

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

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ASPECTOS ANATÔMICOS E
ULTRAESTRUTURAIS DA CALOGÊNESE EM**
Campomanesia adamantium

Marieli Rossato

Bióloga

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Fevereiro de 2015

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

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ASPECTOS ANATÔMICOS E
ULTRAESTRUTURAIS DA CALOGÊNESE EM**
Campomanesia adamantium

Marieli Rossato

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto
Co-orientador: Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis
Co-orientadora: Prof. 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

Fevereiro de 2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Rossato, Marieli

Propagação in vitro e aspectos anatômicos e ultraestruturais da
calogênese em *Campomanesia adamantium* [manuscrito] / Marieli
Rossato. - 2015.

LXV, 65 f.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Costa Netto; co-orientadora Dra.
Vanessa Cristina Stein; co-orientador Dr. Edésio Fialho dos Reis.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional
Jataí, Jataí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Jataí, 2015.

1. Cerrado. 2. Gabiroba. 3. Calos. 4. Brotações. 5. Rizogênese. I.
Costa Netto, Antônio Paulino, orient. II. Stein, Vanessa Cristina, co
orient. III. Título.

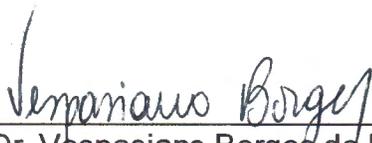
MARIELI ROSSATO

TÍTULO: "PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ASPECTOS ANATÔMICOS E
ULTRAESTRUTURAS DA CALOGÊNESE EM *Campomanesia*
adamantium"

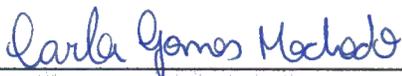
Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 04 de fevereiro de 2015,
pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto
Presidente – CAJ/UFG



Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto
Membro Externo– UFMS



Prof.ª Dr.ª Carla Gomes Machado
Membro Externo -CAJ/UFG

Jataí - Goiás
Brasil

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIELI ROSSATO – nascida no dia 17 de janeiro de 1989, na cidade de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, filha de Liceu Rossato e Lenir Leonida Rossato. 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 2011. Em fevereiro de 2011, iniciou o Curso de Ciências Biológicas Bacharelado na Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí – GO e no mês de fevereiro de 2012 obteve o título de Bióloga Bacharel. Em março 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 Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto. Em fevereiro de 2015 submeteu-se a banca examinadora para a Defesa Final da Dissertação, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia.

A Deus, por iluminar o meu caminho

OFEREÇO

*Aos meus Pais, Liceu e Lenir, e irmão Daniel pelo apoio e amor em todos os
momentos*

DEDICO

Ao meu namorado Pedro: pelo apoio, torcida e amor incondicional

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade.

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

À Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí e Universidade Federal de Lavras, pela estrutura disponibilizada.

Ao meu orientador Antônio Paulino da Costa Netto por participar da minha formação e pela confiança a mim depositada durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu co-orientador Edésio Fialho dos Reis por toda ajuda na elaboração do projeto.

À co-orientadora Vanessa Cristina Stein por todo apoio, atenção e amizade a mim destinada durante este processo. Sabe que és minha segunda mãe.

Ao Professor Luciano Vilela Paiva, coordenador do Laboratório Central de Biologia Molecular.

À Professora Carla Gomes Machado, pela atenção e ajuda durante a qualificação.

Aos meus pais, Liceu e Lenir, e irmão Daniel, por todo apoio, carinho e compreensão. Obrigada por todas as palavras de incentivo e por acreditarem sempre no meu potencial.

Ao meu namorado Pedro pela paciência, apoio e ajuda durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu primo Lucas, que esteve do meu lado durante toda a minha caminhada acadêmica e me deu os melhores conselhos. Obrigada pela força.

À Marlúcia de Souza Pádua por toda ajuda na realização das análises anatômicas e ultraestruturais.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Geiciane, Tatiana, Fabio, Barbara, Luna, Daniela, Jane, Valéria, Lázaro e Cassio por toda ajuda e pelos vários momentos de descontração.

A todos os amigos conquistados no PPGA pelos momentos de aprendizado e descontração.

A toda minha família e amigos que sempre torceram por mim.

Meu eterno obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1. Introdução	1
1.2. Revisão bibliográfica	2
1.2.1. Caracterização botânica	2
1.2.2. Cultura de tecidos de plantas.....	4
1.2.2.1 Micropropagação.....	5
1.2.2.2. Calogênese	7
1.2.2.2.1. Curva de crescimento do calo.....	8
1.2.2.2.2. Análises microscópicas e ultraestruturais.....	9
1.3. Objetivos	11
1.3.1. Objetivo geral.....	11
1.3.2. Objetivos específicos	11
1.4. Referências bibliográficas	12
CAPÍTULO 2 – PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GABIROBEIRA (<i>Campomanesia adamantium</i> Camb.).....	17
RESUMO –	17
SUMMARY –	18
2.1. Introdução	19
2.2. Material e métodos.....	20
2.2.2. Material vegetal.....	20
2.2.3. Indução de brotações	21
2.2.4. Indução de rizogênese.....	22
2.3. Resultados e discussões.....	22
2.3.1. Indução de brotações	23
2.3.2. Indução de rizogênese.....	29
2.4. Conclusão	32
2.5. Referências	33
CAPÍTULO 3 – INDUÇÃO, CURVA DE CRESCIMENTO, CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL EM CALOS DE GABIROBEIRA (<i>Campomanesia adamantium</i> Camb.)	36
RESUMO.....	36

SUMMARY	37
3.1. Introdução	38
3.2. Material e métodos	39
3.2.1. Material vegetal.....	39
3.2.2. Indução de calogênese	40
3.2.3. Curva de crescimento	40
3.2.4. Análise histoquímica	41
3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MEV)	41
3.3. Resultados e discussão.....	42
3.3.1. Indução de calogênese.....	42
3.3.3. Análise histoquímica e ultraestrutural.....	46
3.4. Conclusão	51
3.5. Referências	51

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ASPECTOS ANATÔMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DA CALOGÊNESE EM *Campomanesia adamantium*

RESUMO – Objetivou-se o desenvolvimento de protocolo de propagação *in vitro* de Gabirobeira a partir de segmentos nodais e caracterizar anatômica e ultraestruturalmente a calogênese. No primeiro experimento, brotações foram induzidas *in vitro*, utilizando-se meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), na presença ou não de radiação fotossinteticamente ativa. No segundo experimento, rizogênese foi induzida utilizando diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) de ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA) e ácido naftalenoacético (ANA). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 5 repetições (cada repetição composta por 3 tubos) nos dois experimentos, sendo para as brotações esquema fatorial 2x5 (dois ambientes e cinco concentrações). No terceiro experimento, calos foram induzidos em segmentos nodais utilizando-se diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) de AIB, AIA, ANA, 2,4-diclorofenoxiaéctico e Picloram. A concentração indicada para indução de brotações é 1,0 mg L⁻¹ de BAP mantida no escuro para que ocorra alongamento. Com os tratamentos testados não foi possível obter protocolo eficiente para rizogênese. Calos foram induzidos em todas as concentrações testadas, exceto na testemunha, porém 1,0 mg L⁻¹ de picloram foi mais eficiente. Através da curva de crescimento do calo juntamente com as análises histoquímicas e ultraestruturais, é possível inferir que ao 28º dia os calos devem ser transferidos para novos meios de cultura, visto que durante este período é possível visualizar a formação de centro meristemático se destacando da periferia.

Palavras-chave: Cerrado, gabiroba, calos, brotações, rizogênese

PROPAGATION IN VITRO AND ANATOMIC AND ULTRAESTRUCTURAL ASPECTS OF CALLOGENESIS IN *Campomanesia adamantium*

SUMMARY – The aim of this work was to obtain protocol for Gabirobeira propagation *in vitro* and characterize anatomical and ultrastructure calogenesis. In the first experiment, shoots were induced *in vitro*, using culture medium WPM (Wood Plant Medium) with different concentrations of 6-benzilaminopurine (0; 0,25; 0,5; 1,0 and 2,0 mg L⁻¹), in the influence or not active photosynthetically radiation. In the second experiment, root formation was induced using different concentration (0; 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 mg L⁻¹) of indolbutyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA) and indoleacetic acid (IAA). The experimental design was completely randomized with 5 repetitions (each replication consisted of three tubes), with the factorial 2x5 for shoot multiplication (two environments and five concentrations). In the third experiment, callus were induced in nodal segments using different concentrations (0; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L⁻¹) of IBA, NAA, IAA, 2,4-diclorofenoxiacetic and Picloram. The concentration indicated for shoot induction is 1,0 mg L⁻¹ kept in the dark for elongation. On the rooting experiment was not possible develop protocol for root formation. Callus were induced in all concentrations, except in the control, but 1,0 mg L⁻¹ de picloram was more efficient. Through the showth curve of callus anatomic cuts and ultrastructural analysis, we can infer that after 28 days the callus should be transferred to new media culture since during it was possible to visualize the formation of meristematic center highlighting the periphery.

Keywords: Cerrado, gabiroba, callus, shoots, roting

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

O Bioma Cerrado ocupa aproximadamente cerca de 24% do território brasileiro, abrangendo a área do Distrito Federal e outros dez estados, sendo considerado o segundo maior Bioma brasileiro, e com a maior biodiversidade do planeta. O crescente desmatamento do Cerrado a partir dos anos 70, principalmente para a abertura de novas áreas para ocupação agrícola e pecuária, juntamente com o uso extrativista das populações naturais vem ocasionando um progressivo esgotamento dos recursos vegetais. A partir de dados sobre a quantidade de espécies endêmicas e porcentagem da sua área natural protegida, este Bioma passou a ser considerado um dos 25 “Hotspots” de conservação, pois apresenta grande quantidade de espécies endêmicas e elevada perda de habitat (Myers et al., 2000).

Nos últimos anos o governo, através de seus órgãos de pesquisa e ensino, tem analisado o potencial econômico e conservacionista das espécies nativas do Cerrado, visando conhecer o comportamento e desenvolvimento das espécies vegetais para a sua inserção no mercado consumidor, pela implantação de lavouras comerciais ou renovação da vegetação e recuperação das áreas degradadas (Leite, 2012).

Dentre as frutíferas de importância econômica do Cerrado destacam-se as espécies do gênero *Campomanesia*, conhecidas popularmente como Gabirobeira, com cinco espécies nativas deste Bioma. A Gabiroba possui grande aceitação popular, sendo comercializada em feiras e grandes centros urbanos, podendo ser consumida *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes e geleias (Freitas et al, 2008; Avidos & Ferreira, 2003).

A propagação da Gabirobeira é realizada através de sementes, no entanto apesar de apresentarem altas taxas de germinação as sementes são intolerantes à dessecação e a qualquer armazenamento, sendo classificadas como recalcitrantes (Melchior et al., 2006; Souza, 2014). Resultados promissores têm sido obtidos utilizando a cultura de tecidos como alternativa na propagação em larga escala de frutíferas do Cerrado (Pinhal et al., 2011), como por exemplo, a maior uniformidade e

velocidade na germinação de Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) (Martinotto et al., 2007) e a obtenção de protocolo completo de micropropagação de Goiabeira (*Psidium guajava* L.) (Liu & Yang, 2011).

A micropropagação, uma das principais técnicas da cultura de tecidos, é utilizada principalmente para a multiplicação rápida de plantas elites livres de patógenos. As técnicas de organogênese e embriogênese somática tem se destacado quando se visa propagação de plantas em larga escala. O processo organogênico ocorre a partir do surgimento de gemas adventícias em locais diferentes do curso normal do desenvolvimento de uma planta. Já no processo embriogênico, são formados grandes quantidade de embriões individualizados que formarão novas plantas. Esses dois processos podem seguir duas vias: direta ou indireta (com a formação de calos).

Os calos são caracterizados por massas de células em divisão celular e crescimento desordenado, que apresentam formas e tamanhos variados, as quais apresentam ou não graus de diferenciação. Durante o seu desenvolvimento, é importante identificar, através de análises a nível celular, fases distintas de diferenciação e crescimento com o intuito de observar possível potencial embriogênico ou organogênico.

Vários estudos têm sido realizados visando propagação em larga escala de frutíferas do Cerrado, para serem utilizadas tanto no reflorestamento de áreas degradadas como para a implantação de lavouras comerciais (Pinhal et al., 2011). Porém, são poucas pesquisas publicadas com o uso desta técnica para a propagação de frutíferas nativas da família Myrtaceae, e principalmente da espécie em estudo, reforçando a importância da obtenção de informações sobre o seu comportamento *in vitro*.

Diante do exposto, objetivou-se o desenvolvimento de protocolo de micropropagação de Gabirobeira a partir de segmentos nodais e caracterizar anatômica e ultraestruturalmente a calogênese.

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Caracterização botânica

A família Myrtaceae possui centros de diversidade na Austrália, sudoeste da Ásia, América do Sul e com pouca representatividade na África e na Europa (Grattapaglia et al., 2012; Souza & Lorenzi, 2008; Wilson et al., 2001). Segundo classificação proposta por Wilson et al. (2005), essa família é dividida em duas subfamílias, Psiloxylodeae, que compreende somente dois gêneros africanos, e Myrtoideae, que possui distribuição pantropical e centros de radiação na América do Sul, compreendendo cerca de 130 gêneros e 5600 espécies (Grattapaglia et al., 2012; Gressler et al., 2006).

Reconhecida como a oitava maior família de plantas de floração, compreende vários gêneros de destaque econômico e ecológico de relevância mundial, sendo encontrados em vários “hotspots” de biodiversidade do mundo, incluído o Bioma Cerrado (Grattapaglia et al. 2012). Dentre esses gêneros, destacam-se diversas frutíferas de importância econômica, sendo que o plantio em escala comercial ainda é incipiente, dependendo de estudos para possível domesticação (Souza & Lorenzi, 2008).

O gênero *Campomanesia* spp. enquadra-se nessa descrição, sendo conhecida 36 espécies que se distribuem na parte tropical e subtropical da América do Sul (Souza & Lorenzi, 2005; Landrum, 1997). Segundo Forzza (2010), o Brasil apresenta 31 espécies de *Campomanesia*, sendo 21 endêmicas e 5 nativas para o bioma Cerrado: *C. adamantium*, *C. eugenioides*, *C. pubescens*, *C. pabstiana* e *C. sessiliflora*.

Conhecida como Gabirobeira e Guabirobeira-do-campo, a espécie *C. adamantium* se desenvolve de forma arbustiva, atingindo até 2 metros de altura (Vallilo et al., 2006). Os seus frutos possuem dimensões de 1 a 3 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro, polpa amarelada, succulenta e numerosas sementes (Avidos & Ferreira, 2003), sendo consumidos *in natura*, ou na forma de sucos, doces e sorvetes (Freitas et al, 2008; Avidos & Ferreira, 2003).

