

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO
DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS

Tatiana Rodrigues Ferreira

Bióloga

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO
DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS

Tatiana Rodrigues Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Goiás,
Regional Jataí, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Produção
Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Dezembro de 2015

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TATIANA RODRIGUES FERREIRA – nascida no dia 27 de Julho de 1983, na cidade de Jataí, Goiás, filha de Florinal Rodrigues Silva Ferreira e Aparecido Ferreira dos Santos. Iniciou o Curso de Ciências Biológicas Licenciatura na Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí – GO, no mês de março de 2007 e obteve o título de Bióloga Licenciada em Fevereiro de 2012. Em Agosto de 2013 ingressou no Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia na Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí – GO, sob a orientação do Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein. Em Dezembro de 2015 submeteu-se a banca examinadora para a Defesa Final da Dissertação, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia.

DEDICO

À Deus, razão de tudo que somos e por está sempre a frente de tudo que proponho em minha vida iluminando meu caminho.

A minha família

*em especial a minha avó e minha mãe, Leonor e Florinal,
que me deram a vida, educação e são exemplos de superação.*

*a minha sobrinha Ana Carolina,
que sempre admirou o que fiz e sempre me acompanhou desde pequena.*

*ao meu amor, Genis,
que sempre me apoiou, ajudou e foi companheiro em tudo que pode.*

Aos meus amigos

*em especial a Daiane, Marieli e Vanessa,
que sempre esteve comigo nas horas boas e difíceis.*

A TODOS DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por está sempre ao meu lado, me dando sabedoria e força para enfrentar as dificuldades da vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí pela oportunidade de realização desse curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein pelos ensinamentos, apoio, colaboração, pela amizade construída ao longo dos anos, por participar da minha formação e confiar em mim durante todo esse tempo.

Aos amigos e amigas do PPGA Carolina, Jorge, André, Evelyn, Marieli, Pedro, pelos momentos de estudos e descontração, que muitas vezes culminavam em muitas gargalhadas e tornaram o tempo e o caminho mais agradável.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Bárbara, Jane Karla, Luna, Fábio e Blêndali pelas valiosas ajudas e pelos momentos de gargalhadas.

A Profa. Dra. Denise e a técnica e amiga Ma. Lucielle do laboratório de Bioquímica pelo apoio e ajuda em todos os experimentos, sem elas nada aconteceria.

A Profa. Dra. Carla Gomes Machado pela grande ajuda e ensinamentos durante a qualificação e defesa, a Profa. Dra. Daniella Nogueira Moraes Carneiro durante a qualificação e o Prof. Dr. Christiano Peres Coelho pela grande ajuda durante a defesa.

À minha linda família, minha avó, minha mãe, meus irmãos, meus dois sobrinhos, meus tios e tias, meus primos e primas, e meu esposo Genis pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e companheirismo em todas as etapas deste trabalho. Obrigada por todas as palavras de incentivo e por acreditarem sempre no meu potencial.

A todos os meus amigos e as pessoas que sempre me deram força nessa caminhada com palavras de incentivo e que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MINHA ETERNA GRATIDÃO

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.2.1.Aspectos Gerais do Guanandi (<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess).....	3
1.2.3.A Cultura de Tecidos de Plantas	7
1.2.3.1.Multiplicação	8
1.2.3.2.Alongamento.....	9
1.3. OBJETIVOS	11
1.3.1.Objetivo Geral.....	11
1.3.2.Objetivos Específicos	11
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2 – OSMOCONDICIONAMENTO E MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE GUANANDI	17
RESUMO	17
CHAPTER 2 – PRIMING AND CULTURE MEDIA IN GUANANDI SEED GERMINATION	18
ABSTRACT	18
2.1. INTRODUÇÃO	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.2.1.Material Vegetal.....	20
2.2.2.Desinfestação das sementes.....	21
2.2.3.Meios de Cultura.....	21
2.2.4.Efeito do osmocondicionamento com nitrato de potássio (KNO ₃) na germinação de sementes de Guanandi	22
2.2.5.Efeitos de diferentes meios de cultura na germinação de sementes de Guanandi	22
2.2.6.Delineamento Experimental.....	23
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.3.1.Efeito do osmocondicionamento com nitrato de potássio (KNO ₃) na germinação de sementes de Guanandi	23

2.3.2.Efeitos de diferentes meios de cultura na germinação de sementes de Guanandi	30
2.5. CONCLUSÃO	33
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA	34
CAPÍTULO 3 – MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO SEGMENTOS NODAIS DE GUANANDI	37
RESUMO.....	37
CHAPTER 3 – MULTIPLICATION AND STRETCHING NODAL SEGMENTS OF GUANANDI	38
ABSTRACT	38
3.1. INTRODUÇÃO	39
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1.Material Vegetal.....	40
3.2.2.Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas e indução de brotações em gemas axilares de Guanandi.....	41
3.2.3.Efeito do GA ₃ no alongamento de brotações.....	41
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.3.1.Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas e indução de brotações em gemas axilares de Guanandi.....	42
3.3.2.Efeito do GA ₃ no alongamento de brotações.....	46
3.4. CONCLUSÃO	50
3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS

RESUMO – O Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) é uma espécie nativa do Brasil de grande importância econômica, florestal e medicinal. Objetivou-se com esse trabalho a germinação, multiplicação e alongamento *in vitro* de Guanandi. Nos experimentos de germinação *in vitro* as sementes foram osmocondicionadas com soluções de nitrato de potássio (KNO₃) a 0%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50% ou foram inoculadas em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), ½WPM, MS (Murashige & Skoog), ½MS e H₂O. No experimento de multiplicação *in vitro* os segmentos internodais foram inoculados em meio de cultura WPM suplementados com diferentes citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP) (2; 4,4; 8 e 16 µM), cinetina (CIN) (4, 6, 8 e 16 µM), 6°-isopentyl-amino purine (2-iP) (8 e 16 µM) e tidiazuron (TDZ) (0,91; 2,27; 4; 8 e 16 µM) e 0 µM como. Para o experimento de alongamento os explantes multiplicados foram isolados, inoculados em meio de cultura WPM suplementado com ácido giberélico GA₃ (0, 5, 10 e 20 µM) e mantidos sob fotoperíodo de 16h ou no escuro. A germinação com nitrato de potássio (KNO₃) foi possível verificar que há uma correlação entre a porcentagem de germinação e a porcentagem de KNO₃, mostrando que aos 30, 45 e 60 dias a equação de regressão linear explica a variável dependente (Y). A porcentagem de germinação e o vigor das sementes decresceram com relação ao aumento da concentração de KNO₃. O tratamento 50% foi fitotóxico tornando inviável a germinação das sementes. Com relação aos diferentes tipos de meio, não houve efeito significativo dos meios de cultura para a porcentagem de germinação aos 15 e 30 dias e para o índice de velocidade de emergência. Os tratamentos de multiplicação não apresentaram diferença significativa para o tamanho médio das brotações, número médio de gemas e o número de folhas aos 30 e 60 dias. Com relação às diferentes concentrações de GA₃, nas diferentes condições de luminosidade os explantes mantidos na luz apresentou maior tamanho médio de brotos, maior número de brotos e folhas e menor taxa de oxidação comparada com os mantidos no escuro.

Palavras – chave: Alongamento *in vitro*, cultura de tecidos, Guanandi, multiplicação *in vitro*, osmocondicionamento.

GERMINATION *IN VITRO* AND MICROPROPAGATION OF *Calophyllum brasiliense* CAMBESS

ABSTRACT – Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess), is a Brazilian native species of economic forestry and medicinal value. The aim of this work was to improve the *in vitro* germination, multiplication and elongation of Guanandi. In the germination experiment the seeds were osmoconditioned with potassium nitrate solutions (KNO₃) at 0%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20% 25% and 50% or inoculated in WPM (Wood Plant Medium), ½WPM, MS, ½MS and H₂O. In the multiplication experiment the nodal segments were inoculated in WPM culture medium supplemented with cytokins: 6-benzilaminopurina (BAP) (2; 4,4; 8:16 µM), kinetin (CIN) (4, 6, 8 and 16 µM), 6th-isopentyl-amino purine (2-iP) (8 and 16 µM) and thidiazuron (TDZ) (0.91, 2.27, 4, 8 and 16 µM) and 0 µM as control. In the elongation experiment the explants were inoculated on WPM medium supplemented with gibeletic acid GA₃ (0, 5, 10 and 20 µM) and maintained on dark or 16h foteoperiod. Germination with potassium nitrate (KNO₃) we observed that there is a correlation between the germination percentage and the percentage of KNO₃, showing that at 30, 45 and 60 days linear regression equation explains the dependent variable (Y). The percentage of germination and seed vigor decreased with respect to the concentration of KNO₃. Treatment 50% was toxic impeding the germination of seeds. Regarding the different types of media, there was no significant effect of culture media for the germination percentage at 15 and 30 days and the emergency speed index. The multiplication of treatment showed no significant difference in the average size of the shoots, average number of buds and number of leaves at 30 and 60 days. With regard to different concentrations of GA₃, in different lighting conditions the explants kept in light showed higher average size of buds, the greater number of shoots and leaves and smaller oxidation rate compared to those kept in the dark.

Key - words: *In vitro* elongation, tissue culture, guanandi, *in vitro* multiplication, osmopriming.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a segunda maior cobertura florestal do mundo e a maior extensão de florestas tropicais do planeta. Este setor é compreendido por florestas nativas e plantadas, públicas e privadas, sendo heterogêneo em questões de produtividade, tecnologia, recursos humanos e outros aspectos (BRASIL, 2012).

Estima-se que 98,5%, dos 463 milhões de hectares de cobertura florestal brasileira, sejam constituídos por floresta natural. O restante da área (1,5%) corresponde às florestas plantadas principalmente com espécies exóticas, a exemplo do eucalipto e do pinus, com relevantes indicadores de eficiência produtiva e notória participação socioeconômica no setor (BRASIL, 2014).

Setor Florestal é responsável por 3,5% do Produto Interno Bruto (PIB de 2007) do Brasil, equivalente a US\$ 37,3 bilhões, e por 7,3% das exportações totais do país, equivalente a US\$ 10,3 bilhões, sendo o setor de celulose responsável por US\$ 4 bilhões, o de madeira serrada, compensados e produtos de maior valor agregado por US\$ 2,9 bilhões. O setor é ainda responsável por gerar cerca de 7 milhões de empregos (SNIF, 2015).

Diante desse potencial, crescentes investimentos em pesquisas, visando o desenvolvimento de tecnologias que atendam às necessidades da cadeia produtiva (PAIM, 2011) e conservação de espécies (LEITE, 2012) vêm sendo realizadas. Apesar de o setor florestal ser relevante na economia nacional, é um setor contraditório, que ao mesmo tempo desenvolveu a silvicultura de florestas plantadas com produção integrada e a estrutura produtiva sofisticada, e ainda convive com altos índices de desmatamento ilegal de florestas nativas (SNIF, 2015).

A espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess., nativa do Brasil e conhecida popularmente como Guanandi é uma das espécies florestais nativa de grande importância econômica, florestal e medicinal (FILHO; SILVA; NIERO, 2009). A sua madeira é considerada substituta do mogno por ser resistente e imputrescível, sendo usada para fabricação de móveis, construção civil,

construção naval, entre outros (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994). Também pode ser utilizada em projetos paisagísticos de parques e praças, bem como em reflorestamento para recuperação ambiental (LORENZI, 1992).

No entanto essa espécie apresenta dificuldade de propagação devido a grande variação na taxa de germinação (15 a 90%) e tempo de germinação longo, de aproximadamente 145 dias (LORENZI, 1992). Além disso, as sementes da espécie Guanandi apresentam comportamento recalcitrante (CARBALLO; THOMSEN; JOKER, 2004), dormência física (tegumentar) e mecânica (embrionária) imposta pela estrutura rígida que envolve o embrião (SILVA; VIEIRA; PANOBIANCO, 2014).

Com relação às dormências, elas podem ser exógenas, o que está relacionada diretamente com a impermeabilidade à água, resistência mecânica e presença de inibidores químicos no tegumento ou pericarpo. Podem ser endógenas, estando relacionadas com o embrião, devida à ocorrência de embrião imaturo ou à presença de mecanismo de inibição fisiológica. Já algumas espécies apresentam a dormência combinada, que é quando em suas sementes aparecem os dois tipos de dormência (FOWLER & BIANCHETTI, 2000) dificultando o crescimento do embrião e a propagação da espécie.

Já com relação às sementes recalcitrantes, de acordo com Hendry et al. (1992) e Roach et al. (2010), aparentemente, essas sementes são incapazes de regular seus processos metabólicos durante a desidratação, e com isso acabam permitindo a formação de radicais livres e não podem ser armazenadas por longos períodos. Castro; Bradford; Hilhorst. (2004) acreditam que podem faltar sistemas de mecanismos antioxidantes eficientes para impedir os danos desses compostos.

Portanto, a regulação da mobilização da água nessas sementes, com soluções osmóticas e estresses hídricos, podem ser favoráveis para a conservação dessas sementes (FILHO, 2005). Essas características intrínsecas da espécie, principalmente a perda de viabilidade das sementes no armazenamento (SILVA; VIEIRA; PANOBIANCO, 2014) dificultam o seu manejo e a sua inclusão em programas de plantio comercial e reflorestamento.

Porém para tais espécies surge então a cultura de tecidos vegetais com técnicas que possibilita a potencialização de multiplicação de espécies com

dificuldade de propagação como o Guanandi que possui algumas dessas características citadas.

Não há nenhum artigo publicado de germinação *in vitro*, de micropropagação e de alongamento *in vitro* de *Calophyllum brasiliense*. Diante do exposto, objetivou-se estabelecer parâmetros para a germinação *in vitro* de sementes, multiplicação e alongamento *in vitro* de explantes de Guanandi.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Aspectos Gerais do Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess)

O gênero *Calophyllum* L, pertencente à família Calophyllaceae J.Agardh, é composto por 200 espécies de ampla distribuição tropical. Algumas espécies são utilizadas como agentes medicinais para o tratamento de muitas doenças, incluindo úlceras gástricas, infecções, tumores, processos inflamatórios, entre outros (FILHO; SILVA; NIERO, 2009).

