



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TESE

MICROPROPAGAÇÃO DE *Psidium* spp.

MÁRCIA ADRIANA CARVALHO DOS SANTOS

Areia, PB
Dezembro de 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Psidium* spp.

MÁRCIA ADRIANA CARVALHO DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor

Mailson Monteiro do Rêgo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração Agricultura Tropical.

e Coorientação dos Professores:

Wagner Campos Otoni – Universidade Federal de Viçosa

Manoel Abilio de Queiróz – Universidade do Estado da Bahia

Areia, PB
Dezembro de 2015

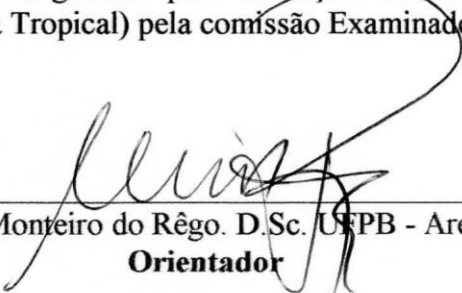
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

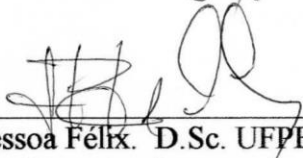
TÍTULO: MICROPROPAGAÇÃO DE *Psidium* spp.

AUTORA: MÁRCIA ADRIANA CARVALHO DOS SANTOS

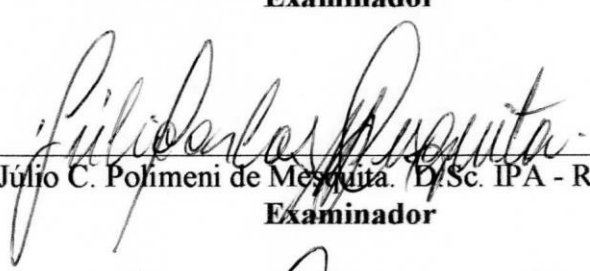
Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela comissão Examinadora:



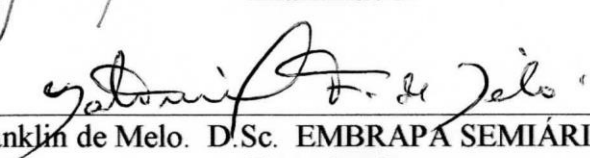
Mailson Monteiro do Rêgo. D.Sc. UFPB - Areia/PB
Orientador



Leonardo Pessoa Félix. D.Sc. UFPB - Areia/PB
Examinador



Julio C. Polimeni de Mesquita. D.Sc. IPA - Recife/PE
Examinador



Nataniel Franklin de Melo. D.Sc. EMBRAPA SEMIÁRIDO - Petrolina/PE
Examinador

Data da realização: 18 de dezembro de 2015.

Presidente da Comissão Examinadora
D.Sc. Mailson Monteiro do Rêgo
Orientador

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da Biblioteca
Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

S237m Santos, Márcia Adriana Carvalho dos.
Micropropagação de *Psidium* spp./ Márcia Adriana Carvalho dos Santos.
- Areia: UFPB/CCA, 2015.
159 f. : il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.
Bibliografia.
Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo.
Coorientação: Wagner Campos Otoni, Manoel Abílio de Queiróz.

1. Araçá 2. Micropropagação 3. Organogênese vegetal 4. Trocas gasosas
I. Rêgo, Mailson Monteiro do II. Otoni, Wagner Campos III. Queiróz, Manoel Abílio
de IV. Título.

UFPB/CCA

CDU: 582.776(043.2)

A Deus primeiramente, e a meus pais Osvaldo e Francisca, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, me apoiando em todas as decisões tomadas. Por todo amor, incentivo, dedicação e paciência, e, por terem proporcionado todas as condições para que eu chegasse até aqui.

Dedico

In memoriam, aos meus irmãos Leonardo Carvalho dos Santos e Sérgio Leandro Carvalho Santos, e ao meu tio João Carvalho dos Santos, por todo apoio, conselhos e confiança que eles depositavam em mim, e, a minha vó Maria Angélica dos Santos, as minhas tias Ana Carvalho e Raimunda Carvalho, a minha madrinha Madalena Ribeiro e padrinho José Santos, por todo amor, carinho, compreensão e apoio.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita bondade, por conceder tantas bênçãos em minha vida, por me fazer encontrar forças, mesmo quando eu achava que não mais as tinha.

