

## ANTIOXIDANTE E GA<sub>3</sub> NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DE CANDOLLE

Cláudia C. Azeredo<sup>1</sup>, Lia R. S. Reiniger<sup>3</sup>, Charlene M. Stefanel<sup>2</sup>, Leandro D. Silva<sup>1</sup>, Ana C. F. Ziegler<sup>1</sup>, Ariane M. Silva<sup>1</sup>

1. Estudante de IC da UFSM
2. Estudante de Doutorado da UFSM
3. UFSM - Departamento de Fitotecnia / Orientador

### Resumo:

*Eugenia involucrata* (Myrtaceae) ocorre naturalmente em vários estados brasileiros e países da América do Sul, nos quais é muito valorizada como recurso genético florestal. Porém, como apresenta sementes recalcitrantes, a produção de mudas dessa espécie pode, alternativamente, ser efetuada pela via clonal. O estudo teve por objetivo avaliar o efeito da giberelina GA<sub>3</sub> no alongamento *in vitro* de explantes na micropropagação. Os tratamentos consistiram da combinação das concentrações de GA<sub>3</sub> (0; 1; 2 ou 4 µM) com dois períodos (30 ou 60 dias) de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS com concentração de sais reduzida à metade. Houve efeito significativo apenas do fator principal GA<sub>3</sub> sobre a altura média dos brotos ( $p=0,0275$ ), obtendo-se ajuste a uma equação linear ( $R^2=0,9904$ ), em que a menor média (0,12 cm) ocorreu na ausência da giberelina, enquanto a maior média (0,52 cm) foi a 4µM. A presença de GA<sub>3</sub> afeta positivamente o alongamento de brotos em *Eugenia involucrata*.

**Palavras-chave:** cerejeira-do-mato; cultura de tecidos; micropropagação.

**Apoio financeiro:** PIBIC-CNPq.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFSM.

### Introdução:

*Eugenia involucrata* De Candolle, conhecida popularmente por Cerejeira-do-mato, pertence à família Myrtaceae e possui ampla distribuição nos estados brasileiros, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, como também em outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (LORENZI, 2008). Esta espécie é muito utilizada para uso madeireiro, frutícola, paisagístico, ambiental e medicinal, porém suas sementes são consideradas recalcitrantes em relação à conservação, ou seja, perdem a viabilidade se armazenadas por longos períodos, o que leva à limitação da propagação seminal (LORENZI, 1992; BACKES e IRGANG, 2002; CARVALHO, 2008) para a produção de mudas. Assim, devido à recalcitrância apresentada pela espécie, vem sendo desenvolvidos vários estudos de produção de mudas via propagação vegetativa, mais especificamente pela micropropagação, uma técnica da cultura de tecidos. Para Degenhardt et al. (2007), o elevado potencial econômico e ambiental da espécie justifica essas pesquisas. A micropropagação tem sido explorada em diversas espécies vegetais com aplicações práticas comprovadas. Porém, o elevado custo para obtenção de muda torna a utilização desta técnica limitada em escala comercial (ERIG; SCHUCH, 2005).

Nessa técnica, os fitorreguladores, substâncias sintéticas análogas aos hormônios vegetais, que alteram morfológicamente as plantas, seja promovendo, inibindo ou influenciando no crescimento ou desenvolvimento, devem ter seus efeitos avaliados. Dentre os fitorreguladores, de uma maneira geral, as giberelinas são consideradas promover a divisão celular e, mais especificamente, atuar na indução de alongamentos de brotos, favorecendo a propagação *in vitro* (ISOGAI et al., 2008). O Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), dentre as giberelinas, é considerado o mais importante para uso comercial (XAVIER et al., 2009), e como sua ação ocorre no meristema intercalar, localizado próximo à base de entrenó (TAIZ, ZEIGER, 2008), sua aplicação não ocasiona em aumento de entrenós, e sim, em alongamento no caule (ALMEIDA; PEREIRA, 1996). Considerado o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a concentração de GA<sub>3</sub> no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

### Metodologia:

O trabalho foi realizado no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS. Foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, arranjo bifatorial 4 x 2, em que os níveis do fator A foram constituídos por concentrações de GA<sub>3</sub> (0; 1; 2 ou 4 µM) e os níveis do fator B, pelos períodos de cultivo *in vitro* (30 ou 60 dias). Foram utilizadas 10 unidades experimentais, constituídas por um frasco contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes, totalizando 80 unidades experimentais e 120 unidades amostrais.

Como explantes utilizaram-se segmentos nodais de indivíduos com aproximadamente 9 anos de idade, que estão sendo cultivados em casa de vegetação. Na coleta descartou-se o segmento apicar caulinar do ramo, a fim de diminuir a variação entre os explantes. Após a coleta, as brotações foram submetidas ao processo de desinfestação superficial no laboratório, que consistiu de: lavagem em água corrente e detergente comercial, seguido de dois enxágues com água destilada; imersão em solução de etanol a 70%, por 1min, em câmara de fluxo laminar, seguido da imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 3,0% durante 15min e,

depois, em solução de hipoclorito de sódio a 2,0% por 15min. No final deste processo, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada.

