

**ESTABELECIMIENTO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Eugenia involucrata* DC.:
INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTE E DO MEIO NUTRITIVO**

IN VITRO ESTABLISHMENT AND DEVELOPMENT OF *Eugenia involucrata* DC.:
INFLUENCE OF EXPLANT SOURCE AND NUTRITIONAL MEDIUM

Diego Pascoal Golle¹ Lia Rejane Silveira Reiniger²
Aline Ritter Curti³ Enrique Astério Benítez León⁴

RESUMO

Apresentando diversas características de interesse nos setores da silvicultura, fruticultura, meio ambiente e medicinal, *Eugenia involucrata* DC. (*Myrtaceae*) é uma espécie florestal nativa de vários Estados brasileiros. Considerada a dificuldade da propagação por sementes, que são recalcitrantes, perdendo rapidamente sua viabilidade após a colheita, este trabalho objetivou avaliar a influência do uso de segmentos apicais e nodais cultivados em diferentes meios nutritivos no estabelecimento e no desenvolvimento *in vitro* desta espécie. Segmentos apicais e nodais coletados em plantas de três anos de idade, mantidas em casa de vegetação, foram inoculados nos meios nutritivos MS, ½ MS e WPM. Em um primeiro momento, adicionaram-se aos meios de cultura 1 µM de ANA e 5 µM de TDZ e, após, os explantes foram transferidos para frascos contendo os respectivos meios nutritivos frescos, na ausência de reguladores de crescimento, mas com o acréscimo de 1 g L⁻¹ de carvão ativado, sendo cultivados por 30 dias adicionais. Os meios ½ MS e WPM são adequados para o estabelecimento e o desenvolvimento *in vitro* a partir do cultivo de segmentos nodais, enquanto que, com segmentos apicais, é apropriado o meio ½ MS. O meio ½ MS possibilitou os melhores índices de enraizamento nos explantes, juntamente com o meio WPM. O estabelecimento e o enraizamento *in vitro* foram promovidos pelo cultivo de segmentos apicais e nodais de *Eugenia involucrata* DC. Os meios nutritivos ½ MS e WPM são apropriados para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *E. involucrata*, recomendando-se o meio ½ MS pela economia e praticidade. Para segmentos apicais, o uso do meio de cultura ½ MS é mais adequado que o dos meios MS e WPM.

Palavras-chave: segmento apical; segmento nodal; meio de cultura MS; meio de cultura ½ MS; meio de cultura WPM.

ABSTRACT

Eugenia involucrata DC. (*Myrtaceae*) is a native forest species to several Brazilian states which has several features of interest in the sectors of forestry, fruit farming, environment and medicine. Considering the difficulty of propagation by seeds, which are recalcitrant and lose viability rapidly after harvest, this study evaluated the influence of the use of apical and nodal segments cultured in different nutrient media on the *in vitro* establishment and development of this species. Apical and nodal segments collected from three-year-old plants kept in the greenhouse were inoculated in the nutrient media MS, ½ MS and WPM. First, 1 µM of NAA and 5 µM of TDZ were added to the culture media. After that, the explants were transferred to flasks containing the respective fresh nutrient media in absence of growth regulators, but with addition of 1 g L⁻¹ activated charcoal, and then cultured for 30 additional days. Medium ½ MS is most suitable for the *in vitro* establishment and development of apical segments while media ½ MS and WPM are appropriate for nodal segments. Medium

1. Biólogo, Dr., Professor da Universidade de Cruz Alta, Campus Universitário Dr. Ulisses Guimarães, Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6, Parada Benito, CEP 98020-290, Cruz Alta (RS). diego.golle@gmail.com
2. Engenheira Agrônoma, Dr^a, Professora do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). liarejanasilveirareiniger@yahoo.com.br
3. Engenheira Florestal, MSc., Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). alinerittercurti@yahoo.com.br
4. Engenheiro Florestal, MSc., Doutorando do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). ebenitezleon@yahoo.com

Recebido para publicação em 14/08/2010 e aceito em 25/03/2011

½ MS enabled the best results of rooting in explants, along with WPM; the *in vitro* establishment and rooting were made possible by the use of apical and nodal segments of *E. involucrata* DC. Nutritional media ½ MS and WPM are most suitable for *in vitro* culture of nodal segments of *Eugenia involucrata* DC; however, medium ½ MS is recommended due to economical and practical features. For apical segments of this species, the use of culture medium ½ MS is more appropriate than media MS and WPM.