À Universidade Federal da Paraíba/UFPB, em especial, a todo o corpo docente da pós-graduação em Agronomia, por todo ensinamento proporcionado, os quais foram essenciais durante as atividades acadêmicas e continuarão sendo em toda minha vida profissional.

À Universidade Federal de Viçosa/UFV, ao Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCTII) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e aos Laboratórios Anatomia Vegetal e Núcleo de Microscopia e Microanálises por fornecer toda a estrutura para realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao trabalho desenvolvido.

Ao professor Dr. Mailson Monteiro do Rêgo, pela orientação e ensinamentos transmitidos durante o curso de doutorado. A confiança depositada pelo senhor foi fundamental para que eu pudesse realizar todos os experimentos à distância e assim, concluir a tese.

Ao professor da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Wagner Campos Otoni, meu coorientador, por todo o apoio técnico e científico e seu profissionalismo, competência e caráter, fatores que foram essenciais para a realização desta pesquisa e para meu crescimento profissional. Sem o senhor, a realização deste trabalho não seria possível. Minha admiração pelo senhor é imensa.

Ao professor da Universidade do Estado da Bahia, Dr. Manoel Abilio de Queiróz, meu coorientador, exemplo de caráter, competência e profissionalismo, pela amizade, conselhos e confiança depositada em mim e por toda contribuição técnico científica em minha vida acadêmica.

À Ana Claudia Ferreira da Cruz, Anyela Marcela Rios Rios, Maria Yumbla Orbes pela amizade e auxílio no Laboratório de Anatomia Vegetal.

À toda a família LCTII pela amizade e contribuição no desenvolvimento da pesquisa, e aos inúmeros amigos que fiz em Viçosa - MG.

À equipe Biomassa pelo acolhimento no período que passei aqui em Areia/UFPB.

À Professora Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Angela Pessoa, Wilza Souza, Geisa Souza, Lindamara e Priscila Barroso, pelo acolhimento e amizade.

À Aline Santos, Carmem Santana e Socorro Sena, pelo apoio nos momentos difíceis, incentivo e amizade.

Ao meu namorado Otto Dietrich, por todo o auxílio, pelo companheirismo, amor, respeito, amizade, paciência, incentivo e confiança em tudo que faço.

À minha família, que é meu alicerce e por tudo que cada um deles representa na minha vida, por todo o amor, compreensão, incentivo e paciência que tiveram e têm comigo. Sem vocês, não conseguiria alcançar mais esse objetivo na minha vida.

A todos aqueles que não foram mencionadas, mas colaboraram de alguma forma, para o desenvolvimento deste trabalho.

SANTOS, M.A.C. **MICROPROPAGAÇÃO DE *Psidium* spp.** 2015. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo. Coorientadores: Wagner Campos Otoni e Manoel Abilio de Queiróz.

