas taxas de oxidação do explante e à abscisão das novas brotações após os 40 dias de cultivo, dos quais, embora verdes, foram categorizados como não sobreviventes ao final dos experimentos (Figura 2D).

**Tabela 3** – Contaminação geral (%); contaminação fúngica (%); contaminação bacteriana (%); sobrevivência (%) e oxidação de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo *in vitro* em função da época de coleta e soluções para assepsia. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Assepsia/ Época	Cont. Geral		Cont. Fúngica		Cont. Bacteriana		Sobrevivência		Oxidação	
	Verão	Outono	Verão	Outono	Verão	Outono	Verão	Outono	Verão	Outono
1,25 HC	87	57	67	33	53	37	7	10	3,5	3,5
1,25 HS	80	23	43	0	57	23	7	17	3,7	3,1
2,5 HC	80	50	57	37	63	17	7	7	3,6	3,7
2,5 HS	73	37	37	20	67	17	0	7	3,9	3,3
<b>Média</b>	60		37		42		7,5		3,5	
<b>CV (%)</b>	27,61		35,94		37,84		132,16		4,38	
<b>Valor p</b>	0,4875ns		0,0572ns		0,1742ns		0,8738ns		0,0945ns	

<sup>ns</sup> Não significativo. Data da coleta dos explantes nodais = 27/02/2019 (verão) e 17/05/2019 (outono). Legenda: Contaminação (Cont.), Hipoclorito de cálcio (HC) e Hipoclorito de sódio (HS).



**Figura 2** – Contaminações de explantes nodais (A e B), foliares (C) e abscisão das brotações de cambucizeiro (D) (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum). Barras = 1 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Contaminações no processo de cultivo *in vitro* representam maior custo financeiro para a aplicação da técnica, e são uma das maiores dificuldades no estabelecimento de um protocolo eficiente de multiplicação *in vitro* de plantas, principalmente, em espécies lenhosas. Os contaminantes podem ser oriundos da assepsia superficial insatisfatória, de ferramentas utilizadas na manipulação do material, ou ainda de origem endofítica. Além disso, a contaminação pode variar seu grau de predominância de microrganismo de acordo com as condições estabelecidas no processo, como, por exemplo, a condição fisiológica e fitossanitária da planta matriz e o ambiente em que está sendo mantida, o tipo de explante utilizado e, até mesmo, a época do ano em que é realizada a coleta (ESPOSITO-POLESI, 2020).

Além da contaminação, a oxidação fenólica apresenta outro entrave do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Exsudados fenólicos resultantes dos cortes realizados para introdução dos explantes em meio de cultura oxidam pela ação de enzimas polifenases, levando ao

escurecimento e morte dos explantes, impossibilitando o estabelecimento *in vitro* (MARTINI; PAPAFOU, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; ASSIS et al., 2018). A família Myrtaceae é conhecida por apresentar abundância de compostos fenólicos em sua composição, a exemplo da grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.) e da uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess.) (DONATO; DE MORRETES, 2007; HAMINIUK et al., 2014). Santoro (2019), ao analisar anatomicamente folhas e ramos herbáceos de cambucizeiro, notou grande presença dos compostos fenólicos nos tecidos, o que pode estar relacionado a alta taxa de oxidação apresentada nos explantes quando introduzidos *in vitro*.

A espécie estudada no presente trabalho apresentou um outro fenômeno, o qual dificultou ainda mais o processo de estabelecimento. Explantes nodais de cambucizeiro introduzidos *in vitro* manifestaram o processo de abscisão das novas brotações, limitando o prosseguimento das etapas seguintes (Figura 3). Esse processo de abscisão pode estar ligado à alta concentração de etileno produzido pelo explante no tubo de ensaio, assim como já relatado no cultivo *in vitro* de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck); pimenta habanero (*Capsicum chinense* Jacq.); kalanchoe (*Bryophyllum calycinum* Salisb) e moringa (*Moringa* spp.) (PLUMMER et al., 1991; STEPHENSON; FAHEY, 2004; SANTANA-BUZZY et al., 2006; RAVI et al., 2019; MARASEK-CIOLAKOWSKA et al., 2020).



**Figura 3** – Camada de abscisão das brotações de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) (setas pretas) (A e B). Piracicaba-SP, Brasil, 2019. Barras = 0,2 cm (A) e 0,1 cm (B).

As épocas do ano nas quais são realizadas as coletas dos explantes influenciam nos principais problemas encontrados no estabelecimento *in vitro* de algumas espécies, ou seja, na taxa de contaminação e de oxidação. Para a goiabeira (*Psidium guajava*), explantes coletados

no início da primavera na Índia são os mais indicados por apresentarem baixa porcentagem de oxidação e contaminação (SINGH; SINGH, 2018).

No cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), explantes coletados no inverno apresentaram menores taxas de contaminações e, conseqüentemente, maiores porcentagens de sobrevivência final do explante em comparação às coletas no verão. As baixas temperaturas afetaram na flutuação dos microorganismos contaminantes endofíticos e exofíticos. A oxidação dos explantes de erva-mate foi diminuída quando coletados nas épocas mais frias em relação ao verão, devido à baixa atividade fisiológica e, conseqüentemente, com baixa produção de compostos fenólicos (ROSA, et al., 2006). Os resultados relatados pelos autores corroboram com os obtidos no presente estudo.

Por outro lado, trabalhos avaliando o efeito das épocas no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas são escassos, especialmente, quando se trata de espécies nativas brasileiras. No presente estudo, as porcentagens de contaminação geral, fúngica e bacteriana, assim como a oxidação dos explantes, apresentaram melhores resultados quando coletados na época do outono em comparação com as coletadas no verão (Tabela 4).

**Tabela 4** – Contaminação geral (%); contaminação fúngica (%); contaminação bacteriana (%) e oxidação de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo *in vitro* em função da época de coleta. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

<b>Época</b>	<b>Cont. Geral</b>	<b>Cont. Fúngica</b>	<b>Cont. Bacteriana</b>	<b>Oxidação</b>
<b>Verão</b>	80 b	51 b	60 b	3,7 b
<b>Outono</b>	42 a	22 a	23 a	3,4 a
<b>Média</b>	60	37	42	3,5
<b>CV (%)</b>	27,61	35,94	37,84	4,38
<b>Valor p</b>	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0,0247*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade. Legenda: Contaminação (Cont.).

Aos 20 dias de cultivo *in vitro*, não houve contaminação bacteriana, porém, foi identificada contaminação fúngica nos explantes foliares de cambuzeiro (Tabela 5). O uso das soluções de hipoclorito de sódio para assepsia, independentemente da concentração de cloro ativo, resultaram em baixas porcentagens de contaminação geral, conseqüentemente, de contaminação fúngica, em comparação ao uso de hipoclorito de cálcio. Em explantes foliares de 13 genótipos de café (*Coffea* spp.), o uso de hipoclorito de sódio foi eficiente para controlar a contaminação em concentrações de até 1,0% (v/v), enquanto que, três genótipos responderam favoravelmente à assepsia realizada com hipoclorito de cálcio (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2011). Por outro lado, para o processo de desinfestação de explantes foliares de pupunheira (*Bactris*

*gasipaes*), o melhor resultado foi obtido quando se utilizou hipoclorito de cálcio a 3,0% (p/v) (SANTOS et al., 2012).

No que se diz respeito à sobrevivência e oxidação dos explantes, as soluções utilizadas não afetaram ambas as variáveis. A média de explantes foliares vivos ao final dos 20 dias de cultivo foi de apenas 8%. Esses baixos valores são coerentes com a alta média de oxidação, provavelmente, causada pela quantidade de compostos fenólicos no tecido foliar, como comentado anteriormente (Tabela 5).

**Tabela 5** – Contaminação geral (%); contaminação fúngica (%); contaminação bacteriana (%); sobrevivência (%) e oxidação de explantes foliares de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 20 dias de cultivo *in vitro* em função das diferentes soluções para assepsia. Piracicaba - SP, Brasil, 2019.