A espécie *Calophyllum brasiliensis* Cambess, popularmente conhecida como Guanandi, é nativa do continente americano e ocorre naturalmente em todas as bacias brasileiras (MARQUES & JOLY, 2000). Possui uma ampla distribuição geográfica, sendo: Norte (Acre, Amazonas, Pará, Roraima, Tocantins), Nordeste (Bahia), Centro oeste (Goiás, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina) (BITTRICH et al., 2014).

Esta espécie é também popularmente conhecida como guandi, manguegalandim, gualambi, guanandi-carvalho, guandi-carvalho, guanandi cedro, guarandi, gualande-carvalho, olandim, pau-de-mangue, landi, landim, jacareíba, jacareúba e cedro d'água (LORENZI, 1998).

O Guanandi possui habito arbóreo e apresentando normalmente 20 m de altura e entre 20 a 50 cm de diâmetro (DAP). Na região amazônica pode atingir até 40 m de altura e 150 cm de DAP. Seu tronco geralmente é reto e cilíndrico, apresentando fuste de até 15 m de altura (CARVALHO, 1994).

Apresenta folhas perenes, com copa larga e arredondada, densa e de coloração verde-escuro. As folhas são simples, opostas, elípticas, coriáceas e

apresentam dimensões de 5 a 15 cm de comprimento por 3 a 7 cm de largura, com nervuras laterais abundantes, próximas e paralelas. O pecíolo é verde-escuro, lustroso, espesso e mede até 2 cm de comprimento. A casca externa é marrom-escuro ou pardacenta, fissurada de alto a baixo e descamando em placas retangulares. A casca interna possui coloração rósea, aromática, amarga e ácida, exsudando látex amarelado e pegajoso (CARVALHO, 1994).

O Guanandi possui flores masculinas e hermafroditas na mesma planta (característica andromonoica), brancas, reunidas em racemos axilares ou panículas de 2,5 a 6 cm (CARVALHO, 1994). Os frutos são do tipo baga, globosos, com pericarpo carnoso e oleaginoso de cor amarelada (SOUZA & LORENZI, 2008). Eles apresentam cerca de 2,5 a 3 cm de diâmetro, sendo esverdeados quando imaturos. Seu exocarpo é coriáceo, fino e com manchas glandulares. O mesocarpo é carnoso, esbranquiçado se tornando amarelo com a maturidade, e com textura granulosa. Já o endocarpo é fino e se fragmenta quando o fruto está maduro (FLORES, 2002). Suas sementes do tipo castanha, contém cerca de 44% de óleo puríssimo, podendo ser utilizado como biocombustível, sendo sua eficiência próxima à mamona (CARVALHO, 1994).

As sementes de Guanandi apresentam dormência tegumentar, que pode ser superada por escarificação mecânica ou estratificação em areia úmida por 60 dias. Sem estes tratamentos, a germinação pode demorar até seis meses onde a taxa de germinação varia entre 15 e 95% e o tempo de germinação é considerado prolongado (aproximadamente 145 dias) (CARVALHO, 1994; LORENZI 1992). As sementes de Guanandi não germinam em solos encharcados, porém nestas condições, elas se mantêm viáveis pelo menos por três meses, enterradas ou submersas pela água e somente germinam quando o nível da água reduz (MARQUES & JOLY, 2000).

As sementes de espécies como *Calophyllum brasiliense* Cambess, não apresentam exigência quanto à luz e ainda toleram a hipóxia, levam vantagem na ocupação de ambientes ribeirinhos, onde a previsibilidade ambiental é baixa (MARQUES & JOLY, 2000). Portanto essa espécie é recomendada para a restauração de mata ciliar, na maior parte em locais sujeitos a inundações periódicas de médio e longo prazo (CARVALHO, 1994).

Com relação à madeira do Guanandi, essa espécie possui massa específica aparente entre 0,62 e 0,79g/cm³, 15% de umidade e densidade

básica entre 0,49 a 0,51 g/cm³. Trata-se, portanto, de uma madeira moderadamente densa (JANKOWSKY et al., 1990). Apresenta baixa permeabilidade aos tratamentos preservativos em função de possuir os poros parcialmente preenchidos por óleo-resina (BENITEZ-RAMOS & MONTESINOS-LAGOS, 1988).

Além da produção de madeira, o Guanandi é indicado para obtenção de resina com propriedades medicinais, taninos (casca e folhas), óleo essencial (fruto) e saponina (folhas) (CARVALHO, 1994). Xantonas, cumarinas, flavonoides e terpenos, que têm ação antibacteriana, moluscicida, anti-hipertensiva e atividade contra imunodeficiência humana (HIV-1) (NOLDIN; ISAIAS; FILHO, 2006; BRAGA et al., 2007; ANTONIO et al., 2010; CARVALHO et al., 2013).

1.2.2. Germinação

As sementes de algumas espécies apresentam comportamento distinto quanto ao armazenamento e a germinação. Podem ser ortodoxas, que se mantêm viáveis após dessecação até o grau de umidade em torno de 5% e podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período de tempo. No outro grupo têm-se as recalcitrantes, ou sementes sensíveis à dessecação, que não sobrevivem com baixos níveis de umidade, o que impede o seu armazenamento por longo prazo (ROBERTS, 1973) como é o caso da espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess. Além destes dois grupos há um terceiro, no qual as sementes apresentam um comportamento de armazenamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante (ELLIS et al., 1990).

A germinação da semente começa com a embebição e é considerada como a retomada das atividades metabólicas do eixo embrionário, no qual se encontrava paralisado nas fases finais do processo de maturação. Porém, quando estimulado por condições ambientais favoráveis seu início é caracterizado principalmente pela: reativação do metabolismo respiratório; intensa mobilização de metabólitos; enfraquecimento dos tecidos que envolvem o embrião; e finalmente, o crescimento do embrião, ocorrendo então, o rompimento dos envoltórios da semente, pela radícula. Essa é uma etapa

crítica do biociclo vegetal pelo fato do processo estar associado a vários fatores de natureza extrínseca (fatores do ambiente físico) e intrínseca, ou seja, a processos fisiometabólicos (BEWLEY & BLACK, 1994; LABORIAU, 1983; POPINIGIS, 1985; SANTOS, 1999; CASTRO & HILHORST, 2004).

Após essa primeira etapa, os tecidos de crescimento se desenvolvem com o fornecimento de alimento pelos cotilédones e a radícula emerge e se fixa. Com a formação das folhas, ocorre então a ativação do aparato fotossintético da plântula, inicia-se a absorção de nutrientes do ambiente e a planta passa a produzir seu próprio alimento (KRAMER & KOZLOWSKI, 1972).

Para que o processo de germinação ocorra naturalmente, é necessário que as condições do meio ambiente sejam adequadas e estimulem este processo. Algumas espécies apresentam alternativas para que suas sementes germinem somente quando os estímulos forem adequados. Com isso, as sementes apresentam dormência como uma estratégia evolutiva para garantir que elas encontrem condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento de plantas adultas (BIANCHETTI, 1989). É também uma adaptação para a sobrevivência dos espécimes em longo prazo, pois geralmente faz com que as sementes mantenham-se viáveis por maior período de tempo.

A dormência apresentada pelas sementes pode ser exógena e/ou endógena, sendo exógena a dormência tegumentar (resistência mecânica) e endógena a dormência embrionária (causada por substâncias inibidoras, imaturidade do embrião ou dormência do próprio embrião). Além disto, a dormência pode ocorrer independentemente uma da outra ou simultaneamente na mesma semente (FOWLER & BIANCHETTI, 2000), neste caso chamado de dupla dormência (KRAMER & KOZLOWSKI, 1972).

Para a quebra da dormência tegumentar são utilizados vários mecanismos, tais como: escarificação mecânica e/ou escarificação ácida. Uma alternativa empregada para a quebra de dormência embrionária ou física é a utilização de solução aquosa de nitrato de potássio, sendo acrescido no substrato para a germinação da semente ou sendo feita a embebição das sementes nestas soluções. O efeito positivo deste tratamento já é frequentemente relatado na literatura (FARON et al., 2004). Dentro do quadro atual a dormência ainda é relacionada à capacidade ou potencial da semente

de produzir plântulas num prazo considerado razoável ou ideal por aquele que semeou (CARDOSO, 2009).

1.2.3. A Cultura de Tecidos de Plantas

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas que possibilita clonar plantas de elite, ou seja, plantas que apresentam alguma característica morfológica e/ou fisiológica que as diferenciam das outras plantas de sua espécie, de maneira uniforme e livre de patógenos (CID, 2001). Tem-se apresentado também como uma alternativa viável na clonagem de espécies florestais (multiplicação), medicinais (produção de metabólitos secundários), nativas (conservação de germoplasma) e no melhoramento de espécies agrícolas e florestais (MORAIS et al., 2012; PINHAL et al., 2011; SOUZA et al., 2008). O cultivo *in vitro* também possibilita a propagação de espécies que possuam algum tipo de dormência e/ou recalcitrância, facilitando a germinação e a tornando mais uniforme com maior velocidade (PINHAL et al., 2011).

A micropropagação é a técnica mais utilizada quando o objetivo é a produção em larga escala de clones elite, pois em um curto período de tempo e com espaço reduzido é possível obter plantas livres de patógenos, com o mesmo material genético que a planta mãe (CID, 2001). Essas técnicas são baseadas na totipotencialidade celular. Isso significa que uma célula vegetal já diferenciada pode manifestar a potencialidade de gerar um novo indivíduo multicelular, voltando ao seu estado meristemático e redefinindo seu padrão de diferenciação celular. Estas células apresentam este potencial quando sofrem estímulos apropriados (TERMIGNONI, 2005; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

O processo organogênico ocorre quando há formação de gemas adventícias a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que geralmente não se expressam. As gemas se originam em locais diferentes do curso normal da planta e podem surgir de forma direta ou precedida também pela formação de calos (CARVALHO et al., 2006).

Vários processos interferem no sucesso da micropropagação como tipo e idade da planta mãe, antecedentes genéticos, componentes nutricionais do

meio de cultivo, reguladores de crescimento e o ambiente no qual o explante ficará exposto (GIRI et al., 2004; GRATTAPAGLIA et al., 1998).

O processo de micropropagação pode ser dividido nos seguintes estágios: 0) seleção e preparação da planta-matriz, etapa em que se identificam plantas livres de contaminantes e as melhores fontes de explantes; 2) estabelecimento de cultura asséptica, a transferência do explante para o meio de cultura; 3) produção de propágulos adequados, quando ocorre a produção massiva de gemas, a partir da adição de citocininas ao meio de cultura; 4) preparação para crescimento no ambiente natural, diminuindo-se as concentrações de carboidratos no meio e promovendo o enraizamento por meio do uso de auxinas; 5) transferência ao ambiente natural, ou aclimatização, que ocorre pela adaptação progressiva dos explantes ao ambiente *ex vitro* (GEORGE & DEBERGH, 2008).

1.2.3.1. Multiplicação

Técnicas baseadas na micropropagação de plantas podem ser empregadas com sucesso para propagação massal, sendo uma ferramenta útil para muitas espécies de importância econômica, produzindo plantas idênticas (RADMANN et al., 2009).

A multiplicação *in vitro*, é a fase onde se objetiva propagar o material vegetal sem a perda da estabilidade genética (PIERIK, 1990). Segundo Grattapaglia & Machado (1998) e George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares e a composição do meio de cultura é uma das variáveis que determinam o sucesso na proliferação das partes aéreas.

No entanto, geralmente, somente o meio de cultivo não é capaz de induzir os processos de diferenciação e desdiferenciação necessários para a indução de brotações laterais entre outros processos morfogênicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Para que este objetivo seja alcançado, é necessária a utilização de reguladores de crescimento vegetal, sendo que as citocininas e auxinas são os mais empregados na cultura de tecidos.

As citocininas são indispensáveis na divisão celular, quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de

gemas adventícias (PREECE & SUTTER, 1991). A citocinina mais utilizada para a indução de brotações é o BAP (6-benzilaminopurina) que induz alta taxa de multiplicação. A ZEA (zeatina) e a CIN (cinetina) possuem estruturas moleculares similares e ambas podem estimular a divisão das células vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2004). Já o TDZ (thidiazuron) promove o crescimento e a desdiferenciação de tecidos (MATSUMOTO, 2000).

As auxinas, outro grupo de reguladores de crescimento fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes, muitas vezes são utilizados nas fases de multiplicação para favorecer o alongamento das brotações. Para a indução de raízes, o regulador de crescimento mais utilizado é o AIB (ácido indolbutírico) (SOUZA & PEREIRA, 2007). Quando o objetivo é o alongamento de brotações usa-se AIA (ácido indol-3-acético) e ANA (ácido naftalenoacético) (BRONDANI et al., 2009). A indução de calos é realizada geralmente com picloram e a indução de embriões somáticos é obtida com o uso de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) (REIS et al., 2007; TITON et al., 2007).

Assim, o grande obstáculo da cultura de tecidos para a produção de mudas é o ajuste de um protocolo com um meio de cultivo que supra as necessidades da planta tornando-a propícia à multiplicação em larga escala.

1.2.3.2. Alongamento

O alongamento dos entrenós é necessário quando o objetivo é multiplicar as brotações induzidas em segmentos nodais. Caso este processo não ocorra naturalmente, é necessário utilizar reguladores de crescimento que induzam a multiplicação e expansão celular.

A auxina e a giberelina adicionadas ao meio de cultura pode promover o aumento do comprimento dos brotos, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (ROCHA et al., 2009).

De acordo com Castro et al. (2001), as auxinas possuem função de ativar enzimas que irão agir sobre constituintes das ligações entre microfibrilas de celulose presente na parede celular, ocasionando ruptura e aumento da plasticidade, causando ao final a entrada de água nas células e aumentando a sua dimensão.