RESUMO

O Brasil possui 47 espécies endêmicas de araçazeiros (*Psidium* spp.), constituindo-se num importante centro de diversidade genética do gênero. No bioma Caatinga, já foram reportadas a ocorrência das espécies *Psidium schenckianum* Kiaersk., *P. guineense* Swartz. e *P. grandifolium* Mart., com maior frequência das duas primeiras. Estas espécies apresentam grande potencial de uso de seus frutos, por serem ricos em vitamina C, podendo ser utilizado no consumo *in natura* ou industrializado, na forma de sucos, doces, compotas, geleias e sorvetes. Apresenta ainda, marcante atividade antimicrobiana, farmacológica e antioxidante além de possuir grande quantidade de óleos essenciais. Além disso, os araçazeiros são as principais fontes de resistência ao nematoide (*Meloidogyne enterolobii*), principal patógeno que acomete a goiabeira (*P. guajava*), a qual pode ser transferida para a goiabeira Paluma (cv. GP). Contudo, os araçazeiros encontram-se em risco de extinção em seus ambientes naturais e apresentam dificuldades na propagação vegetativa pelos métodos convencionais, impossibilitando a clonagem das plantas resistentes. A micropropagação é uma técnica viável para propagação de espécies passíveis de extinção e de difícil propagação vegetativa, devendo-se desenvolver protocolos que possibilitem a clonagem desta espécie para estudos futuros de melhoramento. Dessa forma, objetivou-se com a presente pesquisa desenvolver um protocolo para micropropagação de *Psidium* spp., determinando o meio de cultura, condições de trocas gasosas, tipo de explante e concentração de fitorreguladores. Plântulas de três acessos de araçazeiros e da cultivar de goiaba Paluma (cv. GP), foram crescidas nas seguintes condições: meios de cultura JADS, MS e WPM para determinação do meio de cultura, e em meio de cultura JADS, vedados com tampas sem membrana (SM), uma membrana (1M) e duas membranas (2M) com taxas de trocas de dióxido de carbono (TTCO₂) de 14; 21 e 25 µL L⁻¹, respectivamente, para determinar a melhor TTCO₂ no crescimento de plântulas de *Psidium* spp. Após determinada estas condições, diferentes explantes de araçazeiros foram induzidos a regeneração *in vitro*, utilizando diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0; 2,46; 4,92 e 9,84 µM) na indução de rizogênese; benziladenina (BA) (0,0; 2,2 e

4,44 μM) e BA + ácido naftalenoacético (ANA) (2,22 μM BA + 0,054 μM ANA e 4,44 μM BA + 0,054 μM ANA) na regeneração de brotos dos seguintes explantes: segmentos nodais e apicais em meio de cultura semi-sólido, segmentos caulinares em meio de cultura líquido, organogênese de segmentos internodais, e secções foliares em meio de cultura semi-sólido, de um acesso de *P. guineense* e indução de organogênese em meio de cultura líquido, utilizando segmentos radiculares de um acesso de *P. schenckianum* e três acessos de *P. guineense*. As plântulas de araçazeiro e da cv. GP apresentaram melhor crescimento em meio de cultura JADS. Maiores TTCO_2 (25 $\mu\text{L L}^{-1}$), resultaram no crescimento das plântulas com melhores características morfofisiológicas e anatômicas, e na biossíntese de compostos de reservas nas folhas de ambas as espécies (*P. guineense* e *P. guajava*), sendo esta condição a mais indicada para o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *Psidium* spp. Não foi necessária adição de AIB no enraizamento das brotações. Foram obtidas brotações com e sem adição de fitorreguladores, em segmentos caulinares, segmentos apicais, nodais e, em segmentos radiculares nos acessos de *P. guineense*, a partir de organogênese direta, mantendo a mesma ploidia das plantas oriundas de sementes desta espécie. Em segmentos caulinares, maior número de brotações foi observado com 2,22 e 4,44 μM de BA. As brotações foram alongadas, enraizadas e aclimatizadas com 100% de sobrevivência, permitindo inferir que o protocolo de regeneração *in vitro* estabelecido é eficiente. Este é o primeiro protocolo de micropropagação estabelecido para araçá.

Palavras-chave: Meio de cultura, Trocas gasosas, Micropropagação *in vitro*, Organogênese adventícia.

SANTOS, M.A.C. **MICROPROPAGATION OF *Psidium* spp.** 2015. Thesis (Ph.D. in Agronomy), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia – PB. Advisor: Mailson Monteiro do Rêgo. Co-advisors: Wagner Campos Otoni and Manoel Abilio de Queiróz.