<b>Assepsia</b>	<b>Cont. Geral</b>	<b>Cont. Fúngica</b>	<b>Cont. Bacteriana</b>	<b>Sobrevivência</b>	<b>Oxidação</b>
<b>0,75 HC</b>	41 ab	41 ab	0	11	3,8
<b>0,75 HS</b>	14 a	14 a	0	8	3,8
<b>1,25 HC</b>	56 b	56 b	0	4	3,9
<b>1,25 HS</b>	4 a	4 a	0	9	3,7
<b>Média</b>	29	29	-	8	3,8
<b>CV (%)</b>	112	112,65	-	144	3,45
<b>Valor p</b>	0,0057*	0,0057*	-	0,6395ns	0,3973

<sup>ns</sup> Não significativo \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade. Legenda: Contaminação (Cont.), Hipoclorito de cálcio (HC) e Hipoclorito de sódio (HS).

### **Uso de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) no cultivo *in vitro* de explantes nodais de cambucizeiro**

O gás etileno é um fito hormônio responsável por diversas respostas no crescimento e senescência de plantas, dependendo da interação com outros hormônios, da concentração em que é encontrado e, principalmente, da espécie estudada (GEETHA et al., 2016; IQBAL et al., 2017). No cultivo *in vitro*, a presença de etileno pode ocasionar efeitos negativos, ou seja, a quantidade excessiva de etileno pode levar à abscisão, amarelecimento das folhas e inibição do crescimento, dificultando o sucesso da aplicação da técnica (SANTANNA-BUZZY et al., 2006; CARDOSO, 2019). A produção de etileno em condições de cultura de tecidos é potencializada pelo estresse causado ao explante em sua preparação, durante corte e assepsia, além do que, a utilização de frascos pequenos e fechados potencializa os efeitos negativos causados pela alta concentração do hormônio *in vitro* (YASMIN et al., 2014).

Frente a tal problema, alguns produtos com função inibidora da ação do etileno podem ser adicionados ao meio de cultura a fim de diminuir os efeitos causados pelo fito hormônio sob cultivo *in vitro*. Os íons de prata (Ag<sup>+</sup>), na forma de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), são bastante

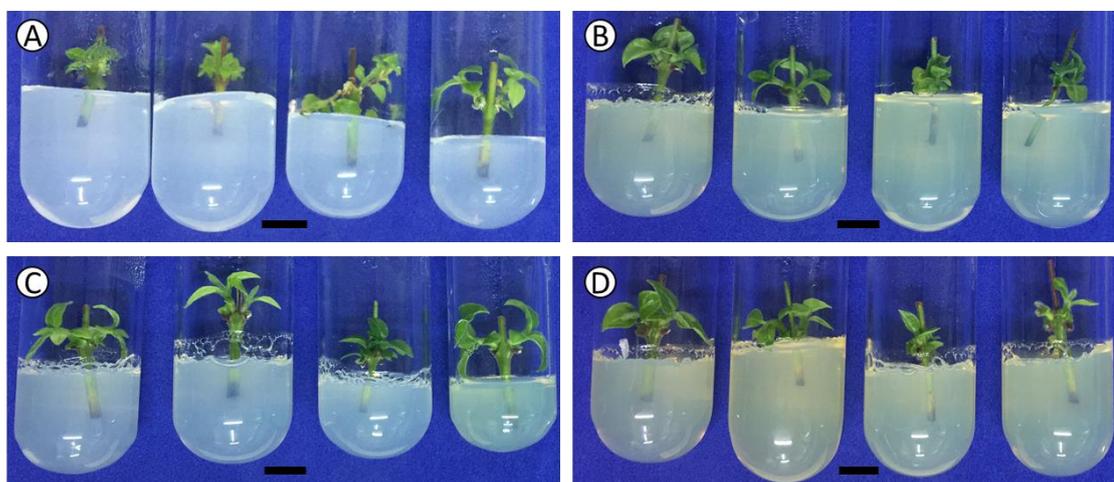
utilizados na cultura de tecidos pela potente ação inibitória do etileno, por competir com os sítios de ligação dos seus receptores na membrana (KUMAR, et al., 2009; MATOS et al., 2021).

A sobrevivência final de explantes nodais de cambucizeiro foi influenciada pela concentração de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) adicionado ao meio de cultura, mesmo não diferindo na nota de oxidação dos explantes (Tabela 6). Essa diferença positiva na taxa de sobrevivência está relacionada à diminuição da abscisão dos brotos obtidos ao final do experimento, pela adição do nitrato de prata (Figura 4).

**Tabela 6** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB) e oxidação de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo em função das concentrações de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

<b>Nitrato de Prata</b>	<b>%SOB</b>	<b>Oxidação</b>
<b>0,0</b>	23 b	3,0
<b>2,0</b>	43 a	2,7
<b>4,0</b>	47 a	2,8
<b>6,0</b>	40 a	2,6
<b>Média</b>	38	2,8
<b>CV (%)</b>	28,67	6,05
<b>Valor p</b>	0,0036*	0,2632ns

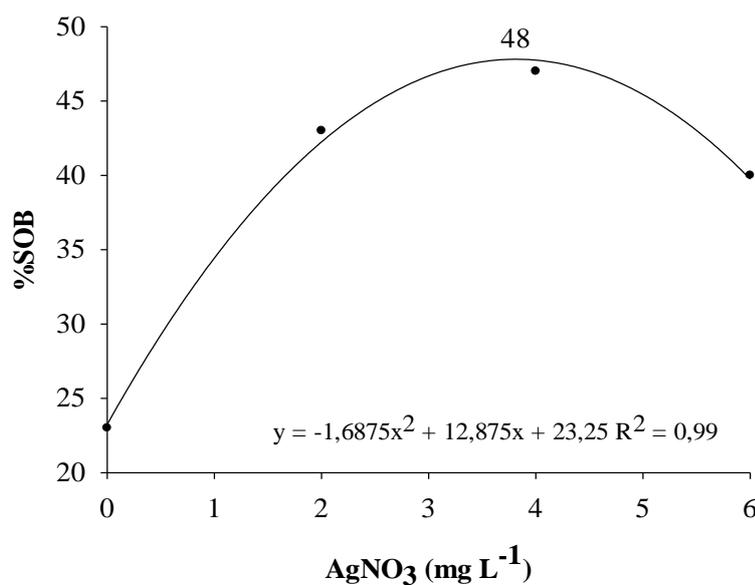
<sup>ns</sup> Não significativo \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.



**Figura 4** – Desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo em função das concentrações de nitrato de prata. T1 – 0,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{AgNO}_3$  (A); T2 – 2,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{AgNO}_3$  (B); T3 – 4,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{AgNO}_3$  (C); T4 – 6,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{AgNO}_3$  (D). Piracicaba-SP, Brasil, 2019. Barras = 1 cm.

A porcentagem de sobrevivência dos explantes nodais apresentou resposta crescente até o seu ponto máximo, o qual foi de 3,8 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{AgNO}_3$ , com a obtenção de 48% de explantes vivos aos 40 dias de cultivo *in vitro* (Figura 5). Matos et al. (2021) relataram que a

adição de nitrato de prata controlou os principais distúrbios encontrados na micropropagação da roseira (*Rosa x hybrida*) cv. Sena, principalmente, a abscisão precoce das folhas. A adição de 5 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> proporcionou menor abscisão foliar no estabelecimento de explantes nodais e apicais de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.). (PANCHAL; PATEL, 2017). Por outro lado, não foram identificados efeitos benéficos no cultivo *in vitro* de araticum do brejo (*Annona glabra* L.) (FARIAS et al., 2020).



**Figura 5** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB) de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo em função das concentrações de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>). Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

### Troca do meio de cultura aos 20 dias de explantes nodais de cambucizeiro

O simples processo de renovação do meio de cultura *in vitro* traz benefícios ao processo de estabelecimento *in vitro* de espécies que apresentam problemas quanto à alta taxa de oxidação fenólica e acúmulo de etileno em cultivo *in vitro*. Segundo George (2008), a renovação mais frequente do meio de cultura permite a retirada de metabolitos tóxicos que inibem o processo de cultivo *in vitro*.

