

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LAURA HONÓRIO JOBIM

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *EUGENIA INVOLUCRATA*
DC.**

São Gabriel

2014

LAURA HONÓRIO JOBIM

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *EUGENIA INVOLUCRATA*
DC.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Biotecnologia na Universidade Federal do Pampa UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Valdir Marcos Stefenon

São Gabriel

2014

LAURA HONÓRIO JOBIM

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *EUGENIA INVOLUCRATA*
DC.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Biotecnologia na Universidade Federal do Pampa–UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Monografia defendida e aprovada em: 22 de agosto de 2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
Orientador
UNIPAMPA

Ms. Cristiane Barbosa D'Oliveira
UNIPAMPA

Biólogo Paulo Roberto Diniz da Silva
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus avós Antonio e Tereza (*in memoriam*),
pois mesmo que eles não possam partilhar deste momento
junto a mim, acredito que de onde quer que estejam
também realizam um sonho.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço à Deus, pois sem Ele eu não teria traçado o meu caminho e feito a minha escolha pela biotecnologia.

À minha mãe Carmelena, por nunca ter deixado de acreditar em mim, e não me deixar desistir do meu sonho.

À minha irmã Camila, por toda amizade, compreensão, ajuda e por simplesmente existir na minha vida.

À meu irmão Ewerton, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À meu pai Almir Jobim.

Aos meus guias espirituais pela proteção e inspiração.

Aos colegas do NCTV, Rosa, Fernanda, Marina e Paulo, que de alguma maneira contribuíram para esta realização.

Ao orientador Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon pela atenção e conhecimento transmitido.

Aos meus amigos pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

À todos os professores, especialmente ao professor Luis Fabiano coordenador do curso, por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Ao mundo por mudar as coisas, por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer, pois através disto consegui concluir o TCC.

“Quanto mais me aprofundo
na Ciência mais me
aproximo de Deus.”
Albert Einstein

RESUMO

A *Eugenia involucrata* DC., conhecida popularmente como cerejeira-do-Rio-Grande pertencente à família Myrtaceae, é nativa principalmente do Sul do Brasil, podendo ocorrer desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Sua utilização é conhecida na medicina popular por possuir ação digestiva, anti-diarréica e anti-reumática e a espécie é muito utilizada por sua excelente formação de copa e recuperação de áreas degradadas. A micropropagação além de oferecer a possibilidade de propagação de árvores selecionadas, possibilita a limpeza clonal, obtendo-se plantas livres de vírus por meio de ápices caulinares e radiculares (meristemas primários), superando problemas de contaminação patogênica. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo para micropropagar *E. involucrata* através da germinação *in vitro* de suas sementes. Frutos maduros sem sinal de ataque de pragas foram coletados diretamente de duas árvores matrizes, despolidos manualmente com o auxílio de uma faca, as sementes foram desinfestadas com dois tratamentos, o primeiro com soluções de álcool 70% (um minuto) e hipoclorito de sódio 1,25% (15 minutos) e o segundo com as duas soluções anteriores seguido de um minuto de imersão no ultrassom, 200 sementes foram inoculadas em meio ágar-água para a germinação, após a germinação as partes aéreas foram excisadas e inoculadas em meio MS contendo quatro concentrações diferentes de BAP (0,02%, 0,04%, 0,1%, 0,16%) para o desenvolvimento da parte aérea. Posteriormente foi feito um meio para enraizamento contendo 0,001% de BAP e 0,02% de AIB, onde foram inoculadas 32 explantes. Também foram inoculadas as raízes para verificação da germinação em meio MS contendo AIB 0,00025% e BAP 0,005%. Concluiu-se que o álcool juntamente com o hipoclorito obteve maior sucesso na desinfestação. Verificou-se também que os meristemas do segmento nodal formam brotos em maior número quando utilizado 0,00025% de AIB e 0,02% de BAP. O enraizamento dos explantes foi visualizado sob a concentração testada. Não foi evidenciado a germinação de raízes.

Palavras chave: cerejeira-do-Rio-Grande, micropropagação, germinação, desinfestação.

ABSTRACT

The *Eugenia involucrata* DC., Popularly known as cherry-the-Rio-Grande belongs to the Myrtaceae family, is native mainly from Southern Brazil, occurring from Rio Grande do Sul to Minas Gerais. Use in folk medicine is known to possess digestive, antidiarrheal and antirreumática action. The species is widely used for its excellent training pantry and reclamation. Micropropagation and offer the possibility of propagation of selected trees, enables clonal cleaning, obtaining virus-free plants by means of stem and root tips (primary meristems), overcoming problems of pathogen contamination. The aim of this study was to establish a protocol for micropropagation *E. involucrata* through in vitro germination of their seeds. Ripe fruit with no sign of pest attack were collected directly from two parent trees were pulped manually with the aid of a knife, the seeds were disinfected with two treatments, the first with 70% alcohol solutions (one minute) and sodium hypochlorite 1.25% (15 minutes) and the second with the two previous solutions followed by one minute of immersion ultrasound, 200 seeds were inoculated in agar-water for germination, after germination, the shoots were excised and inoculated in MS containing four different concentrations of BAP (0.02%, 0.04%, 0.1%, 0.16%) for the development of shoots. Later was made a rooting medium for containing 0.001% of BAP and 0.02% IBA, where 32 explants were inoculated. Were also inoculated roots for verification of germination on MS medium containing BAP AIB 0.00025% and 0.005%. It was concluded that alcohol along with hypochlorite has been more successful in disinfestation. It was also found that the nodal segment meristems form shoots when used in greater numbers than 0.00025% and 0.02% of IBA BAP. The rooting of the explants was visualized under the concentration tested. There is no evidence of sprouting roots.