Estudos realizados por Vallilo et al. (2006) demonstraram que os frutos podem ser utilizadas como flavorizantes na indústria de bebidas devido a sua elevada acidez, presença de ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos. Já as folhas são utilizadas na medicina popular como depurativo, anti-diarréico, anti-reumático e redutor de colesterol no sangue (Biavatti et al. 2004) e as raízes também são empregadas no tratamento de diabetes (Coutinho et al., 2008).

Devido à abertura de novas áreas para a implantação de novas lavouras a partir dos anos 70, e o constante uso extrativista das populações naturais, a Gabirobeira, juntamente com outras espécies nativas do Cerrado, vem sendo colocadas em risco antes mesmo de serem estudadas por pesquisadores. Avidos & Ferreira (2003) destacam a importância de se utilizar essas frutíferas do Cerrado na proteção ambiental, enriquecendo a flora de áreas mais pobres e recuperando áreas desmatadas ou degradadas.

A propagação da Gabirobeira ocorre pelo uso de sementes (Lorenzi et al., 2006), no entanto, essas sementes não suportam nenhum armazenamento e são intolerantes à dessecação (Melchior et al., 2006; Souza, 2014). Sementes que não são tolerantes a dessecação, possuindo períodos de vida limitados no armazenamento e morrendo devido à secagem, são classificadas como recalcitrantes (Ferreira & Borguetti, 2004).

O uso de estaquia como alternativa para a propagação desta espécie não obteve resultados satisfatórios. Estudos utilizando reguladores de crescimento no enraizamento de estacas lenhosas e herbáceas de Gabirobeira obtidas em três épocas diferentes demonstram baixos índices de sobrevivência evidenciando que a ocorrência de variação na sobrevivência de acordo com a época de coleta (Mantelli et al., 2010).

Devido à importância econômica e ecológica da espécie e os decorrentes problemas para a propagação, o cultivo *in vitro* se torna uma ferramenta útil para a propagação desta frutífera, podendo fornecer mudas em quantidades suficientes e com qualidade fitossanitária que possa atender a demanda do mercado.

1.2.2. Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos consiste basicamente no cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais em um meio de cultura com o intuito de obter plântulas seletas e isentas de patógenos, reduzindo o período de espera para a obtenção de mudas em cada geração (Torres et al., 1998). É também uma importante ferramenta na conservação *in vitro* de germoplasmas de espécies ameaçadas de extinção ou que possuam dificuldade na propagação sexuada (Pinhal et al., 2011).

Esta técnica é baseada na totipotencialidade celular, onde qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a

regeneração de uma planta completa (Torres et al., 1998). Cada célula já diferenciada pode ser induzida a voltar ao estado meristemático, redefinindo seu padrão de diferenciação celular podendo desenvolver novos órgãos ou indivíduos inteiros (Termignoni, 2005).

Para que a célula retorne ao estado meristemático pode ser gerados estímulos pela presença de componentes orgânicos e inorgânicos no meio de cultura que propiciam condições necessárias para a diferenciação e rediferenciação celular e posterior crescimento e estabilização das plantas (Grattapaglia & Machado, 1998). Mas na maioria dos sistemas de culturas de tecidos, a composição de sais e vitaminas do meio de cultura não é suficiente para resultar na desdiferenciação celular, e para que isso ocorra são adicionados reguladores de crescimento sintéticos (Kerbauy, 1999) que reproduzem o que ocorre naturalmente nas plantas.

Dentro da cultura de tecidos há varias técnicas que podem ser utilizadas para o cultivo *in vitro*, dentre elas a morfogênese direta, onde ocorre o desenvolvimento de novos órgãos diretamente de um explante ou por morfogênese indireta, via calos (Caldas, 1996).

1.2.2.1 Micropropagação

A micropropagação é uma das técnicas de maior aplicação na cultura de tecidos e de maior impacto, pois é possível a multiplicação rápida de plantas elites livres de patógenos, onde os clones terão o mesmo material genético da planta mãe (Giri et al., 2004; Sartoretto et al., 2008).

Dois processos de micropropagação tem se destacado quando o propósito é a obtenção de plantas *in vitro* em larga escala: organogênese e embriogênese somática.

Organogênese se refere ao surgimento de gemas adventícias em locais diferentes daqueles que se formam no curso normal do desenvolvimento da planta. Esses tecidos apresentam potencial morfogenético e podem seguir duas vias: direta ou indireta. Durante a fase indireta, as gemas adventícias se desenvolvem em novas partes aéreas a partir de células desorganizadas, denominadas calos (Grattapaglia et al., 1998).

Durante a embriogênese somática grandes quantidades de embriões individualizados podem se formar a partir de um explante e germinar regenerando

em novas plantas sem que ocorra fusão gamética. Este processo também apresenta dois padrões básicos: embriogênese somática direta onde os embriões somáticos originam-se diretamente do tecido matriz e a embriogênese somática indireta, na qual os embriões se formam a partir de um calo (Grattapaglia et al., 1998).

Segundo Giri et al. (2004), para que o processo de micropropagação obtenha sucesso há um número de variáveis que devem ser levadas em consideração, como antecedentes genéticos, tipo e idades dos tecidos que serão utilizados, componentes nutricionais, reguladores de crescimento e o ambiente de cultivo.

Os reguladores de crescimento são utilizados na cultura de tecidos para garantir um nível de crescimento básico e são igualmente importantes para direcionar a resposta do explante em desenvolvimento, sendo o sinergismo entre auxina e citocinina determinantes no controle da morfogênese *in vitro* (Nascimento, 2006). Enquanto uma alta razão auxina:citocinina estimula a formação de raízes, uma baixa razão leva a formação de partes aéreas e em níveis intermediários, o tecido cresce como um calo indiferenciado (Taiz & Zeiger, 2013).

O processo de micropropagação engloba diferentes estádios. Segundo Pierik (1990), a fase inicial ou fase 0 corresponde ou tratamento da planta matriz. A fase 1 é caracterizada pelo isolamento do explante em condições assépticas. A fase 2 é a fase de multiplicação, onde se objetiva propagar o material vegetal sem a perda da estabilidade genética. Na fase 3 ocorre a preparação das brotações para a transferência ao solo, com a interrupção da formação dos brotos e o início de seu alongamento. Para a sobrevivência da planta, deve-se induzir também durante esta fase a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A última fase é a transferência das plantas do tubo de ensaio para o solo e consequente aclimatização.

Durante a fase de multiplicação, são utilizados segmentos nodais retirados da planta mãe com o intuito de se obter a maior taxa de multiplicação em um período reduzido de tempo. Estudos realizados com *Eucalyptus* spp. demonstraram resultados satisfatórios para a micropropagação utilizando BAP (6-benzilaminopurina) na multiplicação de gemas axilares (Brondani et al., 2009; Brondani et al., 2012). Para o gênero *Campomanesia*, brotações também foram obtidas utilizando este mesmo regulador de crescimento para as espécies *C. pubescens* e *C. xanthocarpa* (Campos, 2014; Scutti & Zanette, 2000).

Já a fase de enraizamento é caracterizada pela formação de raízes adventícias geralmente induzidas nas partes aéreas provenientes da multiplicação *in vitro*, possibilitando o posterior transplante das plantas para condições *ex vitro* (Nascimento, 2006).

Taxas satisfatórias de enraizamento foram obtidas em *Metrosideros excelsa* utilizando diferentes fontes de auxina, como AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) (Iapichino & Airò, 2008). Já para *C. pubescens* após dois subcultivos, foi possível obter enraizamento com diferentes doses de AIB, porém, a partir do oitavo subcultivo não foi possível à obtenção de raízes, mesmo utilizando outras fontes de auxina, indicando que explantes juvenis respondem melhor aos estímulos hormonais *in vitro* do que os explantes mais maduros ou envelhecidos (Campos, 2014).

1.2.2.2. Calogênese

Os calos são massas de células em crescimento desordenado, que apresentam formas e tamanhos variados em diferentes graus de diferenciação (Carvalho et al., 2011; Ikeuchi et al., 2013; Termignoni, 2005). Este processo ocorre devido aos tecidos vegetais possuírem alto grau de plasticidade para a diferenciação celular (Ikeuchi et al., 2013).

Dentro da cultura de tecidos, a calogênese é amplamente utilizada como indicativo das condições do meio de cultura que o explante requer para crescer, para estudar os processos de diferenciação e o desenvolvimento das células, estudar e produzir metabólitos primários e secundários, obter suspensões celulares e alcançar a formação de brotações múltiplas (Landa et al., 2000; Santos et al., 2010; Siqueira & Inoue, 1992).

Durante a sua formação, há vários fatores que interferem no seu desenvolvimento, como o órgão fornecedor, o tamanho do explante, a idade e a época do ano em que este foi seccionado (Cerqueira et al., 2002). Além disso a composição do meio de cultura e a presença de reguladores de crescimento são fatores determinantes no estabelecimento da competência e determinação destas células, condições necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (Kerbaudy, 1999).

A formação de calos tem sido obtida principalmente através do uso de 2,4-D (Reis et al., 2007) mas outras auxinas, como o picloram (Titon et al., 2007) e AIB (Feitosa et al., 2013), também vem sendo utilizado para a obtenção de calos ou manutenção de culturas em suspensões.

Calos também são obtidos na interação entre auxinas e citocininas. A indução de calos em segmentos foliares de *Jatropha curcas* L. utilizando interações entre diferentes concentrações de BAP e AIB foi significativo, sendo que a partir desta formação foi possível a obtenção de brotos adventícios (Feitosa et al., 2013).

Santos et al. (2008) obtiveram altas taxas de massas celulares em segmentos nodais e foliares de *Coffea canephora* "Apoatã" com a utilização de 2,4-D, porém a interação deste com outra auxina (AIB) não obteve resultados satisfatórios.

Durante o desenvolvimento dos calos é importante identificar fases distintas do seu crescimento, identificando o momento de repicagem dos mesmos. Se faz necessário também análises a nível celular, no intuito de identificar possível potencial embriogênico ou organogênico.

1.2.2.2.1. Curva de crescimento do calo

As características apresentadas pelos calos, tanto morfológicas, bioquímicas ou ultra-estruturais, podem evidenciar mudanças que ocorrem nas diferentes fases do crescimento do calo, fornecendo assim, dados importantes relacionados ao processo morfogenético *in vitro* desses tecidos (Vasconcelos et al., 2012).

O índice de divisão celular dos calos pode elucidar as mudanças fisiológicas das células e auxiliar a otimização de protocolos de regeneração e também de transformação genética (Santos et al., 2008). A partir da curva de crescimento dos calos é possível estabelecer o momento exato da sua repicagem, transportando este para um novo meio de cultura ou utilizando-o em suspensões celulares (Soares, 2003).

O crescimento do calo é composto de cinco etapas: 1) Fase lag: se caracteriza pelo número estacionário das células, sem qualquer divisão, síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos; 2) Fase exponencial: divisão celular acelerada, formando aglomerados composto por mais de dez células; 3) Fase linear: ocorre redução na taxa de divisão celular; 4) Fase de desaceleração progressiva: ocorre a diminuição da divisão celular e expansão das células; 5) Fase estacionária:

não ocorre divisão celular, sem síntese de biomassa ou aumento no número de células (Santos et al., 2008).

A fase de desaceleração é ideal para a repicagem dos calos, pois ocorre a redução de nutrientes, secagem do ágar e extrusão de compostos fenólicos no meio de cultura (Nogueira et al., 2008).

Vários estudos tem demonstrado que os períodos obtidos durante a curva de crescimento variam de acordo com a espécie e o tecido utilizado. Em trabalhos envolvendo curva de crescimento de calos obtidos por meio de ápices meristemáticos de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, Batista (2012) verificou a ocorrência da fase lag até o 7º dia de cultivo sendo que a fase exponencial, quando ocorre mais taxa de multiplicação celular, ocorreu até o 49º de cultivo. Em calos oriundos de segmentos foliares de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) a fase Lag se estende até o 15º dia de cultivo e a fase de multiplicação até o 40º dia (Feitosa et al., 2013). Porém, esta fase Lag em calos de ipê-branco (*Tabebuia róseo-alba*) induzidos em segmentos foliares tem duração aproximada de 30 dias e a fase de maior multiplicação ocorre até os 60 dias (Abbade, 2008). Após a fase exponencial, ocorre a redução de nutrientes no meio de cultura e a extrusão de compostos fenólicos que causam a oxidação das massas celulares.

1.2.2.2. Análises microscópicas e ultraestruturais

A análise ultraestrutural, através da microscopia eletrônica de varredura, vem sendo utilizada em vários estudos de embriogênese somática e organogênese, com o intuito de fornecer maiores detalhes da morfologia externa destas células (Appezato-da-Gloria & Machado, 2004; Nogueira et al., 2007). É possível diferenciar as estruturas formadas, o processo de regeneração e a caracterização dos estágios embriogênicos em globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Nogueira, 2006) sendo possível verificar também, a formação anormal de embriões somáticos (Pescador et al., 2008).

Análises ultraestruturais e histoquímicas são estratégias para aumentar o conhecimento sobre o comportamento celular de calos e melhorar a eficiência do processo embriogênico. Células embriogênicas geralmente possuem características comuns entre si. Apresentam rápida divisão mitótica, tamanho pequeno, citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo proeminente, pequeno vacúolo e abundância

de grãos de amido. Células que apresentam essas características apresentam uma síntese de RNA intensa e alta atividade metabólica (Stein et al., 2010).

O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas também tem sido utilizado para o entendimento da embriogênese em várias espécies vegetais (Moura, 2007). A análise histoquímica, com a utilização de corantes químicos, possibilita a visualização de algumas características dos embriões. Com a utilização de lugol, é possível visualizar a presença de amido, indicativo de alto metabolismo celular, e com o azul de toluidina é possível observar a formação de parede celular, permitindo a visualização de tecidos do embrião somático como meristema fundamental, procâmbio e protoderme evidenciando a formação normal dos embriões e o seu estágio de desenvolvimento (Fillipi et al., 2001; Moura, 2007; Pádua, 2012).

Stein et al. (2010), analisando calos de *Inga vera* Willd., observou diferença entre as células dos calos de anteras, ovários, segmentos nodais e folhas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Apesar dos calos de anteras exibirem algumas características embriogênicas, somente as células do ovário apresentaram este potencial, apresentando proliferação celular organizada. Carvalho et al. (2013) induzindo calos em cotilédones de *Passiflora gibertii* N. E. Brown. observaram diferença ultraestruturais relacionadas com a coloração dos calos. Através da MEV, foi possível verificar que calos com coloração branca e amarelo-escuro possuíam pequenas células isodiamétricas bem organizadas, indicando possível potencial embriogênico.