Keywords: apical segment; nodal segment; MS nutritive medium; ½ MS nutritive medium, WPM nutritive medium.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma infinidade de recursos genéticos com potencial para integrar o sistema produtivo primário do país. No entanto, muitos destes recursos ainda não são utilizados, em contraponto à excessiva exploração de outros, o que também não é desejável. Técnicas que permitam tanto a sua utilização como a sua possível conservação, especialmente pela redução de pressões em seu habitat natural, são extremamente importantes. A cultura de tecidos enquadra-se nessa condição, já que o seu uso pode subsidiar a produção e a proteção de espécies de interesse. Além disso, a biotecnologia tem sido considerada como essencial para a produtividade e sustentabilidade (WATANABE; RAMAN, 1997).

As plantas arbóreas possuem um lugar de destaque no setor econômico. Delas provém uma grande gama de produtos como madeira, polpa celulósica, energia industrial, subprodutos de interesse alimentício e farmacêutico, além de sua importância ambiental (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003). *Eugenia involucrata* DC. (*Myrtaceae*), conhecida como cerejeira-do-rio-grande, possui diversos atributos que a tornam uma espécie com grande potencial de utilização, mas, no entanto, é pouco explorada. Sua madeira é moderadamente pesada e possui alta durabilidade (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2008). Como tem boa formação de copa, pode ser muito aproveitada paisagisticamente e, do ponto de vista ambiental, é considerada uma espécie adequada para a recuperação de áreas degradadas. Seus frutos, embora pouco aproveitados, são muito apreciados *in natura* ou após o processamento, como doces e geleias (LORENZI, 1992; BACKES; IRGANG, 2002). De acordo com Carvalho (2008), sua frutificação em solo fértil ocorre entre os seis e sete anos de idade. Silva (1991) relatou que uma única cerejeira pode frutificar por até 200 anos, produzindo cerca de mil frutos por safra. Além disso, esta espécie possui propriedades medicinais antidiarreicas, digestivas

e antirreumáticas (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Contudo, a cerejeira apresenta difícil propagação, tendo sementes extremamente recalcitrantes, as quais perdem sua viabilidade logo após o armazenamento, principalmente devido ao seu alto teor de umidade. Para Lorenzi (1992) e Carvalho (2008), após duas semanas o potencial germinativo das sementes já sofre reduções significativas. Assim, a propagação por técnicas vegetativas seria uma alternativa de produção de mudas.

Além disso, é de suma importância no melhoramento de espécies lenhosas a propagação vegetativa e, mais especificamente, a cultura de tecidos, já que espécies florestais necessitam de longos ciclos de vida para se reproduzirem (PARANJOTHY et al., 1990). Acrescenta-se a isso o fato da cultura de tecidos poder auxiliar na conservação de germoplasma destas espécies (FERREIRA et al., 1998). Xavier et al. (2007) relataram que a propagação *in vitro* 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.

Diversos critérios são importantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro* como, por exemplo, a escolha do tipo de explante e do meio nutritivo. Embora, teoricamente, qualquer tecido possa ser utilizado como fonte de explante, alguns aspectos devem ser considerados e testados quanto à escolha do mais adequado aos processos morfogênicos de interesse (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Quanto aos meios nutritivos, existem formulações distintas que devem ser ajustadas para cada espécie. O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suas diluições são, costumeiramente, as mais utilizadas. No entanto, existem formulações específicas a determinados grupos de plantas como, por exemplo, o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), mais usual em espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998).