Em conjunto com as auxinas, as giberelinas promovem a síntese de enzimas, como a α -amilase, que possui função de diminuir o potencial osmótico celular através da formação de glicose a partir do amido, proteases que resultam na síntese de triptofano e formação de AIA, que aumentará a plasticidade da parede celular, além de hidrolases e lipases (CASTRO et al., 2001).

O alongamento das brotações se faz necessário durante a micropropagação, pois brotações com entrenós mais curtos torna-se um fator limitante durante o processo de enraizamento, além de que explantes menores possuem mais chances de sofrerem com processos oxidativos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

Objetivou-se estudar a germinação *in vitro* de sementes, a multiplicação e alongamento *in vitro* de explantes de Guanandi.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer os efeitos do osmocondicionamento com Nitrato de Potássio (KNO_3) na germinação de sementes de Guanandi;
- Estabelecer o melhor meio de cultura para a germinação de sementes de Guanandi *in vitro*;
- Induzir a multiplicação de gemas laterais utilizando diferentes tipos de citocininas em diferentes concentrações;
- Alongar as brotações de Guanandi utilizando diferentes concentrações de GA_3 .

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO, A. B.; ZÚÑIGA, M. E. E.; GONZÁLEZ, L. B.; CHILPA, R. R.; ÁVILA, V. M. C.; SOSA, F. C. C. Production of anti-HIV-1 calanolides in a callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 33–40, 2010.
- BENITEZ-RAMOS, R. F. & MONTESINOS-LAGOS, J. L. “Catalogo de ciem especies forestales de Honduras: distribución, propiedades y usos”. Siguatepeque: **Escuela Nacional de Ciencias Forestales**, p.200, 1988.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2.ed. New York: **Plenum**, p.445, 1994.
- BIANCHETTI, A. Tratamentos pré-germinativos para sementes florestais. In: 2º Simpósio brasileiro sobre sementes florestais, Atibaia. São Paulo: **SEMA-SP/IF**, Anais. p. 237-246, 1989.
- BITTRICH, V.; TRAD, R. J.; CABRAL, F. N.; NASCIMENTO JR, J. E.; SOUZA, V. C. Calophyllaceae *In*: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6827>>. Acesso em: 14 jun. 2014
- BRAGA, F. C.; SERRA, C. P.; JUNIOR, N. S. V.; OLIVEIRA, A. B.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, v.78, p.353-358, 2007.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Brasil com Florestas. Oportunidades para o desenvolvimento de uma economia florestal e a reestruturação necessária do setor. **Serviço Florestal Brasileiro**. Brasília, março de 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Panorama Econômico do Setor Florestal. Serviço Florestal Brasileiro. **Gerência Executiva de Planejamento Florestal**. Brasília, 2014.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Establishment, multiplication and elongation *in vitro* of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p.11-19, 2009.
- BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A. & SEEL, W.A. Free radical processes and loss of viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, p.273-279. 1992.
- CARBALLO, W. V; THOMSEN, K. A.; JOKER, D. Desiccation and storage of seeds of *Astronium graveolens* and *Calophyllum brasiliense*, two native species of Costa Rica. In: SACANDÉ, M.; JOKER, D.; DULLOO, M.E.; THOMSEN, K.A. Comparative storage biology of tropical tree seeds. Rome: **International Plant Genetic Resources Institute**, p.285-294. 2004.

CARDOSO, V. J. M. Conceito e Classificação da Dormência em Sementes. **Oecologia Brasiliensis** 13(4): p.619-631, 2009.

CARVALHO, H. DE O.; MEDEIROS, B.J.L.; SÁ, B.M. DE; ARAÚJO, J.T.C. DE; KAWAKAMI, M.Y.M.; FAVACHO, H.A.S.; CARVALHO, J.C.T. Study of dissolution profiles and desintegration of capsules containing the dried hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense*. **Revista Brasileira de**

CARVALHO, L. R.; DA SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação das sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista brasileira de sementes**, Pelotas, v.28, n.2, p.15-25, 2006.

CARVALHO, P. E. R. “Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira” – Colombo: **EMBRAPA – CNPF**; Brasília: **EMBRAPA – SPI**, p.640, 1994.

CASTRO, H. D.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. D.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. Visconde do Rio Branco, MG: **Editora Suprema**. 2001.

CASTRO, R. D. & HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. *In*: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. (orgs). Germinação: do básico ao aplicado. **Artmed**, Porto Alegre. p. 323. 2004.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H.W.M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). **Artmed**, Porto Alegre, p.51-67 2004.

CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 17–21, 2001.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, Sept. 1990.
Farmacognosia, v.23, p.194-199, 2013.

FARON, M. L. B.; PERECIN, M. B.; LAGO, A. D.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B. Temperatura, nitrato de potássio e fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliense* Choisy. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 193-199, 2004.

FILHO, J. M. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: **Fealq**, p.495, 2005.

FILHO, V. C.; SILVA, C. M.; NIERO, R. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 313–327, 2009.

FLORES, E. M. *Calophyllum brasiliense* Cambess. In: VOZZO, J. A. (Ed.). Tropical tree seed manual. Washington: **USDA Forest Service**, p. 353 - 356. 2002.

FOWLER, J. A. P. & BIANCHETTI, A. Dormência em sementes florestais. Colombo: **Embrapa Florestas**, (Documentos 40), p.27, 2000.

GEORGE, E. F. & DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture, 3. ed. vol. 1. Dordrecht: **Springer**, 2008.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology. Edington: **Exegetics**, p.574, 1996.

GIRI, C. C.; SHYMKUMAR, M.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v.18, p. 115-135, 2004.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1998.

HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; JANKOWSKY, I. P.; CHIMELO, J. P.; CAVANCANTE, A. de A.; GALINA, I. C. M.; NAGAMURA, J. C. S. "Madeiras brasileiras". Caxias do Sul: **Spectrum**, p.172, 1990.

KRAMER, J. P. & KOSWLOSKI, T. Fisiologia das árvores. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbekian**, p.754, 1972.

LABOURIAU, L. G. A germinação da semente. Washington: **OEA**, p.173, 1983.

LEITE, J. F. R. Desafio e oportunidade de implantação de política pública de valorização do Cerrado no estado de Goiás. **Boletim Goiano de Geografia**, v. 32, n. 2, p. 205-218, 2012.

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

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, p.352, 1998.

MARQUES, M. C. M. & JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botânica Brasília**, Brasília, v.14, n.1, p.113-120, 2000.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Efeito da escaurificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* D. C.). **Ciência & Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, 2007.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. *In*: BARRUETO CID, LP. (Ed.). Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: **Embrapa/Cenagen**, p.83 – 105, 2000.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

NOLDIN, V.F.; ISIAS, D.B.; FILHO, V. C. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Nova Química**, v.29, p.549-554, 2006.

PAIM, A.F. Contribuições para a Micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC) MATTOS. **Universidade Federal de Santa Maria**, dissertação de Mestrado, 2011.

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

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicação da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. 2. ed. **Brasília**, 1985.

PREECE, J. E. & SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In*: Micropropagation. **Springer Netherlands**, p. 71-93. 1991.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P. DE; FACHINELLO, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto "TSUKUBA 1"(Prunus persica L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 656–663, 2009.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 498-500, 2007.

ROACH, T., BECKETT, R.P., MINIBAYEVA, F.V., COLVILLE, L.; WHITAKER, C. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. **Plant, Cell and Environment**. 33:59–75. 2010.

ROBERTS, E. H. P Predicting the storage life of seeds. **Seed Science & Technology**, London, v. 1, n. 1, p. 499-514, Jan. 1973.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.1, p.69-74, 2009.

SANTOS, S. R. G. dos. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith e Downs (Branquilha). Dissertação Mestrado em Agronomia. Produção e Tecnologia de Sementes - **Universidade Estadual Paulista**, Jaboticabal, SP, p.76, 1999.

SILVA, R. C. DA; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Técnicas para superação da dormência de sementes de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 9, p. 719–727, 2014.

SINF. Sistema Nacional de Informação Florestal. Produção Florestal. Disponível em <<http://www.florestal.gov.br/snif/producao-florestal/cadeia-productiva>> Acesso em 30/11/2015

SOUZA, A. V. & PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; DONINI, L. P.; RIBEIRO, M. F. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, v. 38, n.7, p. 2046-2048, 2008.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª ed. **Instituto Plantarum**: Nova Odessa, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4ª ed. **Porto Alegre**, p. 819, 2004.

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

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007.

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

CAPÍTULO 2 – OSMOCONDICIONAMENTO E MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE GUANANDI

RESUMO – O Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) é uma espécie nativa do Brasil, que há aproximadamente 10 anos vem sendo utilizado em plantios comerciais. Porém, a curta longevidade das sementes restringe sua utilização, causando desuniformidade na produção e limitando a oferta de mudas em determinadas épocas do ano. Objetivou-se avaliar o efeito do nitrato de potássio (KNO_3) no osmocondicionamento de sementes de Guanandi e estabelecer o meio de cultura mais adequado para a germinação *in vitro*. Para o osmocondicionamento as sementes foram imersas em soluções de nitrato de potássio (KNO_3) a 0%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50% e para estabelecer o melhor meio de cultura para a germinação e manutenção de plântulas *in vitro* as sementes foram inoculadas em WPM, $\frac{1}{2}$ WPM, MS, $\frac{1}{2}$ MS e H_2O . Os parâmetros analisados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pela análise de regressão. Foi possível verificar que há uma correlação entre a porcentagem de germinação e a porcentagem de nitrato de potássio (KNO_3), mostrando que aos 30, 45 e 60 dias a equação de regressão linear explica a variável dependente (Y) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Aos 30 dias 82,86% da variação de Y são explicadas pela regressão. Aos 45 dias essa variação é de 83,5% e aos 60 dias essa variação é de 79%. Aos 15 dias os resultados não ajustaram a regressão. Aos 30, 45 e 60 dias, a porcentagem de germinação e o vigor das sementes decresceram com relação ao aumento da concentração de KNO_3 . O tratamento 50% foi fitotóxico tornando inviável a germinação das sementes. Com relação aos diferentes tipos de meio, não houve efeito significativo dos meios de cultura para a porcentagem de germinação aos 15 e 30 dias e para o índice de velocidade de emergência. Aos 15 dias a germinação não passou de 5% e aos 30 dias não foi maior que 40%. Com relação ao desenvolvimento das plântulas, a influencia dos meios de cultura também não foi significativo para nenhum dos parâmetros avaliados.

Palavras – chave: Dormência, germinação *in vitro*, nitrato de potássio, recalcitrância, tipos de meios.

CHAPTER 2 – PRIMING AND CULTURE MEDIA IN GUANANDI SEED GERMINATION

ABSTRACT – Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) is a Brazilian native species that has been used in commercial plantations. Moreover, the seed longevity restricts their commercial application by uniformity production and seedlings limited supply over the year. The aimed of this work was evaluate priming with potassium nitrate (KNO_3) in Guanandi seed germination and seedling growth and the most suitable culture medium for *in vitro* germination. For priming the seeds were immersed in potassium nitrate solutions (KNO_3) at 0%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 50% and to establish the best culture medium for germination and maintenance of *in vitro* plants, seeds were inoculated in WPM, $\frac{1}{2}$ WPM, MS, $\frac{1}{2}$ MS and H_2O . The parameters analyzed were subjected to analysis of variance and the means were compared by regression analysis. It was possible to verify that there is a correlation between the germination percentage and the percentage of potassium nitrate (KNO_3), showing at 30, 45 and 60 days from the linear regression equation explains the dependent variable (Y) at the level of 5% probability by F test at 30 days 82.86% of the variation of Y is explained by the regression. 45 days this variation is 83.5% at 60 days and this variation is 79%. At 15 days, the results did not fit the regression. At 30, 45 and 60 days, the percentage of germination and seed vigor decreased with respect to the concentration of KNO_3 . Treatment 50% was toxic impeding the germination of seeds. Regarding the different types of media, there was no significant effect of culture media for the germination percentage at 15 and 30 days and the emergency speed index. 15 days germination was no more than 5% and at 30 days was not greater than 40%. Regarding the development of seedlings, the influence of the culture media was also not significant for any of the evaluated parameters.

Key - words: Dormancy, *in vitro* germination, potassium nitrate, recalcitrance, types of medium.

2.1. INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro vem ocupando lugar de destaque na economia nacional. (SILVEIRA et al., 2001). O Guanandi é uma espécie nativa do Brasil que, desde 2005, vem sendo utilizado em plantios comerciais. Foi escolhido pelas ótimas características silviculturais e pela excelente qualidade de madeira (TROPICAL FLORA, 2011).

A produção de mudas é feita principalmente através da germinação das sementes de Guanandi, que apresentam dormência tegumentar e as sementes possuem características de recalcitrância (CARBALLO et al., 2004). A dormência tegumentar das sementes de Guanandi é imposta física e mecanicamente pela estrutura rígida que envolve o embrião. Em ambos os casos, uma vez eliminadas as barreiras, o embrião está fisiologicamente preparado para retomar seus processos metabólicos e germinar (SILVA; VIEIRA; PANOBIANCO, 2014).

No entanto, a ocorrência de adversidades ambientais entre a formação e a colheita dos frutos, tais como geadas, estiagens e problemas fitossanitários, pode provocar a diminuição na oferta de mudas, em virtude das dificuldades de manutenção de estoques de sementes (RODRIGUES et al., 2009) que apresentam comportamento recalcitrante, como as do Guanandi (CARBALLO et al., 2004), já que as sementes não suportam armazenamento por um longo período.

Essas características fisiológicas provocam a curta longevidade das sementes que restringe a sua germinação, devido à desuniformidade na produção e limitações na oferta de mudas em determinadas épocas do ano (RODRIGUES et al., 2009).

Para aperfeiçoar o estabelecimento das culturas em campo são necessárias sementes de elevada qualidade, capazes de germinar de forma rápida e uniforme nas mais diferentes condições climáticas. Muitas vezes, as condições de clima e solo não favorecem o estabelecimento uniforme das plântulas, gerando falhas no estande que comprometem a produtividade e a qualidade final do produto (PEREIRA et al., 2008). No entanto, são poucas as pesquisas voltadas para a obtenção de alternativas viáveis e práticas para a germinação uniforme ou homogênea de sementes que são recalcitrantes.