ABSTRACT

Brazil has 47 endemic species of strawberry guava (*Psidium* spp.), being an important center of genetic diversity of this genus. In the Caatinga biome, the occurrence of the species *P. schenckianum* Kiaersk, *P. guineense* Swartz. (most often) and *Psidium grandifolium* Mart. have been reported. These species have great potential for economic exploitation of the fruit, which is rich in vitamin C and can be consumed fresh or processed in the form of juices, sweets, jams, jellies and ice cream. It also presents outstanding antimicrobial activity, pharmacological and antioxidant as well as essential oils. In addition, strawberry guava are the main sources of resistance to nematode (*Meloidogyne enterolobii*), which is the main pathogen of guava (*P. guajava*). This resistance can be transferred to the *Paluma guava* (cv. GP). However, the strawberry guava is endangered in its natural environment and presents limitations in vegetative propagation by conventional methods, making impossible cloning the resistant plants. Micropropagation is a viable propagation technique of species susceptible to extinction and difficult vegetative propagation. Protocols allowing the cloning of this species for future studies should be improved. Thus, the aim of this research is to develop a protocol for micropropagation of *Psidium* spp., determining the culture medium, conditions of gas exchange, type of explant and concentration of growth regulators. Seedlings of three access of strawberry guava and cultivar guava paluma (cv.GP) were grown under the following conditions: JADS culture medium, MS and WPM to determine the culture medium; and medium JADS sealed with lids without membrane (SM), one membrane (1M) and two membranes (2M) with carbon dioxide exchange rates (TTCO₂) 14; 21 and 25 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively, to determine the best seedling growth in TTCO₂ *Psidium* spp. After this, different explants of Brazilian guava trees were transferred to regeneration media with different concentrations of indolbutyric acid (IBA): 0, 2.46, 4.92 and 9.84 mM in rooting induction and benzyladenine (BA): 0.0, 2.2 and 4.44 mM; BA + naphthaleneacetic acid (NAA): 2.22 μM BA + 0.054 μM ANA; and 4.44 μM BA + 0.054 μM ANA in regeneration shoots of the following explants: nodal and apical segments in semi-solid culture, stem

segments in liquid culture, organogenesis internodal segments, and leaf sections in semi-solid culture of a *P. guineense* access and induction of organogenesis in liquid culture using root segments of a *P. schenckianum* access and three accessions of *P. guineense*. Seedlings of strawberry guava and cv. GP showed better growth in JADS culture medium. TTCO₂ (25 µL L⁻¹) resulted in the growth of seedlings with improved morphophysiological and anatomical characteristics and biosynthesis of compounds of reserve in leaves from both species (*P. guineense* and *P. guajava*). This condition is the most indicated for the development in *in vitro* propagation protocols of *Psidium* spp. It was not necessary the addition of IBA in the rooting of shoots. Shoots were obtained with and without addition of plant hormones in stem segments, apical segments, nodal and root segments in *P. guineense* accesses from direct organogenesis, maintaining the same ploidy of the seedlings of this species. In stem segments, the greater number of shoots was observed with 2.22 and 4.44 mM of BA. Shoots were elongated, rooted and acclimatized with 100% survival, showing that the *in vitro* regeneration protocol established is efficient. This is the first micropropagation protocol established to strawberry guava

Key words: Culture medium, Gas exchange, *In vitro* micropropagation, Adventitious organogenesis.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 . Constituição dos meios de cultura JADS, MS e WPM utilizados no crescimento de acessos de <i>Psidium guineense</i> e de <i>P. guajava</i>	42
Tabela 2. Resumo da análise de variância das variáveis de crescimento, índice estomático e pigmentos fotossintéticos, analisadas em acessos de <i>P. guineense</i> e em <i>P. guajava</i> crescidas <i>in vitro</i> sob diferentes meios de cultura (MC).	45
Tabela 3. Médias das variáveis de crescimento analisadas em acessos de <i>P. guineense</i> (Y93, Y95 e Y97) e em <i>P. guajava</i> (GP) crescidas <i>in vitro</i> sob diferentes meios de cultura.	46
Tabela 4. Acúmulo dos macronutrientes e micronutrientes na parte aérea de plantas de <i>Psidium guineense</i> após 110 dias de cultivo nos meios de cultura JADS, MS e WPM.....	50