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a influência da utilização de segmentos nodais e apicais e de diferentes meios nutritivos sobre o estabelecimento e demais aspectos do desenvolvimento *in vitro* de *E. involucrata* DC.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas doadoras de explantes, com cerca de três anos de idade, foram obtidas por meio da aquisição de mudas com origem seminal. Estas permaneceram em casa de vegetação, acondicionadas em vasos plásticos com 22 cm de altura e 24 cm de diâmetro (capacidade para aproximadamente 8 L) contendo o substrato Plantmax®. Além de irrigações diárias, as plantas receberam para o aporte nutricional, mensalmente, 400 mL de solução de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K: 5-20-20) a 1 g L⁻¹ e, a cada 15 dias, 400 ml de solução a 1 g L⁻¹ de nitrogênio (ureia). Foram realizadas pulverizações quinzenais com solução à base do fungicida Cercobin700PM® (thiophanato metílico) a 1 g L⁻¹ e do antibiótico sulfato de estreptomicina a 0,1 g L⁻¹, constituindo um pré-tratamento, visando auxiliar à posterior desinfestação dos explantes. Quatro semanas precedentes à coleta dos explantes, realizou-se uma poda em toda a parte aérea das plantas. As podas foram efetuadas deixando-se regiões de galhos e ramos com duas ou mais gemas visíveis. Após a poda, foi intensificado o uso da solução de nitrogênio (ureia), à qual foi adicionado potássio na proporção de 2:1, efetuando-se uma aplicação semanal, que ocorreu por meio da obtenção de uma solução destes nutrientes diluídos em água a 1 g L⁻¹. Administrou-se 400 mL da solução em cada vaso. Além disso, os tratos sanitários foram administrados a cada sete dias, encharcando-se os ramos por completo.

Para a coleta dos explantes, foram escolhidos ramos jovens, verdes, possuindo entre dois e três segmentos, considerando-se o apical e o(s) nodal(is). Os segmentos foram imersos em solução contendo o fungicida sistêmico Benlate500® (benomyl) a 1 g L⁻¹ e o antibiótico sulfato de estreptomicina a 0,1 g L⁻¹ durante 30 minutos. No Laboratório, foram cuidadosamente lavados em água corrente, com o auxílio de esponja e detergente comercial, e seccionados com o uso de uma tesoura. Após, permaneceram por 30 segundos em solução de etanol a 70% (v/v), objetivando-se a desinfestação superficial e surfactar a tensão superficial, após houve um enxágue em água estéril. A seguir, em capela de exaustão, os explantes

foram imersos em solução do agente desinfestante bicloreto de mercúrio (HgCl₂) a 0,05% (p/v), onde permaneceram por 10 minutos. Posteriormente, foram enxaguados com água estéril e, em câmara de fluxo laminar, foram expostos à agitação por 15 minutos em solução do desinfestante hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) acrescida de três gotas de detergente comercial. Passado este período, as plantas foram enxaguadas três vezes e permaneceram, durante a inoculação, em água estéril contendo 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, para reduzir a oxidação fenólica. Os explantes foram compostos por segmentos apicais (região apical dos ramos), seccionados em bisel a 0,8 cm do nó e contendo uma gema dormente; e segmentos nodais, os quais tiveram seus pares de folhas laterais retirados, deixando-se apenas o vestígio inicial do limbo, e cortados a 0,3 cm acima e 0,8 cm abaixo da região do nó, a qual possuía duas gemas dormentes. O corte da região basal dos segmentos nodais também foi realizado em bisel.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se esquema bifatorial 2 x 3, em que os níveis do fator "A" referem-se aos dois tipos de explantes (segmentos apicais e segmentos nodais) e os níveis do fator "B" aos três meios nutritivos testados. Os meios utilizados foram o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ MS (composto pela diluição do meio MS à metade de sua concentração normal de sais) e WPM – *Woody Plant Medium* (LLOYD; MCCOWN, 1981). O ensaio apresentou 10 repetições, cada uma composta por um frasco com capacidade para 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e dois explantes, contabilizando 60 unidades experimentais e 120 explantes inoculados. Aos meios foram acrescidos 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mioinositol e 7 g L⁻¹ de ágar.