Keywords: cherry-of-Rio-Grande, micropropagation, germination, disinfestation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Eugenia involucrata</i>	12
Figura 2 - Frutos maduros de <i>E. involucrata</i>	13
Figura 3 - Semente de <i>E. involucrata</i> germinada após 90 dias.....	24
Figura 4 - Parte aérea excisada, com broto.....	25
Figura 5 - Câmara de germinação do tipo B.O.D, com amostras de <i>Eugenia involucrata</i>	27
Figura 6 – Explante de <i>E. involucrata</i> enraizada.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Verificação do número de sementes germinadas em um período de 90 dias.....	25
Tabela 2 - Verificação do número de contaminação bacteriana em explantes de <i>E. involunrata</i>	26
Tabela 3 - Verificação do número de brotos por explantes inoculados.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Cultura de tecidos - Micropropagação.....	14
1.2 Etapas da Micropropagação.....	16
1.3 Desinfestação	16
1.4 Multiplicação.....	17
1.5 Enraizamento	18
1.6 Semente	18
1.7 Germinação	20
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Coleta do material.....	20
3.2 Desinfestação	21
3.3 Meio de cultura para germinação.....	22
3.4 Meio de Cultura para explantes.....	22
3.5 Meio para enraizamento.....	23
3.6 Meio germinação de raízes	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
4.1 Germinação in vitro.....	23
4.2 Inoculação de explantes.....	25
4.3 Brotamento	26
4.4 Enraizamento de explantes.....	28
4.5 Organogênese via radículas	29
5 CONCLUSÃO	29
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A *Eugenia involucrata* DC., conhecida popularmente como cerejeira-do-rio-grande (Figura 1) da família Myrtaceae, é nativa principalmente do Sul do Brasil, podendo ocorrer desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais (DONADIO et al., 2002). As espécies brasileiras de Myrtaceae compreendem diversas plantas arbóreas e arbustivas que, em razão da qualidade de suas frutas, podem ser utilizadas na produção de frutos para consumo *in natura* ou para indústria, na produção de fármacos e na arborização urbana (LORENZI, 1992, 1998; DONADIO e MORO, 2004). A cerejeira ocorre nos fragmentos florestais de forma dispersa, ao acaso, não formando agrupamentos e, por esta razão, é considerada uma espécie rara. Contudo, possui ampla dispersão no Rio Grande do Sul, dando preferência a solos férteis e medianamente drenados. Não se observa regeneração abundante na espécie dentro dos fragmentos florestais. As sementes que caem das árvores não germinam ao redor da planta mãe (REITZ et al., 1988).

Figura 1 - Exemplar de *Eugenia involucrata*.



Fonte: Site Viveiro do Bagé

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

Figura 2 - Frutos maduros de *E. involucrata*.



Fonte: Site Cultura Mix

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

Por possuir ação digestiva, antidiarréica e antirreumática, sua utilização é conhecida na medicina popular (RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

Com a crescente compreensão da função ecológica das florestas para a sustentabilidade da vida no planeta e as possíveis consequências decorrentes da exploração indiscriminada, florestamentos e reflorestamentos encontram-se nas agendas de diversas nações (MURALIDHARAN e KALLARACKAL, 2004).

Utilizar a biotecnologia para o ganho de produtividade e sustentabilidade pode ser considerado, de acordo com Watanabe e Raman (1997), como uma das prioridades mundiais, já que a excessiva demanda por produtos, oriundos de espécies vegetais, bem como o subsídio à sustentabilidade e à proteção do meio ambiente, necessitam destas técnicas para sua manutenção. Entretanto, os estudos sobre a propagação dessa espécie ainda são incipientes e técnicas de cultura de tecidos poderiam auxiliar na propagação da espécie por clonagem *in vitro* (GOLLE 2010).

1.1 Cultura de tecidos - Micropropagação

A cultura de tecidos esta ancorada na teoria da totipotência celular, a qual define a capacidade que a célula vegetal já diferenciada possui de voltar ao seu estado meristemático e, após, redefinir seu padrão de diferenciação (TERMIGNONI, 2005); e, conforme citam Taiz e Zeiger (2004), totipotência é a conservação da capacidade genética total para o desenvolvimento de uma planta completa. Por meio desta técnica, fragmentos de tecidos vegetativos vivos, denominados “explantes”, são retirados de plantas de interesse e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas. Estes fragmentos podem ser compostos por células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI et al., 2001).

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como a manutenção, propagação e regeneração de certas partes da planta (células ou tecidos) em ambiente asséptico e em condições controladas (*in vitro*), constituindo uma das áreas de maior êxito da biotecnologia vegetal (MROGINSKI et al., 2004). As técnicas de cultura de tecidos vêm sendo utilizadas de diferentes formas para o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas (GOLLE et al., 2009). Dentre estas, a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação pode constituir uma alternativa econômica adequada em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois além de oferecer a possibilidade de propagação de árvores selecionadas, possibilita a limpeza clonal, obtendo-se plantas livres de vírus por meio de ápices caulinares e radiculares (meristemas primários), superando problemas de contaminação patogênica (WENDLING et al., 2006).