A renovação do meio de cultura no vigésimo dia favoreceu a porcentagem de sobrevivência e obtenção de uma menor oxidação dos explantes nodais de cambucizeiro, quando comparados a não realização da troca, aos 40 dias *in vitro* (Tabela 7). Na micropropagação de eucalipto, a troca do frequente do meio de cultura é essencial, e auxilia no controle dos efeitos negativos, tais como a oxidação (DUTRA et al., 2009). Ferreira et al. (2002), ao avaliar a frequência de troca do meio de cultura durante o cultivo de eixos

embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.), relataram que a renovação do meio de cultura foi essencial para o desenvolvimento *in vitro* da espécie.

**Tabela 7** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB) e oxidação de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo em função da troca ou não do meio de cultura aos 20 dias. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

<b>Condição</b>	<b>%SOB</b>	<b>Oxidação</b>
<b>Sem troca do meio</b>	16 b	3,0 b
<b>Com troca do meio</b>	41 a	2,2 a
<b>Média</b>	28	2,8
<b>CV (%)</b>	60,79	9,49
<b>Valor p</b>	0,0016*	0,0028*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

### **Adição de antioxidantes no cultivo *in vitro* de explantes nodais e foliares de cambucizeiro**

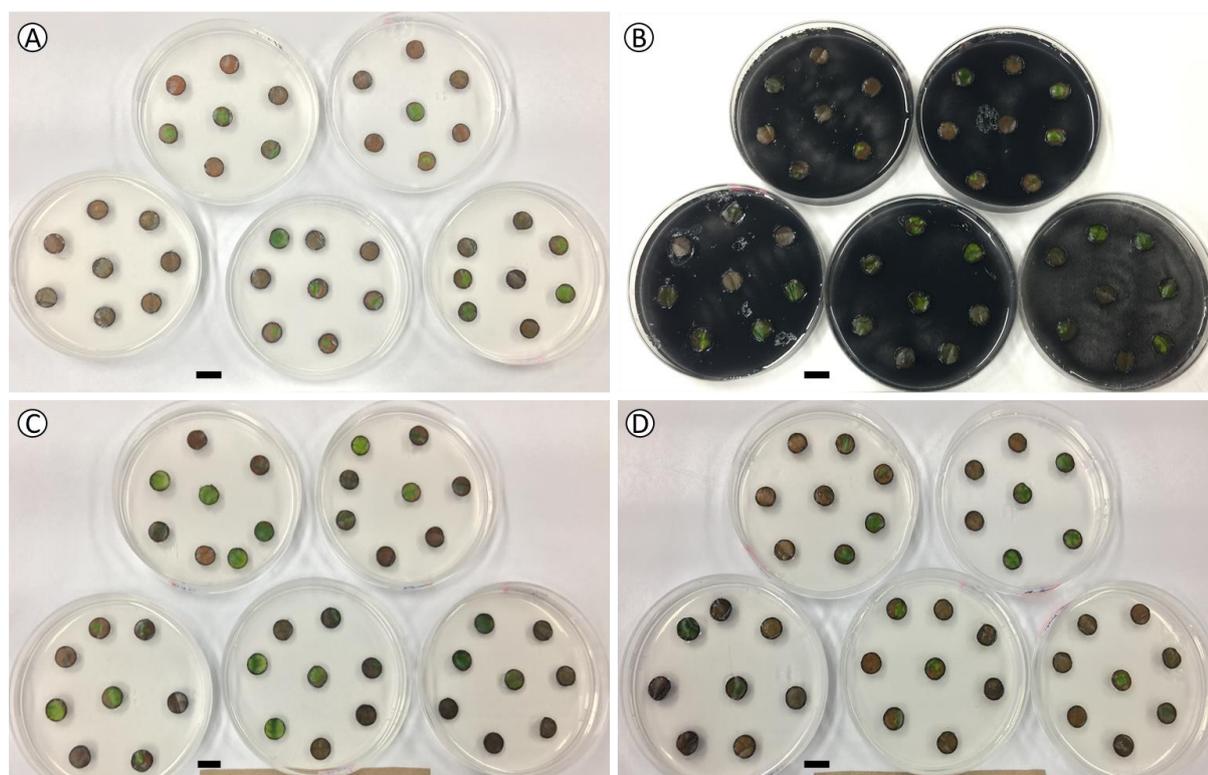
Existem muitos produtos a serem utilizados no meio de cultura visando a diminuição da oxidação fenólica dos explantes, permitindo assim a continuidade do processo de cultivo *in vitro*. Em cultura de tecidos, tem-se utilizado produtos com ação inibitória da oxidação, tais como os antioxidantes ou inibidores da PPO (polifenoloxidase), dentre os quais destacam-se o ácido ascórbico, polivinilpirrolidona e o carvão ativado, atuando na inibição da síntese e ação de enzimas que ocasionam a oxidação ou agindo como adsorventes dessas substâncias no meio de cultura (GOULART et al., 2010; CHAI et al., 2018).

No presente trabalho, não foram identificados efeitos dos antioxidantes utilizados no cultivo *in vitro* de explantes nodais de cambucizeiro. Por outro lado, explantes foliares, quando introduzidos em meio de cultura com a adição de 1 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), apresentaram melhores resultados em comparação a adição de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e a não adição de antioxidantes no meio de cultura. A porcentagem de sobrevivência aos 20 dias quando utilizado 1 g L<sup>-1</sup> de PVP alcançou os 63%, não diferindo apenas do uso de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O melhor resultado para redução de oxidação foi obtido com a utilização do PVP (Tabela 8), permitindo assim, o cultivo *in vitro* de explantes foliares da espécie (Figura 6).

**Tabela 8** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB) e oxidação de explantes foliares de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 20 dias de cultivo em função dos diferentes antioxidantes. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

<b>Antioxidantes</b>	<b>%SOB</b>	<b>Oxidação</b>
<b>Sem Antioxidante</b>	33 b	3,5 b
<b>2 g L<sup>-1</sup> Carvão Ativado</b>	45 ab	3,3 b
<b>1 g L<sup>-1</sup> Polivinilpirrolidona (PVP)</b>	63 a	2,8 a
<b>200 mg L<sup>-1</sup> Ácido ascórbico</b>	35 b	3,4 b
<b>Média</b>	44	3,3
<b>CV (%)</b>	29,88	4,33
<b>Valor p</b>	0,0391*	0,0003*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.



**Figura 6** – Explantes foliares de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 20 dias de cultivo em função dos diferentes antioxidantes. T1- Sem antioxidante (A); T2 – 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (B); T3 – 1 g L<sup>-1</sup> de PVP (Polivinilpirrolidona) (C); T4 – 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico (D). Barras = 1 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

A adição de PVP ao meio de cultura tem revelado ser uma adequada estratégia para diminuir a oxidação dos mais variados tipos de explante. Sant’ana et al. (2018), ao avaliarem a adição de polivinilpirrolidona na calogênese de explantes de caseira (*Campomanesia rufa* (Berg) Nied.), destacaram que a substância é essencial para a diminuição de cerca de 30% da oxidação do tecido, permitindo, conseqüentemente, o incremento na formação de calos nos discos foliares da espécie. Resultados semelhantes foram relatados para o cultivo de pecíolos

de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (PEQUEÑO-GRANADO et al., 2015). Em comparação com a adição de carvão ativado, o uso de 0,8g L<sup>-1</sup> de PVP na micropropagação de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less.), uma espécie florestal nativa, proporcionou melhores resultados para o sucesso do seu cultivo *in vitro* (MIRANDA et al., 2018).