Durante os primeiros 30 dias de cultivo, os explantes permaneceram nos meios nutritivos citados, aos quais foi acrescido 1 µM de Ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e 5 µM de Tidiazuron (TDZ). Após este período, os explantes foram transferidos para frascos contendo os respectivos meios nutritivos, porém, na ausência de reguladores de crescimento e com o acréscimo de 1 g L⁻¹ de carvão ativado, o qual foi realizado previamente ao processo de autoclavagem dos meios frescos. Após, realizou-se o cultivo por mais 30 dias.

Aos 60 dias, foram avaliadas as variáveis: oxidação fenólica (visualizada pela coloração escura do explante, mesmo quando o aspecto oxidativo não

inibiu o seu desenvolvimento), estabelecimento *in vitro* (explantes verdes, vivos, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), enraizamento, intumescimento dos explantes, e formação de calos na base dos explantes; todas expressas em porcentagem. Adicionalmente, avaliaram-se as variáveis: média de brotos por explantes (considerando-se como broto qualquer desenvolvimento das gemas do explante), média de brotos desenvolvidos por explante (considerando-se como brotos apenas aqueles desenvolvidos e que haviam emitido folhas), e, por fim, média de folhas emitidas por explante.

Na vedação dos frascos, foi utilizado papel alumínio. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e após a inclusão dos reguladores de crescimento ou carvão ativado. Os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,5 atm de pressão. As unidades experimentais foram dispostas em sala de cultivo com temperatura controlada de 25±3°C e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. O fotoperíodo foi regulado para 16 horas.

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, foram realizadas transformações pela função $\sqrt{x+0,5}$ e os dados foram submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) foi utilizado para o processamento dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oxidação fenólica apresentou diferenças significativas (P=0,0028) apenas para o tipo de explante. Os segmentos nodais apresentaram reduzida oxidação (15,74%), diferindo daquela observada em segmentos apicais (38,33%). Nestes, em função da fragilidade dos tecidos, houve um aumento nas injúrias durante o processo de desinfestação, o qual ampliou a ocorrência de oxidações no decorrer do tempo. As oxidações, possivelmente, constituíram a resposta celular ao estresse causado, já que ferimentos podem estimular a atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), a qual está relacionada à

formação de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Contudo, na maioria das vezes, a presença de aspectos oxidativos nos explantes, embora indesejados, não inviabilizaram o estabelecimento e o desenvolvimento das culturas *in vitro*.

Todos os níveis testados foram eficientes na promoção do estabelecimento *in vitro* de cerejeira, uma vez que não se observaram diferenças significativas para esta variável em nenhum dos fatores estudados (níveis do fator “A” com P= 0,0789; níveis do fator “B” com P= 0,5371) e nem para a interação (P=0,8440); obtendo-se uma média geral de estabelecimento de 91,92%. Este resultado evidencia que o cultivo desta espécie, tanto por meio de segmentos apicais como nodais, empregando-se qualquer um dos três meios nutritivos, é extremamente promissor, favorecendo a sua propagação pela clonagem *in vitro*.

Obteve-se uma resposta de enraizamento *in vitro* dos explantes após 60 dias de cultivo, tanto em segmentos apicais como nodais, entretanto, para este último, não ocorreu em meio MS. (Tabela 1; Figura 1e). Assim, pode-se afirmar que os meios nutritivos influenciaram o enraizamento (Tabela 1) de maneira diferenciada (P=0,0268), com o meio ½ MS (17,5%) revelando-se mais adequado e superior ao MS (2,5%). Já o meio WPM (5,0%) não diferiu de ambos, podendo ser considerado como intermediário. Embora, em cultura de tecidos, a etapa de enraizamento seja importante após a multiplicação e o alongamento dos explantes, optou-se por relatá-la, mesmo tendo ocorrido na fase inicial de estabelecimento, pois este resultado mostra que a espécie é promissora a esta etapa, geralmente recalcitrante no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Não obstante, demonstra a existência de competência e determinação celular para esta rota morfogênica.