Através de análise histoquímica realizadas em embriões somáticos a partir de inflorescências de bananeira, Fillipi et al. (2001) observaram diferentes formações em embriões da mesma cultivar tendo apresentado uma protoderme definida caracterizada por células justapostas. Em embriões mais desenvolvidos foi possível observar faixas pró-cambiais e o meristema caulinar. Essa análise também possibilita a visualização de possíveis falhas durante esse processo, fornecendo informações importantes sobre o cultivo *in vitro*.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo geral

Objetivou-se com essa pesquisa desenvolver protocolo de micropropagação de Gabirobeira a partir de segmentos nodais e caracterizar anatômica e ultraestruturalmente a calogênese.

1.3.2. Objetivos específicos

- Induzir brotações em segmentos nodais de Gabirobeira utilizando diferentes doses do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP);
- Induzir enraizamento em segmentos nodais de Gabirobeira utilizando diferentes concentrações e reguladores de crescimento;
- Induzir calogênese em segmentos nodais de Gabirobeira utilizando diferentes concentrações de regulador de crescimento e cinco fontes diferentes de auxina;
- Estabelecer a curva de crescimento dos calos de Gabirobeira;
- Caracterizar anatômica e ultraestruturalmente os calos formados durante a curva de crescimento.

1.4. Referências bibliográficas

- ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. Lavras, 2008, p.127. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 429-437, 2004.
- ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos Cerrados – Preservação gera muitos frutos. **Biociência**, v.3, n.15, p.36-41, 2003.
- BATISTA, T. R. **Organogênese e embriogênese somática de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012, p. 76. Dissertação (Agronomia/Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 385-389, 2004.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maidem & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maidem. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BRONDANI, G. E.; ONDAS, H. W. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 48, p. 478-487, 2012.
- CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do Cerrado. In.: ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de Ipê-branco**. Lavras, 2008, p. 127. Dissertação (Mestre em Agronomia), Universidade Federal de Lavras.
- CAMPOS, N. A. **Estratégias para conservação *in vitro* de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*): micropropagação, unidades encapsuláveis e criopreservação**. 2014, 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos. **Plant cell culture & micropropagation**, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011.
- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal Botany**, v. 36, n. 2, p. 141-151, 2013.
- CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de exalantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 301-308, 2002.

- COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDAL, N. K.; SILVA, J. R. M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 53-60, 2008.
- FEITOSA, L. S.; COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M. P.; BLANK, A. F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- FILLIPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.
- FREITAS, J. B.; CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R. Geleia de gabioba: avaliação da aceitabilidade e características físicas e químicas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 87-94, 2008.
- FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, p. 873, 2010.
- 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. et al. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 463-508, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, 1998.
- GRESSLER, E. et al. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.
- IAPICHINO, G.; AIRÒ, M. Micropropagation of *Metrosideros excelsa*. **In Vitro Cell**, v. 44, p. 330-337, 2008.
- IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v. 2, 1999.
- LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência & Agrotecnologia**, v. 24, p. 56-63, 2000.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brasil: na illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LEITE, J. F. REDD: 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.

LIU, X.; YANG, G. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) on nodal explants of mature elite cultivar. **International Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 2., p. 07-10, 2011.

LORENZI, H.; SARTORI, S.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. In: ASSIS, E. S. **Diversidade genética de gabiroleiras (*Campomanesia* spp) por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares RAPD**. Jataí, 2011. 61 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás.

MANTELLI, M.; SANTOS, S. C.; COSTA NETTO, A. P. **Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas de gabirola (*Campomanesia* spp.), sob nebulização intermitente**. Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão – CONPEEX, 2010.

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

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

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 24, p. 853-858, 2000.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Lavras, 2007. 66 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.

NASCIMENTO, A. C. **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. Lavras, 2006. 122 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. Lavras, 2006. 50 p. Dissertação (Agronomia/Fisiologia vegetal). Universidade Federal de Lavras.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 48-50, 2007.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análise bioquímica de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p 44-48, 2008.

PÁDUA, M. S. **Germinação *in vitro*, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.)**. Lavras, 2012. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

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

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.

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 Biosciências**, v. 5, n. 2, p. 498-500, 2007.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canéfora* L. cv. Apoatã. **Revista Magistra**, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.

SANTOS, D. N.; NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; VALENTE, T. C. T.; OLIVEIRA, A. C. L.; SILVEIRA, N. M. Análise bioquímica de calos de pinhão-mansão. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2268-2273, 2010.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SCUTTI, M. B.; ZANETTE, F. Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) vegetative propagation *in vitro* and by cutting. **Scientia Agraria**, v.1, n.1-2, p. 75-82, 2000.

SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 27, n.4, p. 639-646, 1992.

SOARES, G. A. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC) T.D. Penn.]. In.: NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Birsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biosciências**, v. 5, n.2, p. 48-50, 2007.

SOUZA, G. C. **Qualidade fisiológica de sementes de duas espécies frutíferas do gênero *Campomanesia***. 2014, 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2014.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 260 -261, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed, 2008.

STEIN, V. C.; PAIVA, R. VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, v. 34, n.5, p. 789-796, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

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 sompática 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.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. **Ciência Tecnologia e Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDEZ, L. G.; BELLO KOBLITS, M. G.; SILVA, M. L. C. Indução, caracterização bioquímica e ultraestrutural de calos de aoreira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

WILSON, P. G. et al. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

CAPITULO 2 – PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium* Camb.)

RESUMO – Objetivou-se obter protocolo de multiplicação e rizogênese de Gabirobeira *in vitro*, utilizando 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações e ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 3-indolacético (AIA) para a indução de rizogênese. Utilizou-se segmentos nodais provenientes de plântulas mantidas *in vitro* ao quarto subcultivo em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,9 mM de polivinilpirrolidona. Para a indução de brotações, foram adicionados diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) de BAP e o experimento foi mantido em duas condições ambientais, na influência ou não da radiação fotossinteticamente ativa (intensidade luminosa de 43 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para a indução de rizogênese, foram utilizadas diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) de AIB, ANA e AIA. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições (cada repetição com três tubos), porém o experimento de brotações foi conduzido em esquema fatorial 2x5 (dois ambientes e cinco concentrações). Todos os tratamentos induziram brotações, porém, para taxa de multiplicação, comprimento da maior brotação e presença de folhas, concentrações entre 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP sem radiação fotossinteticamente ativa foram melhores. Ocorreu protrusão de raízes somente aos 80 dias. Os tratamentos com 2,0 mg L⁻¹ de AIB, 2,0 mg L⁻¹ de AIA e a testemunha apresentaram as maiores médias do número de raízes, já para o comprimento da maior raiz, as concentrações com AIB foram melhores. Entretanto os resultados para número de raízes não foram significativos. A concentração indicada para indução de brotações é 1,0 mg L⁻¹ de BAP mantida no escuro para que ocorra alongamento. Não foi possível obter protocolo eficiente para rizogênese.

Palavras-chave: Gabiroba, rizogênese, brotações, multiplicação, regulador de crescimento

CHAPTER 2 – MICROPROPAGATION OF GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium* Camb.)

SUMMARY – The aim of this work was to develop multiplication protocol and *in vitro* rooting of Gabirobeira, using 6-benzylaminopurine (BAP) on shoot induction and indolbutiric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA) and indoleacetic acid (IAA) for the induction of root formation. It was use nodal segments from seedlings maintained *in vitro* subculture the fourth inoculated in culture medium WPM (Wood Plant Medium), added of 30 g L⁻¹ sucrose, 7 g L⁻¹ agar and 0,9 mM polyvinylpyrrolidone. For shoot induction, different concentrations were used (0; 0,25; 0,5; 1,0 and 2,0 mg L⁻¹) of BAP and the experiment was conducted in two environmental conditions, in the influence or not photosynthetic active radiation (light intensity of 43 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). For root induction, different concentrations were used (0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 mg L⁻¹ and a control) of IBA, NAA and IAA. The experiments were conducted in a completely randomized design with 5 repetitions (each repetition with three tubes), but shoots experiment was conducted in a factorial 2x5 (two environments and five concentrations). All the treatments induced shots formations, but for multiplication rate, length of budding and presence of leaves, concentrations between 0,5 and 2,0 mg L⁻¹ BAP without photosyntetically active radiation were better. It was possible to observe the protruding roots only at 80 days. Treatment with 2,0 mg L⁻¹ IBA, 2,0 mg L⁻¹ IAA and the control had the highest roots average number. As for roots length AIB concentrations were better. However, results for roots number of were not significant. The concentration indicated for shoot induction is between 1,0 mg L⁻¹ of BAP kept in the dark for elongation to occur. Could not get efficient protocol for root formation.

Keywords: Gabiroba, root formation, shoots, multiplication, growth regulator

2.1. Introdução

A Gabirobeira (*Campomanesia adamantium* Camb.) é uma espécie frutífera nativa do Cerrado, que vem se destacando pelo alto potencial econômico, pois seus frutos são consumidos *in natura* ou na forma de sucos, doces, geléias e sorvetes (Bradiviesso et al., 2011), além de serem utilizados na indústria de bebidas devido a sua elevada acidez, presença de ácido ascórbico, minerais, hidrocarbonetos monoterpênicos, sendo estes fatores que conferem-lhe aroma cítrico (Vallilo et al., 2006).

No entanto, o uso extrativista dos frutos que são obtidos diretamente das populações naturais e a destruição da vegetação nativa do Cerrado causada pelo avanço das fronteiras agrícolas, vêm ocasionando um progressivo esgotamento dos recursos desse bioma. Somando-se a estes acontecimentos, a propagação natural e comercial da Gabirobeira tem sido dificultada pela recalcitrância de suas sementes (Melchior et al., 2006; Nogueira, 2012; Souza, 2014), fato que aumenta a importância do desenvolvimento de estudos para a obtenção de mudas por via assexuada.

O cultivo de células e tecidos é utilizado para a formação de mudas frequentemente mais uniformes, em pequeno espaço e curto período de tempo e com alta qualidade fitossanitária, a partir de plantas elite pela técnica de micropropagação. O importante durante esse processo é obter taxas satisfatórias de multiplicação com o mínimo de variação de explante para explante (Cañal et al., 2001; Moraes et al., 2012).

Essa técnica engloba algumas etapas, que vão do estabelecimento *in vitro*, enraizamento e posterior aclimatização da microplanta (Bastos et al., 2007; Santos et al., 2006), sendo que a composição do meio nutritivo e a combinação dos reguladores de crescimento são fatores fundamentais para a produção de plantas em larga escala (Smith, 2013).

No caso de frutíferas do Cerrado, os reguladores de crescimento possuem importância ainda maior, visto que a maioria destas espécies necessitam dos estímulos gerados por estes compostos, sendo indispensáveis para o bom desenvolvimento da cultura *in vitro*. No entanto, as respostas variam conforme a espécie, as classes, tipos e doses do regulador de crescimento utilizado (Pinhal et al., 2011).

Nos processos de micropropagação, os reguladores mais importantes são citocininas e auxinas, sendo a primeira utilizada na multiplicação de gemas laterais e a segunda na indução de rizogênese (Smith 2013). Dentro da família Myrtaceae, o gênero *Eucalyptus* spp. é um dos mais estudados e tem demonstrado resultados satisfatórios para micropropagação, sendo o BAP utilizada para a multiplicação de gemas axilares e ANA e AIB na indução de rizogênese (Borges et al., 2012; Brondani et al., 2009; Brondani et al., 2012; Navroski et al., 2013).

Visando o conhecimento sobre o desenvolvimento da Gabirobeira para posterior implantação de lavouras comerciais, utilização no reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, objetivou-se obter protocolo de multiplicação e rizogênese de Gabirobeira *in vitro*, utilizando 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações e ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 3-indolacético (AIA) para a indução de rizogênese.

2.2. Material e métodos

2.2.2. Material vegetal

As sementes utilizadas foram coletadas no Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, em dezembro de 2013 e levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos da mesma instituição.

Primeiramente as sementes, retiradas dos frutos, sofreram ação mecânica (esfregaço) para a remoção da mucilagem. Posteriormente foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguidos de desinfestação, em fluxo laminar, com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo durante 10 minutos. Após lavagem com água destilada e autoclavada, as sementes forma inoculadas em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,9 mM de polivinilpirrolidona (PVP) e pH ajustado a 5,8 autoclavado a 121° C por 20 minutos. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de fóton de 43 μmol m⁻²s⁻¹.

2.2.3. Indução de brotações

Segmentos nodais, com cerca de 1 cm de comprimento, contendo um par de gemas axilares foram excisados de plântulas germinadas *in vitro* e subcultivadas a cada 40 dias nas mesmas condições iniciais do item 2.2.2.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 0,9 mM de PVP e utilizando diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), sendo o pH do meio de cultura ajustado para 5,8 e, posteriormente autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C.

Os tratamentos foram mantidos em duas condições ambientais, na presença e ausência de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) (fotoperíodo de 16h com irradiância de fóton de 43 μmol m⁻²s⁻¹) (Figura 1). Aos 40 dias de cultivo, avaliou-se o número de brotações, número de folhas, comprimento da maior brotação, taxa de multiplicação e presença de calos na base do explante. A taxa de multiplicação foi determinada dividindo-se o número de gemas axilares por explante, obtidos aos 40 dias de cultivo, pelo número de gemas axilares no estabelecimento do experimento (duas gemas), segundo metodologia descrita por Erig & Schuch (2002).

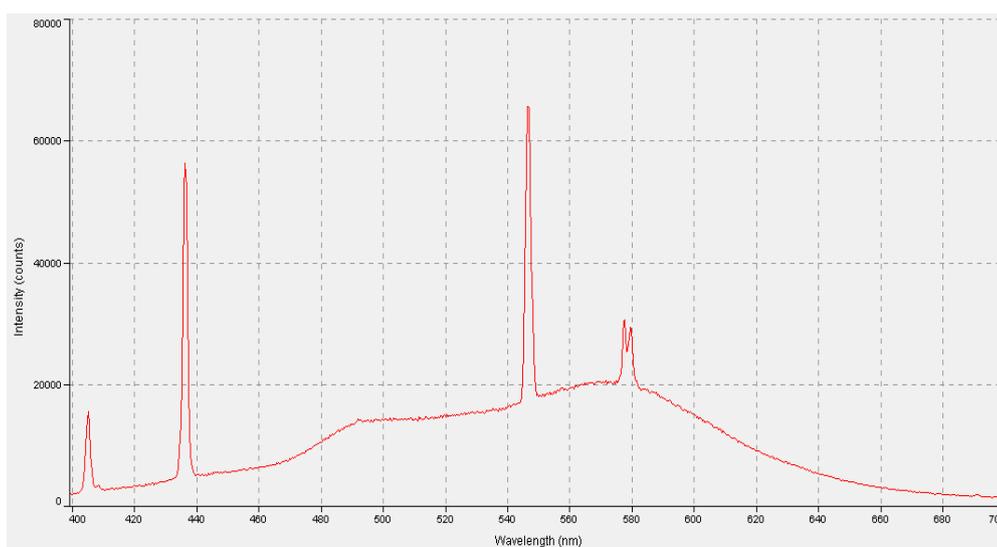


Figura 1 - Fluxo de fótons fotossintéticos presentes na sala de cultivo do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas UFG/Jataí – GO

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5 (dois ambientes e cinco doses) com 5 repetições cada tratamento. Cada repetição foi constituída de 3 tubos de ensaio com um explante em cada tubo. Os dados foram submetidos à ANAVA e as médias analisadas pelo teste de Tukey com 5% de significância. Para a variável calo, os dados foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, sendo atribuídas notas: 0 – ausência de caloe 1 – presença de calo. Os dados forma analisados com o auxílio do software Assistat (Silva & Azevedo, 2009).