### Concentrações de BAP e ANA na indução e desenvolvimento de brotações em explantes nodais de cambucizeiro *in vitro*

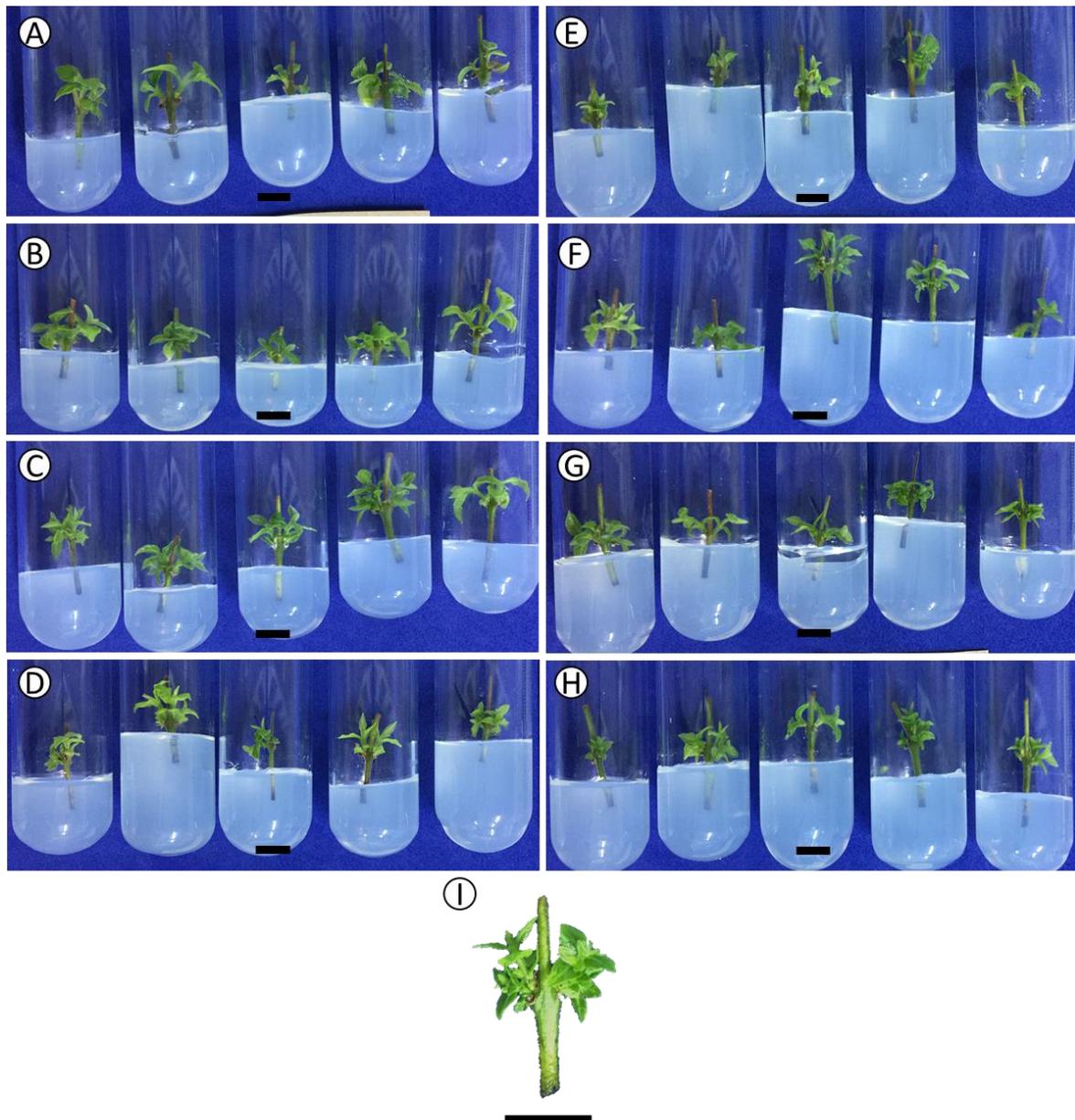
Não foram identificadas interações entre os fatores concentrações de BAP e presença e ausência de ANA no meio de cultura para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 9).

**Tabela 9** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB); comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB); número de brotações por explantes (NBPE); número de brotações adventícias por explantes (NBAPE) e oxidação de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

BAP/ ANA (mg L <sup>-1</sup> )	%SOB		CPB		%GB		NBPE		NBAPE		Oxidação	
	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
0,0	47	50	0,34	0,37	30	35	1,0	1,0	0,4	0,3	2,0	1,7
1,0	73	53	0,38	0,40	58	35	1,9	1,4	0,7	0,7	1,5	1,5
2,5	70	50	0,36	0,34	62	47	2,0	1,5	0,8	0,6	1,5	1,6
5,0	50	53	0,35	0,30	40	48	1,3	1,5	0,5	0,5	1,5	1,2
<b>Média</b>	56		0,36		44		1,4		0,6		1,5	
<b>CV (%)</b>	27,42		21,98		26,97		11,36		10,98		12,47	
<b>Valor p</b>	0,3284ns		0,6031ns		0,1586ns		0,3472ns		0,9185ns		0,2358ns	

<sup>ns</sup> Não significativo

No entanto, ao final do experimento, observou-se que foi possível a obtenção de brotações advindas de explantes nodais da espécie, apresentando, em média, 56% de sobrevivência e 1,4 broto por explante, sem necessidade de adição de reguladores vegetais (Figura 7), além do que, explantes nodais de cambucizeiro revelaram capacidade de produzir brotações adventícias na ausência de reguladores (Figura 7I).



**Figura 7** – Desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) sobre as diferentes concentrações ( $\text{mg}^{-1}$ ) de BAP e presença ou ausência de ANA aos 40 dias de cultivo. T1 – 0,0 BAP + 0,0 ANA (A); T2 – 1,0 BAP + 0,0 ANA (B); T3 – 2,5 BAP + 0,0 ANA (C); T4 – 5,0 BAP + 0,0 ANA (D); T5 – 0,0 BAP + 0,1 ANA (E); T6 – 1,0 BAP + 0,1 ANA (F); T7 – 2,5 BAP + 0,1 ANA (G); T8 – 5,0 BAP + 0,1 ANA (H). Gemas adventícias desenvolvidas de explantes nodais de cambucizeiro (I); Barras = 1,0 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

Espécies nativas, especialmente as lenhosas, apresentam recalcitrância quanto às respostas às condições de cultivo *in vitro* de explantes provenientes de planta matriz adulta. Entretanto, efeitos satisfatórios pela adição de reguladores no processo de micropropagação têm sido relatados em diversos trabalhos científicos. Dentre as principais citocininas utilizadas, o BAP recebe destaque por apresentar efeitos benéficos na multiplicação e alongamento de brotações, sendo o principal regulador utilizado em espécies lenhosas (PINHAL et al., 2011; PASQUAL, et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

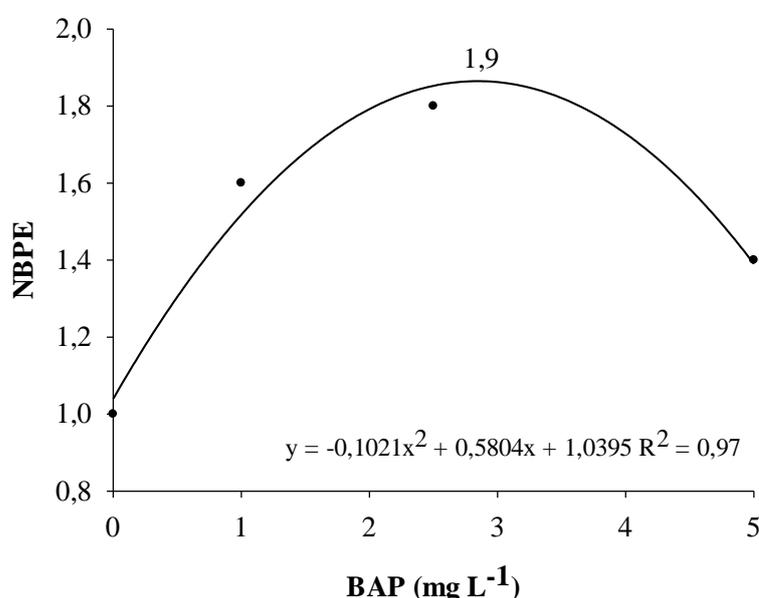
Quando analisadas as diferentes concentrações de BAP, observou-se influência sobre o número de brotações por explante aos 40 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 10).