A melhor resposta rizogênica dos explantes de cerejeira ao meio ½ MS pode estar ligada à relação carbono/nitrogênio (C/N), em que a redução do nitrogênio (conforme ocorre no meio) e o aumento de fontes de carboidrato (as quais se mantiveram em seu nível normal no presente trabalho, no meio ½ MS, a saber, 30 g L⁻¹) favoreceram os processos de enraizamento. Xavier et al. (2009) expuseram que o alto conteúdo de carboidratos atua como um fator importante à rizogênese, já que a iniciação radicial requer energia. Estes mesmos autores relataram a existência de evidências sobre a melhor ocorrência de enraizamento quando se mantêm as plantas bem nutridas, mas com redução nos teores de nitrogênio.

TABELA 1: Efeito de diferentes tipos de explantes e meios nutritivos no desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC. Variáveis avaliadas aos 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.TABLE 1: Effect of different kind of explants and nutritive media on *in vitro* development of *Eugenia involucrata* DC. Variables evaluated at 60 days of culture. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Meio	-----Brotos por Explante-----			-----Brotos Desenvolvidos por Explante-----		
	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média
MS	0,75 a b	1,16 b	0,95	0,40 b	1,00 a	0,70
1/2 MS	1,20 a	1,50 a b	1,35	1,00 a	1,31 a	1,15
WPM	0,55 b	1,75 a	1,15	0,33 b	1,43 a	0,88
Média	0,83	1,47		0,57	1,25	
CV (%)		16,61			19,87	
Meio	-----Folhas Emitidas por Explante-----			-----Enraizamento (%)-----		
	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média
MS	1,05 b	3,55 a	2,30	5,00	0,00	2,50 b
1/2 MS	2,80 a	4,00 a	3,13	15,00	20,00	17,50 a
WPM	1,20 b	5,06 a	3,40	5,00	5,00	5,00 a b
Média	1,68	4,20		8,33	8,33	
CV (%)		27,87			14,15	
Meio	-----Intumescimento do Explante (%)-----			-----Calo na Região Basal (%)-----		
	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média	Seg. Apical	Seg. Nodal	Média
MS	55,00 b B	27,77 a A	41,38	20,00 a A	44,44 a A	32,22
1/2 MS	15,00 a A	18,74 a A	16,87	45,00 a b B	12,50 a A	28,75
WPM	61,11 b B	12,50 a A	36,80	66,66 b A	38,74 a A	52,70
Média	43,70	19,67		43,88	31,89	
CV (%)		17,54			20,52	

Em que: Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. A letra "a" é atribuída conforme o que se deseja no cultivo *in vitro*.

Em *Crataeva nurvala* (*Capparidaceae*), o enraizamento foi obtido com a utilização de ANA e ocorreu apenas em meio 1/2 MS, semelhante ao observado em cerejeira, porém, não sendo possível a rizogênese no cultivo de explantes em meio WPM (WALIA et al., 2007). Em *Balanites aegyptiaca* (*Zygophyllaceae*), Anis et al. (2010) observaram a vantagem do meio MS reduzido à metade de sua concentração de sais sobre os processos rizogênicos em segmentos nodais. Nesta lenhosa, o uso da auxina ANA não diferiu do maior valor de enraizamento observado, o qual ocorreu com o uso de AIB.

A presença de intumescimento nos explantes (Tabela 1), indesejável no estabelecimento *in vitro*, apresentou interação entre os níveis dos fatores testados ($P=0,0179$). O uso de segmentos nodais não diferiu dos segmentos apicais quando cultivados em meio 1/2 MS, registrando-se uma média geral de 16,87%. No entanto, segmentos nodais propiciaram menos intumescimento em

relação aos segmentos apicais, especialmente quando cultivados nos meios MS e WPM.

A formação de calos na base dos explantes, também indesejada no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais e apicais, mostrou interação entre os níveis dos fatores testados ($P=0,0272$). Não houve diferenças para os tipos de explantes testados, exceto quando cultivados em meio 1/2 MS, ocorrendo menor calogênese na base dos explantes em segmentos nodais (12,50%) em relação aos segmentos apicais (45%). A maior porcentagem de calogênese na base dos explantes, em segmentos apicais, ocorreu quando foram cultivados no meio WPM (66,66%), a qual não diferiu daquela observada no meio 1/2 MS (45%). O meio nutritivo MS formou apenas 20% de calos na base dos explantes.