Dentre os principais problemas existentes na micropropagação, ressalta-se a recalcitrância de várias espécies nativas ao cultivo *in vitro* e a contaminação por microrganismos (tanto endógena como exógena), representando limitações ao estabelecimento dessas culturas (XAVIER et al., 2013).

A propagação vegetativa está entre os principais métodos de multiplicação de espécies florestais, a qual é extremamente vantajosa quando comparada à reprodução sexuada, pois permite reproduzir o componente genético total, conseqüentemente, existem maiores ganhos em uma mesma geração (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Neste contexto encontram-se as técnicas de cultura de tecidos vegetais, as quais oferecem potencial para a rápida multiplicação de linhagens elite em larga escala. Em árvores, estas tecnologias são essenciais frente a longos períodos necessários à multiplicação e a maturação das plantas (JAIN, 1997). Além disso a cultura de tecidos pode auxiliar na conservação *in vitro* de germoplasma dessas espécies (FERREIRA et al., 1998). Foi relatado, segundo Xavier et al. (2007), que a micropropagação está entre as técnicas da biotecnologia vegetal com maior interesse científico e econômico, sendo a micropropagação de espécies florestais a mais difundida e com aplicações comprovadas no setor.

Para diversas espécies florestais têm-se obtido resultados que indicam a possibilidade de produção, em um curto espaço de tempo, de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante, por meio da cultura de tecidos (XAVIER, 2007).

As técnicas de micropropagação permitem a produção massal de indivíduos com características genéticas desejáveis e com alto padrão de sanidade das mudas (GEORGE, 1993; XAVIER, 2007). Segundo Merkle e Nairn (2005), a biotecnologia florestal empregada para espécies tropicais poderá aumentar a disponibilidade de madeiras nas áreas manejadas, reduzindo a pressão de degradação nas florestas

nativas. As espécies arbóreas pertencentes à família das leguminosas são conhecidas por serem recalcitrantes à cultura de tecidos (JHA et al., 2004).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a micropropagação é, sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos mais difundida e com maior utilização no âmbito comercial.

1.2 Etapas da Micropropagação

Diversos são os critérios para o estabelecimento de cultivo *in vitro* como, por exemplo, a escolha da melhor fonte de explantes e a forma mais adequada de assepsia destes. Quanto aos meios nutritivos, existem formulações distintas que devem ser ajustadas para cada espécie. O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suas diluições são, costumeiramente, os mais utilizados. A micropropagação é realizada segundo um determinado procedimento padrão, no qual os explantes ou sementes oriundas de material vegetal, coletado no campo ou em casa de vegetação passam por uma limpeza e desinfestação prévia ao estabelecimento *in vitro* (DUTRA et al., 2009).

1.3 Desinfestação

As plantas lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente devido à contaminação por microrganismos (ERIG e SCHUCH, 2003;). Apesar da maioria dos microrganismos não serem patogênicos, o seu crescimento é acelerado no meio de cultura a tal ponto que competem com os explantes por nutrientes, prejudicando o desenvolvimento e crescimento dos mesmos (YAMAZAKI et al., 1995).

Dessa forma, algumas substâncias são utilizadas com ação germicida visando a desinfestação do material. Dentre os agentes desinfestantes utilizados destaca-se o hipoclorito de sódio, utilizado para assepsia de sementes. Utiliza-se também álcool 70% que é eficaz contra bactérias. As combinações dos princípios ativos desinfestantes podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (ERIG e SCHUCH 2003).

O uso de antibióticos e fungicidas em meio de cultura justifica-se quando há contaminações proveniente de infecções sistêmicas das plantas matrizes (WENDLING et al., 2006).

1.4 Multiplicação

Nesta fase, o principal objetivo é produzir o maior número de gemas ou brotos possíveis, no menor intervalo de tempo e com o mínimo de variação genética entre explantes, além de livres de contaminantes que prejudiquem a micropropagação (LÉON, 2010). É importante que as partes aéreas estejam íntegras, pois influenciam o enraizamento adventício posteriormente *in vitro*.

Os meios de cultura constituem também um fator relevante na micropropagação uma vez que possuem, substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, controlam o padrão de desenvolvimento e a resposta morfogênica *in vitro* (CALDAS et al., 1998), influenciando as respostas morfofisiológicas dos explantes (ALMEIDA et al., 2012).

Utilizam-se meios nutritivos determinados para que as plantas se desenvolvam na micropropagação, com formulações que seguem as necessidades de cada vegetal. De forma geral, os meios de cultura apresentam em sua composição, basicamente: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, água, fontes de carboidratos e , quando necessário, reguladores de crescimento (DODDS; ROBERTS, 1995). Desta forma, aproximam-se as condições *in vitro* aquelas necessárias para que as plantas se desenvolvam no ambiente, como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os principais reguladores de crescimento utilizados são pertencentes aos grupos das auxinas, os quais controlam o alongamento celular e a rizogênese, entre outros processos (HINOJOSA, 2000); as citocininas, que são promotoras da divisão celular e da emissão de gemas adventícias (BARRUETO CID, 2000); e as giberelinas, responsáveis, principalmente, pelo alongamento de caules (MATSUMOTO, 2000).