**Tabela 10** – Número de brotações por explantes (NBPE) de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

<b>BAP (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NBPE</b>
<b>0,0</b>	1,0 b
<b>1,0</b>	1,6 ab
<b>2,5</b>	1,8 a
<b>5,0</b>	1,4 ab
<b>Média</b>	1,5
<b>CV (%)</b>	11,36
<b>Valor p</b>	0,0307*

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.

Na medida em que se aumentou a concentração de BAP no meio de cultura, o número de brotações por explante respondeu de forma crescente até seu ponto máximo de 2,8 mg L<sup>-1</sup> da citocinina, possibilitando obtenção, em média, de 1,9 brotação por explante introduzido para esta concentração (Figura 8).



**Figura 8** – Número de brotações por explante (NBPE) de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) em função das concentrações de BAP e adição de ANA. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

A citocinina BAP atua na quebra da dominância apical, induzindo o desenvolvimento das brotações axilares, aumentando a taxa de multiplicação *in vitro* (VILLA et al., 2007). A

indução de brotação em explantes nodais de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) foi influenciada pela adição de BAP ( $0,56 \text{ mg L}^{-1}$ ) no meio de cultura, sendo que, na ausência do regulador, não há respostas do explante na porcentagem de gemas brotadas (ARAGÃO et al., 2011). Assim como os resultados obtidos no presente trabalho, Bezerra et al. (2014), em seu estudo sobre a influência das concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* da lenhosa nativa sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.), identificaram que o número de brotações por explante foi afetado positivamente até  $17,76 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  da citocinina BAP, e que altas concentrações afetaram de maneira negativa a variável analisada.

Na micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess), representante da família Myrtaceae, o uso de BAP é indispensável para obtenção do maior número de brotações a partir de segmentos nodais, sendo que a adição de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  possibilitou a obtenção de 2 brotos por explante (NASCIMENTO et al., 2008). Por outro lado, em *Eugenia involucrata*, o maior número de brotações foi obtido pela adição combinada da citocinina TDZ (thiadizuron) e ANA (ácido naftaleno acético), sendo indispensável a utilização de tais reguladores na micropropagação desta espécie (GOLLE et al., 2017).

#### **Diferentes meios de cultura na indução de brotação de explantes nodais de cambucizeiro *in vitro***

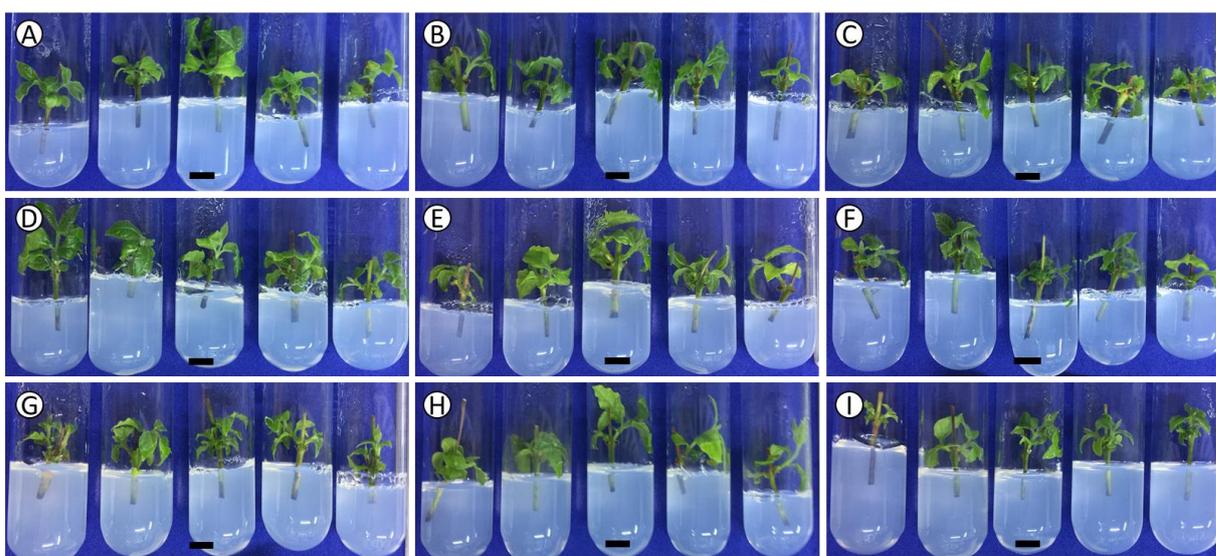
A avaliação da resposta do explante e do desenvolvimento das brotações em função do meio de cultura apresenta grande importância no cultivo *in vitro*. As interações entre a composição do meio de cultura são inúmeras, e representam um dos principais papéis no sucesso da técnica. Normalmente, apesar da necessidade diferenciada de nutrientes para cada espécie cultivada, utilizam-se meios de cultura já estabelecidos na literatura (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Dentre os mais utilizados no cultivo *in vitro*, destacam-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e suas diluições, e o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), específico para uso em espécies lenhosas (PHILLIPS; GARDA, 2019). Meios desenvolvidos para o cultivo de plantas da família Myrtaceae também são relatados em trabalhos visando a otimização do desenvolvimento *in vitro*, apresentando bons resultados no cultivo das espécies, a exemplo do meio SP (CID et al., 1999) e JADS (CORREIA et al., 1995).

Neste estudo, os diferentes meios de cultura utilizados influenciaram no cultivo e desenvolvimento *in vitro* de cambucizeiro aos 40 dias de cultivo (Tabela 11) (Figura 9).

**Tabela 11** – Porcentagem de sobrevivência (%SOB); comprimento das brotações (CPB); porcentagem de gemas brotadas (%GB); número de brotações por explante (NBPE); número de folhas por brotação (NFPB); número de folhas senescentes (NFS) e oxidação aos 40 dias após introdução *in vitro* de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) em função dos diferentes meios de cultura. Piracicaba - SP, Brasil, 2020.

Meios de Cultura	%SOB	CPB	%GB	NBPE	NFPB	NFS	Oxidação
MS	64 a	0,46 ab	56 ab	1,6 a	3,0	1,0	1,6
1/2MS	64 a	0,56 ab	58 ab	1,6 a	3,0	0,7	1,7
1/4MS	80 a	0,52 ab	72 ab	1,9 a	2,5	0,5	1,8
WPM	84 a	0,59 a	72 ab	1,6 a	4,0	0,8	1,9
1/2WPM	76 a	0,58 a	78 a	1,6 a	3,6	1,0	1,6
1/4WPM	48 ab	0,33 b	44 bc	1,2 ab	2,6	0,8	2,4
JADS	60 ab	0,46 ab	52 abc	1,4 ab	3,4	1,8	2,0
SP Modificado	80 a	0,61 a	76 a	1,7 a	3,6	0,7	2,0
SP	24 b	0,38 ab	22 c	0,6 b	3,2	2,5	2,6
Média	64	0,5	59	1,5	3,2	1,1	2,0
CV (%)	30,41	26,40	28,23	10,33	13,91	27,79	10,31
Valor p	0,0001*	0,0034*	<.0001*	0,0023*	0,2672ns	0,3022ns	0,1640ns

<sup>ns</sup> Não significativo \* Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Tukey com 5% de probabilidade.