2.2.4. Indução de rizogênese

Segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento e contendo um par de gemas axilares foram excisados de plântulas germinadas *in vitro* e subcultivadas a cada 40 dias nas mesmas condições iniciais do item 2.2.2.

Os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 0,9 mM de PVP e utilizando como reguladores de crescimento AIB, AIA e ANA nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, sendo o pH do meio de cultura ajustado para 5,8 e, posteriormente autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C, com irradiância de fóton de 43 µmol m⁻²s⁻¹.

Após os 40 e 80 dias de cultivo foram avaliados números de raízes, comprimento da maior raiz (mm) segundo metodologia proposta por Santos et al. (2006) e presença de calos na base do explante. Decorrente da baixa taxa de formação de raízes, os dados obtidos foram analisados através de análise descritiva devido a não normalidade dos dados, calculando-se a média dos tratamentos e aplicando o erro padrão da média. Para a variável calo, os dados foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com o auxílio do software Assistat (Silva & Azevedo, 2009).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Indução de brotações

A utilização de diferentes concentrações de BAP e a exposição a duas condições ambientais distintas resultou na interação entre os fatores, ou seja, os tratamentos não apresentaram semelhança na indução de brotações, comprimento da maior brotação e taxa de multiplicação (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1 – Análise de variância para ambiente (A) e concentrações (C) para os índices de brotação, taxa de multiplicação (T. M.), comprimento (Comp.) e folha em segmentos nodais de Gabirobeira

Tratamentos	Brotação	T. M.	Comp. (mm)	Folha
A	0,01 ^{ns}	2,25 ^{ns}	5,01*	-
C	4,13**	5,74**	2,19 ^{ns}	1,83 ^{ns}
AxC	3,05*	2,69*	4,42**	-

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F ^{ns}não significativo – variável folha analisada somente em ambiente com radiação fotossinteticamente ativa

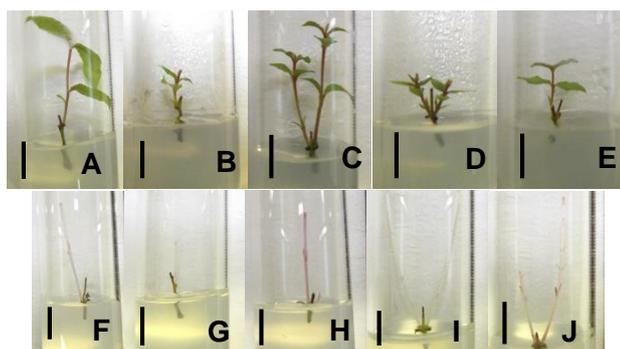


Figura 2 – Brotações em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM contendo diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}) – Com RFA: (A) 0,0; (B) 0,25; (C) 0,50; (D) 1,0; (E) 2,0. Sem RFA: (F) 0,0; (G) 0,25; (H) 0,50; (I) 1,0; (J) 2,0 – Barra: 1cm

Segundo Brondani et al. (2009) as citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, sendo que o sucesso da micropropagação depende da citocinina utilizada e da sua concentração, visto que o balanço hormonal é diferente para cada espécie.

Das citocininas utilizadas para a indução de multiplicações, o BAP é a que apresenta melhores resultados na propagação de gemas axilares (Borges et al., 2012; Brondani et al., 2009; Brondani et al., 2012; Navroski et al., 2013; Souza et al., 2008), sendo utilizada amplamente na propagação de espécies florestais brasileiras (Oliveira et al., 2013). Isso se deve principalmente a capacidade dos tecidos

vegetais metabolizarem os hormônios naturais mais rapidamente do que os reguladores de crescimento sintéticos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Todos os tratamentos induziram brotações, incluindo a testemunha (Tabela 2), porém, os tratamentos mantidos na presença de RFA e as maiores doses mantidas na ausência de RFA apresentaram melhores médias para a presença de brotações, indicando que a ausência de BAP ou baixas concentrações na ausência de RFA prejudicam a formação dos brotos.

Tabela 2 – Número médio de brotos em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM¹ contendo diferentes concentrações de BAP² e mantidos em duas condições ambientais

BAP ² (mg L ⁻¹)	Ambiente	
	Com RFA ³	Sem RFA ³
0,0	1,06 aA	0,40 cB
0,25	1,13 aA	0,73 bcA
0,5	1,20 aA	1,40 abA
1,0	1,33 aA	1,60 aA
2,0	0,80 aA	1,33 abA
CV ⁴ (%)	41,11	
DMS ⁵ para linha	0,81	
DMS ⁵ para coluna	0,57	

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

¹WPM – Wood Plant Medium; ²BAP – 6-benzilaminopurina; ³RFA – Radiação fotossinteticamente ativa; ⁴CV – Coeficiente de variação; ⁵DMS – diferença mínima significativa

Tabela 3 – Taxa de multiplicação em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM¹ contendo diferentes concentrações de BAP² em duas condições ambientais

BAP ² (mg L ⁻¹)	Ambiente	
	Com RFA ³	Sem RFA ³
0,0	2,60 aA	0,86 bA
0,25	2,40 aA	0,60 bA
0,5	3,30 aA	1,80 abA
1,0	4,43 aA	4,33 aA
2,0	2,10 aA	4,00 aA
CV ⁴ (%)	57,64	
DMS ⁵ para linha	2,75	
DMS ⁵ para coluna	1,94	

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

¹WPM – Wood Plant Medium; ²BAP – 6-benzilaminopurina; ³RFA – Radiação fotossinteticamente ativa; ⁴CV – Coeficiente de variação; ⁵DMS – diferença mínima significativa

Corroborando com os dados de brotações, a taxa de multiplicação apresentou resultados semelhantes, indicando que a testemunha e a concentração de 0,25 mg L⁻¹ de BAP mantidas sem RFA obtiveram as menores médias (Tabela 3).

Scutti & Zanette (2000) observaram resultados semelhantes durante a multiplicação de *Campomanesia xanthocarpa* Berg., onde 0,5 mg L⁻¹ de BAP resultou em melhores taxas para a indução de brotações, porém para se obter brotações mais longas nesta espécie, as brotações devem ser colocadas meio de cultivo sem a adição de reguladores de crescimento.

Campos (2014) observou maior média no número de brotos (dois brotos por segmento nodal) e maior número de novos segmentos nodais para explantes cultivados com adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP em experimentos realizados com *Campomanesia pubescens*, indicando que maiores concentrações inibiram a indução de brotações e a formação de folhas. Concentrações elevadas deste hormônio podem gerar desequilíbrio no balanço hormonal endógeno, prejudicando vários mecanismos celulares que podem gerar o desenvolvimento anormal de plântulas e problemas de toxidez (Nascimento, 2006).

Nascimento et al. (2008) utilizando diferentes concentrações de BAP na indução de brotações em *Eugenia pyriformis* Cambess verificaram brotações em todas as doses testadas, porém 1,0 mg L⁻¹ desta citocinina é indicada para a propagação, um vez que se mostrou eficiente produzindo dois brotos por explante com uma média de 7 gemas, obtendo ao final uma taxa de multiplicação de 3,5, resultado semelhante ao obtido neste trabalho. Para a multiplicação de *Eugenia uniflora* L., 1,13 mg L⁻¹ de BAP apresentou melhores resultados para a indução de brotações quando comparados com os reguladores de crescimento zeatina e isopenteniladenina, induzindo cerca de 2 brotações e em média 3,93 gemas por explante (Souza et al., 2008).

Para a variável comprimento da maior brotação, os tratamentos mantido sem RFA diferiram estatisticamente do ambiente com RFA nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, sendo obtidas médias de 21,39 mm e 14,78 mm no escuro e 6,64 mm e 6,66 mm no claro, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Comprimento médio da maior brotação em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM¹ contendo diferentes concentrações de BAP² em duas condições ambientais

BAP ² (mg L ⁻¹)	Ambiente	
	Com RFA ³	Sem RFA ³
0,0	10,40 aA	6,39 bA
0,25	8,39 aA	5,40 bA
0,5	10,08 aA	12,90 abA
1,0	6,64 aB	21,39 aA
2,0	6,66 aB	14,78 abA
CV ⁴ (%)	57,30	
DMS ⁵ para linha	10,66	
DMS ⁵ para coluna	7,55	

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

¹WPM – Wood Plant Medium; ²BAP – 6-benzilaminopurina; ³RFA – Radiação fotossinteticamente ativa; ⁴CV – Coeficiente de variação; ⁵DMS – diferença mínima significativa

Não verificou-se diferença estatística entre os tratamentos para a variável folha na presença de RFA, sendo que todos os tratamentos, incluindo a testemunha apresentaram a emissão de folhas (Tabela 5).

Tabela 5 – Número médio de folhas presente em brotações de segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM¹ contendo diferentes concentrações de BAP² mantidos com RFA³

BAP ² (mg L ⁻¹)	Com RFA ³
0,0	3,93 a
0,25	2,26 a
0,5	3,40 a
1,0	4,80 a
2,0	2,33 a
CV ⁴ (%)	53,25
DMS ⁵	3,37

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

¹WPM – Wood Plant Medium; ²BAP – 6-benzilaminopurina; ³RFA – Radiação fotossinteticamente ativa; ⁴CV – Coeficiente de variação; ⁵DMS – diferença mínima significativa

Quando as brotações são mantidas no escuro ocorre um crescimento geralmente alongado (estiolamento) com coloração amarelo ou branca devido à falta de clorofila (Hartmann & Kester, 1990).

Mesmo não apresentando diferenças significativas, no ambiente com RFA é possível verificar uma diminuição no comprimento médio da maior brotação quando as doses de BAP são maiores (Tabela 4). Já para o ambiente escuro, é esperado um comprimento maior das brotações induzidos pela concentração hormonal e pela

translocação da maior parte de seus recursos metabólicos para crescerem em altura, em busca de luz, por meio do alongamento dos entrenós (estiolamento) (Dardengo et al., 2013).

Os resultados obtidos com altas doses de citocinina na presença de RFA estão de acordo com o exposto por Nascimento (2006). Segundo este autor, o excesso de citocinina nos meios de cultura podem gerar entufamento e falta de alongamento das culturas. Com isso ocorre redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules além de apresentar vitrificação generalizada, levando a sérios problemas durante o processo de enraizamento.

A utilização do estiolamento já vem sendo utilizado em algumas espécies de importância econômica, dentre elas o abacaxizeiro, indicando benefícios nesse processo. Uma das vantagens é dada principalmente pelo fato do estiolamento atrasar a lignificação dos tecidos, reduzindo as propriedades mecânicas e facilitando o enraizamento das brotações estioladas (Carvalho et al., 2009; Moreira et al., 2003), resultando em uma alternativa viável na propagação vegetal de algumas espécies.

Foi possível observar a formação de calos em todos os tratamentos, exceto a testemunha, concluindo que a concentração endógena de auxina juntamente com a concentração exógena de BAP resultaram na proliferação de células não diferenciadas (Figura 3 e 4).

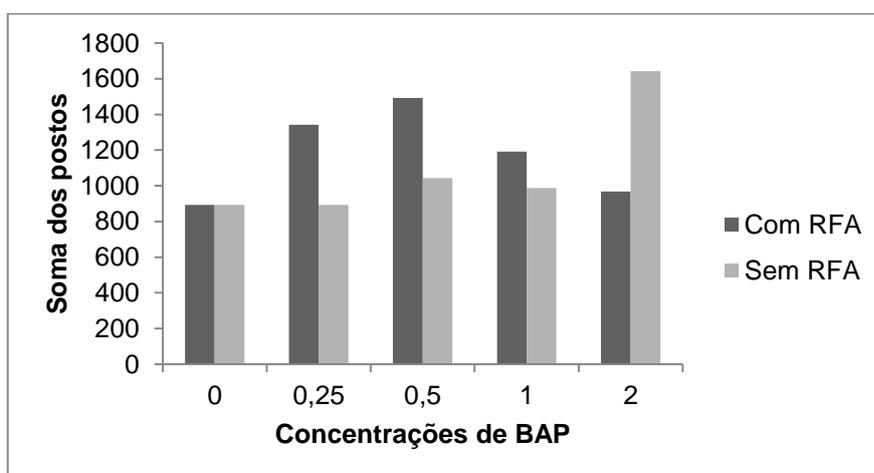


Figura 3 – Porcentagem média de calos induzidos na base dos segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM com diferentes concentrações de BAP em dois ambientes



Figura 4 – Calo formado na base de segmento nodal de Gabirobeira em meio de cultura WPM com concentração de BAP em ambiente claro – Barra: 1cm

De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que os tratamentos mantidos sem RFA, exceto 2,0 mg L⁻¹ de BAP, tiveram menor taxa de formação de calos na base do explante, indicando que os outros tratamentos tiveram o andamento da multiplicação prejudicados pela competição gerada pelas brotações e pela multiplicação celular.

Calos são massas de células desorganizadas, com tamanhos e colorações diferentes que podem ser formados a partir de uma ou várias células com potencial de diferenciação (Ikeuchi et al., 2013).

Resultado semelhante foi observado por Campos (2014) em segmentos nodais de *Campomanesia pubescens*, onde cerca de 90% dos segmentos apresentaram a formação de calos em todas as concentrações de BAP testadas.

Uma das alternativas que vem sendo empregada principalmente na propagação de diversos genótipos de *Eucalyptus* spp. é a adição de auxinas no meio de cultura, juntamente com concentrações de citocinina, que auxiliam na indução de brotações e alongamento do caule por estimular a divisão celular (Borges et al. 2012; Brondani et al., 2009; Navroski et al., 2013). Porém, segundo Grattapaglia & Machado (1998), quantidades excessivas de auxina no meio de cultura podem resultar na formação de calos na base do explante, processo inviável nestas condições, visto que se busca a indução de organogênese pela fase direta, ou seja, sem a formação de calo. As observações geradas neste experimento são suficientes para rejeitar interações entre citocinina e auxina na indução de brotações em *C. adamantium*.