O meio nutritivo utilizado foi MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com redução de sais à metade ( $\frac{1}{2}$ MS) e acréscimo de  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $50\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $4\text{g L}^{-1}$  de ágar e pH, ajustado para 6,0, segundo a metodologia desenvolvida por Stefanel (2016). O meio nutritivo foi autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  e  $1\text{atm}$  durante 15min, antes da inoculação e após a adição de ágar. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $20\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , oriundas de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

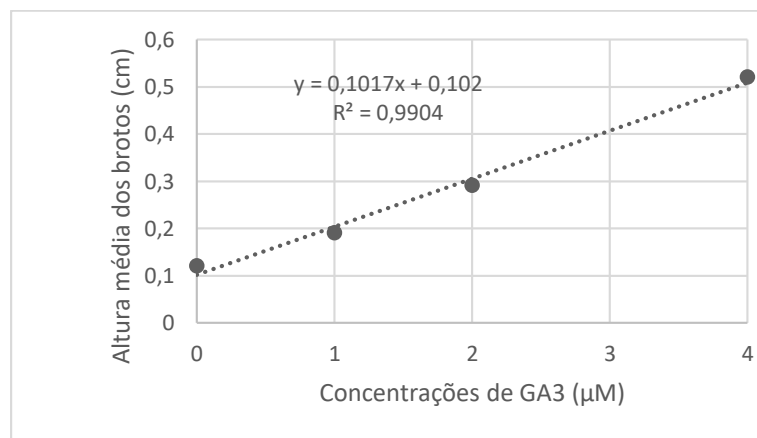
Aos 30 e aos 60 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis: sobrevivência (expressa em porcentagem), sinalizada pela coloração verde do explante, e altura média dos brotos (em cm). Os dados foram transformados pela função  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância, depois da normalidade dos erros ser avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Quando o valor "F" foi significativo, as médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Utilizou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 5.1 (FERREIRA, 2011) para análise estatística dos dados e a precisão dos ensaios foi estimada pelo Índice de Variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009).

### Resultados e Discussão:

Para a variável sobrevivência *in vitro* observou-se efeito significativo somente do fator principal período de cultivo ( $p=0,0073$ ), já para a variável de altura média dos brotos ( $p=0,0275$ ), somente do fator principal  $\text{GA}_3$ . Para a sobrevivência, a maior média ocorreu aos 30 dias de cultivo (88,10%), ocorrendo um decréscimo aos 60 dias (61,45%), provavelmente provocado pelo período de permanência no mesmo meio nutritivo, ocasionando menor disponibilidade de nutrientes às culturas *in vitro*. Desempenho semelhante foi observado em outro trabalho com *Eugenia involucrata* em que houve 71,12% de sobrevivência aos 30 dias, que decresceu para 52,48% aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo de idêntica composição (STEFANEL, 2016).

Em relação à altura média dos brotos, houve o ajuste a uma equação linear (Figura 1), em que a menor média (0,12cm) foi obtida na ausência de  $\text{GA}_3$ , enquanto a maior média (0,52cm) ocorreu na máxima concentração testada ( $4\mu\text{M}$ ). O efeito das concentrações da giberelina nas brotações de *Eugenia involucrata* pode ser observado na Figura 2. O resultado observado em *Eugenia involucrata* ratifica a afirmação de que o ácido giberélico é conhecido por propiciar alongamento celular (DAVIES, 1995). De maneira similar ao que foi observado no presente estudo, também em macieira (*Malus sylvestris*) cv "Fuji", o crescimento em altura aumentou proporcionalmente ao incremento na concentração de  $\text{GA}_3$  (CORRÊA et al., 1991).

**Figura 1** – Altura média dos brotos (cm), obtidos a partir do cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), em função das concentrações de  $\text{GA}_3$ , independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2017.



**Figura 2** – Brotações de *Eugenia involucrata* cultivadas *in vitro*, em função de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> no meio nutritivo ½MS, independentemente do período de cultivo *in vitro*. Observa-se em “A” brotações na ausência do fitorregulador; “B” brotações na presença de 1µM de GA<sub>3</sub>; “C” brotações na presença de 2µM de GA<sub>3</sub>; e “D” brotações na presença de 4µM de GA<sub>3</sub>. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.



### Conclusões:

A presença de GA<sub>3</sub> afeta positivamente o alongamento *in vitro* de brotos na micropropagação de *Eugenia involucrata*.

### Referências bibliográficas

- ALMEIDA, J. A. S. de; PEREIRA, M. de F. D. A. Efeito de GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol no desenvolvimento vegetativo do girassol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Campinas, SP. v. 9, n. 1, p. 55-60, 1996.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Santa Cruz do Sul. Instituto Souza Cruz, 2002. p.2002-2003.
- CARVALHO, R. E. **Escola inclusiva**: a reorganização do trabalho pedagógico. 1. ed. Porto Alegre: Mediação, 2008. 152 p.
- CORRÊA, D. M.; PASQUAL, M; YUI, E. Concentrações de ácido giberélico e de ácido naftaleno acético na propagação *in vitro* da macieira 'Fuji'. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 1, p. 26-31, 1991.
- DAVIES, P. J. (1995). **The plant hormones: Their nature, occurrence and functions**. In: DAVIES, P. J. (ed). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Pp. 1-12. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- DEGENHARDT, J.; DUCROQUET, J. P.; REIS, M. S.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Goiabeira serrana**: estimativa de variabilidade para características de frutos com base no coeficiente de repetibilidade. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 18p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 51).
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**. Curitiba, v. 6, n. 1/2, p. 91-96, 2005.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistic analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA, v. 35, n. 6, p 1039-1042, 2011.
- ISOGAI, Y.; KING, N.; WESTBROOK, J.; YOUNG, S.; ABEDIN, M.; CHAPMAN, J.; FAIRCLOUGH, S.; HELLSTEN, U. The genome of the ciliophore *Monosiga brevicollis* and the origins of metazoan multicellularity. **Nature** 451:783-8.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 2. v. 352 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. v. 384 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n. 1, p. 437-496, 1962.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 15.ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451p.
- STEFANEL, C. M. **Aspectos da Qualidade de Sementes e do Estabelecimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* De Candolle**. 2016. 101 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819 p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272 p.