Para tal, o uso de substâncias inorgânicas como o KNO_3 e orgânicas como o polietileno glicol (PEG) por serem osmoticamente ativas, reduz o potencial hídrico da solução de embebição das sementes, e com isso permiti o controle do nível de embebição, contribuindo para a maturação acelerada do embrião e melhoria na germinação, pois supera a dormência por embrião imaturo e contribui para características de vigor das sementes (HEYDECKER; HIGGIS & TURNER, 1975). O KNO_3 e outros sais permitem melhor aeração da solução, além de serem removidas com maior facilidade das sementes, após o tratamento (PEREIRA et al., 2012).

Estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* de espécie recalcitrantes e com vários tipos de dormência são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação, como para obtenção de plântulas uniformes com qualidade genética e fitossanitária adequada. O domínio de melhores técnicas para a germinação é fundamental para embasar as avaliações de laboratório e impulsionar a comercialização das sementes de Guanandi. (SILVA; VIEIRA; PANOBIANCO, 2014).

Assim objetivou-se avaliar o efeito do nitrato de potássio (KNO_3) no osmocondicionamento de sementes de Guanandi e estabelecer o meio de cultura mais adequado para a germinação *in vitro*.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material Vegetal

Os frutos de Guanandi foram coletados de populações naturais, no município de Cássia dos Coqueiros, SP, latitude $21^\circ 16' 50''$ Sul e longitude: $47^\circ 10' 20''$ Oeste, situada a 873 metros de altitude. Os frutos foram despolidos e as sementes escarificadas manualmente (Figura 1) para remoção do tegumento.

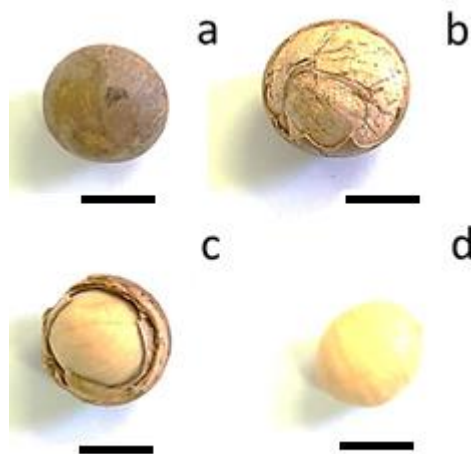


Figura 1. Sementes de Guanandi. Semente com tegumento (a). Retirada parcial do tegumento (b c). Semente escarificada manualmente (d). Barra de escala 1 cm.

2.2.2. Desinfestação das sementes

As sementes foram lavadas em água corrente por aproximadamente cinco (5) minutos. Em seguida, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar onde ficaram imersas em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) de 2 a 2,5% de cloro ativo por 20 minutos e submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada para desinfestação.

2.2.3. Meios de Cultura

Após desinfestação as sementes foram inoculadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD & MCCOWN, 1980) com 20 g L⁻¹ de sacarose, para a germinação de sementes após o osmocondicionamento com nitrato de potássio. E meio de cultura WPM, WPM com metade das concentrações de sais e 10 g L⁻¹ sacarose (½ WPM), meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com 30 g L⁻¹ de sacarose (MURASHIGE & SKOOG, 1962), e MS contendo metade da concentração dos nutrientes e 15 g L⁻¹ sacarose (½ MS) e água destilada sem nenhum tipo de nutriente (H₂O).

Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado em $5,8 \pm 1$ (com exceção da água), e solidificados com 0,7% de ágar, em seguida foram autoclavados a

120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Depois de inoculados foram mantidas em sala de crescimento a 25°C ± 2°C de temperatura, irradiância de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.2.4. Efeito do osmocondicionamento com nitrato de potássio (KNO₃) na germinação de sementes de Guanandi

As sementes foram pré-embebidas em solução de nitrato de potássio (KNO₃) nas concentrações de: 0%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50%; com tempo de exposição de 24 horas a temperatura ambiente totalizando onze (11) sendo o tratamento 0% como controle para o osmocondicionamento.

Após as 24 horas as sementes foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultura WPM.

Observações diárias foram realizadas avaliando o índice de velocidade de germinação (IVG), o índice de velocidade de emergência (IVE). Para avaliar o IVG e o IVE, a germinação foi avaliada até a estabilização, ou seja, 60 dias com objetivo de obter a taxa máxima de germinação.

A porcentagem de germinação foi avaliada aos 15, 30, 45 e 60 dias. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula e foi considerada emergência a protrusão da parte aérea ($\pm 0,2$ mm) As sementes que apresentam somente protrusão da parte aérea foram consideradas plântulas anormais.

Aos 30 e 60 dias foram avaliados: número de nós; número de gemas; número de folhas; número de raízes, o comprimento da plântula e da raiz principal.

2.2.5. Efeitos de diferentes meios de cultura na germinação de sementes de Guanandi

As sementes escarificadas foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultura WPM, $\frac{1}{2}$ WPM, MS, $\frac{1}{2}$ MS e H₂O totalizando cinco (5) tratamentos. Em seguida foram mantidas em sala de crescimento por 30 dias.

Observações diárias foram realizadas, avaliando o índice de velocidade de germinação (IVG), o índice de velocidade de emergência (IVE) e a porcentagem de germinação após 15 e 30 dias. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula e foi considerada emergência a protrusão da parte aérea ($\pm 0,2$ mm). Aos 30 dias foram avaliados: o número de nós, o número de folhas, o comprimento da plântula e da raiz principal.

2.2.6. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso (DIC), com 20 sementes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F e as médias ajustadas pela análise de regressão utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Efeito do osmocondicionamento com nitrato de potássio (KNO_3) na germinação de sementes de Guanandi

Pela figura 2 é possível verificar que há uma correlação entre a porcentagem de germinação e a porcentagem de nitrato de potássio (KNO_3), mostrando que aos 30, 45 e 60 dias a equação de regressão linear explica a variável dependente (Y) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Mas para saber se é uma correlação forte é preciso analisar o (R^2) que representa a porcentagem da variação Y em que está sendo explicada pela equação de regressão. Quanto maior o R^2 melhor ela é explicada. Neste caso o valor de R^2 aos 30 dias é de 0,8286. O que significa que 82,86% da variação de Y são explicadas pela regressão já que a variável Y é dependente da variável X. Aos 45 dias essa variação é de 83,5% já que o R^2 é de 0,835. E aos 60 dias essa variação de Y é de 79% uma vez que o valor de R^2 foi de 0,79. Aos 15 dias os resultados não ajustaram a regressão entre as variáveis Y e X (Dados não mostrados).

Aos 30 dias, a porcentagem de germinação decresceu com relação ao aumento da concentração de KNO_3 . A porcentagem de germinação do controle foi de 76%, e chegando a 0% na concentração de 50% de KNO_3 .

Após 45 e 60 dias o efeito do KNO_3 continuou apresentando o mesmo comportamento, com redução na germinação nas sementes tratadas com as maiores concentrações. O tratamento 50% foi fitotóxico tornando inviável a germinação das sementes.

Nesse caso a análise mostrou que há uma correlação e é possível explicar a variação da porcentagem de germinação por meio da concentração de KNO_3 a partir dos 30 dias, mostrando que de acordo com que se aumenta a concentração de KNO_3 a porcentagem de germinação é diminuída (Figura 2).

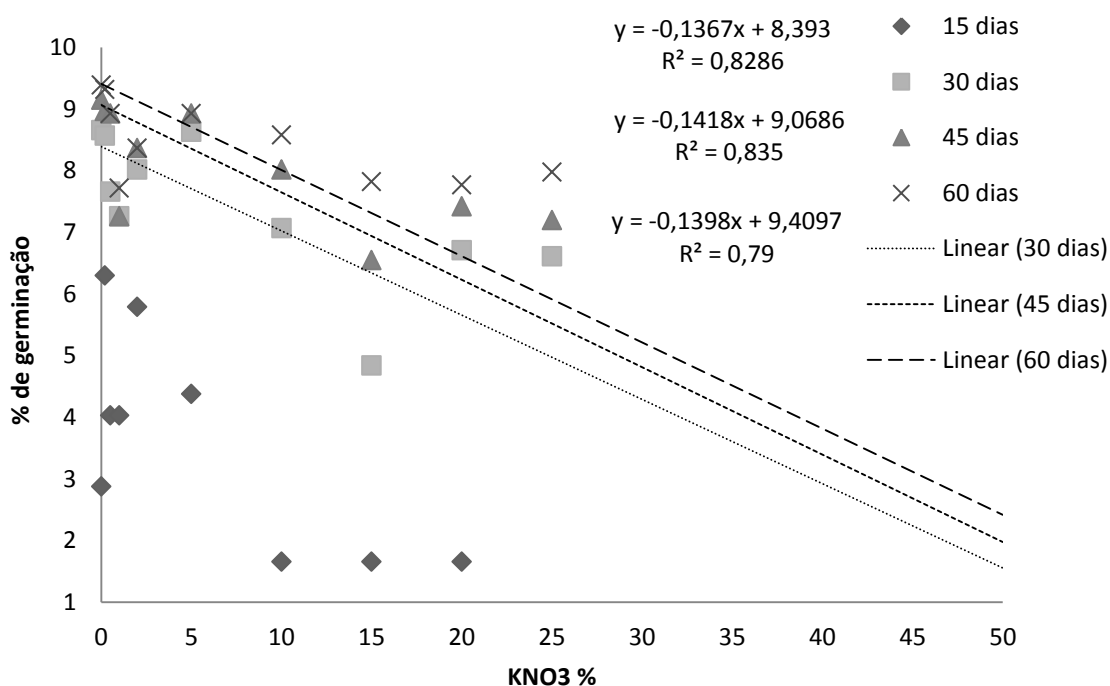


Figura 2. Análise de regressão da porcentagem de germinação, aos 15, 30, 45 e 60 dias, de sementes de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

Segundo Mwase & Mvula (2013), estimuladores químicos, como o KNO_3 aumentam a germinação por criar um balanço hormonal na semente que promove a germinação, reduzindo os hormônios que a inibem como o ácido giberélico, no entanto, as sementes de Guanandi podem ser sensíveis ao KNO_3 .

Os tratamentos com concentrações mais elevadas apresentaram inibição da germinação provavelmente devida à perda da viabilidade celular causada por danos celulares até a morte das células (concentração 50%). Para sementes de *Salvia cyanescens*, Yücel & Yilmaz (2009) confirmaram o efeito inibitório nas concentrações acima de 2% do KNO_3 na germinação.

Shanmugavalli; Renganayaki; Menaka (2007) mostraram que as sementes de sorgo embebido em nitrato de 0,5% e 1% de potássio (KNO_3) melhorou a germinação até 44%, mas novamente não foi um sucesso completo.

Assim como a porcentagem de germinação, o IVE e o IVG possuem uma tendência linear decrescente com uma redução na velocidade de germinação e emergência de acordo com o aumento da concentração de KNO_3 . 87,51% da equação do IVE e 89,97% da equação do IVG são explicadas pelo ajuste na análise de regressão mostrando que há uma correlação forte (Figura 3).

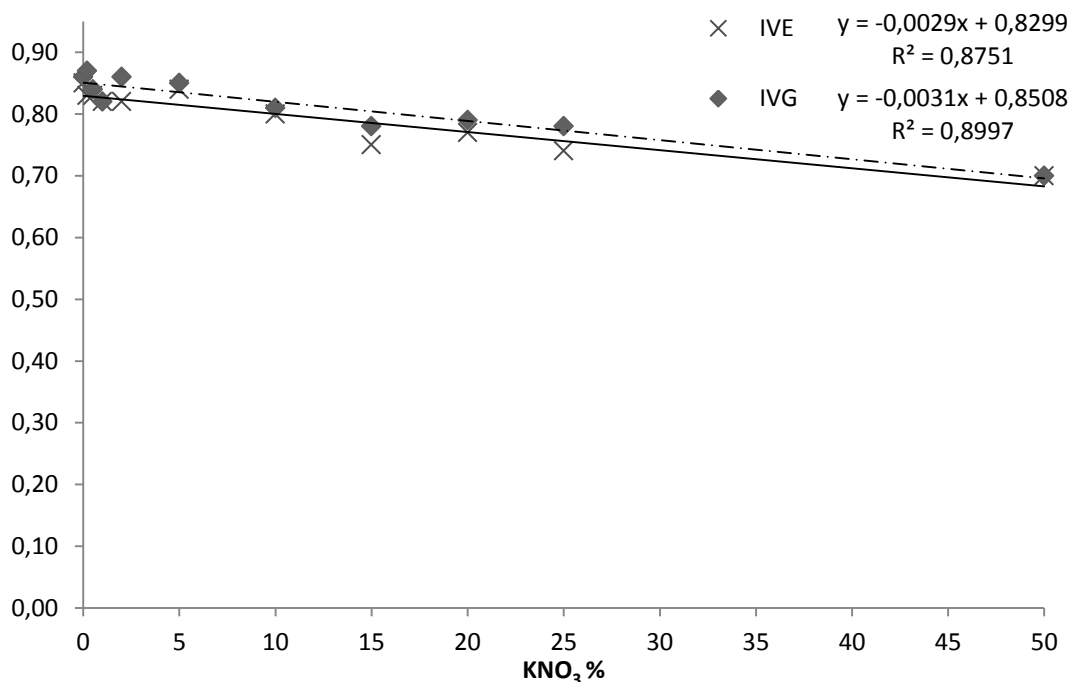


Figura 3. Análise de regressão do Índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

O KNO_3 é o químico mais utilizado para promover a germinação (GASHI et al., 2014). Essa solução é recomendada pela Regra de Análises de Sementes (BRASIL, 2009), pela Association of Official Seed Analysts (AOSA) e

pela International Seed Testing Association (ISTA) para testes de germinação de muitas espécies (COPELAND & MC DONALD, 1995).