**Figura 9** – Desenvolvimento de brotações de explantes nodais de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) sobre os diferentes meios de cultura aos 40 dias após introdução *in vitro*. T1 – MS completo (A); T2 – ½ MS (B); T3 – ¼ MS (C); T4 – WPM completo (D); T5 – ½ WPM (E); T6 – ¼ WPM (F); T7 – JADS (G); T8 – SP (H) e T9 – SP Mod (I). Barras = 1cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

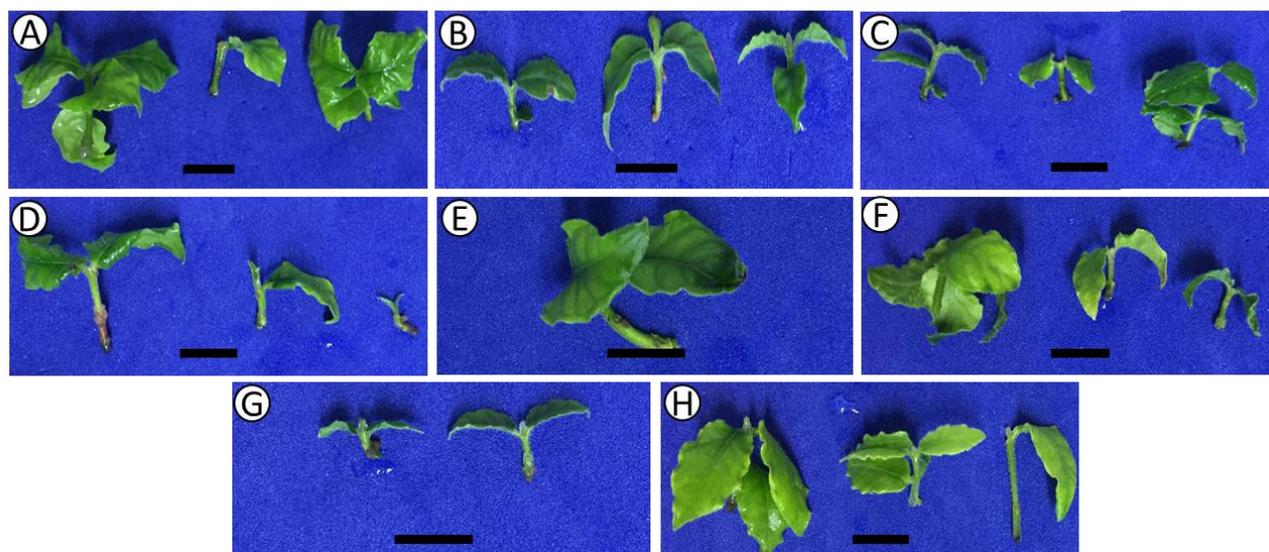
As maiores médias de porcentagem de sobrevivência (%SOB) foram obtidas nos meios WPM, ¼ MS, SP modificado e ½ WPM, diferindo apenas do meio SP. Quanto à porcentagem de gemas brotadas (%GB), o seu comportamento foi semelhante à variável sobrevivência, no qual os meios WPM, ¼ MS, SP modificado e ½ WPM apresentaram as maiores médias, com diferença estatística apenas para o meio SP (Tabela 11).

O meio SP influenciou negativamente o número de brotações por explante (NBPE), diferindo dos demais meios utilizados, os quais variaram de 1,2 a 1,9 broto por explante (Tabela 11). Os menores valores no desenvolvimento *in vitro* da espécie quando cultivada em meio SP pode ser devido à diminuição das fontes de carboidratos, mio-inositol e sacarose, em sua composição. A falta ou deficiência dos carboidratos em condições de cultivo *in vitro* afetam o potencial fotossintético das espécies, e tais substâncias são suplementadas ao meio de cultura como uma fonte de carbono, uma vez que as condições são limitadas para o processo fotossintético (SUMARYONO et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho em referência ao meio SP corroboram com os relatados por Miranda et al (2018), nos quais os autores reportaram que o uso de sacarose é indispensável no desenvolvimento de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.)), sendo que a utilização de 30 g L<sup>-1</sup>, valor usualmente utilizado na cultura de tecidos, é a concentração mais adequada no processo de multiplicação daquela espécie nativa.

O uso de ¼ WPM afetou de negativamente o crescimento e o a porcentagem de brotação das gemas. A concentração de sais desse meio de cultura, em comparação aos demais, é inferior, principalmente, a de nitrogênio. De acordo com Poothong et al (2018), meios de cultura com maiores concentrações de nitrogênio promovem maior alongamento de brotações. Assim como para o cambucizeiro, no cultivo *in vitro* de camu-camu (*Myrciaria dubia*), o aumento das concentrações de sais do meio WPM promoveram maior incremento no comprimento das brotações (ARAUJO et al., 2016).

Após o subcultivo, aos 30 dias, as brotações de cambucizeiro apresentaram, em média, 17% de sobrevivência. A maioria das brotações apresentaram amarelecimento e necrose do tecido, provavelmente, ocasionada por algum distúrbio fisiológico, como a alta concentração de etileno em tubos de ensaio durante a micropropagação, porém, estudos que avaliem melhor a causa, o estabelecimento e controle da morte dos brotos são necessários (Figura 10).

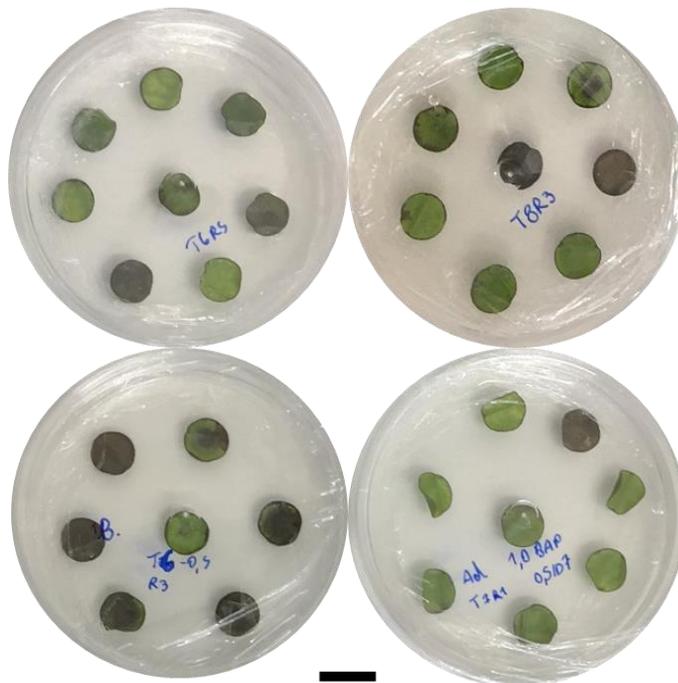


**Figura 10** – Desenvolvimento de brotações de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) sobre os diferentes meios de cultura aos 30 dias após subcultivo. T1 – MS completo (A); T2 – ½ MS (B); T3 – ¼ MS (C); T4 – WPM completo (D); T5 – ½ WPM (E); T6 – ¼ WPM (F); T7 – JADS (G) e T8 – SP Mod. Barras = 1cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2020.

### **Posição do disco foliar e adição de reguladores no cultivo *in vitro* de explantes foliares de cambucizeiro**

Respostas morfogênicas na cultura de tecidos são dependentes de fatores externos e internos em que a planta matriz e o explante são acondicionados. O ambiente, o tipo de explante, o meio de cultura utilizado, o grau de juvenildade da planta matriz e a proporção de auxina/giberelina adicionada ao meio de cultura são alguns exemplos dos elementos que influenciam, junto com a capacidade responsiva do tecido, a promoção de alterações celulares, direta ou indiretamente, possibilitando a regeneração de embriões somáticos ou novos órgãos, no caso da via organogênese (HARTMANN et al., 2014).

Entre as demais aplicações da técnica, destaca-se a produção clonal de mudas de espécies de interesse, sendo um método opcional em espécies de difícil multiplicação como o cambucizeiro. Entretanto, explantes foliares de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) utilizados no presente estudo não apresentaram nenhuma resposta morfogênica sobre a influência das concentrações de reguladores, BAP e ANA (Figura 11).



**Figura 11** – Explantes foliares de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm. Piracicaba-SP, Brasil, 2019.