Houve interação entre o tipo de explante e o meio de cultura para a média de brotos por explante ($P=0,0060$), a média de brotos desenvolvidos por explante ($P=0,0284$) e a média de folhas por explante ($P=0,0237$). Da mesma forma, houve

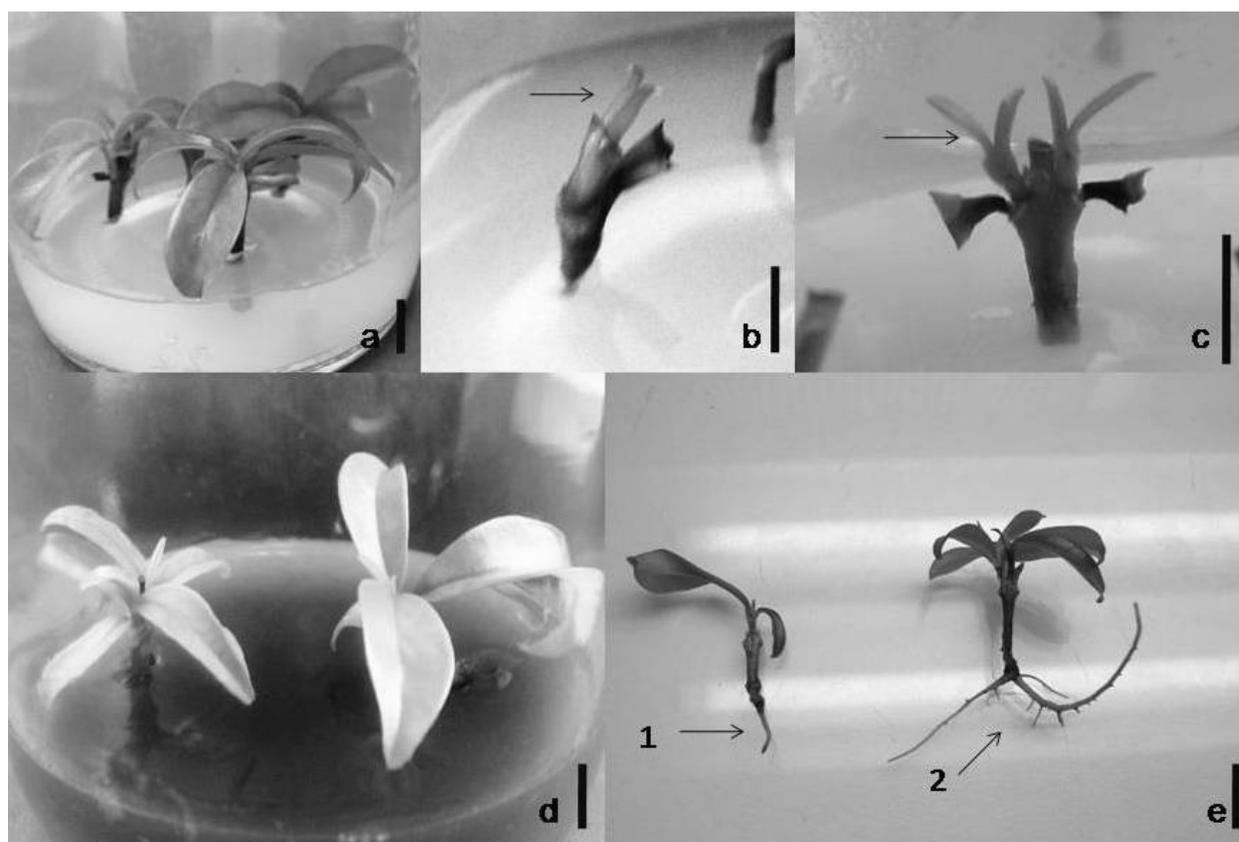


FIGURA 1: Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC. “a” = estabelecimento inicial, após a desinfestação (21 dias); “b” = desenvolvimento inicial em segmentos apicais (7 dias); “c” = desenvolvimento inicial das gemas em segmentos nodais (7 dias); “d” = cultivo em meio com carvão ativado (60 dias); e, “e” = rizogênese em segmento apical (seta com o número 1) e em segmento nodal (seta com o número 2), aos 60 dias de cultivo. Barra = 0,5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