1.5 Enraizamento

De acordo com Fett Neto et al. (1992) em espécies florestais lenhosas, o enraizamento adventício é induzido em meio de cultura com auxina, com a posterior transferência para o meio de cultura isento de regulador de crescimento, estimulando, assim, a rizogênese e o crescimento das raízes. Dentre as auxinas, o AIB (ácido indolbutírico) e BAP (6-benzilaminopurina) são muito utilizados em razão da baixa fitotoxicidade aos explantes, proporcionando resultados positivos ao enraizamento *in vitro*, como o reportado para *Caryocar brasiliense* (SANTOS et al., 2006).

Um importante fator no processo de micropropagação de espécies florestais é a rizogênese, a qual é o processo de desenvolvimento de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, possibilitando o transplante para o ambiente *ex vitro* (SOUZA e PEREIRA, 2007).

A ocorrência de enraizamento adventício pressupõe a existência de células responsivas aos sinais exógenos e aos níveis endógenos, bem como sensíveis aos sinais de auxinas oriundos da parte aérea (MARKS et al., 2002).

A aplicação exógena de auxinas no meio de cultura sinaliza as células responsivas, simulando o mecanismo hormonal natural das plantas inteira (SILVA et al., 2007). Nestas técnicas, uma das limitações encontradas em espécies lenhosas é a formação de raízes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

1.6 Semente

Os embriões ou tecidos de sementes são também utilizados como explantes iniciais na micropropagação. A utilização deste tipo de explante apresenta vantagens do ponto de vista experimental para determinação de um protocolo de micropropagação (WENDLING et al., 2006).

Muitas espécies são de uso limitado, por ausência de informações sobre o manejo de suas sementes (BARBEDO et al., 1998). *E. involucrata* é uma árvore de vasta distribuição nas submatas mais desenvolvidas, em solos úmidos e não muito

acidentados (LEGRAND e KLEIN, 1969). Por não se desenvolver tanto em altura e ter copa ampla, tem potencial como árvore ornamental (BARBEDO et al., 2005).

Eugenia involucrata apresenta dificuldade em sua propagação, o que constitui um obstáculo ao seu aproveitamento econômico. Suas sementes são recalcitrantes e não mantêm seu potencial germinativo durante o armazenamento, iniciando-se a sua deterioração já nas primeiras semanas após a coleta (CARVALHO, 2008).

Muitas espécies do gênero *Eugenia*, apesar da sua importância ecológica e do potencial de exploração comercial, apresentam uma baixa densidade de ocorrência de matrizes produtoras de sementes. Isso dificulta a obtenção de sementes em quantidade que permita a produção de mudas em larga escala, seja para aproveitamento comercial e em programas de repovoamento vegetal, seja para o plantio de pomares de produção de frutas (SILVA et al., 2005). Além disso, para Silva et al. (2003), a maioria das espécies de *Eugenia* nativas do Brasil produzem frutos com poucas sementes, freqüentemente uma ou duas. Diante desse fato, tentaram maximizar o uso de sementes na produção de mudas.

Como material de pesquisa a semente apresenta algumas características que a tornam de incomparável valor. Não bastassem tais características, a semente é um órgão que, não obstante uma organização morfológica muito simples, apresenta organização fisiológica e bioquímica altamente complexa, permitindo, praticamente, qualquer tipo de estudo da área de biologia vegetal. Do óvulo fecundado desenvolve-se uma semente que, nas angiospermas, está contida no interior de um fruto resultante do desenvolvimento do ovário. A semente ortodoxa madura apresenta um baixo teor de água (10 a 20%), e os seus tecidos, uma baixa atividade metabólica. A semente, se for viável e não apresentar dormência, uma vez colocada em condições favoráveis de temperatura e na presença de oxigênio e água (as vezes, luz), germinará. O embrião reiniciará as suas atividades, e o eixo embrionário, o seu crescimento, originando então uma plântula, ou uma planta jovem (CARVALHO et al., 2013).

1.7 Germinação

O processo de germinação é um mecanismo dependente da viabilidade das sementes e de condições ambientais favoráveis (BEWLEY e BLACK, 1984; GUI-FERREIRA e BORGHUETTI, 2004). Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares, que compõem os meios de cultura, não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1993).

A germinação depende de fatores internos e externos à semente, dos quais a água, a temperatura, o oxigênio e a luz são os mais importantes (BASKIN e BASKIN, 1998). A temperatura altera a velocidade de absorção de água e das reações bioquímicas que acionam o metabolismo, transporte e ressíntese (CARVALHO e NAKAWA, 1988; BEWLEY e BLACK, 1994). O estímulo luminoso é bastante variável sobre a germinação de espécies selvagens (MAYER e POLJOKOFF, 1989).

2 OBJETIVO

- Estabelecer um protocolo para a micropropagação de *Eugenia involunrata* utilizando germinação *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia da UNIPAMPA campus São Gabriel.