O Nitrato no geral (como o KNO_3) claramente estimula a germinação de sementes dormentes (ALBORESI et al., 2005). No entanto, para sementes de Guanandi esse efeito não foi observado. O KNO_3 também não estimulou a germinação de *Tulipa kaufmanniana* Regel. nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3% (ROUHI; SHAKARAMI; AFSHARI, 2010).

Amri (2010) estudando o efeito do pré-tratamento com soluções de nitrato de potássio (KNO_3) na germinação de sementes de *Terminalia sericea* Buch ex Dc. Seeds não obteve resultados significativos nos tratamentos com 0, 2, 4, 6 e 8% de KNO_3 . Ainda segundo Amri (2010) mesmo não sendo significativa, evidências a partir dos resultados mostraram diferenças insignificantes no efeito do regime de imersão de diferentes concentrações de KNO_3 na porcentagem de germinação das sementes. A porcentagem de germinação foi reduzida com a concentração aumentada.

A figura 4 mostra que houve um ajuste do contraste na análise de regressão para o tamanho das plântulas, mostrando que 89,54% das médias são explicadas pela equação aos 30 dias e que 92,13% são explicadas aos 60 dias mostrando que o ajuste das médias é forte. Isso mostra que o vigor das sementes no crescimento das plântulas possuem uma tendência linear decrescente com o aumento das concentrações de KNO_3 .

Quanto ao número de nós (Figura 5) e o número de gemas (Figura 6) esse ajuste é ainda mais contrastante, uma vez que as médias mostraram um ajuste de 90,72% e 91,08% respectivamente aos 30 dias e de 94,16% e 93,95% respectivamente aos 60 dias. Isso confirma ainda mais que com o aumento da concentração de nitrato, o vigor das sementes e o desenvolvimento das plântulas são diretamente afetados.

Com relação ao número de folhas (Figura 7) e tamanho da raiz (Figura 8) não foi diferente dos demais parâmetros avaliados. Houve um ajuste de 79,73% para o contraste do número de folhas e de 87,96% no tamanho da raiz aos 30 dias. E esse ajuste foi de 88,2% para o número de folhas e de 89,17% para o tamanho da raiz aos 60 dias. Esse ajuste mostra que em todos os parâmetros avaliados a resposta sempre foi linear decrescente.

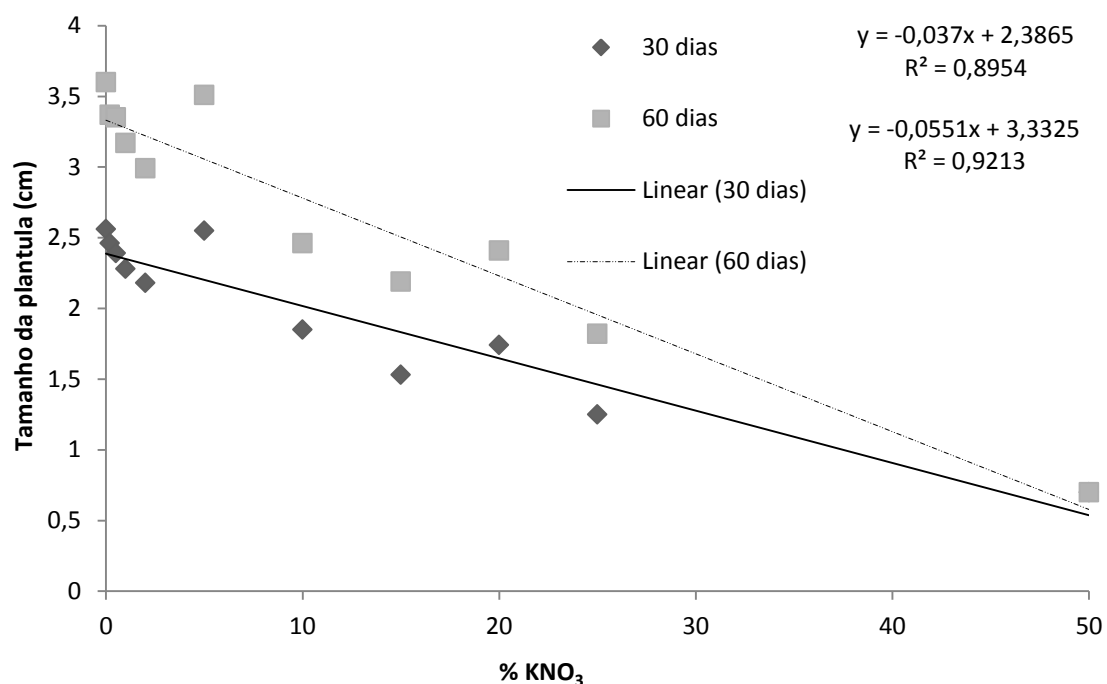


Figura 4. Análise de regressão do crescimento das plântulas Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

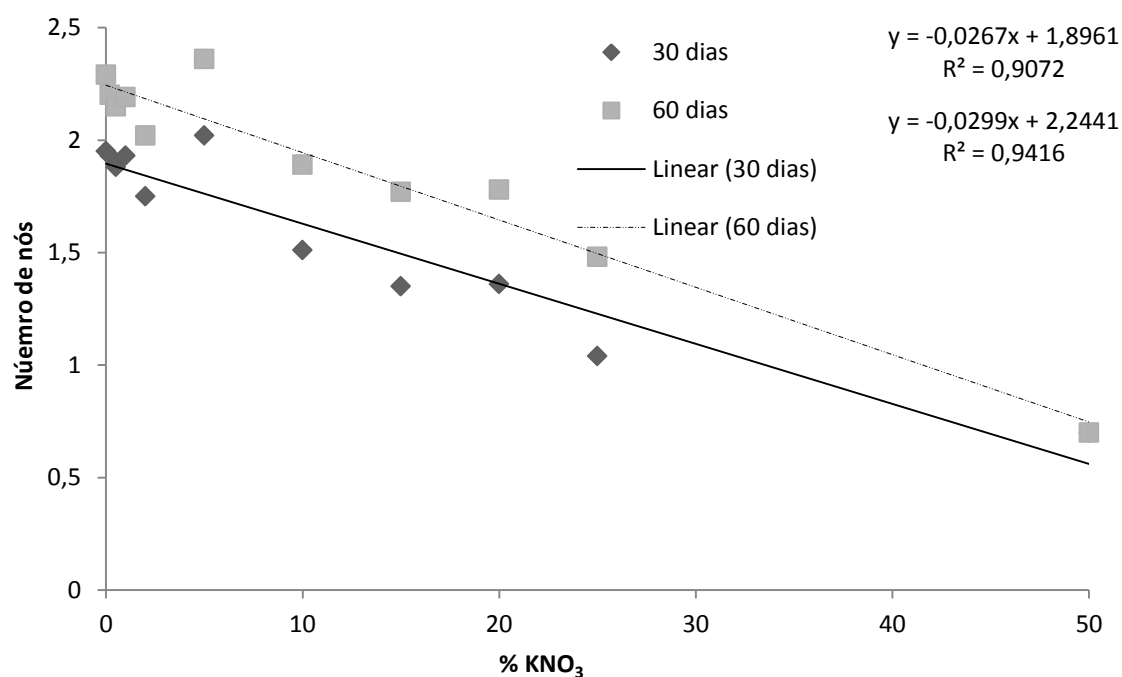


Figura 5. Análise de regressão do número de nós no crescimento de plântulas Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

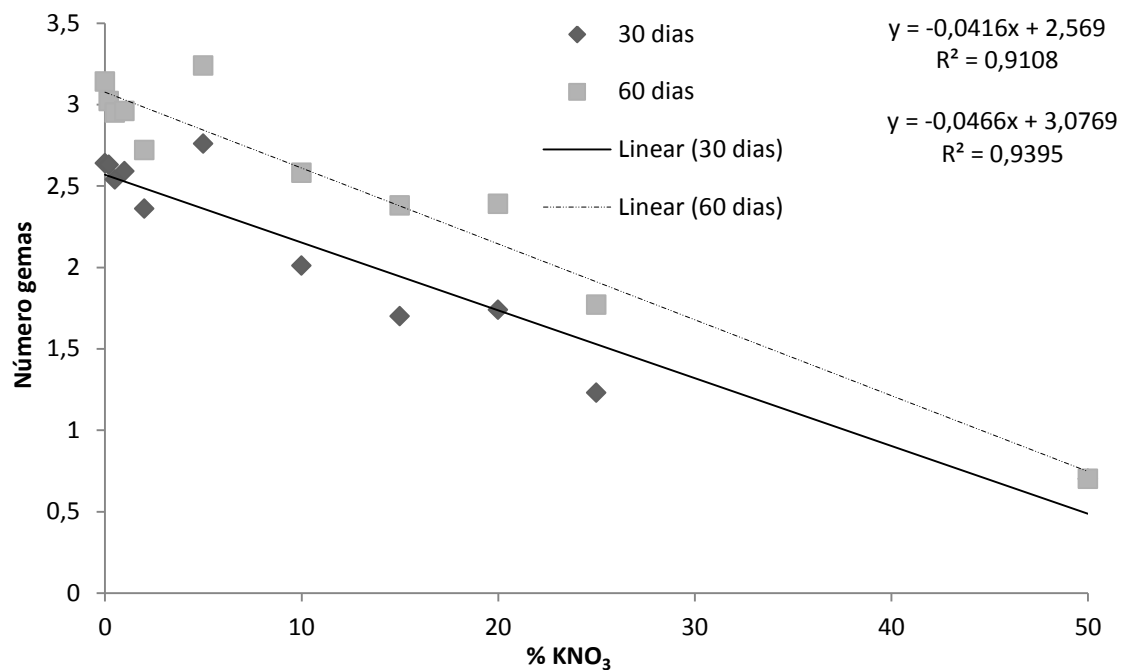


Figura 6. Análise de regressão do número de nós no crescimento de plântulas Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

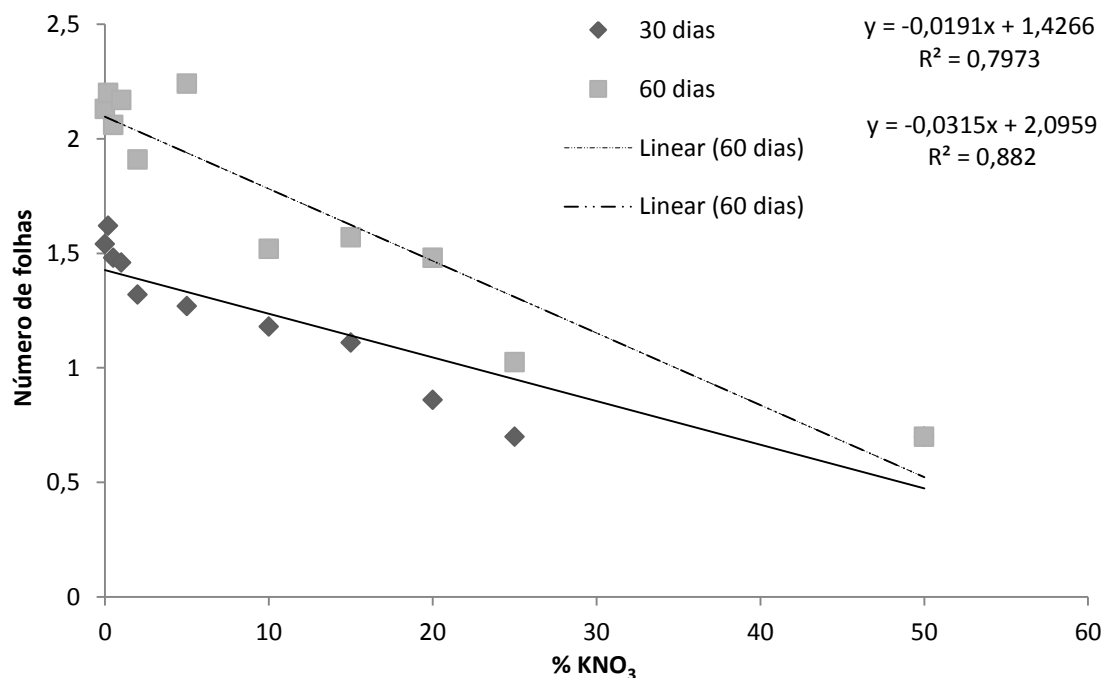


Figura 7. Análise de regressão do número de folhas no crescimento de plântulas Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

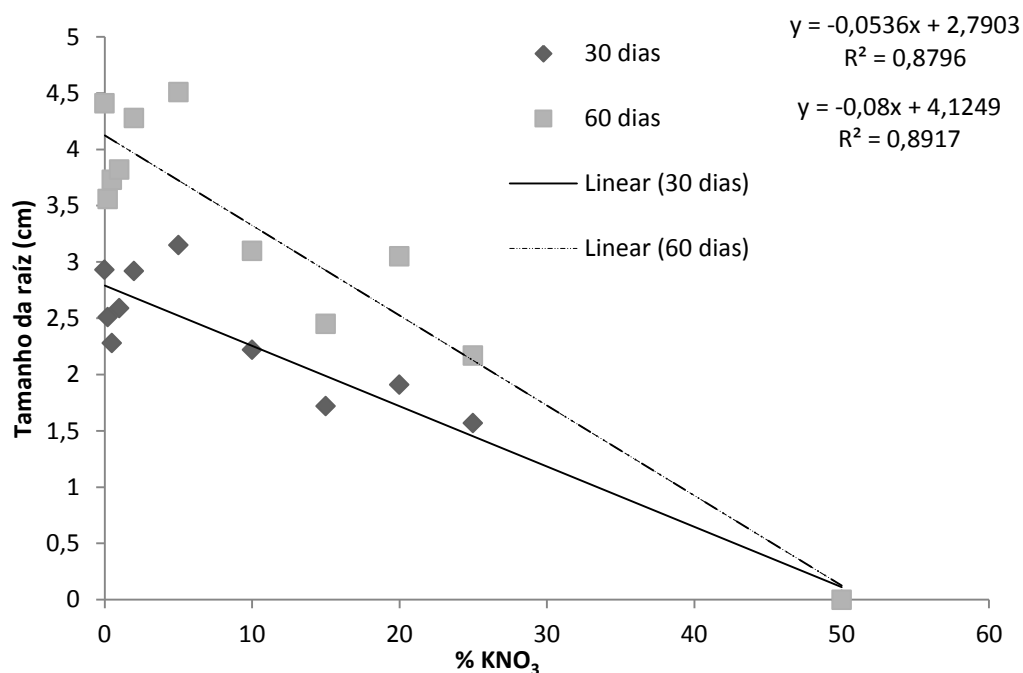


Figura 8. Análise de regressão do crescimento da raiz de plântulas Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) pré-embebidas com diferentes concentrações de KNO_3 .