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis de crescimento analisadas em genótipos (G) de <i>P. guineense</i> e em <i>P. guajava</i> crescidas <i>in vitro</i> sob diferentes níveis de trocas gasosas (TG).	71
Tabela 2. Médias das variáveis de crescimento analisadas em acessos de <i>P. guineense</i> e em <i>P. guajava</i> crescidas <i>in vitro</i> sob diferentes níveis de trocas gasosas	72
Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis de crescimento após aclimatização em acessos de <i>P. guineense</i> e em <i>P. guajava</i> crescidas <i>in vitro</i> sob diferentes níveis de trocas gasosas (TG).	76
Tabela 4. Médias da interação (acessos x vedações) para massa fresca e seca de parte aérea e raiz e médias dos fatores acessos e tratamentos para comprimento de parte aérea e raiz, analisados após a aclimatização, em acessos de <i>Psidium guineense</i> (Y93, Y95 e Y97).....	77

CAPÍTULO III

Tabela 1. Resumo da análise de variância do número de brotações por explante (NB), comprimento médio de brotações (CB), massa fresca (MFB) e seca de brotações	
---	--

(MSB) aos 45 dias de cultivo, em segmentos nodais e apicais de plantas de *Psidium guineense*, cultivados em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de BA e BA+ANA (μM)..... 116

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Resumo da análise de variância do número de brotações e porcentagem de explantes com brotações (%) aos 60 dias de cultivo, em explantes de raiz de quatro acessos de araçá, três da espécie *Psidium guineense* (Y40, Y93 e Y97) e um da espécie *P. schenckianum* (Y01), cultivados em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes tratamentos de indução de organogênese de raiz. ..141

Tabela 2. Médias do número de brotações e porcentagem de explantes com brotações (%) aos 60 dias de cultivo, em explantes de raiz de quatro acessos de araçá (*Psidium* spp.), cultivados em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes tratamentos de indução de organogênese de raiz. 143

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Plantas do acesso Y97 de *Psidium guineense*, crescidas *in vitro*, nos meios de cultura JADS (A e D), MS (B e E) e WPM (C e F), após 110 dias de cultivo. Barras 0,5cm.47

Figura 2. Médias do número de nó para o fator genótipo, de plântulas dos acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e de *P. guajava* (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes meios de cultura. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.47

Figura 3. Índice estomático das faces adaxial (A) e abaxial (B), conteúdo de clorofila *a* (C), clorofila *b* (D), clorofila total (E) e carotenoides (F) das folhas dos acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e de *P. guajava* cv. Paluma (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes meios de cultura (JADS, MS e WPM). Médias seguidas pela mesma letra na interação meios de cultura x acessos de *P. guineense* e cv. Paluma

(GP): letras maiúsculas iguais para os meios de cultura e minúscula para os genótipos, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade.49

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Plantas de *Psidium guineense*, acesso Y93 (A, B, C e D) e de *Psidium guajava*, cv. Paluma (E e F), crescidas *in vitro*, sob diferentes níveis de trocas gasosas SM (A e D), 1M (B e E) e 2M (C e F). SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹]. Barras = 0,5cm.73
- Figura 2.** Índice estomático das faces adaxial (A) e abaxial (B), conteúdo de clorofila *a* (C), clorofila *b* (D) e clorofila total (E) das folhas dos acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e *P. guajava* cv. Paluma (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes níveis de trocas gasosas (SM, 1M e 2M). Médias seguidas pela mesma letra na interação trocas gasosas x acessos de *P. guineense* e cv. Paluma: letras maiúsculas iguais para as vedações e minúsculas para os genótipos, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.....75
- Figura 3.** Cortes transversais da secção mediana (A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, O, P, Q, T, U, V, X e Y) e impressão epidérmica (A, C, J, K, R e S) de folhas de *Psidium guineense* (acesso Y93), crescidas *in vitro* por 110 dias, sob diferentes níveis de trocas gasosas: SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹], sob irradiância de 41 µmol m.⁻² s.⁻¹. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Cu: cutícula; Cr: cristais; Pp: parênquima paliçádico; Sp: parênquima lacunoso; Sc: cavidade secretora; Co: colênquima; Tr: tricomas; Fi: feixes vasculares; Xy: xilema; Ph: floema; St: estômato. Microscopia de luz - Barra = 50 µm e microscopia eletrônica de varredura - Barra = 10µm.....80
- Figura 4.** Estudo histoquímico de secções transversais da porção mediana de folhas de *Psidium guineense* (acesso Y93), crescidas *in vitro* por 110 dias, sob os diferentes

níveis de trocas gasosas e irradiância de 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO_2 (TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Lugol: coloração roxa ou negra, evidenciando amido (3 e 4); Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS): coloração magenta, evidenciando polissacarídeos neutros (7-12); Xylidine Ponceau (XP): coloração avermelhada, evidenciando proteínas (13-18); Sudan Black B: coloração negra, evidenciando lipídios totais (21-24); Vermelho de rutênio: coloração rosa, evidenciando pectinas (25-30). Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Sc: cavidade secretora. Barra = 50 μm 83