2.3.2. Indução de rizogênese

Foi possível observar a protrusão de raízes somente aos 80 dias. Os tratamentos com 2,0 mg L⁻¹ de AIB, 2,0 mg L⁻¹ de AIA e a testemunha obtiveram as maiores médias do número de raízes (0,43; 0,33 e 0,26 respectivamente) (Figura 5).

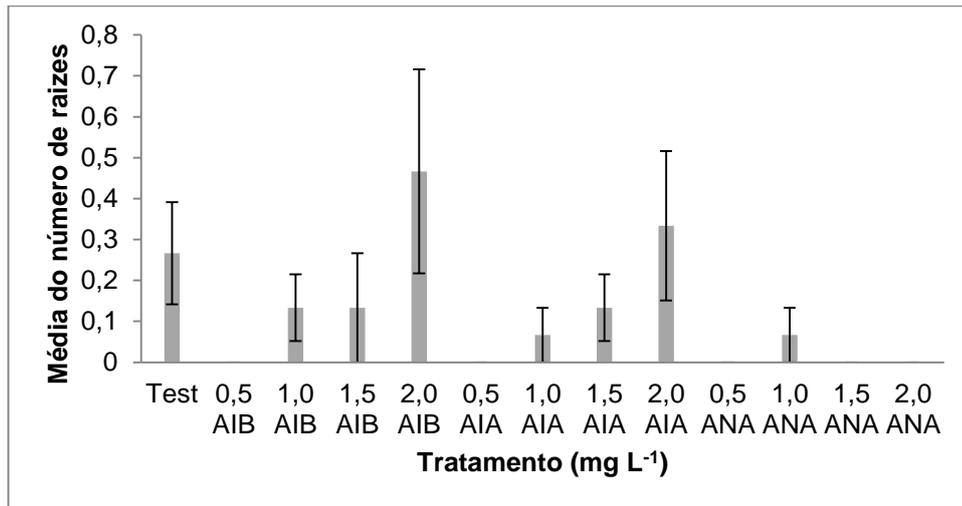


Figura 5 – Média do número de raízes em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM com diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA – Barra: erro padrão da média

Para o comprimento da maior raiz, as concentrações que obtiveram maiores médias foram 2,0 mg L⁻¹ de AIB, 1,0 mg L⁻¹ de AIB e a testemunha (4,14; 2,35 e 2,54 respectivamente) (Figura 6).

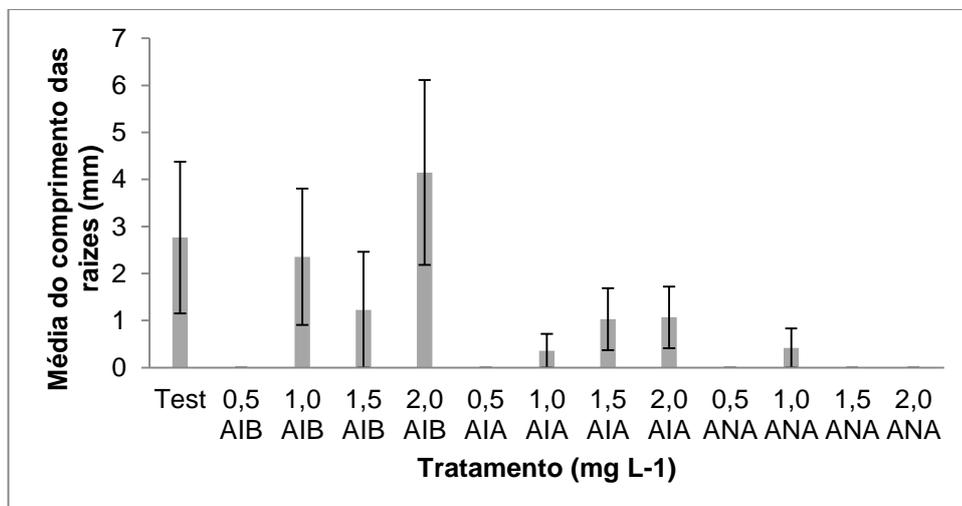


Figura 6 – Média do comprimento da maior raiz em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM com diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA – Barra: erro padrão da média

A Figura 7 demonstra a protrusão de raízes adventícias em segmentos nodais de Gabirobeira com diferentes concentrações hormonais.



Figura 7 – Rizogênese em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM – (A) $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ AIB; (B) $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ AIA e (C) Testemunha – Barra: 1 cm

A concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA que havia obtido uma das maiores médias para o número de raízes apresentou comportamento possivelmente fitotóxico, uma vez que o comprimento da raiz diminuiu quando comparada com as dosagens que induziram maior número de raízes. Este resultado pode ser explicado porque durante o processo de formação radicular, o explante necessita de auxina para as fases de indução e iniciação, porém para a fase de crescimento (elongação) as raízes podem ser inibidas na presença de certas dosagens de auxina (Souza & Pereira, 2007).

A utilização de explantes ao quarto subcultivo pode ser o motivo da obtenção de baixas taxas de rizogênese. Isso se deve ao fato de ter sido utilizado explantes oriundos de plântulas mantidas *in vitro* após a germinação e não a utilização das brotações induzidas no experimento anterior.

A utilização de explantes jovens no processo de enraizamento é mais eficiente porque os explantes respondem melhor aos estímulos hormonais do que os explantes mais velhos (Pierik et al., 1997). Já a vantagem da utilização de explantes oriundos das brotações induzidas e alongadas pelo processo de multiplicação é a menor lignificação dos tecidos, facilitando assim a protrusão de raízes adventícias (Carvalho et al., 2009; Moreira et al., 2003).

O processo de contínuas subculturas vem sendo utilizado para promover o rejuvenescimento dos tecidos *in vitro*, principalmente em espécies lenhosas, com o intuito de aumentar a capacidade de enraizamento (Souza & Pereira, 2007). Porém, para algumas espécies essa metodologia acaba afetando a capacidade de emitir raízes dos explantes.

Campos (2014) induzindo rizogênese em *Campomanesia pubescens* obteve taxa de 50% utilizando 1,02 mg L⁻¹ de AIB após dois subcultivos. Porém após oito subcultivos a utilização de diferentes concentrações de reguladores de crescimento AIB, AIA e ANA não foram eficientes para a indução de raízes, concluindo que esta espécie é recalcitrante para enraizamento *in vitro* após oito subcultivos.

Scutti e Zanetii (2000) obtiveram indução de raízes em meio de cultura sem a utilização de reguladores de crescimento em *Campomanesia xanthocarpa*. Para a espécie *Psidium guajava* L., foi obtido taxa de 78% de indução de raízes sem a presença de reguladores de crescimento, porém os melhores resultados foram obtidos com 1,0 mg L⁻¹ de AIB, indicando também que todas as concentrações de ANA testadas induziram a formação de calos e não de raízes (Rai et al., 2009).

Uma das alternativas que vem sendo empregada durante o processo de rizogênese é a utilização de carvão ativado no meio de cultura principalmente por seu efeito físico, já que simula o ambiente escuro, mas também por absorver substâncias como compostos fenólicos e substâncias residuais como citocininas provenientes do processo de multiplicação (Souza & Pereira, 2007). Em *Eugenia pyriformis* Cambess a utilização de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de AIB induziu cerca de 50 % de raízes em meio de cultura na presença de carvão ativado (Nascimento et al., 2008). Porém, para algumas espécies como *Campomanesia pubescens*, o uso desta técnica não se mostrou favorável, sem nenhum efeito sobre o processo de rizogênese (Campos, 2014).

Foi possível observar a formação de calos na base dos explantes em todos os tratamentos, exceto na testemunha (Figura 8 e 9). Esse é um dos principais problemas durante a elaboração de protocolos de micropropagação, pois as massas celulares acabam comprometendo a protrusão de raízes e também de brotações (Radmann et al., 2002). Além do problema exposto, estas estruturas podem interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo principalmente o processo de aclimatização das plantas (Souza & Pereira, 2007).

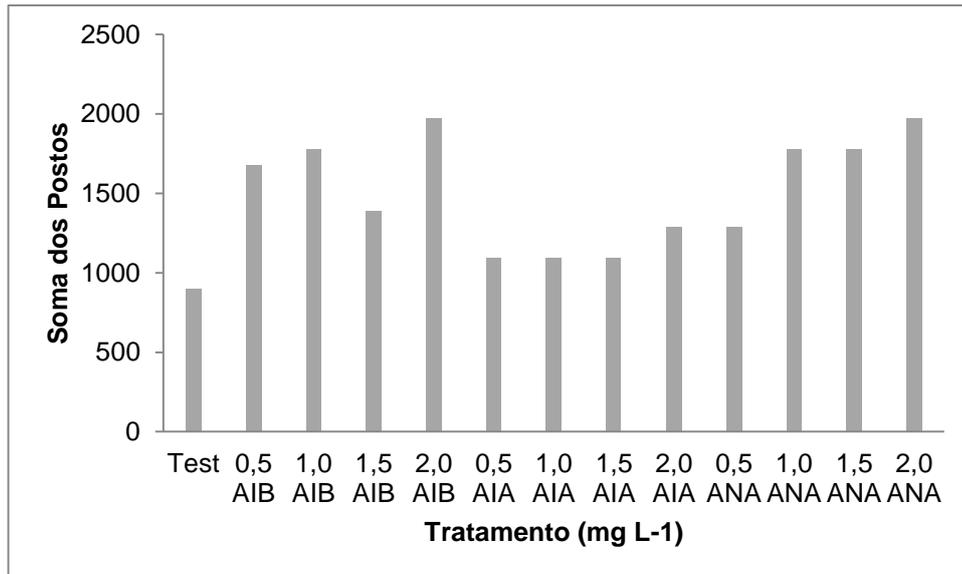


Figura 8 – Porcentagem média de calos induzidos na base dos segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM com diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA

Uma alternativa para que esse problema não ocorra, é a utilização de doses maiores de auxina, visto que os calos são formados quando há um balanço igual de auxina e citocinina (Taiz & Zeiger, 2013).

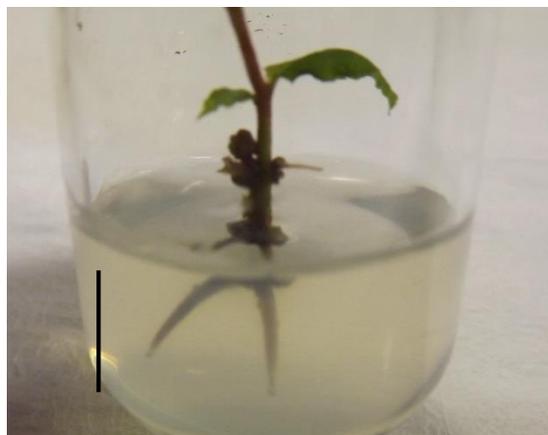


Figura 9 - Calo formado na base de segmento nodal de Gabirobeira em meio de cultura WPM com 2,0 mg L⁻¹ de AIB – Barra: 1cm

2.4. Conclusão

Para a indução de brotações em *Campomanesia adamantium* é indicado a utilização de meio de cultura WPM suplementado com concentrações entre 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP mantidas sem RFA por promover maior número de brotos, taxa de multiplicação e maior comprimento da maior brotação.

Não foi possível estabelecer um protocolo eficiente para a indução de rizogênese.

2.5. Referências

- BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007.
- BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K.; MELO, L. A. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus glóbulos*. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 605-116, 2012.
- BARDIVIESSO, D. M.; MARUYAMA, W. I.; REIS, L. L.; MDESTO, J. H.; REZENDE, W. E. Diferentes substratos e recipientes na produção de mudas de gabioba (*Campomanesia pubescens* O.Berg.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.18, n.1, p. 52-59, 2011.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maidem & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maidem. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BRONDANI, G. E.; ONDAS, H. W. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 48, p. 478-487, 2012.
- CAMPOS, N. A. **Estratégias para conservação *in vitro* de gabiobeira (*Campomanesia pubescens*): micropropagação, unidades encapsuláveis e criopreservação**. 2014, 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- CAÑAL, M. J.; RODRÍGUES, R.; FERNÁNDEZ, B.; SÁNCHEZ-TEMES, R.; MAJADA, J. P. Fisiología del cultivo *in vitro*. **Biotechnology vegetal**, v. 1, p. 3-9, 2001.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.
- DARDENGO, M. C. J. D.; SOUSA, E. F.; REIS, E. F.; GRAVINA, G. A. Crescimento e qualidade de mudas de café conilon produzidas em diferentes recipientes e níveis de sombreamento. **Coffe Science**, v. 8, n. 4, p. 500-509, 2013.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira CV. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 293-295, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagation de plants: pricipios y practicas**. In: MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B.

Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro Cv. Pérola. **Ciência e agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Journal Combined Proceedings, International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427.

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

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.

MOREIRA, M. P.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Perola. **Ciência e agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

NASCIMENTO, A. C. **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. 2006, 122p. Dissertação (Agronomia/Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista acadêmica: Ciências agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O.; CURTI, A. R.; PAIM, A. F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maidem. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

PIERIK, R. L. M.; OOSTERKAMP, J.; EBBING, M. A. C. Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* "Fastigiata". **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 1/2, p. 87-92, 1997.

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

RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.

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 pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 8, n. 2, p. 293-296, 2006.

SCUTTI, M. B.; ZANETTE, F. Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) vegetative propagation *in vitro* and by cutting. **Scientia Agraria**, v.1, n.1-2, p. 75-82, 2000.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. **Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance**. In: World congress on the computers in agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SMITH, R. H. **Plant Tissue Culture – Techniques and experiments**. Texas: College Station, 2013.

SOUZA, G. C. **Qualidade fisiológica de sementes de duas espécies frutíferas do gênero *Campomanesia***. 2014, 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2014.

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, 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.

VALILLO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.BERG. **Ciências e Tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

CAPÍTULO 3 – INDUÇÃO, CURVA DE CRESCIMENTO, CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL EM CALOS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia adamantium* Camb.)