3.1 Coleta do material

Para a germinação *in vitro* de sementes de *Eugenia involunrata* foram utilizados frutos maduros, oriundos de plantas selecionadas em populações do município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram selecionados frutos com polpa firme, sem sinal de ataque de pragas ou microrganismos. A coleta foi feita

manualmente, coletando os frutos diretamente da árvore. Após os frutos foram acomodados em uma caixa de isopor e levados até o Núcleo de Cultura de Tecidos Vegetais, UNIPAMPA – São Gabriel.

3.2 Desinfestação

Os frutos de *E. involucrata* foram despolidos manualmente, com o auxílio de uma faca, retirando 100 sementes, que foram lavadas primeiramente em água corrente, secando naturalmente. Inicialmente antes da inoculação foi realizado o processo de desinfestação onde 50 sementes foram colocadas em 15mL de álcool 70% durante um minuto, e após imersas em uma solução de 10mL de água destilada e 2,0 mL de Hipoclorito de sódio durante 15 minutos sem agitação. Após, as sementes foram levadas para um aparelho de ultrassom imersas no hipoclorito durante um minuto. As 50 sementes restantes foram desinfestadas com solução de álcool 70% durante um minuto. Todas as sementes foram lavadas três vezes com água autoclavada antes da inoculação. Todos os explantes tiveram o mesmo método de desinfestação, um minuto no álcool 70%, 15 minutos no hipoclorito e 30 minutos em 100mL de água destilada com 50 mL de Cloranfenicol (antibiótico).

De acordo com Miller et al. (1974) os efeitos fisiológicos do ultrassom estão relacionados à parede celular, à membrana plasmática e ao crescimento. As respostas de captação de ultrassom são dependentes da frequência e duração, sendo que tratamentos com maior tempo de captação ocasionaram ruptura de protoplastos (LIU et al., 2005). Tendo posse destas informações, utilizamos o ultrassom para fazer rupturas no tecido para facilitar a entrada dos desinfestantes, sem que o tecido fosse prejudicado, desta forma impedindo a germinação das sementes utilizadas. Fazendo com que esse processo seja otimizado.

3.3 Meio de cultura para germinação.

O meio de germinação foi preparando com 6g de ágar (Vetec) e um litro de água destilada, cozimento feito em microondas por aproximadamente 5 minutos, os tubos contendo 10mL do meio foram autoclavados durante 17 minutos sob temperatura de 121°C e pressão de 1,2 atm. Dentro de uma câmara de fluxo laminar foram inoculadas as 100 sementes em tubos de ensaio contendo o meio de cultura de germinação, após foram tampadas com papel laminado, lacradas com papel filme e levadas para a estufa do tipo B.O.D (Figura 5) *em* temperatura oscilante, entre 25°C, na noite, e 30°C, durante o dia, por sete dias e foto período de 16 horas de luz. Esse processo foi repetido um mês após a primeira inoculação com mais 100 sementes. Em um total de 200 sementes inoculadas. Foi observado a germinabilidade e de contaminação das sementes conforme descrito por Silva et al. (2014).

3.4 Meio de Cultura para explantes

Após 90 dias foram feitas a excisão da parte aérea das sementes germinadas em um total de 100 sementes germinadas. Estas foram divididas em ápices caulinares e do segmentos nodais. Estas foram inoculadas em meio reduzido de sais. Contendo 4,6g de meio MS (Sigma Aldrich), 11,6g de Agar (Vetec), 63g de sacarose (Vetec) e dois litros de água destilada com 0,000005% de AIB. Esse meio foi dividido em quatro béquers para a formulação das concentrações de hormônios. No primeiro béquer adicionou-se BAP 0,02%, no segundo adicionou-se BAP 0,04%, no terceiro BAP 0,1% e no quarto béquer adicionou-se BAP 0,16%. Após o meio foi cozido em forno de microondas por aproximadamente 5 minutos adicionando a sacarose. Os tubos contendo 10 mL do meio foram autoclavados durante 17 minutos sob temperatura de 121°C e pressão de 1,2 atm. Após a excisão, as partes aéreas passaram pelo processo de desinfestação antes da inoculação. Todas as duzentas partes aéreas ficaram em solução de álcool 70% durante um minuto, após foram imersas em uma solução contendo hipoclorito de sódio 1,25% por 15 minutos, lavadas três vezes com água destilada, e por último as amostras foram imersas em uma solução contendo cloranfenicol 0,05% (antibiótico) durante 30 minutos. Após o

processo de desinfestação as amostras de parte aérea foram inoculadas no meio preparado.

3.5 Meio para enraizamento

O meio foi confeccionado com 1,1 g de Meio MS (SIGMA) diluído em 350 mL de água destilada, 2,28 g de Ágar (Vetec) e 10,5 g de sacarose. Adicionamos hormônios para acelerar o processo de enraizamento, BAP 0,01% e AIB 0,02%. Utilizamos 32 tubos com 10 ml de meio, cada um com uma parte aérea inoculada, estas sem sinal de contaminação. Após 90 dias do brotamento dos explantes, estas foram excisadas e inoculadas em meio para enraizamento.