Figura 5. Cortes transversais da secção mediana (A, D, E, H, I e L) e impressão epidérmica (B, C, F, G, J e K) de folhas *Psidium guajava*, crescidas *in vitro* por 110 dias, sob diferentes níveis de trocas gasosas: SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO_2 (TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$], sob irradiância de 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Cu: cutícula; Pp: parênquima paliçádico; Sp: parênquima lacunoso; Sc: cavidade secretora; Co: colênquima; Fi: feixes vasculares; Xy: xilema; Ph: floema; St: estômato. Barra = 50 μm 86

Figura 6. Estudo histoquímico de secções transversais da porção mediana de folhas de *P. guajava*, cv. Paluma (GP), crescidas *in vitro* por 110 dias, sob diferentes níveis de trocas gasosas e irradiância de 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO_2 (TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Lugol: coloração roxa ou negra, evidenciando amido (5 e 6); Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS): coloração magenta, evidenciando polissacarídeos neutros (7-12); Sudan Black B: coloração negra, evidenciando lipídios totais (15-18); Vermelho de rutênio: coloração rosa, evidenciando pectinas (19-24); Xylidine Ponceau (XP): coloração avermelhada, evidenciando proteínas (25-30). Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Sc: cavidade secretora. Barra = 50 μm 88

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Porcentagem de enraizamento (A) e Número de raízes adventícias (B) emitidas por explantes de *Psidium guineense*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de AIB..... 114
- Figura 2.** Rizogênese de parte aérea de plantas de *P. guineense* aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS, suplementado com AIB nas concentrações de 0,0 (A); 2,46 (B); 4,92 (C) e 9,84 μM (D). Barras de 0,5cm..... 114
- Figura 3.** Número de brotações (A), Comprimento de brotações (B), Massa fresca (C) e seca (D) de brotações em segmentos caulinares de *Psidium guineense*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS líquido, suplementado com diferentes concentrações de BA e BA+ANA. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. 115
- Figura 4.** Número de brotações (A), Comprimento de brotações (B), Massa fresca de brotações (C) e Massa seca de brotações (D) em segmentos nodais e apicais de *P. guineense*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de BA. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (tipos de explantes) e minúscula (concentrações de fitorreguladores), não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. 118
- Figura 5.** Micropropagação de plantas de *P. guineense* utilizando diferentes explantes: segmentos caulinares em meio de cultura JADS líquido na fase inicial de indução (A) e após 45 dias de indução com 0,0 μM BA (B); na concentração de 2,22 μM BA (C); 4,44 μM BA (D); e em combinação com ANA (2,22 μM BA + 0,054 μM ANA (E) e 4,44 μM BA + 0,054 μM ANA (F); segmentos nodais (G) e apicais (H) a 0,0 μM BA aos 45 dias de indução; organogênese a partir de secções foliares (I) e internodais (J); fase de alongamento (K), enraizamento (L) e aclimatização (M) das plântulas obtidas dos segmentos caulinares, nodais e apicais após 45 dias de aclimatização. Barras = 0,5 cm. 120