Poucos são os estudos relacionados a indução a morfogênese em explantes foliares de espécies frutíferas nativas do Brasil. Porém, alguns estudos demonstraram a capacidade das espécies, ainda que em nível inicial, de gerarem resultados positivos em algumas frutíferas, como o jenipapeiro (*Genipa americana* L.) (ALMEIDA et al., 2015; SOUZA et al., 2019) e o muricizeiro (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) (NOGUEIRA et al., 2007).

Em frutíferas da família Myrtaceae, há relatos de explantes foliares apresentando efeitos positivos por via indireta, ou seja, com a formação de calos em folhas introduzidas *in vitro*. Em trabalhos recentes com cerejeira-do-Rio-Grande, foram constatadas formações de calos em discos foliares submetidos aos reguladores 2,4-D, BAP, ANA e suas combinações, com altas porcentagens de explantes responsivos na presença dos reguladores no meio de cultura (GOLLE et al., 2013; GOLLE et al., 2020a; GOLLE et al., 2020b). Araújo et al. (2015) afirmaram que explantes foliares de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh), outra espécie pertencente à família Myrtaceae, possuem capacidade de formação de calos a partir de explantes foliares em meio de cultura suplementado com BAP e 2,4-D.

No que se diz respeito ao gênero *Campomanesia*, poucos trabalhos evidenciam a morfogênese em discos foliares. Goelzer et al. (2014) observaram que folhas de guavira (*Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg), mesmo com ausência de regulador vegetal no meio de cultura, apresentaram 60% dos explantes com formação de calos. Para a casaqueira (*Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied), explantes foliares foram responsivos à formação de calos

quando adicionados  $2,2 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D (SANT'ANA et al., 2018). Em ambos trabalhos, foram utilizados segmentos foliares de plântulas jovens germinadas em condições *in vitro*, diferindo dos experimentos do presente estudo, os quais tiveram como doadoras de explantes plantas mantidas em estufas. A utilização de plântulas germinadas *in vitro* como doadoras de explantes tendem a obter maiores resultados em trabalhos de cultura de tecido, devido a fase juvenil em que se encontram (LÉDO et al., 2014).

Por fim, conclui-se sobre a necessidade de desenvolvimento de estudos voltados às respostas morfogênicas de cambucizeiro, avaliando-se, além de diferentes fontes de citocinina de e de auxina, também os graus de juvenilidade das plantas matrizes doadoras de explantes.

### **Conclusões**

Explantes nodais de cambucizeiro coletados no outono apresentaram menores taxas de contaminação e oxidação.

Não houve diferenças no tipo de solução utilizada para a assepsia dos explantes nodais, sugerindo a utilização de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo.

O uso de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi indicado no controle da abscisão de brotações e a renovação do meio aos 20 dias contribuiu para a diminuição da oxidação e da abscisão *in vitro*.

Explantes foliares apresentaram menores porcentagens de contaminação com o uso de hipoclorito de sódio, podendo ser utilizado 0,75 % de cloro ativo. A adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de PVP favoreceu o controle de oxidação fenólica em discos foliares.

Na indução de brotações de explantes nodais, o uso de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  promoveu a maior quantidade de brotações por explante.

Os meios de cultura MS,  $\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{1}{4}$  MS, WPM,  $\frac{1}{2}$  WPM, JADS e SP Modificado apresentaram os melhores valores na indução e desenvolvimento das brotações. O subcultivo das brotações foi dificultado pelo amarelecimento e senescência, apresentando em média 17% de sobrevivência dos brotos.

Explantes foliares de cambucizeiro não foram responsivos à morfogênese em meios suplementados de BAP e ANA.

### **Referências**

ARAUJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; GARCIA, M. I. R.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; FILHO, A. B. M.; SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 15, n. 33, p. 1771-1780, 2016.

POOTHONG, S.; KHEN, T.; CHUMPHUKAM, O. In vitro mineral nutrition for improving growth and multiplication of stevia. **Agric. Nat. Resour.**, v. 52, n. 5, 477-483, 2018.

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTOS, M. M.; OLIVEIRA, R. N. Antioxidants, sucrose, and agar in the in vitro multiplication of *Eremanthus incanus*. **Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 3, 2018.

SUMARYONO, S.; MUSLIHATIN, W.; RATNADEWI, D. Effect of Carbohydrate Source on Growth and Performance of In Vitro Sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) Plantlets. **J. Biosci.**, v. 19, n. 2, p. 88-92, 2012.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 38, p. 116-124, 2002.

PHILLIPS, G.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: nan overview. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019.

ALMEIDA, C. S.; SILVA, A. V. C.; ARAÚJO, A. G.; LÉDO, A. S. Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 58-64, 2015.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explante de Pau-Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.

ARAÚJO, M. C. R.; VENDRAME, W. A.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; VILACA, R. Preliminary studies on in vitro propagation of camu-camu (*Myrciaria dubia*), na important medicinal plant. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, n. 128, p. 52-54, 2015.

ASSIS, F. A.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; ASSIS, G. A.; LUZ, M. Q.; JANONI, F.; COSTA, I. J. S.; COSTA, B. N. S.; SOARES, J. D. R. Antioxidants in the controlo f microorganism contamination and phenol oxidation in *Eugenia pyriformis*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 34, n. 1, p. 49-58, 2018.

BEZERRA, R. M. F.; ALOUFA, M. A. I.; FREIRE, F. A. M.; SANTOS, D. D. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.

BIANCHINI, F. G.; BALBI, R. V.; PIO, R.; SILVA, D. F.; PASQUAL, M.; VILAS BOAS, E. V. B. Caracterização morfológica e química de frutos de cambucizeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 1, p. 10-18, 2016.

*Campomanesia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10307>>. Acesso em: 17 Out 2020.

CARDOSO, J. C. Silver nitrate enhances in vitro development and quality of shoots of *Anthurium andraeanum*. **Sci. Hort.**, v. 253, p. 358-363, 2019.

CHAI, J.; GAO, Y.; DONG, Y.; KONG, L.; ZHANG, Y. Browning treatment in tissue culture of 'Hongyang' kiwifruit. **IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.**, v. 452, n. 2, 2018.

CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 56, p. 17-23, 1999.

CORDEIRO, G. D.; PINHEIRO, M.; DÖTTERL, S.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Pollination of *Campomanesia phaea* (Myrtaceae) by night-active bees: a new nocturnal pollination system mediated by floral scent. **Plant Biol.**, v. 19, n. 2, p. 132-139, 2017.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DONATO, A. M.; DE MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga de floresta. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 426-443, 2007.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesqui. Florest. Bras.**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo in vitro de plantas. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

FARIAS, A. R. O.; GALLO, C. M.; OLIVEIRA, J. D. S.; SANTOS, H. R. S.; REZENDE, L. P.; LEMOS, E. E. P. Nitrato de prata e tiosulfato de prata como inibidores da ação do etileno em cultivo in vitro de *Annona glabra* L. **Divers. J.**, Santana do Ipanema, v. 5, n. 4, p. 2768-2778, 2020.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; FILHO, C. F. D. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*

Schum.) á concentrações de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 246-248, 2002.

FRAUCHES, N. S.; AMARAL, T. O.; LARGUEZA, C. B. D.; TEODORO, A. J. Brazilian Myrtaceae fruits: A review of anticancer properties. **Br. J. Pharm. Res.**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2016.

GEETHA, G.; HARATHI, K.; NAIDU, C. V. Role of Silver Nitrate on in Vitro Flowering and Shoot Regeneration of *Solanum nigrum* (L.)—An Important Multipurpose Medicinal Plant. **Am. J. Plant Sci.**, v. 7, p. 1021-1032, 2016.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture**. 3ed., Springer, 2008, 501 p.

GOELZER, A.; DÉO, T. G.; SILVA, L. D.; DAMIANI, C. R. Tipo de explantes, concentração de TDZ e efeito de diferentes reguladores de crescimento na organogênese in vitro de *Campomanesia adamantium*. In: Encontro de ensino, pesquisa e extensão, 8., 2014, Dourados. **Anais Eletrônicos...** Dourados: ENEPEX, 2014. p. 1-13. Disponível em: <http://eventos.ufgd.edu.br/enepep/anais/>. Acesso em: 20 fev. 2021.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S. Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução a calogênese em cerejeira-do-mato. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1759-1762, 2013.