O efeito do KNO_3 no vigor das sementes refletiu diretamente no desenvolvimento das plântulas, pois as sementes tratadas com concentrações altas de KNO_3 originaram plântulas com menores taxas de crescimento ou no máximo manteve todas as avaliações.

Isso mostra que economicamente não seria viável a utilização de nitrato já que o mesmo não apresentou efeito positivo para a aceleração da germinação, mas foi interessante para saber que a não utilização de nitrato de potássio diminui os custos de produção de plântulas de Guanandi através de suas sementes.

Em experimentos anteriormente realizados, com sementes coletadas em outras épocas e locais, houve uma homogeneização na germinação na concentração de 25% de KNO_3 , verificando-se que para sementes recalcitrantes a época de coleta pode estar relacionada com o vigor das sementes.

As sementes osmocondicionadas com KNO_3 apresentam uma tendência linear decrescente com relação ao aumento da concentração principalmente a partir dos 30 dias e esse comportamento se mantém até os 60 dias.

Todos os trabalhos encontrados em que se tratava de osmocondicionamento ou condicionamento osmótico com algum tipo de solução, os autores só relataram os efeitos na germinação, não sendo relatados os efeitos no crescimento das plântulas, os números de nós e gemas, o número de folhas e nem o tamanho de raiz dificultando assim a comparação dos resultados com outros autores.

2.3.2. Efeitos de diferentes meios de cultura na germinação de sementes de Guanandi

Não houve efeito significativo dos meios de cultura para a porcentagem de germinação para os 15 e 30 dias para o índice de velocidade de emergência. Observou-se que aos 15 dias a germinação não passou de 5% e que aos 30 dias não foi maior que 40% (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação e índice de velocidade de emergência de sementes de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) inoculadas em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Porcentagem de Germinação (15 dias)	Porcentagem de Germinação (30 dias)	Índice de Velocidade de Emergência
Água	5% a	40% a	0.097 a
MS	0% a	35% a	0.072 a
½ MS	0% a	35% a	0.099 a
WPM	0% a	15% a	0.037 a
½ WPM	5% a	15% a	0.048 a

Letras iguais na coluna não diferem entre si a 0,5% de significância pelo teste Tukey.

Almeida et al., (2013) observaram que na ausência de sais, ou seja, apenas água e no meio ½ MS com 30 g L⁻¹ de sacarose houve maior porcentagem de germinação de plântulas normais de Jenipapeiro. Resultados

semelhantes aos de Almeida et al., (2013) foram observados por Léo et al., (2008b) para a germinação *in vitro* de moringa nativa do Norte da Índia e por Léo et al., (2007) para germinação de Mangaba nativa da região do Nordeste. Em ambos os meios com apenas água e ½ MS também obtiveram melhores resultados, o que não foi observado para *Calophyllum brasiliense*.

Com relação ao desenvolvimento das plântulas, a influência dos meios de cultura também não foi significativo para nenhum dos parâmetros avaliados. O tamanho do caule, o número de gemas, o número de folhas e o tamanho da raiz não diferiram em nenhum dos tratamentos (Tabela 2).

Barin et al., (2012) observou que os meios com apenas água proporciona 100% de germinação *in vitro* e o meio ½ MS maior desenvolvimento em altura de plântulas de cambuzeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg) diminuindo assim os custos de produção, por demandarem menor concentração dos sais para o desenvolvimento de plântulas.

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas influenciam no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (ALMEIDA et al., 2013), o que não observamos para *Calophyllum brasiliense*.

Tabela 2. Crescimento das plântulas de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) 30 dias após inoculadas em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Tamanho do caule (cm)	Número de gemas	Número de folhas	Tamanho da raiz (cm)
Água	4,95 a	2,40 a	1,5 a	1,78 a
MS	2,69 a	2,35 a	1,25 a	1,27 a
½ MS	3,18 a	2,70 a	1,50 a	1,73 a
WPM	1,67 a	1,20 a	0,65 a	1,41 a
½ WPM	1,44 a	1,30 a	0,65 a	1,51 a

Letras iguais na coluna não diferem entre si a 0,5% de significância pelo teste Tukey.

Segundo Dodd & Donovan (1999), a presença de uma concentração maior ou menor de sais, ou outros compostos osmoticamente ativos, no meio de germinação, levando-se em consideração a espécie e o potencial osmótico de suas sementes, poderá ser o fator responsável na adequada hidratação destas. Logo, poderá viabilizar ou inviabilizar a ocorrência do processo germinativo, a partir de uma embebição adequada ou não.

De acordo com Almeida et al., (2013) há um menor comprimento da parte aérea dos explantes mantidos na ausência de sais e sacarose quando comparado com o meio $\frac{1}{2}$ MS com 30 g L^{-1} de sacarose. Apesar do baixo custo proporcionado pelo meio na ausência de sais, o meio $\frac{1}{2}$ MS com 30 g L^{-1} de sacarose também é promissor pelo vigor apresentado pelas plântulas, pois, na ausência de sais houve um menor comprimento da parte aérea, mesmo esses dados não apresentando diferença significativa após os testes estatísticos realizados pelos autores.

Com relação ao Guanandi, a presença de sais e sacarose no meio não é necessária, já que o mesmo não apresentou diferença no vigor apresentado pelas plântulas, mostrando assim que é possível diminuir os custos de produção, por não demandarem necessidade de concentração de sais para o seu desenvolvimento.

Considerando que os cotilédones têm a função de armazenar substâncias de reservas até a plântula tornar-se autotrófica, a presença de solução nutritiva no meio externo torna-se dispensável para o crescimento inicial de plântulas (LEDO et. al., 2008a). Isso explica o motivo de em ambos os experimentos realizados no presente trabalho: o tratamento controle do osmocondicionamento e apenas água nos diferentes tipos de meio, terem apresentado resultados superiores ou iguais aos demais tratamentos, em todos os parâmetros analisados. Outra informação que pode explicar esses resultados são os cotilédones de Guanandi que são proporcionalmente grandes.

Com isso, os custos com a produção de mudas de Guanandi são reduzidos, uma vez que não é necessária a utilização de meios pra sua germinação e desenvolvimento.

2.5. CONCLUSÃO

Sementes tratadas com nitrato de potássio (KNO_3) têm sua germinação e seu vigor reduzido com o aumento da concentração dos sais no osmocondicionamento.

O tratamento controle foi igual aos demais tratamentos em todos os parâmetros analisados. Se tornando melhor por não demandar custo na sua produção.

O meio de cultura com ausência de sais são os mais propícios para a germinação e desenvolvimento uma vez que não diferiu dos demais meios diminuindo assim o custo de sua produção.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

ALBORESI, A.; GESTIN, C.; LEYDECKER, MT.; BEDU, M.; MEYER, C.; TRUONG HN. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Cell. Environ.** v. 28, n. 4, p. 500-512, 2005.

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.** vol. 9, n. 10. 2013

AMRI, E. Germination of *Terminalia sericea* Buch ex Dc. seeds: effect of temperature regime, photoperiod, gibberellic acid and potassium nitrate. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 8, p. 722-727, 2010.

BARIN, L. B.; LÉDO, A. S.; SILVA, A. V. C. DA. Efeito de Diferentes Meios de Cultura na Germinação *In Vitro* do Cambuzeiro. III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas. **Embrapa Brasília DF**, p. 57 – 60, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Coordenação de Laboratório Vegetal – CLAV, **Departamento Nacional de Defesa Vegetal**, p. 398, 2009.

CARBALLO, W. V; THOMSEN, K. A.; JOKER, D. Desiccation and storage of seeds of *Astronium graveolens* and *Calophyllum brasiliense*, two native species of Costa Rica. In: SACANDÉ, M.; JOKER, D.; DULLOO, M.E.; THOMSEN, K.A. Comparative storage biology of tropical tree seeds. Rome: **International Plant Genetic Resources Institute**, p.285-294. 2004.

COPELAND, L. O. & MCDONALD, M. B. Principles of seed science and technology. 3.ed. New York: **Chapman & Hall**, p. 409,1995.

DODD, G. L. & DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **American Journal of Botany**, v.86, n.8, p.1146-1153, 1999.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

GASHI, B.; ABDULLAI, K.; MATA, V.; KONGJIKA, E. Effect of gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 20, p. 4537 - 4542, 2014.

HEYDECKER, W.; HIGGIS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.3, n.3, p.881-888, 1975.

LÉDO, A. S.; BLANK A. F.; BARBOZA S. B. S. C.; RANGEL M. S. A.; LEDO C. A. S. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.1- 5, 2008.

LÉDO, A. S.; RANGEL, M. S. A.; FREIRE, K. C. S.; MACHADO, C. A.; OLIVEIRA, L. F. M.; Propagação sexuada *in vitro* de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 39 Embrapa**. Aracaju, SE 2008

LÉDO, A. S.; VIEIRA G. S. S.; BARBOZA S. B. S. C.; JUNIOR J. F. S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.989-993, 2007

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

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v. 15, n.3, p. 473 - 497, 1962.

MWASE, W. F. & MVULA, T. Effect of seed size and pre-treatment methods of *Bauhinia thonningii* Schum. on germination and seedling growth. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 26, p. 5143-5148, 2013.

PEREIRA, M. D.; DIAS, D. C. F.; DIAS, L. A. DOS S.; ARAÚJO, E. F. Germinação e vigor de sementes de cenoura osmocondicionadas em papel umedecido e solução aerada. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, nº 2, p.137-145, 2008

PEREIRA, M. D.; SOARES, E. R.; LOPES, J. C.; BORGES, E. E. de L. e. Condicionamento osmótico de sementes de cubiu. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 25, n. 3, p. 12-17, jul.-set., 2012

RODRIGUES, M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; MARTINOTTO, C.; SILVA JR. J. M. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**. Viçosa, v.33, n.1, p.21- 26, 2009.

ROUHI, H. R. SHAKARAMI, K. AFSHARI R. T. Seed treatments to overcome dormancy of waterlily tulip (*Tulipa kaufmanniana* Regel.). **Australian Journal of Crop Science**. 4(9) p. 718 - 721. 2010.

SHANMUGAVALLI M., RENGANAYAKI P.R., MENAKA C. Seed dormancy and germination improvement treatments in fodder sorghum. **Int Crops Res Inst Semi-Arid Tropics**. v.3, p. 1-3, 2007

[

SILVA, R. C. DA.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, N. Técnicas para superação da dormência de sementes de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.49, n.9, p.719-727, set. 2014

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; SGARBI, F.; MUNIZ, M. R. A. Seja o doutor do seu eucalipto. Arquivo do agrônomo - nº 12. POTAFOS. **Informações agronômicas** - nº 93 - março/2001.

TROPICAL Flora Reflorestadora – *Calophyllum brasiliense* e suas características. Disponível em: <<http://www.tropicalflora.com.br/pt/reflorestamento/og.jsp>>. Acesso em: 12 jun. 2015.

YÜCEL, E. & YILMAZ, G. Effects of different alkaline metal salts (NaCl, KNO₃), acid concentrations (H₂SO₄) and growth regulator (GA₃) on the germination of *Salvia cyanescens* Boiss. & Bal. Seeds. G.U. **Journal of Science** v.22 n.3 p.123-127. 2009.

CAPÍTULO 3 – MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO DE SEGMENTOS NODAIS DE GUANANDI

RESUMO – A micropropagação representa uma alternativa para produção de mudas em situações onde há baixo percentual de emergência, a semente é insumo limitante, sendo difícil o processo de obtenção de mudas através de sementes. Uma das formas de estimular o alongamento das brotações é por meio da adição de Ácido Giberélico (GA_3) ao meio nutritivo. Objetivou-se com este trabalho a multiplicação e alongamento *in vitro* de *Calophyllum brasiliense* Cambes. Para a multiplicação utilizou-se diferentes concentrações de, 6-benzilaminopurina (BAP) (2; 4,4; 8 e 16 μM), cinetina (CIN) (4, 6, 8 e 16 μM), 6- γ - γ -(dimetilalilamino)-purina (2-iP) (8 e 16 μM) e tidiazuron (TDZ) (0,91; 2,27; 4; 8 e 16 μM) e um tratamento sem nenhum tipo de citocinina como testemunha, para o alongamento das multiplicações foram utilizados diferentes concentrações de GA_3 (0, 5, 10 e 20 μM). Os tratamentos de multiplicação não apresentaram diferença significativa para o tamanho médio das brotações, número médio de gemas e o número de folhas aos 30 e 60 dias. Aos 30 dias, os explantes de Guanandi cultivados em meio de cultura WPM, não apresentaram interação entre as diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3) e as condições de luminosidade. Com relação às diferentes concentrações de GA_3 , nas diferentes condições de luminosidade os explantes mantidos na luz apresentou maior tamanho médio de brotos, maior numero de brotos e folhas e menor taxa de oxidação comparada com os mantidos no escuro.

Palavras – chave: Citocininas, giberelina e propagação *in vitro*.