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Número médio de brotações adventícias e percentagens de explantes com brotações em explantes radiculares de acessos de araçá da espécie *Psidium guineense* (Y40, Y93 e Y97) e *P. schenckianum* (Y01), aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas pela

mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.
 142

Figura 2. Organogênese *in vitro* de explante de raiz do acesso Y93 de *P. guineense* na fase inicial de indução a 0 de BA (A e B) e início de brotações após vinte dias de cultivo (C), com formação de calos e brotos diretos no tratamento de indução de 2,22 µM BA + 0,054 µM ANA (D, E e F), mostrando a conexão vascular entre o explante e brotação (F); desenvolvimento das brotações após 40 dias de cultivo (G, H e I); brotos oriundos dos explantes de raiz após 90 dias (J); fase de alongamento e enraizamento (K e L) e aclimatização das plantas regeneradas de explantes de raiz sob o meio de indução de 0 BA. Sistema vascular (Vs); Calos (Cl); Compostos fenólicos (Pc) e Domo apical (Ad). Barras de 50 µm (B, C, E, F, H e I); 500 µm (D e G) e 5 mm (A, J, K, L, M e N)..... 145

Figura 3. Histogramas representativos de citometria de fluxo em escala logarítmica de núcleos corados com iodeto de propídeo obtidos a partir de folhas dos acessos de *Psidium guineense*. a) Histograma representativo do padrão externo tetraploide germinado *in vitro* a partir de semente (pico $G_0 \backslash G_1$ canal = 604, $2C = 4x$), b) histograma representativo de plantas regeneradas a partir da organogênese de raiz (pico $G_0 \backslash G_1$ canal = 609, $2C = 4x$) (b). 146

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO I.....	35
Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Psidium guineense</i> Sw. e <i>P. guajava</i> L. sob diferentes meios de cultura	36
RESUMO	36
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Local da realização do experimento e material experimental utilizado	40
2.2. Desinfestação e germinação de sementes.....	40
2.3. Efeito do meio de cultura no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Psidium</i> spp.....	41
2.4. Análises de crescimento das plântulas	42
2.4.1. Índice estomático.....	43
2.4.2. Pigmentos fotossintéticos.....	43
2.4.3. Análise nutricional	43
2.5. Análises estatísticas.....	44
3. RESULTADOS	44
3.1. Efeito do meio de cultura no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Psidium</i> spp.....	44
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO II.....	62
Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Psidium guineense</i> Sw. e <i>P. guajava</i> L. sob diferentes níveis de trocas gasosas com ventilação natural	63
RESUMO	63
ABSTRACT	63
1.INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1. Local da realização do experimento e material experimental utilizado	66
2.2. Desinfestação e germinação de sementes.....	66
2.3. Efeito dos níveis de trocas gasosas no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Psidium</i> spp.	67
2.4. Análises de crescimento das plântulas	67
2.4.1. Índice estomático.....	68
2.4.2. Pigmentos fotossintéticos.....	68
2.5. Aclimatização das plantas	68
2.6. Estudos anatômicos e histoquímicos de folhas de <i>Psidium</i> spp.....	69
2.7. Avaliações e análises estatísticas	70

3. RESULTADOS	70
3.1. Efeito dos níveis de trocas gasosas no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Psidium</i> spp.	70
3.2. Estudos anatômicos e histoquímicos de secções de folhas de <i>Psidium</i> spp. sob diferentes níveis de trocas gasosas	77
3.2.1. Estudos anatômicos de secções de folhas de <i>P. guineense</i>	77
3.2.2. Estudos histoquímicos de secções de folhas de <i>P. guineense</i>	82
3.2.4. Estudos histoquímicos de secções de folhas de <i>P. guajava</i>	86
4. DISCUSSÃO	89
5. CONCLUSÕES	97
6. REFERÊNCIAS	97
CAPÍTULO III	104
Micropropagação de <i>Psidium guineense</i> Sw. utilizando diferentes tipos de explantes de plântulas germinadas <i>in vitro</i>	105
RESUMO	105
ABSTRACT	105
1. INTRODUÇÃO	106
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1. Local da realização do experimento, germinação e desenvolvimento de plântulas ..	108
2.2. Tipo de explante para indução de rizogênese e brotações	109
2.3. Meio de cultura	110
2.4. Experimento 1: Indução de rizogênese	110
2.5. Experimento 2: Multiplicação <i>in vitro</i> utilizando explante caulinar em meio de cultura líquido	110
2.6. Experimento 3: Multiplicação <i>in vitro</i> utilizando explante nodal e apical em meio de cultura semi-sólido	111
2.7. Experimento 4: Indução de organogênese em explantes internodais e secções foliares	111
2.8. Condições de cultivo, avaliações e análises estatísticas	112
2.9. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização	113
3. RESULTADOS	113
3.1. Indução de rizogênese	113
3.2. Multiplicação <i>in vitro</i> de explante caulinar em meio de cultura líquido	114
3.3. Multiplicação <i>in vitro</i> de explante nodal e apical em meio de cultura semi-sólido ..	115
3.4. Indução de organogênese em explantes internodais e secções foliares	118
3.5. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização	118
4. DISCUSSÃO	121
5. CONCLUSÕES	125
6. REFERÊNCIAS	126
CAPÍTULO IV	131
Organogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes radiculares de <i>Psidium schenckianum</i> Kiaersk e <i>P. guineense</i> Sw.	132