RESUMO – Objetivou-se induzir calos em segmentos nodais de Gabirobeira e verificar seu potencial embriogênico. Segmentos nodais foram obtidos de plântulas *in vitro* após 40 dias de cultivo e inoculados em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,9 mM de polivinilpirrolidona sendo o pH ajustado para 5,8. Para a indução de calogênese, foram utilizadas diferentes concentrações (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) de ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 3-indolacético (AIA), 2,4-diclorofenoxiacético e Picloram. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições cada tratamento (3 tubos cada repetição). A curva de crescimento foi obtida verificando-se a matéria fresca dos calos induzidos com 1,0 mg L⁻¹ de picloram em intervalos de 7 dias, sendo retiradas amostras aos 14, 28, 42 e 56 dias para a realização das análises histoquímicas e ultraestruturais. Calos foram formados em todas as concentrações testadas, exceto na testemunha, porém 1,0 mg L⁻¹ de picloram se mostrou mais eficiente. Através da curva de crescimento do calo juntamente com as análises histoquímicas e ultraestruturais, é possível inferir que ao 28^o dia os calos devem ser transferidos para novos meios de cultura, visto que durante este período é possível visualizar a formação de centro meristemático se destacando da periferia, porém a partir do 28^o dia após a inoculação, as massas celulares não possuem mais característica embriogênica.

Palavras-chave: Calogênese, regulador de crescimento, embriogênese somática, potencial embriogênico

CHAPTER 3 – INDUCTION, GROWTH CURVE, HITOCEMICAL AND ULTRASTRUTURAL CHARACTEIZATION IN GABIROBEIRA CALLUS (*Campomanesia adamantium* Camb.)

SUMMARY – The aim of this work was callus induction in nodal segments of Gabirobeira and check their embryogenic potential. Nodal segments were obtained from seedlings *in vitro*, after 40 days were inoculated on culture medium WPM (Wood Plant Medium), added of 30 g L⁻¹ sucrose, 7 g L⁻¹ agar, 0,9 mM polyvinylpyrrolidone and the pH as adjusted to 5,8. For induction of callus, different concentration were used (0; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L⁻¹) of induction and indolbutiric acid (AIB), naphthaleneacetic acid (ANA), indoleacetic acid (AIA), picloram and 2,4-dichlorophenoxyacetic. The experiment was conducted in a completely randomized design with 5 repetitions each treatments (three tubes each repetitions). The growth curve was obtained with fresh weight of callus induced with 1,0 mg L⁻¹ picloram, every 7 days, being samples taken at 14, 28, 42 and 56 days to histochemical and ultrastructural analysis. Callus were induced in all concentrations, except in the control, but 1,0 mg L⁻¹ of picloram was more efficient. Through the showth curve of callus anatomic cuts and ultrastructural analysis, we can infer that after 28 days the callus should be transferred to new media culture since during it was possible to visualize the formation of meristematic center highlighting the periphery, but from the 28th day after inoculation, the cell masses are no longer feature embryonic.

Keywords: Calogenesis, growth regulator, somatic embryogenesis, embryogenic potential

3.1. Introdução

Campomanesia adamantium CAMB., pertencente a família Myrtaceae, é popularmente conhecida como Gabirobeira e possui importância econômica bastante diversificada. Seus frutos são muito apreciados pelos habitantes da região do Cerrado, podendo ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, sorvetes, picolés, doces e licores (Bardivieso et al., 2011).

A propagação da Gabirobeira é realizada por meio de sementes, porém a sua recalcitrância dificulta a sua propagação sexuada (Melchior et al., 2006; Nogueira, 2012; Souza, 2014). O conhecimento a respeito desta espécie ainda é incipiente, e se faz necessário para a inserção no mercado consumidor, preservação do seu estado natural e implantação de lavouras comerciais (Oliveira et al., 2011).

As técnicas da cultura de tecidos vêm sendo amplamente utilizadas para a propagação de espécies recalcitrantes e tem apresentado bons resultados e propiciando a propagação em larga escala de várias frutíferas do Cerrado (Pinhal et al., 2011).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos a organogênese e a embriogênese somática indireta (com a formação de calos) são particularmente interessantes para a obtenção de plantas *in vitro* em larga escala.

Os tecidos vegetais possuem totipotência e alta plasticidade para a diferenciação celular, principalmente quando colocados em contato com meios de culturas adequados na presença ou não de reguladores de crescimento sofrendo sucessivas divisões celulares e formando aglomerados de células denominados calos (Ikeuchi et al., 2013). Os calos podem ser estimulados fisiologicamente e diferenciarem-se em órgãos ou embriões somáticos.

A indução de calos é uma técnica amplamente empregada na cultura de tecidos, pois pode ser utilizada também como indicativo das condições de cultura que o explante requer para crescer (Siqueira & Inoue, 1992) e para estudar o desenvolvimento das células, explorando produtos que são gerados pelo metabolismo primário e secundário, podendo-se obter ao final, suspensões celulares, multiplicação em larga escala e a formação de gametas e embriões somáticos (Landa et al., 2000). Outra vantagem destes processos é a utilização em programas de transformação genética, regenerando plantas transformadas de forma mais eficiente (Fernandes et al., 2008).

No entanto, essas células podem ou não possuir competência para regenerar estruturas organizadas, expressando sua totipotencialidade se estimuladas de forma adequada. Isso significa que cada célula já diferenciada pode ser induzida a voltar ao seu estado meristemático, redefinindo seu padrão de diferenciação celular e desenvolvendo ao final novos órgãos ou embriões somáticos (Termignoni, 2005).

Durante a fase de calo, acompanhamentos citológicos e ultraestruturais se fazem necessários, pois assim é possível identificar células que possuem potencial organogênico ou embriogênico, obtendo informações associadas à morfologia e os parâmetros bioquímicos das células viáveis, sendo possível também identificar a formação anormal de embriões somáticos (Moura et al., 2008; Pescador et al., 2008; Stein et al., 2010; Carvalho et al. 2013). Células de calos com este potencial possuem divisão mitótica rápida, tamanho pequeno e isodiamétrico, citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo proeminente, pequeno vacúolo e abundância de grãos de amido (Stein et al., 2010), indicativos que podem ser obtidos através da utilização destas análises.

Análises ultraestruturais e citológicas já vêm sendo realizadas em algumas espécies da família Myrtaceae no intuito de descrever sequências de eventos morfogenéticos envolvidos no desenvolvimento e formação de embriões somáticos (Pescador et al., 2008; Correia & Canhoto, 2010; Pinto et al., 2010). Com isso, objetivou-se a indução de calos em segmentos nodais de Gabirobeira e a partir da curva de crescimento de calo verificar o comportamento citológico e ultraestrutural das células formadas.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material vegetal

As plântulas utilizadas como fonte de explante foram provenientes da germinação *in vitro* de sementes de Gabirobeira inoculadas em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado a 5,8. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de fóton de 43 μmol m⁻²s⁻¹.

Para a indução de calogênese utilizou-se plântulas com 40 dias. Para o estabelecimento da curva de crescimento de calo, anatomia de calo e ultraestrutura do calo foram utilizados explantes de plântulas subcultivadas a cada 40 dias nas mesmas condições iniciais ao quarto subcultivo.

3.2.2. Indução de calogênese

Para a indução de calos foram utilizados como explantes segmentos nodais de Gabirobeira cultivadas *in vitro*. Os explantes de aproximadamente 1 cm foram inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,9 mM de PVP e pH ajustados a 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, a uma temperatura de 25 ± 2 °C.

Como tratamento, foram acrescidos ao meio de cultura diferentes concentrações (1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹, com uma testemunha) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), AIA (ácido 3-indolacético), AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenoacético) ou Picloram.

As avaliações foram realizadas de 30 em 30 dias até atingir 90 dias de inoculação, sendo avaliada a porcentagem de massa celular da seguinte forma: 1 = ausência de calo, 2 = 25% do explante recoberto por calo, 3 = 50% do explante recoberto por calo, 4 = 75% do explante recoberto por calo e 5 = 100% do explante recoberto por calo.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições (3 tubos cada repetição) sendo as notas de porcentagens de calo comparadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis utilizando o Software SAS® 9.3.

3.2.3. Curva de crescimento

Para a obtenção da curva de crescimento de calos, segmentos nodais de aproximadamente 1cm foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 30 mg L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,9 mM de PVP e 1,0 mg L⁻¹ de picloran e pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem a 121° C por 20 minutos. Após a

inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz a temperatura de 25 ± 2 °C.

Para a determinação da curva de crescimento de calo, utilizou-se 25 repetições que foram pesadas de 7 em 7 dias até a estabilização da curva de crescimento. O percentual de crescimento dos calos foi determinado pela equação descrita por Lameira et al. (1997):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{Pf - Pi}{Pf} * 100$$

Onde Pi = peso inicial e Pf = peso final dos calos.

3.2.4. Análise histoquímica

As análises histoquímicas foram realizadas no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras.

Foram realizadas com calos provenientes da curva de crescimento, sendo retiradas amostras de 14 em 14 dias até a estabilização da curva de crescimento. As amostras foram armazenadas em solução FAA 50% (formol, ácido acético glacial e etanol etílico) durante 72h e posteriormente conservadas em álcool 70%.

Segundo metodologia descrita por Pádua et al. (2013), as amostras foram desidratadas em série etílica (70%, 80%, 90% e 100%) por uma hora em cada concentração e duas vezes de 1 hora na concentração de 100%, posteriormente ficaram *over night* em álcool + resina (50%). Então as amostras foram colocadas em resina 100% durante 48 horas e depois emblocados em resina Leica de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram seccionadas com espessura de 5 µm em micrótomo rotativo e coradas com Azul de toluidina 0,05% e solução de lugol fraca, sendo as lâminas visualizadas em microscópio fotônico, Zeiss Scope.Al acoplado com câmera.

3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras.

Os calos utilizados para a realização da microscopia eletrônica de varredura foram provenientes da curva de crescimento, sendo as amostras retiradas de 14 em 14 dias até a estabilização da curva. As amostras foram imediatamente imersas em solução de fixação Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformoldeído 2,0%, tampão cacodilato 0,5M, pH 7,2).

As amostras foram lavadas em aldeído e posteriormente em tampão cacodilato 0,05M por 10 minutos e imersas em uma solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão cacodilato 0,05M com pH 7,2 por 1 hora, a temperatura ambiente. Após, foram lavadas em água destilada seguidas de soluções crescentes de acetona (25, 50, 75 e 100%) permanecendo 10 minutos em cada uma, sendo três vezes na concentração de 100%. Após a desidratação, as amostras foram secas ao ponto crítico por CO_2 líquido, revestida em ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss EM 109 (Bossola & Russel, 1998).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Indução de calogênese

Foi observada a formação de calos em todos os tratamentos na presença de auxina, porém não foi observado o mesmo na testemunha (Figura 10).

O tratamento com melhor performance na indução de calos em segmentos nodais de Gabirobeira foi $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram, uma vez que aos 30 dias observou-se a formação de calo em 100% dos explantes, sendo que aos 60 e 90 dias já era visualizada a oxidação dos mesmos. As dosagens de $2,0$ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram também demonstraram resultados semelhantes, porém só foi possível obter 100% de formação de calo a partir de 60 dias.

Segundo Titon et al. (2007) o picloram é utilizado para a indução de calos ou manutenção culturas em suspensões, induzindo também a formação de calos embriogênicos.

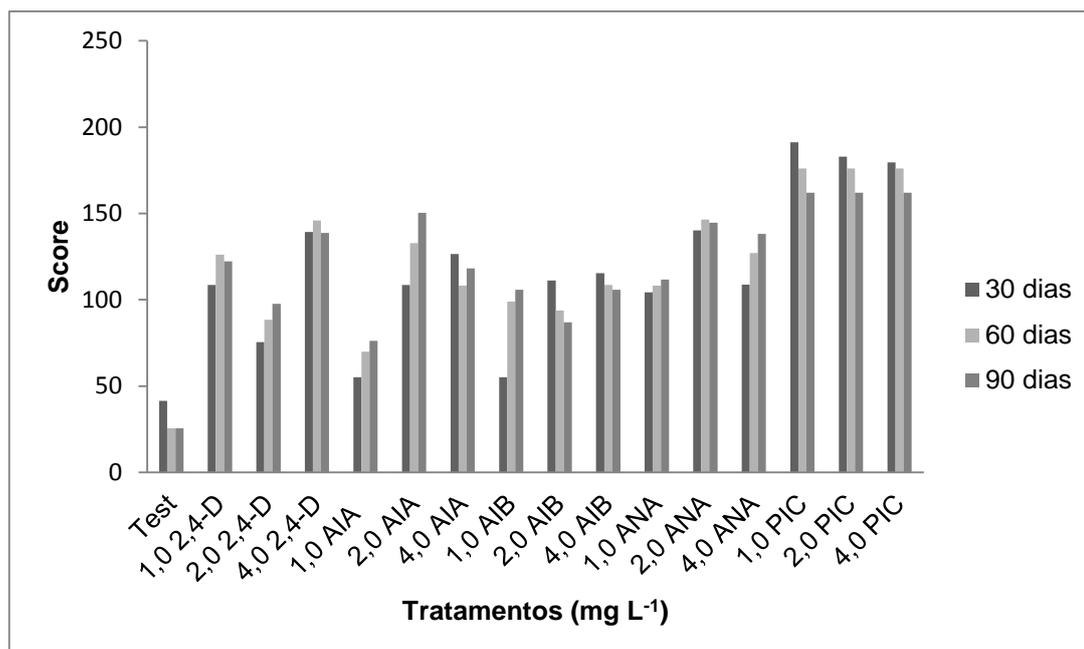


Figura 10 – Indução de calos em segmentos nodais de Gabirobeira em meio de cultura WPM com diferentes concentrações de 2,4-D, AIA, AIB, ANA e Picloram

A maioria dos trabalhos indica que a formação de calos tem sido obtida principalmente através do uso de 2,4-D (Reis et al., 2007), entretanto para segmentos nodais desta espécie, esta auxina não demonstrou resultados satisfatórios.

Calos com potencial embriogênico foram obtidos através de explantes cotiledonares de plântulas de *Eucalyptus grandis* utilizando picloram, porém as dosagens empregadas foram superiores a utilizada neste trabalho, sendo de 5 e 10 mg L⁻¹ (Titon et al., 2007).

A utilização de picloram também obteve resultados satisfatórios quando utilizado em segmentos caulinares e foliares de *Eugenia pyriformis* Cambess. Para a indução de calos em segmentos caulinares os melhores resultados obtidos foram utilizando 0,5 mg L⁻¹ de picloram, já para os segmentos foliares é necessário uma interação entre a auxina e citocinina, sendo utilizado 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de picloram (Nascimento, 2006).

3.3.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento de calos em segmentos nodais de Gabirobeira apresentou um padrão tipo sigmoide, apresentando as cinco fases de crescimento

(Figura 11). Com base nos dados observados durante a curva de crescimento e os disponíveis na literatura, é possível inferir que o crescimento das massas celulares em segmentos nodais de Gabirobeira é rápido.