3.6 Meio germinação de raízes

Após a excisão das partes aéreas, 16 raízes foram inoculadas. Para verificar a germinação das mesmas. As raízes passaram por uma desinfestação antes de serem inoculadas. Ficaram imersas durante um minuto em álcool 70% e 15 minutos em hipoclorito de sódio 1,25% sem agitação, após foram lavadas 3 vezes com água ultra pura. Passaram por uma descontaminação com antibiótico (cloranfenicol 0,05%) durante 30 minutos e foram inoculadas em meio ½ MS contendo AIB 0,00025% e BAP 0,005% em vidro contendo 10 ml do meio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Germinação in vitro

Para as sementes que foram inoculadas em outubro de 2013 verificou-se a germinação de 44 sementes de *Eugenia involucrata* (Figura 3) que foram desinfestadas apenas com álcool em um total de 50 sementes. Para as sementes que foram desinfestadas utilizando ultrassom juntamente com o hipoclorito, houve a germinação de 32 sementes de *E. involucrata* para um total de 50. Assim totalizando 76 explantes aéreos após 3 meses da inoculação. Para as sementes que foram inoculadas em novembro de 2013 observou-se a germinação de 13 sementes de *E. involucrata* que foram desinfestadas apenas com álcool, em um total de 50 sementes inoculadas. Enquanto que as sementes que foram desinfestadas

utilizando o ultrassom juntamente com o hipoclorito germinaram 19 em um total de 50 sementes. Totalizando 32 sementes. Desta forma destaca-se falar que 57 sementes foram o número total de sementes que germinaram sem nenhuma contaminação utilizando apenas álcool 70%, enquanto que 51 sementes germinaram sem contaminação utilizando hipoclorito e ultrassom, isso implica que maiores estudos envolvendo ultrassom para a desinfestação são necessários, uma vez que a diferença entre os dois tratamentos foi baixa. P.R Diniz da Silva (2014) disse no seu trabalho que utilizar sementes selecionadas em vez de árvores selecionadas como ponto de partida para a propagação de *E. uniflora* é um avanço. Considerando a taxa de germinação observado para *E. uniflora* (98% depois de 45 dias), o uso do meio Agar/água como substrato revelou ser eficiente, além de permitir a redução dos custos em comparação com os meios MS e WPM (P.R DINIZ DA SILVA, 2014).

Figura 3 - Semente de *Eugenia involucrata* germinada após 90 dias.



Fonte: NCTV, UNIPAMPA-SG

Tabela 1 - Verificação do número de sementes germinadas em um período de 90 dias.

	A (Out. 2013)	B (Nov. 2013)	TOTAL
Álcool/Hipoclorito	44	13	57
Álcool/Hipoclorito/Ultrassom	32	19	51
TOTAL			108

N=108 $\chi^2= 8,17$ P= 0,0427

4.2 Inoculação de explantes

Para os 50 tubos onde foram inoculados ápices caulinares de *Eugenia involucrata*, estes contendo a concentração A (AIB 0,000005%. e BAP 0,02%) obtivemos contaminação por bactéria em 5 tubos. Para os tubos da concentração B (AIB 0,000005%. e BAP 0,04%) foram 9 tubos contaminados. Para a concentração C (AIB 0,000005%. e BAP 0,1%) foram observados 6 tubos contaminados. E para a concentração D (AIB 0,000005%. e BAP 0,16%) 4 tubos contaminados. Para os 50 tubos de segmentos nodais obtivemos 6 tubos contaminados para a concentração A, 7 tubos contaminados para a concentração B, 5 tubos contaminados para a concentração C e 5 tubos contaminados para a concentração D. Pode-se observar a baixa quantidade de tubos contaminados utilizando segmentos nodais.

Figura 4 - Parte aérea excisada, com broto.



Fonte:NCTV, UNIPAMPA-SG (2014)

Tabela 2 - Verificação do número de contaminação bacteriana em explantes de *E. involunrata*.

Concentração	Ápice Caulinar	Segmento Nodal	TOTAL
A	5	6	11
B	9	7	16
C	6	5	11
D	4	5	9
TOTAL			100

N=100 $X^2= 6,0$ e $5,75$

Não existiu diferença significativa referente a contaminação para concentrações para ápice caulinar e segmentos nodais. observamos que o menor número de explantes contaminados se encontra no grupo que apresenta uma maior concentração do hormônio BAP. Mesmo utilizando o antibiótico clorafenicol, houve contaminação por bactéria, o que implica que este antibiótico não é eficiente para controlar essa bactéria endógena da *Eugenia involunrata*. P. R Diniz da Silva em seu trabalho utilizou $\frac{1}{2}$ MS suplementado com AIB 0,1 mg L⁻¹ BAP e 0,2 mg L⁻¹ que se mostrou eficaz para a sobrevivência e desenvolvimento in vitro de ápices caulinares e segmentos nodais de *E. uniflora*, embora nenhum desenvolvimento radicular foi observado nestas condições.

4.3 Brotamento

Foi observado o número de brotamento para as quatro concentrações de hormônios utilizados nesse trabalho. Onde obtivemos para ápices caulinares para a concentração A (AIB 0,000005% e BAP 0,02%) 1 broto, para a concentração B (AIB 0,000005% e BAP0,04%) 5 explantes brotaram, a concentração C (AIB 0,000005% e BAP0,1%) apenas 1 broto e para a concentração D (AIB 0,000005% e BAP 0,16%) obtivemos 2 brotos.