CHAPTER 3 – MULTIPLICATION AND STRETCHING NODAL SEGMENTS OF GUANANDI

ABSTRACT – Micropropagation represents an alternative to produce seedlings of plants that presents seeds with low emergence percentage, the seeds production is low. Vegetative propagation techniques are important to get genetically uniform plant material, suitable for industrial processes. One way to stimulate shoots growth is through the addition of gibberellic acid (GA₃) to the culture medium. The aim of this work was to establish protocols for *in vitro* multiplication and elongation of *Calophyllum brasiliense* Cambess. For the multiplication were used different concentrations of BAP (2; 4,4, 8 and 16 µM), CIN (4, 6, 8 and 16 µM), 2-iP (8 and 16 µM) and TDZ (0.91, 2.27, 4, 8 and 16 µM) and treatment without any cytokinin as a control. For the elongation were used different concentrations of GA₃ (0, 5, 10 and 20 µM). The multiplication of treatment showed no significant difference in the average size of the shoots, average number of buds and number of leaves at 30 and 60 days. At 30 days, the explants Guanandi cultured in WPM medium showed no interaction between the different concentrations of gibberellic acid (GA₃) and lighting conditions. With regard to different concentrations of GA₃, in different lighting conditions the explants kept in light showed higher average size of buds, the greater number of shoots and leaves and smaller oxidation rate compared to those kept in the dark.

Key - words: Cytokinins, gibberellin and *in vitro* propagation.

3.1. INTRODUÇÃO

O Guanandi (*Calophyllum brasiliensis* Cambeáedes) é uma espécie florestal nativa do Brasil e de elevada importância econômica, devido à alta qualidade da madeira e as propriedades medicinais (BRENZAN et al., 2012). No entanto, a propagação do Guanandi é realizada através da germinação de semente que possuem reduzida taxa de germinação (XAVIER et al., 2003).

A micropropagação representa uma alternativa para produção de mudas em situações onde se deseja obter material vegetal geneticamente uniforme, adequado a processos industriais (OLIVEIRA et al., 2003). O uso da cultura de tecidos para a propagação de plantas é a aplicação mais amplamente utilizada desta tecnologia (SMITH, 2000).

O sucesso do cultivo *in vitro* está diretamente relacionado com a manipulação isolada ou combinada de reguladores de crescimento. Segundo Melo et al. (2001), o cultivo *in vitro* sem reguladores de crescimento é quase impraticável, e a adição destes aos meios de cultivo desempenha a função de suprir prováveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes. Para o uso prático da micropropagação é necessário aperfeiçoar as condições de cultivo para cada espécie ou genótipo. Dentre os fatores que mais influenciam a maximização do potencial genotípico *in vitro*, estão as auxinas e as citocininas (ROGALSKI et al., 2003).

A utilização de reguladores de crescimento, como as citocininas, é indispensável para indução de divisão celular, quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (JARDIM et al., 2010).

Um dos reguladores de crescimento mais comumente utilizados na fase de multiplicação é a 6-benzilaminopurina (BAP) (FRÁGUAS et al., 2004), e é a que proporciona, em geral, os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de diversas espécies (SANTOS et al., 2006), além de ser economicamente mais viável que outras fontes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ROCHA et al., 2009). Existem outras citocininas que também são utilizadas na multiplicação como o thidiazuron (TDZ) que tem sido utilizado para a multiplicação de gemas axilares de espécies lenhosas durante a micropropagação (GRAÇA et al., 2001).

Após o processo de multiplicação é necessário o alongamento das brotações formadas para que se evite a oxidação desses explantes por serem muito pequenos. Uma das formas de estimular o crescimento e alongamento dessas brotações é por meio da adição de Ácido Giberélico ao meio nutritivo e o mais utilizado é o GA₃, o qual promove o aumento do comprimento das brotações, pelo estímulo da divisão e alongamento das células (MÉTRAUX, 1987).

Um dos fatores que afeta o alongamento *in vitro* de brotações está relacionado ao efeito residual de BAP, utilizado durante a fase de multiplicação de gemas em subculturas sucessivas (GRATTAPAGLIA et al., 1987). Outro fator é a produção de compostos fenólicos que é o problema principal do cultivo *in vitro* de plantas lenhosas (GEORGE et al., 2008), pois reduz muito seu potencial de estabelecimento e propagação *in vitro*.

Assim, objetivou-se a multiplicação e alongamento *in vitro* de explantes de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess.).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material Vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí.

Para o experimento de multiplicação foram utilizados segmentos nodais, com cerca de 1 cm de comprimento, contendo um par de gemas axilares excisados de plântulas germinadas *in vitro*.

No experimento de alongamento foram utilizados os explantes oriundos da multiplicação *in vitro* do experimento anterior após ficarem 15 dias em meio de cultura sem reguladores para limpeza dos explantes.

Os experimentos de multiplicação foram feitos simultaneamente com os de germinação, em função da recalcitrância das sementes não sendo esperado o resultado de melhor meio de cultura para esses experimentos.

3.2.2. Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas e indução de brotações em gemas axilares de Guanandi

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura Wood Plant Medium WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 1 g L⁻¹ de PVP e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina BAP (2; 4,4; 8 e 16 µM), Cinetina CIN (4, 6, 8 e 16 µM), 6-γ-γ-(dimetilalilamino)-purina 2-iP (8 e 16 µM) e tidiazuron TDZ (0,91; 2,27; 4; 8 e 16 µM) e um tratamento sem nenhum tipo de citocinina como controle, com todos os tratamentos isolados não tendo nenhuma interação entre as citocininas, totalizando 15 tratamentos com 20 repetições cada. O pH das soluções foram ajustado para 5,8± 1 e, posteriormente autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C.

Aos 30 e aos 60 dias foram avaliados o tamanho médio da brotação, número de folhas e o número médio de gemas em cada brotação.

O experimento foi distribuído por delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F e as médias comparadas Teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.2.3. Efeito do GA₃ no alongamento de brotações

Os explantes oriundos da multiplicação *in vitro* foram subcultivadas durante 15 dias em meio básico Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD & MCCOWN, 1980) antes de se iniciar os tratamentos, a fim de se retirar efeitos residuais de reguladores de crescimento que outrora eram presentes. Em seguida, os explantes foram inoculados no meio WPM básico suplementado de PVP (polivinilpirrolidona) (1,0 g.L⁻¹), sacarose (20 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹) e com ácido giberélico (GA₃) utilizadas nas concentrações de 0µM, 5 µM, 10 µM ou 20 µM totalizando 4 tratamentos com 20 repetições cada, e tiveram seu pH

ajustado em $5,8 \pm 1$, antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos.

Os tratamentos foram feitos duplicados para que um fosse mantido constantemente no escuro a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e o outro mantido em sala de crescimento a 25°C com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Aos 30 e aos 60 dias foi avaliado o tamanho médio dos brotos, número de brotos, número de folhas e porcentagem de oxidação.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso (DIC), com 20 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F e as médias comparadas Teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas e indução de brotações em gemas axilares de Guanandi

Os tratamentos não apresentaram diferença significativa e as médias estão apresentadas na Tabela 1 para o tamanho médio das brotações, número médio de gemas e o número médio de folhas aos 30 dias.

Com relação aos números de gemas as variações foram de 1,8 a 2,65 isso quando comparadas cada tipo de citocinina em cada concentração. As brotações tiveram seu tamanho médio variando entre 0,3 e 0,54 cm. O número de folhas variou entre 0 e 0,6. O tratamento suplementado com $4 \mu\text{M}$ de CIN, não foi encontrada nenhuma folha formada aos 30 dias.

Segundo George e Debergh (2008), segmento nodal é o tipo mais simples de explante, requerendo apenas que ocorra o desenvolvimento das gemas. No caso de plantas lenhosas, a utilização de segmentos nodais é indicada a fim de estimular o desenvolvimento das gemas e contornar a recalitrância das sementes da maioria destas espécies, eliminando problemas associados à dormência, crescimento sazonal e desenvolvimento lento (SMITH, 2000).

Tabela 1. Tamanho médio de brotação (cm), número médio de gemas e número médio de folhas em explantes de Guanandi cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de diferentes tipos de citocininas aos 30 dias.

Citocininas	Concentração (μM)	Tamanho médio de brotação (cm)	Número médio de gemas	Número médio de Folhas
Controle	0	0,42 a	2,50 a	0,6 a
TDZ	0,91	0,48 a	2,15 a	0,20 a
	2,27	0,54 a	2,65 a	0,10 a
	4	0,37 a	1,90 a	0,25 a
	8	0,41 a	2,35 a	0,50 a
	16	0,30 a	1,80 a	0,05 a
CIN	4	0,48 a	2,55 a	0,00 a
	6	0,76 a	2,35 a	0,50 a
	8	0,48 a	2,20 a	0,25 a
	16	0,49 a	2,30 a	0,20 a
BAP	2	0,40 a	2,10 a	0,35 a
	4,4	0,45 a	2,45 a	0,10 a
	8	0,41 a	2,30 a	0,30 a
2iP	16	0,44 a	2,15 a	0,35 a
	8	0,46 a	2,40 a	0,35 a
	16	0,50 a	2,55 a	0,30 a

Letras iguais na coluna significam que não houve diferença estatística pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$). 6-benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN), 6- γ - γ (dimetilalilamino)-purina (2-iP) e tidiazuron (TDZ).

Aos 60 dias, todos os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre os tamanhos médio das brotações, o número médio de gemas e o número médio de folhas e as médias comparadas estão apresentadas na tabela 2.

Com relação aos números de gemas as variações foram de 2,6 a 4,0 gemas, isso quando comparadas cada tipo de citocinina em cada concentração. As brotações tiveram seu tamanho médio variando entre 0,58 e 1,02 cm (Figura 1). O número de folhas variou entre 0 e 1,3 folhas. Assim como nos 30 dias, o tratamento suplementado com 4 μM de CIN, também não foi encontrada nenhuma folha formada aos 60 dias

Tabela 2. Tamanho médio de brotação (cm), número médio de gemas e número médio de folhas em explantes de Guanandi cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de diferentes tipos de citocininas aos 60 dias.

Citocininas	Concentração (μM)	Tamanho médio de brotação (cm)	Número médio de gemas	Número médio de Folhas
Controle	0	0,76 a	3,00 a	0,4 a
TDZ	0,91	0,75 a	3,05 a	0,2 a
	2,27	0,96 a	3,90 a	0,7 a
	4	0,88 a	3,75 a	0,9 a
	8	1,02 a	3,75 a	1,3 a
	16	0,69 a	3,60 a	1,2 a
CIN	4	0,58 a	2,70 a	0,0 a
	6	0,59 a	2,65 a	0,7 a
	8	0,58 a	2,60 a	0,2 a
	16	0,81 a	2,80 a	0,2 a
BAP	2	0,74 a	3,65 a	1,2 a
	4,4	0,71 a	3,20 a	0,5 a
	8	0,88 a	3,45 a	1,1 a
2iP	16	0,72 a	3,30 a	0,9 a
	8	0,66 a	3,85 a	0,5 a
	16	0,78 a	4,00 a	0,7 a

Letras iguais significam que não houve diferença estatística pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$). 6-benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN), 6- γ - γ (dimetilalilamino)-purina (2-iP) e tidiazuron (TDZ)

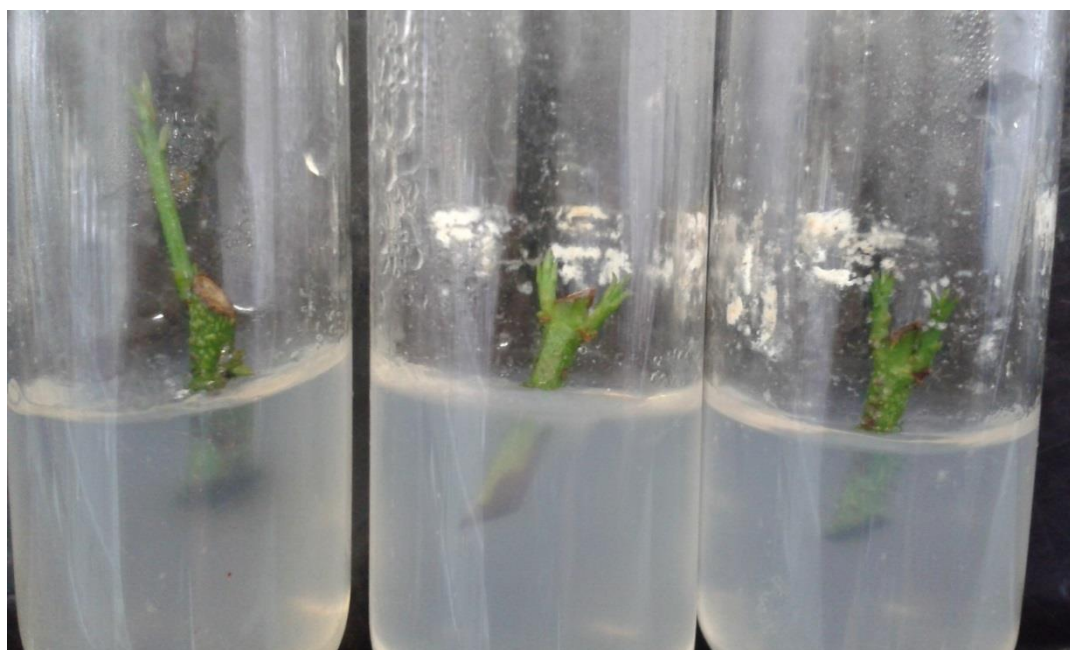


Figura 1. Brotações de Guanandi em meio de cultura WPM, desenvolvidas sem adição de nenhum tipo de Citocininas.

A figura 2 ilustra a formação de brotações nas gemas axilares dos explantes, mostrando que não ocorreu diferença entre os tratamentos mesmo após 60 dias de inoculação.