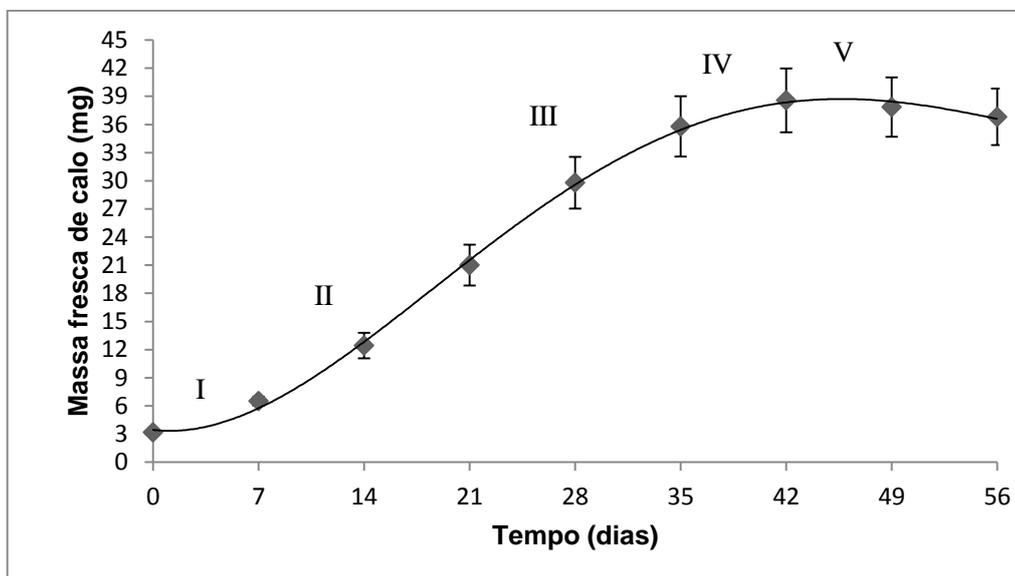


Figura 11 – Curva de crescimento de calos usando segmentos nodais de Gabirobeira inoculados em meio de cultura WPM suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram. I – fase lag (0-7 dias); II – fase exponencial (7-21 dias); III – fase de crescimento linear (21-35 dias); IV – fase de desaceleração (35-42 dias); V – fase estacionária (após 42 dias)

A fase lag, onde as células preparam-se para a divisão celular, ocorreu até o 7º dia de cultivo, demonstrando 52% do crescimento *in vitro*. Este processo é caracterizado por um número estacionário de células, início da mobilização de metabólitos e síntese de proteínas (Stein et al., 2010). Vasconcelos et al. (2012) analisando o crescimento de calos em explantes foliares de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) observou acúmulo de matéria fresca até o 14º dia após a inoculação. Porém, o padrão de crescimento dos calos é diferente para cada espécie e explante. Calos induzidos em folhas e segmentos nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã apresentaram diferença temporal para a fase lag, sendo que calos em segmentos foliares apresentaram fase lag até 28º dia de inoculação e para segmentos foliares esta fase se estendeu até o 49º dia (Santos et al., 2008).

A fase de crescimento exponencial, caracterizada pela máxima divisão celular (Stein et al., 2010), ocorreu entre o 7º e 21º dia após a inoculação, com crescimento observado de 69%. Santos et al. (2010) estudando o padrão de crescimento de calos em explantes foliares de *Coffea canephora* var. Conilon, obteve o crescimento

exponencial entre o 16º e o 34º dia após a inoculação. Em calos obtidos em folhas de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn) esta fase iniciou ao 40º dia e se estendeu até o 50º dia (Stein et al., 2010).

A fase de crescimento linear, onde ocorre a diminuição da divisão celular e aumento da área celular (Santos et al., 2008), foi observada do 21º ao 35º dia após a inoculação, com 41% do crescimento *in vitro*. Nogueira et al. (2008) analisando o crescimento de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) observou esta fase entre o 40º e 60º dia de cultivo. Em calos obtidos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã, o crescimento linear foi obtido do 63º ao 70º dia para ambos os explantes (Santos et al., 2008).

O período de desaceleração foi observado no 35º dia e se estendeu até o 42º dia após a inoculação, obtendo 7% de crescimento *in vitro*. Durante esta fase, os calos devem ser repicados, principalmente por ocorrer diminuição do teor de nutrientes no meio de cultura, secagem do ágar ou também o acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultivo (Smith, 1992).

O crescimento dos calos chegou à fase estacionária no 42º após a inoculação, porém pós o 42º dia já é possível observar um breve declínio da curva de crescimento, indicando o início da última fase de decréscimo.

A Figura 12 demonstra o aspecto geral da formação de calos em segmentos nodais de Gabirobeira.

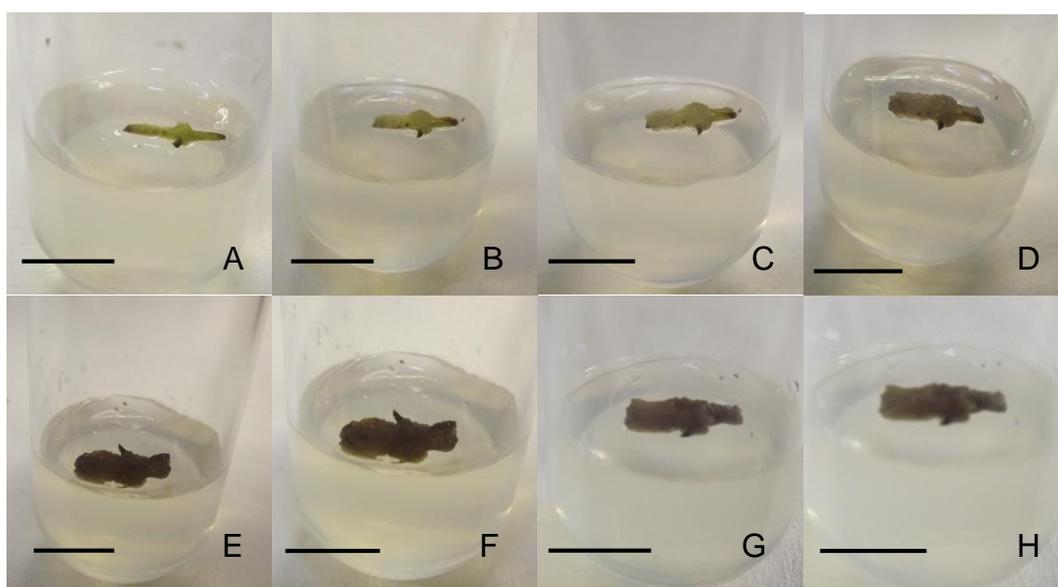
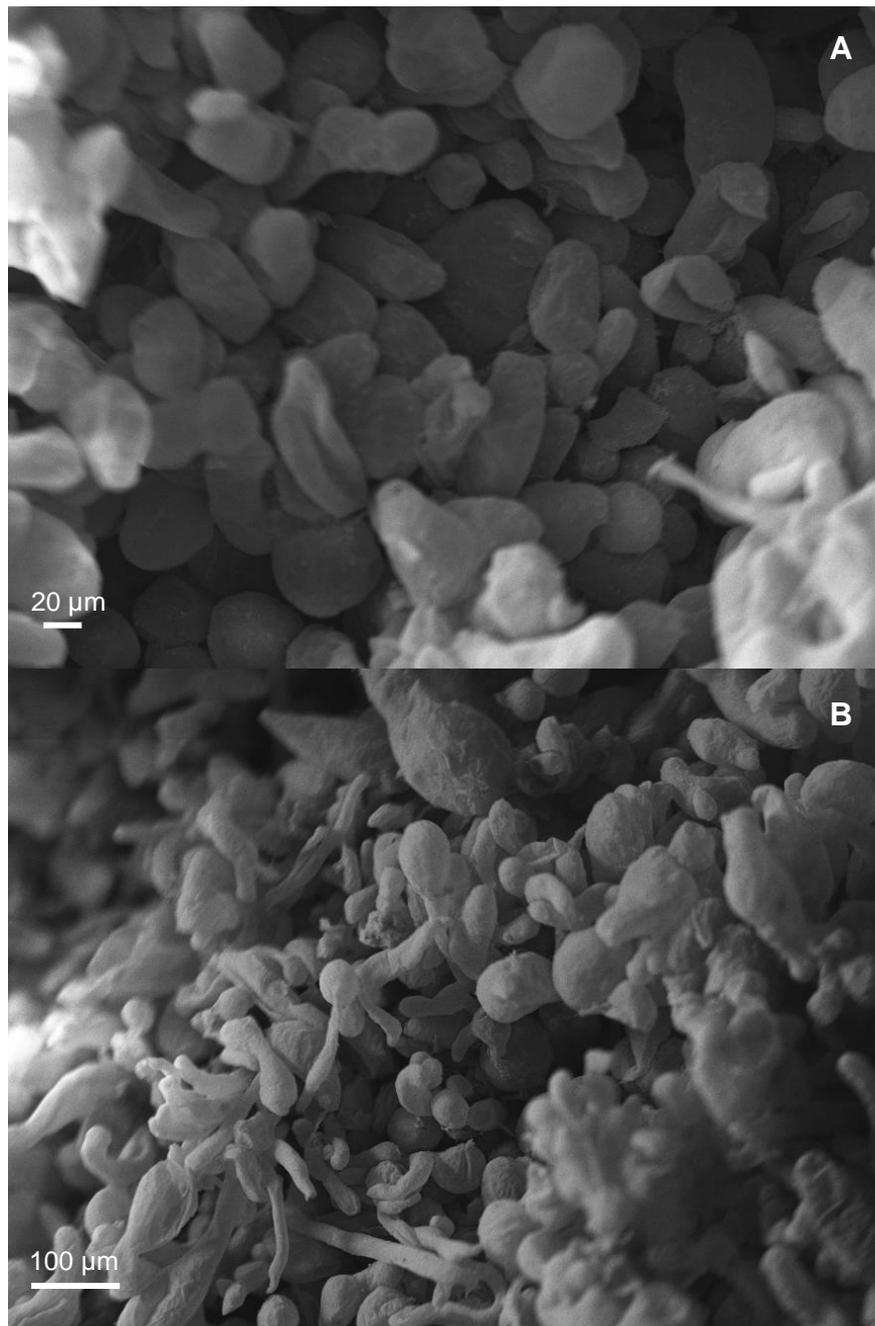


Figura 12 – Aspecto geral de calos de Gabirobeira formados a partir de segmentos nodais inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 1,0 mg

L⁻¹ de picloram. (A) 07 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias; (E) 35 dias; (F) 42 dias; (G) 49 dias; (H) 56 dias – Barra: 1 cm

3.3.3. Análise histoquímica e ultraestrutural

A análise ultraestrutural dos calos juntamente com a análise histoquímica, permitiu inferir que os calos induzidos com 1,0 mg L⁻¹ de picloram em segmentos nodais de Gabirobeira apresentam potencial embriogênico aos 14 e aos 28 dias após a inoculação (Figuras 13 e 14), ou seja, na fase de crescimento exponencial.



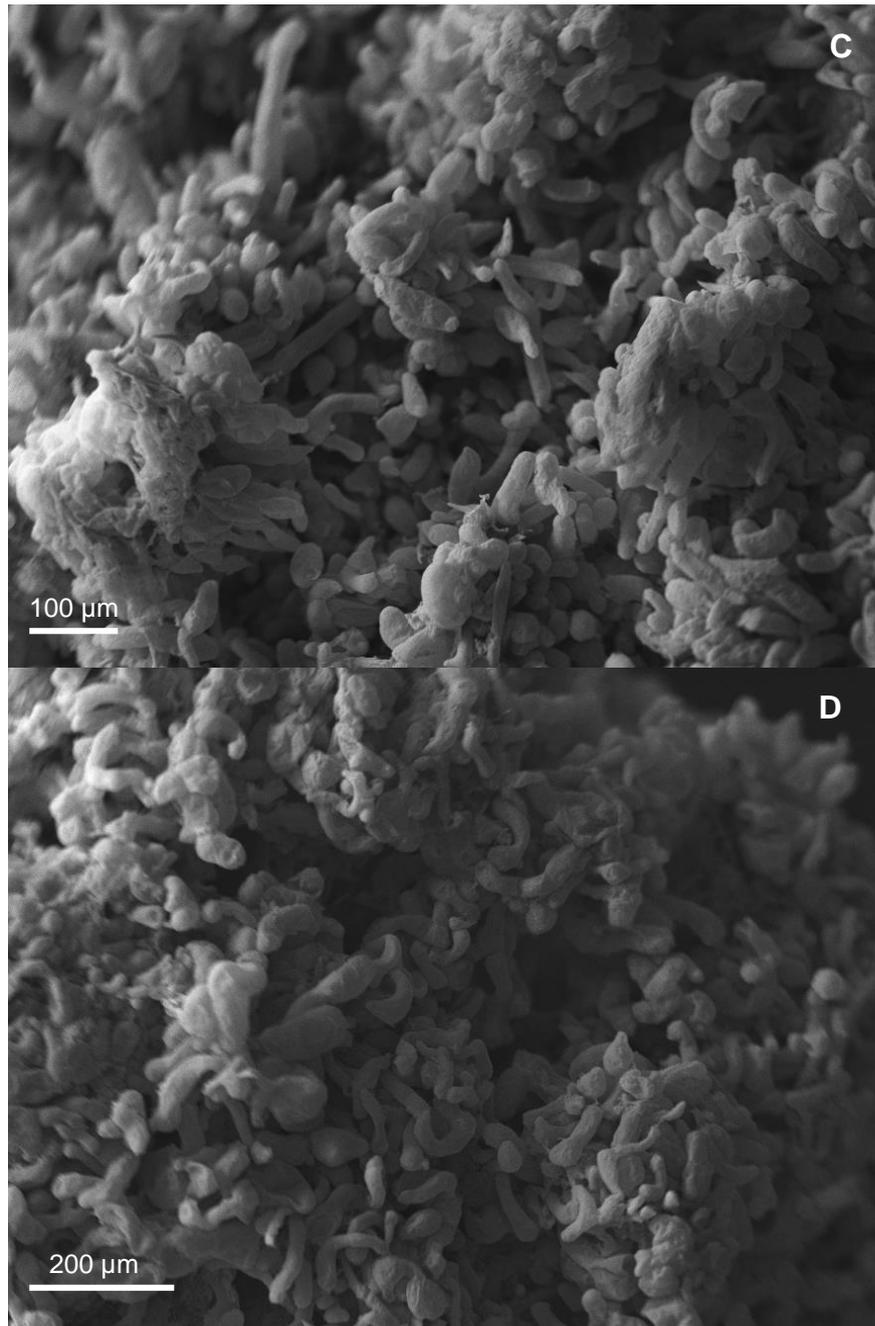


Figura 13 – Análise ultraestrutural de calos induzido com 1 mg L^{-1} de picloram em segmentos nodais de Gabirobeira. (A) 14 dias; (B) 28 dias; (C) 42 dias; (D) 56 dias

Através da MEV, aos 14 dias foi possível a visualização de células isodiamétricas, em sua maioria (Figura 13 A). O formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas e os calos embriogênicos são compostos por este tipo celular, com dimensões pequenas e com citoplasma denso (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2013; Nogueira et al., 2007).