Para segmentos nodais para a concentração A (AIB 0,000005% e BAP 0,02%) observamos 8 brotos, para a concentração B (AIB 0,000005% e BAP 0,04%) 6 explantes brotaram, para a concentração C (AIB 0,000005% e BAP 0,1%) 4

explantes e para a concentração D (AIB 0,000005% e BAP0,16%) 6 explantes brotaram. Quanto aos reguladores de crescimento, maiores concentrações de BAP promoveu efeitos negativos na resposta organogênica de *E. uniflora* (Lattuada et al., 2008, Souza et al., 2008) e *E. pyriformis* (Nascimento et al., 2008), enquanto a menor concentração de AIB foram mais eficazes para o desenvolvimento radicular em *Rubus spp* (Leitzke et al., 2009). Este resultado implica na alta eficiência de brotamento dos segmentos nodais, sendo estes altamente recomendados.

Figura 5 - Câmara de germinação do tipo B.O.D, com amostras de *Eugenia involucrata*.



Fonte: NCTV, UNIPAMPA-SG (2014)

Tabela 3 - Verificação do número de brotos por explantes inoculados.

Concentração	Ápice Caulinar	Segmento Nodal	Total
A	1	8	9
B	5	6	11
C	1	4	5
D	2	6	8
Total			100

N=100 $X^2= 2,25$ e $6,0$ $P= 0,0240$

Existiu diferença significativa entre os números de brotos de ápices caulinares e segmentos nodais. Evidenciamos contaminações em diferentes estágios dos explantes, isso corrobora para maiores estudos, uma vez que a contaminação é bacteriana. Sendo assim, identificar um antibiótico eficiente para combater essa bactéria, uma vez que o meio esteja totalmente asséptico, implica em uma bactéria endógena da espécie das *Eugenias*.

4.4 Enraizamento de explantes.

Verificamos após seis meses o surgimento de raízes em alguns explantes de *Eugenia involucrata* (figura 6).

Figura 6 – Explante de *E. involucrata* enraizada



Fonte: NCTV, UNIPAMPA-SG

4.5 Organogênese via radículas

Sabendo que qualquer parte da planta inoculada poderá vir a germinar, não evidenciamos germinação das raízes de *Eugenia involucrata*, não foi observado contaminações e nem oxidação das amostras. Estas amostras ficaram inoculadas 120 dias em incubadora de crescimento.

5 CONCLUSÃO

Obtivemos melhores resultados para a desinfestação de sementes de *Eugenia involucrata* utilizando álcool 70% e o hipoclorito de sódio 1,25%. Porém não podemos descartar que o uso do ultrassom na desinfestação, pode ser de grande importância, após maiores estudos, pois não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Para a contaminação bacteriana ficou evidenciado que em altas concentrações de BAP a taxa de contaminação é baixa.

Para a verificação de brotos, verificamos que os segmentos nodais são indicados para esse processo. Ressaltando que o maior número de brotos ocorreu no meio que continha menor concentração de BAP.

O enraizamento dos explantes foi evidenciado utilizando a concentração mais alta de BAP. Uma vez que seja demorado o processo de enraizamento, essa concentração é viável.

Foi concluído também que maiores estudos envolvendo a germinação de raízes é necessário, para saber a concentração de hormônio necessária para que esse processo seja realizado com sucesso.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em diferentes estágios da micropropagação, evidenciamos crescimento bacteriano nos meios de cultura onde estavam inoculados nossos explantes. Sabe – se que essas contaminações não são patogênicas para as plantas, porem inviabilizam o crescimento total dos explantes. Maiores estudos envolvendo a cultura dessas bactérias são necessários, para que assim o processo de desinfestação seja otimizado, impedindo o crescimento bacteriano. Fazendo com que maiores números de explantes sejam aclimatados, possibilitando um maior número de mudas livre de contaminações, estabelecendo um protocolo para a descontaminação.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. **Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study.** Plant Cell Reports, New York, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.

ABREU-TARAZI, M. F. **Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study.** Plant Cell Reports, New York, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.

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

BARBEDO, A.S.C.; BIANCHI, C.G.; KELLER, L.R.; ORTEGA, M.G.; ORTEGA, S.E.H. **Manual técnico de arborização urbana.** 2.ed. São Paulo: PMSP-SVMA, 2005. 45p.

BARBEDO, C.J.; KOHAMA, S.; MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C. **Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água.** Revista Brasileira de Sementes, v.20, p.184-188, 1998.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. *In*: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos**

hormônios vegetais. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 55 - 81.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination.** New York : Academic Press, 1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2nd ed. New York: Plenum, 1984, 445 p.

BRASÍLIA: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 21-43. Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.**

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. *In:* TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília, DF: ABCTP; EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 37-70.

CARVALHO N.M.; NAKAGAWA J. (Ed.) **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Funep, 2013. 128 p.

CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção** Campinas: Fundação Cargill, 1988.