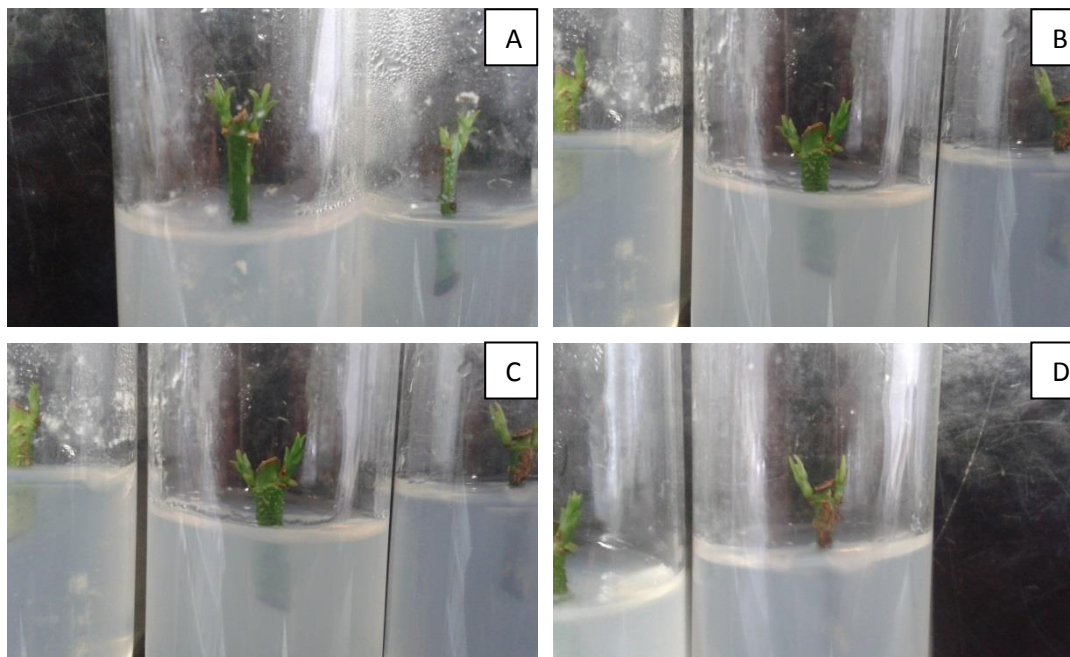


Figura 2. Brotações de Guanandi em meio de cultura WPM, desenvolvidos com os tipos de Citocininas. A) BAP - 6-Benzilaminopurina; B) TDZ - Thidiazuron; C) 2iP - Isopenteniladenina; D) CIN – Cinetina.

Almeida et al., (2009) testou o efeito das citocininas BAP, CIN e 2iP, em *Crossandra infundibulisformis* Nees cv. Mona Wallhead, Figueiredo et al., (2008) utilizou 2iP, BAP e Zeatina em [*Chaenomelis japônica* (Thunb.) Lindl. ex Spach cv. Andramig I], e ambos obtiveram maior porcentagem de brotação com BAP, no estabelecimento *in vitro*.

Furtado et al. (2007) não encontrou muitas diferenças na utilização de TDZ, BAP e CIN, na regeneração *in vitro* de amendoim (*Arachis hipogaea* L.) e Oliveira et al. (2008) encontrou mais eficiência no uso de 2iP na multiplicação *in vitro* de mandacaru (*Cereus jamacaru* P.DC.).

Quando comparamos as figuras 1 e 2 vimos que não apresentam diferenças no desenvolvimento das brotações. Portanto, os fitorreguladores utilizados não foram eficientes no desenvolvimento das gemas axilares para a formação dos brotos de Guanandi, necessitando dessa forma novos testes para uma produção massal.

3.3.2. Efeito do GA₃ no alongamento de brotações

Aos 30 dias, os explantes de Guanandi cultivados em meio de cultura WPM, não apresentaram interação entre as diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) e as condições de luminosidade. Com relação às diferentes concentrações de GA₃ não houve diferença para os parâmetros números de brotos, tamanho médio dos brotos e quantidade de folhas, no entanto houve maior taxa de oxidação devido à presença de GA₃ (Tabela 3).

Tabela 3. Tamanho médio dos brotos (cm), número de brotos, número de folhas, porcentagem de oxidação em explantes de Guanandi cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido giberélico aos 30 dias mantidos em condições de luminosidade.

GA ₃ (μ M)	Tamanho médio de brotos (cm)	Números de brotos	Número de folhas	Oxidação
0	0,46 a	0,46 a	0,78 a	0,53 a
5	0,62 a	5,80 a	0,64 a	0,17 b
10	0,62 a	5,14 a	0,82 a	0,35 ab
20	0,66 a	5,50 a	0,67 a	0,25 ab

Letras iguais na coluna significam que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

As maiores taxas de oxidação foram observadas nas concentrações de 0, 10 e 20 μ M (Tabela 3). A oxidação fenólica é um dos pontos que dificultam o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, por ocorrer à liberação de compostos fenólicos devido a injúria causada nos tecidos e explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, que são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (Flores *et al.*, 1998).

Com relação às diferentes condições de luminosidade os explantes mantidos na luz apresentaram maior tamanho médio de brotos, maior número de brotos e folhas e menor taxa de oxidação (Tabela 4) comparada com os mantidos no escuro.

Tabela 4. Tamanho médio dos brotos (cm), número de brotos, número de folhas, porcentagem de oxidação em explantes de Guanandi cultivados em duas condições de luminosidade aos 30 dias.

Ambiente	Tamanho médio de brotos (cm)	Número de brotos	Número de folhas	Oxidação
Luz	0,89 a	7,6 a	1,19 a	0,14 b
Escuro	0,29 b	2,6 b	0,26 b	0,51 a

Letras iguais na coluna significam que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

Após 60 dias, os explantes cultivados em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3) apresentaram diferenças quanto ao tamanho médio de brotos, sendo que os maiores brotos foram observados no tratamento sem adição de GA_3 (0,75 cm) (Tabela 5), diferente do alongamento de brotações de *Rollinia mucosa* que é necessário à adição do GA_3 (FIGUEIREDO, et al., 2001). Assim como no desenvolvimento *in vitro* de brotações de Moreira (*Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud.) que a utilização de GA_3 em concentrações que variam de 1 a 6 mg L⁻¹ favoreceu o seu crescimento (GOMES, 1999).

Tabela 5. Tamanho médio dos brotos (cm) de Guanandi cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido giberélico com o desenvolvimento em ambiente controlado aos 60 dias.

GA_3 (μM)	Tamanho médio de brotos (cm)
0	0,75 a
5	0,38 ab
10	0,65 ab
20	0,37 b

Letras iguais significam que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

As giberelinas aumentam tanto a divisão celular como o alongamento celular, porque aumentam o número e o comprimento das células (Rodrigues & Leite, 2004). Estes efeitos ocorrem devido à ação das giberelinas controlarem a

plasticidade da parede celular, através do controle da ação de determinadas enzimas, que podem regular o fluxo de água nas células durante a expansão (Daykin *et al.*, 1997). Mas a ação de uma substância reguladora de crescimento depende de fatores ambientais, concentração utilizada e espécie ou cultivar tratada (Schmidt *et al.*, 2003). Assim sendo, dependendo da concentração utilizada de ácido giberélico para o desenvolvimento de plantas, pode ocasionar em um resultado diferente do que é esperado, como observado para o Guanandi.

Quanto ao número médio de brotos, os explantes mantidos em 0 de GA₃ e na luz apresentaram maior taxa de brotação (13 brotos) e número de folhas, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 6). O efeito do GA₃ na proliferação de brotações varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie que está sendo micropropagada (George, 1996).

Tabela 6. Número de Brotos, número de folhas, porcentagem de oxidação em explantes de Guanandi cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido giberélico com o desenvolvimento em ambiente controlado aos 60 dias.

GA ₃ (μ M)	Ambiente	Número médio de brotos	Número de folhas	Oxidação
0	Luz	13 a	4,3 a	0 b
5	Luz	5,7 b	1,16 b	0,4 a
10	Luz	8,5 b	1,8 b	0,08 ab
20	Luz	6,5 b	1,2 b	0,33 ab
0	Escuro	2,6 AB	0 A	0,6 AB
5	Escuro	0,6 AB	0 A	0,91 A
10	Escuro	4,3 A	0 A	0,33 B
20	Escuro	0 B	0 A	1 A

Letras iguais maiúsculas e letras iguais minúsculas na mesma coluna, significam que não houve diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

Foi observado em *Ficus carica* L., onde houve redução no número de brotos com o aumento da concentração de GA₃ (FRÁGUAS *et al.*, 2004), por outro lado, para Arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) o melhor alongamento dos

brotos ocorreu quando os brotos foram deixados na presença de 3 mg-L⁻¹ de GA₃ por 19 dias.

A presença de GA₃ no meio de cultura promoveu um melhor desenvolvimento dos eixos caulinares e das folhas, tornando mais fácil a individualização, aproveitamento e contagem das brotações de *Cordia trichotoma* (MANTOVANI et. al., 2001).

Observando os diferentes ambientes de desenvolvimento, foi possível perceber que os explantes que foram mantidos em fotoperíodo de 16 h, apresentaram maior número de brotos (13) e folhas (4,33), quando comparado com os explantes desenvolvidos na ausência de luz (Tabela 6). Como as concentrações de 0 e 10 µM de ácido giberélico foram as melhores para os dois tipos de desenvolvimento, a falta de luminosidade não proporcionou formação de folhas, demonstrando o quanto a luz influencia no comportamento da planta.

Portanto, o fotoperíodo é importante para o alongamento *in vitro* de Guanandi. Existem relativamente poucos estudos e publicações acerca dessa variável necessitando de mais estudos comparativos entre o fotoperíodo e o GA₃.

A taxa de oxidação foi maior no desenvolvimento na ausência de luz para *Calophyllum brasiliensis* Cambess, onde o mesmo comportamento foi observado no cultivo no escuro de embriões de guarirrobeira, sendo desfavorável para o controle da sua oxidação (MELO et al., 2001).

3.4. CONCLUSÃO

Com relação à multiplicação para o Guanandi, nenhuma concentração das citocininas utilizadas foram positivas para o tamanho médio das brotações, número de gemas e número de folhas tanto aos 30 quanto aos 60 dias.

Para o alongamento do Guanandi, o ambiente controlado com fotoperíodo é o mais favorável para o tamanho médio de brotos, número de brotos, número de folhas e oxidação. O ambiente escuro demonstra possíveis resultados negativos para a oxidação, número de folhas, número de brotos e tamanho médio de brotos.

Esses dados demonstram que a multiplicação e alongamento de explantes de Guanandi necessitam de maiores estudos.

3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Calophyllum brasiliense* conhecida como Guanandi por ser uma espécie lenhosa e suas sementes serem recalcitrantes, necessita de mais estudos principalmente com relação a sua recalcitrância.

A germinação *in vitro* mostrou que o uso de nitrato de potássio no osmocondicionamento ocorreu uma tendência linear decrescente. À medida que aumenta a concentração de nitrato diminui a germinação das sementes. Isso implica que não seria necessária a utilização de nitrato uma vez que as sementes que não tiveram nenhum tratamento mostraram-se semelhante aos tratamentos aos demais tratamentos. Isso pressupõe que não há necessidade da utilização de nitrato no pré-tratamento diminuindo assim o custo de produção.

Já com relação aos diferentes tipos de meios de cultura, não foram significativas as diferenças, mostrando ser mais viável a não utilização de sais e sim apenas a água gelificada como meio para germinação, com a intenção de diminuir os custos de produção.

Seriam necessários mais estudos com relação às sementes de Guanandi uma vez que resultados de estudos anteriores se mostrou favoráveis a utilização de nitrato na aceleração da germinação. Isso mostra que provavelmente a época de coleta e o local estão diretamente relacionados com o vigor da semente.

Os resultados mostrados na multiplicação e no alongamento, por não diferirem entre si requer um novo balanço hormonal, já que esses não foram suficientes para o objetivo inicial que era o aumento do número de brotos e o alongamento desses brotos.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F. Micropropagação de *Crossandra infundibuliformis* Ness cultivar 'Mona Wallhead'. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 2, p.115 - 122. 2009.

DAYKIN, A., SCOTT, I.M., FRANCIS, D., CAUSTON, D.R. Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. **Revista Planta** v.203 p. 526 - 535, 1997.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

FIGUEIREDO, G. S. ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MARMELEIRO JAPONÊS (*Chaenomeles sinensis* Koehne) CV ANDRAMIG. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Pelotas**. 2009.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *in vitro* cellular & developmental. **Biology Plant, Wallingford**, v. 37, n. 4, p. 471-475, 2001.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira santa (*Moutenous ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrocência**, v.4, n.3, p.201-5, 1998.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

FURTADO, C. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; CASTRO, J. P. DE.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea* L.), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 51-58, 2007.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology. **Edington: Exegetics**, p.574, 1996.

GEORGE, E. F. & DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture, vol. 1. 3. ed. **Dordrecht: Springer**, 2008.

GEORGE E.F.; HALL M.A.; DE KLERK G.J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd ed. **Dordrecht, the Netherlands: Springer**, p. 175–204, 2008.

GOMES, G. A. C. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). 91 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – **Universidade Federal de Lavras**, Lavras, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T. F.; CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2. Anais. Brasília: **Embrapa**, p. 8. 1987.

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

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

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabidaex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, 2001.

MARQUES, M. C. M. & JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botânica Brasília**, Brasília, v.14, n.1, p.113-120, 2000.

MELO B, PINTO J. E. B. P.; LUZ J. M. Q.; PEIXOTO J. R.; JULIATTI F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25. p. 1301-1306, 2001.

MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). Plant hormones and their role in plant growth and development. **Dordrecht: M. Nijhoff**, p. 296-317, 1987.

OLIVEIRA, A. J. B.; CARVALHO, V.M.; FERREIRA, A.; SATO, F.Y.; MACHADO, M.F.P.S. *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.4, p.421-425, 2003.

OLIVEIRA, A. B. DE; DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 48-54, 2008.

RODRIGUES, T. J. D.; LEITE, I. C. Fisiologia vegetal – hormônios das plantas. **Funep**, Jaboticabal, Brasil, p.78, 2004.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.1, p.69-74, 2009.

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

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.28, n.2, p.293-296, 2006.

SCHMIDT, C. M.; BELLÉ, R. A.; NARDI, C.; TOLEDO, K. A. Ácido giberélico (GA3) no crisântemo (*DeDRanthe magrandiflora* Tzvelev.) de corte viking: cultivo de verão. **Ciência Rural**. v. 33, p.267- 274, 2003.

SMITH, R. H. Plant tissue culture: techniques and experiments. 2^a ed., San Diego, CA: **Academic Press**, 2000.