FIGURE 1: *In vitro* establishment and development of *Eugenia involucrata* DC. “a” = initial establishment, after the disinfection (21 days); “b” = initial development in apical segments (7 days); “c” = initial development of buds on nodal segments (7 days); “d” = culture in medium with activated charcoal (60 days); and “e” = rooting in apical segment (arrow number 1) and nodal segment (arrow number 2) at 60 days of culture. Bar=0.5 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

diferenças significativas para o efeito dos fatores principais para estas mesmas variáveis, sendo $P=0,0397$; $0,0109$ e $0,0430$, respectivamente. Optou-se por considerar nos níveis do fator “meio de cultura”, pois a comparação entre diferentes tipos de explantes seria tendenciosa, já que o número de gemas iniciais apresentadas é diferente. Os dados estão expostos na Tabela 1. O aspecto geral das culturas estabelecidas e do desenvolvimento inicial *in vitro*, em segmentos apicais e nodais, pode ser visualizado na Figura 1.

O uso do meio $\frac{1}{2}$ MS promoveu um aumento no número de brotos por explantes, no cultivo *in vitro* de segmentos apicais (1,20), sendo superior ao

meio WPM (0,55). O meio MS (0,75), no entanto, não diferiu dos demais. Com segmentos nodais, o meio WPM (1,75) mostrou-se superior ao meio MS (1,16), mas não diferiu da utilização do meio $\frac{1}{2}$ MS (1,50), que, por sua vez, não diferiu de ambos.

Pode-se afirmar que os meios $\frac{1}{2}$ MS e WPM foram favoráveis ao desenvolvimento *in vitro* de cerejeira. A maior adaptação dos explantes a estes meios demonstrou a preferência da espécie pelo cultivo em meios nutritivos, com concentração iônica reduzida em comparação ao meio MS. Para Vengadesan et al. (2002) e Nunes et al. (2002), o meio WPM possui cerca de 45% da força iônica do meio MS. O meio $\frac{1}{2}$ MS, por sua vez, possui 22,5%

da capacidade iônica do MS, explicando os bons resultados visualizados com o emprego dos meios nutritivos ½ MS e WPM.

Comportamento semelhante foi observado na micropropagação de *Acacia mangium* (*Mimosaceae*) a partir de explantes nodais, em diferentes meios de cultura. Monteuis (2004) registrou que o melhor desenvolvimento ocorreu com a redução da concentração dos sais do meio MS, tanto à metade como a 1/3. Além disso, também foi possível propagar a planta em meios com redução da sacarose para 5 g L⁻¹. Contudo, este desempenho é particular de cada espécie. Em *Melia azedarach* (*Meliaceae*), por exemplo, sobressaíram-se os efeitos positivos do meio MS, com sua constituição completa de sais, especialmente no número de brotações emitidas, ao serem testados os meios MS, ½ MS, WPM e B5 (HUSAIN; ANIS, 2009). Tal resultado é dispar daquele observado em cerejeira.

No cultivo de *Magnolia x soulangiana* (*Magnoliaceae*) em que foram utilizadas brotações apicais, Kamenicka; Lanakova (2000) obtiveram maior crescimento e desenvolvimento *in vitro* em um meio nutritivo denominado “S”, porém, os meios WPM e ½ WPM também apresentaram um desempenho satisfatório, demonstrando que esta espécie adapta-se aos meios de cultura com capacidades iônicas reduzidas, semelhante à cerejeira.

Em relação aos brotos desenvolvidos por explante, o meio ½ MS foi superior aos meios MS e WPM, quando foram utilizados segmentos apicais, apresentando as médias de 1,00; 0,40 e 0,33, respectivamente. No entanto, em segmentos nodais, não houve diferenças entre os meios MS (1,00), ½ MS (1,31) e WPM (1,43).

Para segmentos apicais, a maior emissão de folhas ocorreu com a utilização do meio ½ MS (2,80), que foi superior aos meios MS (1,05) e WPM (1,20). Por outro lado, não houve diferença entre os meios nutritivos em segmentos nodais, sendo observada a média geral de 4,20 folhas por explante.