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

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

DONADIO, L.C.; MORO, F.V. **Potential of Brazilian Eugenia (Myrtaceae) - as ornamental and as a fruit crop**. Acta Horticulturae, v.632, p.65-68, 2004

DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 2002. 288p.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. **A micropropagação de eucalipto**. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009. DOI: 10.4336/2009.pfb.58.49

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. **Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento in vitro de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala**. Revista Brasileira Agrociência, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

ERIG, A.C. & SCHUCH, M.W. **Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica*BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala**. Revista Brasileira de Agrociência. Pelotas, 2003, 9, n. 3, p. 221-227.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. **Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas**. Brasília: Embrapa CNPH, 1998. P. 21 -43

FETT-NETO, A. G.; TEIXEIRA, S.; SILVA, E. A. M.; SANTANNA, R. **Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenes in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl.** Journal of Plant Physiology, Stuttgart, v. 140, p. 720-728, 1992.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture.** Exegetics, Edington. 1993, 555 p. v. 1.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. **Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo.** Ciência Florestal, Santa Maria, RS, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GOLLE, D.P **Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia.** Ciência Rural, Santa Maria, v.39, n.5, p.1606-1613, ago, 2009.
75

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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-SOPI/Embrapa-SNPH, 1998. v, 1, p. 183 – 260

GUI-FERREIRA, A.; BORGUETTI, F. (Ed.) **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

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

JAIN, S. M. **Biotechnology of industrially important tree species in developing countries**. Austin, Texas, U.S.A.: Academic Press, 1997. p. 227

JHA, A. K. et al. **Micropropagation of *Sesbania rostrata* from the cotyledonary node**. *Biologia Plantarum*, v. 48, n. 2, p. 289-292, 2004.

LATTUADA D.S., 2010. **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. MSc Thesis, Porto Alegre, UFRGS, 75 p.

LEITZKE L.N., DAMIANI C.R., SCHUCH M.V., 2009. **Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-preta e framboezeira**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31: 582-587

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1969. 216p

LEÓN, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese in vitro em explantes de açoita cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

LIU, Z.; PARK, B.-J.; KANNO, A.; KAMEYA, T. **The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene**. *Molecular Breeding*, 16: 189-197, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v.2. 368p.

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

MARKS, T. R. et al. **A role for polar auxin transport in rhizogenesis**. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 70, p. 189-198, 2002.

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

MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds** Pergamon Press (Oxford), 1989.

MERKLE, S. A.; NAIRN, J. **Hardwood tree biotechnology**. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*, v. 41, p. 602-619, 2005.

MILLER, M. W.; VOORHEES, S. M.; CARTENS, E.L.; EAMES, F.A. **Histological study of effect of ultrasound on growth of *Vicia faba* roots**. *Radiation Botany* 14: 201-208, 1974

MROGINSKI, L. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: ECHENIQUE, V. **Biología y mejoramiento vegetal**. INTA: Consejo Argentino para La Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2004. p.35-42.

MURALIDHARAN, E.M.; KALLARACKAL, J. Current trends in Forest tree biotechnology. In: SRIVASTAVA, P.S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Eds.). **Plan**

Biotechnology and molecular Markers. New Delhi: Anamaya publishers, 2004. P. 169 – 182

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

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

P. R DINIZ, R.G RISPOLI, M.M MINOZZO, L.H JOBIM, M. JUNGES **A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through in vitro germination and micropropagation.** Disponível em: <http://www.afrjournal.org/index.php/afr/article/view/179>. Acessado em 13/08/14.

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

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CASTRO, C. V. B.; CARNEIRO, A. G. **Cultivo in vitro de eixos embrionários de paricá.** *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 33, n. 1, p. 60-66, 2009.

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

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais.** *Ciencia e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 1, p.102-123, jan./fev. 2001.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis na arborização urbana**. 2ed. Porto Alegre: SAGRA, 1989, p. 158-163.

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 brasiliense Camb.)**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

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

SILVA, C. G. et al. **Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2007.

SILVA, C.V.; BILIA, D.A.C.; MALUF, A.M.; BARBEDO, C.J. **Fracionamento e germinação de sementes uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. – Myrtaceae)**. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v.26, n.2, p. 231-221, 2003

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

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

SOUZA J.A., SCHUCH M.W., DONINI L.P., RIBEIRO M.F., 2008. **Types and concentrations of cytokinin on in vitro multiplication of 'pitangueira'**. *Ciência Rural* 38: 2046- 2048.

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

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

VICENZI, M.; CHAVES, A.C.; ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. & FACHINELLO, J.C. **Desinfestação de Explantes de Mirtilo (*Vaccinium Ashei* Reade) Visando o Estabelecimento de Plantas *In Vitro***. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém, 2002.

WATANABE, K.N.; RAMAN, K.V. Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. In: WATANABE, K.N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin, Texas, U.S.A.: Academic Press, 1997. p. 1 – 13.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

XAVIER, A. et al. Micropropagação e Enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: Borém, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Ed. UFV. 2007, p. 55-74.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In BORÉM, A. (Ed) **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Ed. UFV, 2007

YAMAZAKI, T.; OYANAGI, H.; FUJIWARA, T.; FUKUMORI, Y. **Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*: a novel cytochrome-cd(1) with Fe(II)-nitrite oxidoreductase activity**. European Journal Biochemistry, Berlim, v. 233, n. 2, p. 665-671, 1995.

Site Cultura Mix. Disponível em: <http://flores.culturamix.com/informacoes/melhores-especies-de-arvores-para-plantar-proximo-a-piscina>. Acessado em 11/08/14.

Site Viveiro do Bagé. Disponível em: <http://www.viveirodobage.com.br/cerejeira.html>. Acessado em 11/08/14.