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciênc. Florest.**, v. 30, p. 898-906. 2020a.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; Fitorreguladores na calogênese e risogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesqui. Florest. Bras.**, v. 40, p. 1-9, 2020b.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 961-972, 2010.

- HAMINIUK, C. W.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; MATTOS, G.; CARPES, S. T.; BRANCO, I. G. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **J. Food Sci. Technol.**, v. 51, n. 10, p. 2862-2866, 2014.
- HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2014. 880p.
- IBQAL, N.; KHAN, N. A.; FERRANTE, A.; TRIVELLINI, A.; FRANCONI, A.; KHAN, M. I. R. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Front. Plant Sci.**, v. 8, 2017.
- KUMAR, V.; PARVATAM, G.; RAVISHANKAR, G. A. AgNO<sub>3</sub> – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electron. J. Biotechnol.**, v. 12, n. 2, 2009.
- LANDRUM, L. R. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, v. 34, n. 2, p. 220-224, 1982.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. A rare and potentially economic fruit of Brazil: cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). **Econ. Bot.**, v. 51, n. 4, p. 403-407, 1997.
- LÉDO, A. S.; BARIN, L. B.; SILVA, A. V. C.; SÁ, F. P.; MACHADO, C. A. In vitro germination and acclimatization of cambui tree type seedlings. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1355-1359, 2014.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Comb. Proc. - Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LÓPEZ-GÓMEZ, P.; IRACHETA-DONJUAN, L.; CASTELLANOS-JUÁREZ, M.; MÉNDEZ-LÓPEZ, I.; AGUIRRE-MEDINA, J. F.; GUTIÉRREZ-DÍEZ, A.; OJEDA-ZACARÍAS, M. C.; PÉREZ-PÉREZ, B. R. Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos elite de *Coffea* spp. cultivados *in vitro*. **Rev. Mex. Cienc. Agríc.**, v. 2, n. 5, p. 645-657, 2011.
- LORENZI, H.; LACERDA, M. T. C.; BACHER, L. B. **Frutas no Brasil nativas e exóticas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, p.768, 2015.
- MALUF, A. M.; PISCIOTTANO-EREIO, W. A. Secagem e armazenamento de sementes de cambuci. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 707-714, 2005.
- MARASEK-CIOLAKOWSKA, A. M.; SANIEWSKI, M.; DZIURKA, M.; KOWALSKA, U.; GÓRAJ-KONIARSKA, J.; UEDA, J.; MIYAMOTO, K. Formation of the secondary abscission zone induced by the interaction of methyl jasmonate and auxin in *Bryophyllum calycinum*: relevance to auxin status and histology. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 8, p. 1-18, 2020.

MARTINI, A. N.; PAPAFOOTI, M. Season and explant origin affect phenolic content, browning of explants, and micropropagation of *Malosorbus Florentina* (Zucc.) Browicz. **HortScience**, v.48, n. 1, p. 102-107, 2013.

MATOS, A. V. C. S.; OLIVEIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, J. C. AgNO<sub>3</sub> improved micropropagation and stimulate in vitro flowering of rose (Rosa x hybrida) cv. Sena. **Ornm. Hortc.**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 33-40, 2021.

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTOS, M. M.; OLIVEIRA, R. N. Antioxidants, sucrose and agar in the in vitro multiplication of *Eremanthus incanus*. **Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 311-320, 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-493, 1962.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Rev. Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26, 2008.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 366-370, 2007.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesqui. Florest. Bras.**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 445-460, 2013.

PANCHAL, R. K.; PATEL, R. M. Effect of silver nitrate on leaf abscission in culture during establishment of explants of custard apple (*Annona squamosa* L.) cv. Balanagar. **IJAEB**, v. 10, n. 2, p. 263-266, 2017.

PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A. Tissue culture techniques for native amazonian fruit trees. In: LEVA, A.; RINALDI, L. (Org.). **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. 1ed. IntechOpen, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/52211>.

PEQUEÑO-GRANADO, I. L.; OJEDA-ZACARÍAS, M. C.; OLIVARES-SÁENZ, E.; ZAVALA-GARCÍA, F.; ALVARADO-GOMEZ, O. G.; IRACHETA-DONJUAN, L. Morfogénesis *in vitro* de peciolas de *Jatropha curcas* L.. **Agrociencia**, v. 49, p. 775-785, 2015.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

- PLUMMER, J. A.; VINE, J. H.; MULLINS, M. G. Regulation of stem abscission and callus growth in shoot explants of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Ann. Bot.**, v. 67, p. 17-22, 1991.
- RAVI, R. S. D.; SIRIL, E. A.; NAIR, B. R. The effect of silver nitrate on micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. an important vegetable crop of tropics with substantial nutritional value. **Physiol. Mol. Bio. Plants**, v. 25, p. 1311-1322, 2019.
- ROSA, F. C.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. **Micropropagação de Erva-Mate: Efeito de Diferentes Épocas do Ano no Estabelecimento *in vitro* de Segmentos nodais**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. (Comunicado técnico n.163). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/313089/micropropagacao-de-erva-mate-efeito-de-diferentes-epocas-do-ano-no-estabelecimento-in-vitro-de-segmentos-nodais>> Acesso: 01 mar. 2021.
- SANT'ANA, C. R. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; SILVA, D. P. C.; SILVA, L. C. In vitro propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciênc. Agrotec.**, n. 42, v. 4, p. 372-380, 2018.
- SANTANA-BUZZY, N.; ANTO-FLICK, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; MONTALVO-PENICHE, M. C.; LÓPEZ-PUC, G.; BARAHONA-PÉREZ, F. Improvement of in vitro culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. **HortScience**, v. 41, n. 2, 2006.
- SANTORO, M. B. **Multiplicação do cambucizeiro (*Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum) espécie nativa da Mata Atlântica**. 2019. 99f. Dissertação (Mestre em Ciências, área de concentração Fitotecnia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
- SANTOS, M. R. A.; ROCHA, J. F.; FERREIRA, M. G. R.; CORREIA, A. O. Estabelecimento *in vitro* e calogênese em explantes foliares de pupunheira. **Rev. Cienc. Agrar.**, v. 55, n. 3, p. 197-203, 2012.
- SILVA, I. G.; CORREIA, A. F. K.; BIGARAN, J. T.; BAPTISTA, C. P.; CARDO, L. F.; SPOTO, M. H. F. Estudo de caracterização do fruto cambuci [*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum] e sua aplicação no processamento de geleia. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 83-90, 2012.
- SINGH, K. K.; SINGH, S. P. A review: micropropagation of guava (*Psidium* Spp). **Horticult. Int. J.**, v. 2, n. 6, p. 462-467, 2018.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; MAZINE, M.; LUCAS, E. **Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em 08 de Out de 2020.

SOUZA, R. R.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, R. R.; SILVA, D. P. C.; REIS, M. V.; PAIVA, R. Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient in vitro regeneration of *Genipa* sp.. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, n. 132, p. 153-160, 2019.

STEPHENSON, K. K.; FAHEY, J. W. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germoplasm. **Econ. Bot.**, v. 58, p. 116-124, 2004.

TOKAIRIN, T. O.; NETO, H. B.; JACOMINO, A. P. **Cambuci – Campomanesia phaea (O. Berg.) Landrum**. In: RODRIGUES, S.; SILVA, E. O.; BRITO, E. S. (Ed.). Exotic Fruits Reference Guide. Academic Press. p. 91-95, 2018.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Centro-Oeste**. Brasília: MMA, p. 1160, 2016.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; TEODORO, G. S. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação in vitro de duas espécies frutíferas de clima temperado. **Ceres**, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.

YASMIN, S.; MENSUALI-SODI, A.; PERATA, P.; PUCCIARIELLO, C. Ethylene influences in vitro regeneration frequency in the FR13A rice harbouring the SUB1A gene. **Plant Growth Regul.**, v. 72, n. 1, p. 97-103, 2014.