Aos 14 dias, é possível observar também baixas taxas de células alongadas. Porém, aos 28, na fase de crescimento linear, 42 e 56 dias após a inoculação, a

proporção de células isodiamétricas é extremamente baixa quando comparada a presença de células alongadas (Figura 13 B, C e D). Células alongadas apresentam vacuolização, sendo este, um dos primeiros sinais de morte celular acompanhado da ruptura de suas membranas (Filanova et al., 2000).

As análises histoquímicas das massas celulares indicaram resultados que corroboram com a análise ultraestrutural. Aos 14 dias, é possível visualizar a presença de células isodiamétricas e justapostas (Figura 14 A). Porém aos 28, 42 e 56 dias após a inoculação verifica-se a presença de células alongadas e dispersas quando coradas com azul de toluidina (Figura 14 C, E e G).

Aos 14 e 28 dias, os calos ainda estavam em constante metabolismo celular, indicativo gerado pela presença de grãos de amido quando coradas com lugol (Figura 14 B e D). Entretanto, aos 42 e 56 dias, não foi possível observar a presença dos mesmos nas células dos calos, indicando que após 28 dias de cultivo, as massas celulares não apresentam nenhuma característica embriogênica (Figura 14 F e H).

O armazenamento de grãos de amido no embrião ou em células adjacentes é um indicativo de competência embriogênica, sendo que os grãos de amido são produzidos anteriormente para sustentar e iniciar o desenvolvimento dos embriões (Moura, 2007; Pádua, 2012). Inocente (2007) analisando teores de amido durante o desenvolvimento de embriões somáticos de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) verificou q os teores de amido iniciais da cultura eram seis vezes maior que ao final do desenvolvimento embriogênico, corroborando com o exposto inicialmente.

Aos 28 dias de cultivo foi possível observar a presença de massas pró-embriogênicas (MPE) (Figura 15). Essas MPE, segundo Xu & Huang (2008), são aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos e possuem como característica células de tamanhos reduzidos e citoplasma denso (Filanova et al., 2000).

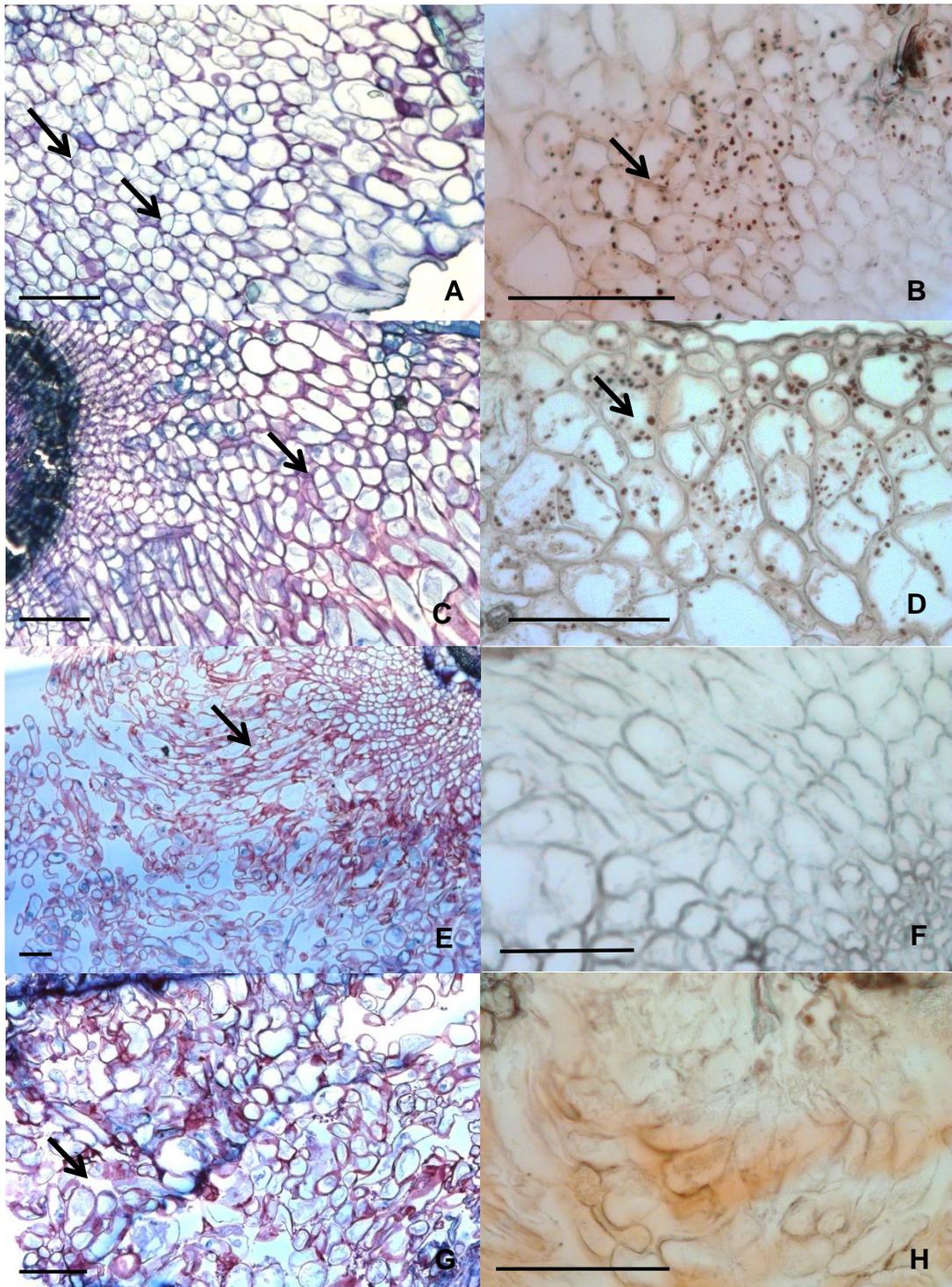


Figura 14 – Análise histoquímica de calos induzidos com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram em segmentos nodais de Gabirobeira – (A, C, E, G) Calos corados com azul de toluidina; (B, D, F, H) Calos corados com lugol – (A e B) Calos aos 14 dias apresentando células com núcleo proeminente, intensa divisão celular e presença de grãos de amido (seta); (C e D) Calos aos 28 dias apresentando células em divisão e presença de grãos de amido (seta); (E e F) Calos aos 42 dias apresentando células alongadas (seta) sem a presença de grãos de amido; (G e H) Calos aos 56 dia apresentando células alongadas e dispersas (Seta) sem a presença de grãos de amido. Barra: $100 \mu\text{m}$

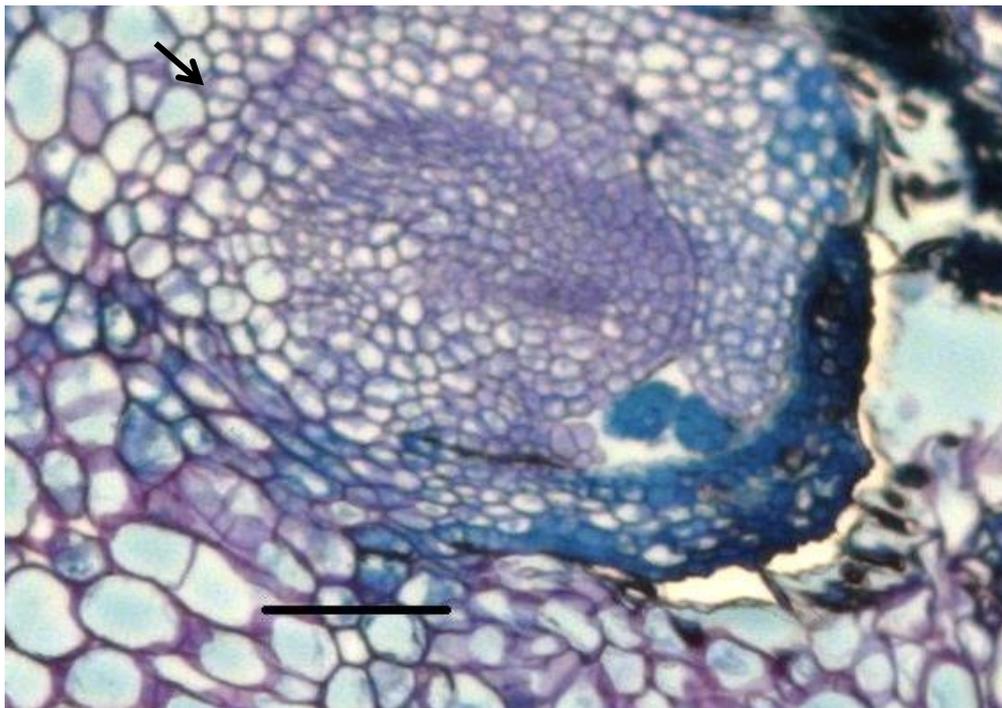


Figura 15 – Formação de massa pró-embriogênica ao 28º dia de cultivo. Células coradas com azul de toluidina demonstrando intensa afinidade pelo corante. Células pequenas, com formato isodiamétrico e justapostas em intensa divisão celular (seta). Barra: 100 µm

Santos et al. (2013), avaliando o comportamento citológico de calos induzidos em segmentos cotiledonares de Pinhão-manso (*Jatropha curcas*) a partir de diferentes períodos de cultivo, também observou que durante a fase estacionária as estruturas embriogênicas não continuam seu desenvolvimento, visto que as células entram em declínio, perdendo a organização a nível intracelular devido a senescência.

Calos induzidos em segmentos foliares de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) obtiveram ganho de massa até o 56º dia de cultivo. Entretanto, no 45º dia análise ultraestrutural indicava a ocorrência de estruturas não granulares e compactas em alguns setores, porém próximo aos setores compactos foram observadas células pequenas e esféricas, sugerindo o início da proliferação de células embriogênicas (Vasconcelos et al., 2012). Esses resultados indicam que a mudança para um novo meio de cultivo poderia proporcionar uma maior proliferação de embriões somáticos.

Os calos obtidos a partir dos segmentos nodais de Gabirobeira apresentam coloração translúcida com aspecto aquoso. Contudo, para a obtenção de culturas

embriogênicas é indispensável à indução de calos friáveis, por conter células arredondadas e com características meristemáticas (Vasconcelos et al., 2012)

Nogueira et al. (2013) obtiveram diferentes colorações em calos induzidos em segmentos foliares utilizando diferentes concentrações de picloram e cinetina. Calos translúcidos também foram obtidos apresentando células isodiamétricas, alongadas e desorganizadas com espaços intracelulares, não indicando potencial embriogênico após 30 dias de cultivo.

Calos translúcidos obtidos a partir de folhas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) exibiram células sem característica embriogênica, sendo os calos compostos de células alongadas e vacuolizados com paredes celulares delgadas, indicando apoptose celular (Pádua et al., 2013).

Os resultados expostos por Nogueira et al. (2013) e Pádua et al. (2013) não corroboram com o obtido neste trabalho, pois foi possível a obtenção de massas pró-embriogênicas, porém a partir do 28º dia de cultivo, a cultura não apresenta mais tal potencial.

3.4. Conclusão

Calos induzidos com 1,0 mg L⁻¹ picloram apresentaram a maior porcentagem de massa celular.

Ao 28º dia após a inoculação os calos devem ser transferidos para novos meios de cultivo, com a finalidade de manter a característica embriogênica que é apresentada pelo calo durante o 14º e 28º dia de cultivo.

3.5. Referências

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2013.

BARDIVIESSO, D. M.; MARUYAMA, W. I.; REIS, L. L.; MDESTO, J. H.; REZENDE, W. E. Diferentes substratos e recipientes na produção de mudas de gabioba (*Campomanesia pubescens* O.Berg.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.18, n.1, p. 52-59, 2011.

BOSSOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett, 1998.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; CASTO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Morphogenetic potential of native

passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 141-151, 2013.

CORREIA, S. M.; CANHOTO, J. M. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). **Protoplasma**, v. 242, p. 95-107, 2010.

FERNANDES, E. H.; PRIOLO, A. J.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; MOTERLE, L. M. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipo de milho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2604-2607, 2008.

FILANOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. V. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, 2000.

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

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

INOCENTE, G. C. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret.)**. 2007, 276 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonoides em erva-baleeira (*Cordia verbenácea* L.)**. In: SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 56-63, 2000.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Journal Combined Proceedings, International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427.

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

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007, 83 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 95, p. 175-184, 2008.

- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 48-50, 2007.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análise bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.
- OLIVEIRA, L. J.; MARIANO-DA-SILVA, S.; COSTA NETTO, A. P.; SILVA, S. M.; MARIANO-DA-SILVA, F. M. S. Características agronômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia* sp. sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 43-53, 2011.
- PÁDUA, M. S. **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 2012, 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- PÁDUA, M. S.; PAIVA, L. V.; LABORY, C. R. G.; ALVEZ, E.; STEIN, V. C. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.
- PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em frutíferas do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7., p. 1136-1142, 2011.
- PINTO, G.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 24, p. 763-769, 2010.
- 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 Biosciências**, v. 5, n. 2, p. 498-500, 2007.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in Conilon coffee. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 133-136, 2010.
- SANTOS, D. N.; NUNES, C. F.; SOARES, J. D. R.; VALENTE, T. C. T.; ALVES, E.; LABORY, C. R. G.; PASQUAL, M. Cytological characterization of *Jatropha curcas* callus in diferente periods of cultivation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 228-233, 2013.
- SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 639-646, 1992.
- SMITH, R. M. Plant tissue culture: techniques and experiments. In.: STEIN, V. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; VARGAS, D. P. Curva de crescimento e índice de

divisão celular em calos de Ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159-163, 2010.

SOUZA, G. C. **Qualidade fisiológica de sementes de duas espécies frutíferas do gênero *Campomanesia***. 2014, 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2014.

STEIN, V. C.; PAIVA, R. VARGAS, D. P.; SOARES, F. P.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. Subso. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, v. 34, n.5, p. 789-796, 2010.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; VARGAS, D. P. Curva de crescimento e índice de divisão celular em calos de Ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159-163, 2010.

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 sompática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007.

VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDES, L. G.; BELLO KOBLITZ, M. G.; SILVA, M. L. C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

XU, C.; HUANG, B. Root proteomic response to heat stress in two *Agrotis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 15, p. 4248-4194, 2008.