Em *Arbutus unedo* (*Ericaceae*), uma espécie lenhosa, o uso de segmentos nodais e apicais permitiu o estabelecimento *in vitro* da espécie (GOMES; CANHOTO, 2009), assim como observado em cerejeira.

Portanto, pode-se afirmar que, para segmentos apicais, o meio ½ MS foi o mais adequado ao seu desenvolvimento, ao passo que, com o uso de segmentos nodais, foram mais promissores, ao

processo de propagação *in vitro*, os meios ½ MS e WPM. Contudo, recomenda-se o uso do meio ½ MS, uma vez que permite o estabelecimento, o desenvolvimento e o enraizamento *in vitro* de culturas oriundas tanto de segmentos nodais quanto apicais de *Eugenia involucrata*. Adicionalmente, é mais econômico e prático, considerando-se o seu modo de preparo, já que o uso do meio MS costuma ser rotineiro nos laboratórios de cultura de tecidos.

CONCLUSÕES

A utilização de segmentos nodais é mais promissora ao cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* do que o uso de segmentos apicais.

Os meios nutritivos ½ MS e WPM são apropriados para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, recomendando-se o meio ½ MS pela economia e praticidade.

Para segmentos apicais de *E. involucrata*, o uso do meio de cultura ½ MS é mais adequado do que o dos meios MS e WPM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANIS, M.; VARSHNEY, A.; SIDDIQUE, I. *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **Agroforestry systems**, Dordrecht, v.78, n.2, p. 151-158, Feb. 2010.
- BACKES, A.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Porto Alegre: Pallotti, 2002, p. 275.
- CALDAS, L. S.; PADMAJA, H.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 87-132.
- CARVALHO, P. E. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 593 p. v. 3.
- CONDE, P. et al. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. **Plant cell, tissue and organ culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 113-119, Jan. 2008.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no

- melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 21-43
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p. 316-321, May/June, 2003.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 45, n. 1, p. 72-82, Feb. 2009.
- 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-SPI/Embrapa –SNPH, 1998. v. 1, p. 183 - 260.
- HUSAIN, M. K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta physiologiae plantarum**, Kraków, v. 31, n. 4, p. 765-772, July, 2009.
- KAMENICKA, A.; LANAKOVA, M. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of magnolia *in vitro*. **Acta physiologiae plantarum**, Kraków, v. 22, n. 2, p. 129-134, June, 2000.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedins International Plant Propagators Society**, Washington, v. 30, p. 327-421, 1981.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.
- MALLIKARJUNA, K.; RAJENDRUDU, G. High frequency *in vitro* propagation of *Holarrhena antidysenterica* from nodal buds of mature tree. **Biologia plantarum**, Prague, v. 51, n. 3, p. 525-529, Sept. 2007.
- MONTEUUIS, O. *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 40, n. 1, p. 102-107, Jan./Feb. 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NUNES, E. C. et al. *In vitro* cultures of *Cedrella fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant cell, tissue and organ culture**, Dordrecht, v.70, n.1, p. 259-268, Sept. 2002.
- PARANJOTHY, K. et al. Clonal multiplication of woody perennials. In: BHOJWANI, S. S. **Plant tissue culture: applications and limitations**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 190-219.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande – Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev., 2001.
- SHIRIN, F.; RANA, P. K. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown callus in *Bambusa glaucescens* Willd. **Plant biotechnology reports**, Tokyo, v. 1, n. 3, p. 141-147, Aug. 2007.
- SIDDIQUE, I.; ANIS, M. Direct plant regeneration from nodal explants of *Balanites aegyptiaca* L. (Del.): a valuable medicinal tree. **New forests**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 53-62, Jan. 2009.
- SILVA, S. **Frutas Brasil Frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 1991. 166 p.
- STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência florestal**, Santa Maria, v.13, n. 1, p. 167-178, 2003.
- SUJATHA, K.; HAZRA, S. Micropropagation of mature *Pongamia pinnata* Pierre. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 607-613, Dec. 2007.