RESUMO	132
ABSTRACT	132
1. INTRODUÇÃO.....	133
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	136
2.1. Local da realização do experimento, germinação e desenvolvimento de plântulas.	136
2.2. Indução da organogênese em explantes radiculares <i>in vitro</i>	137
2.3. Estudos anatômicos da organogênese em explantes radiculares <i>in vitro</i> de <i>Psidium</i> spp.	138
2.4. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização	139
2.5. Análises de citometria de fluxo.....	139
3. RESULTADOS	140
3.1. Indução da organogênese em explantes radiculares <i>in vitro</i> de <i>Psidium</i> spp.....	140
3.2. Estudos anatômicos da organogênese em explantes de raiz <i>in vitro</i> de <i>Psidium</i> spp.	144
3.3. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização	144
3.4. Análises de citometria de fluxo.....	146
4. DISCUSSÃO	146
5. CONCLUSÕES	151
6. REFERÊNCIAS.....	151
CONCLUSÕES GERAIS	158

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae, é originário das Américas Tropical e Subtropical (LANDRUM e KAWASAKI, 1997) e apresenta cerca de 92 representantes do gênero no mundo (GOVAERTS et al., 2015). O Brasil é um grande centro de diversidade de *Psidium*, podendo ser encontrado em torno de 60 espécies, das quais 47 são endêmicas (SOBRAL et al., 2015). Alocados neste gênero encontram-se a goiabeira (*Psidium guajava*) e os araçazeiros (*Psidium* spp.).

A goiabeira é a espécie de maior importância econômica dentro do gênero *Psidium* e está amplamente difundida em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (RISTERUCCI et al., 2005; RAI et al., 2009). A Índia é o maior produtor mundial de goiaba, com uma produção de aproximadamente 1.700 mil toneladas, seguido pelo Paquistão (600 mil toneladas), México (317 mil) e Brasil (300 mil toneladas) (FAO, 2010). Os frutos desta espécie apresentam grande aceitação mundial, principalmente pelo seu aroma e sabor, elevado teor nutritivo, sendo ricos em hidratos de carbono, fibras e minerais, vitamina C, licopeno e betacaroteno (AULAR e CASARES, 2011).

Propriedades medicinais também são atribuídas à goiabeira, largamente utilizada na medicina tradicional de vários países (GUTIÉRREZ, 2008), no tratamento de gastroenterite, diarreia e disenteria (VILCHEZ et al., 2014).

No Brasil, devido principalmente às condições edafoclimáticas favoráveis, a goiabeira é cultivada em escala comercial em todas as regiões, porém o destaque fica para as regiões Sudeste (50%) e Nordeste (41,5%), somando juntas mais de 90% da produção nacional (IBGE, 2013). Ainda, segundo a mesma publicação, na região Nordeste, o estado de Pernambuco é o maior produtor (103.697 mil toneladas), seguido do Ceará (13.984 mil toneladas) e Bahia (9.677 mil toneladas), com as maiores produções de Pernambuco e Bahia representada por Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), nos perímetros irrigados no Submédio do Vale do São Francisco. No entanto, nas últimas décadas, essa cultura vem sofrendo vários danos causados pelo nematoide de galha (*Meloidogyne enterolobii*, sin. *M. mayaguensis*), que em associação sinérgica com o fungo *Fusarium solani* Mart. Sacc, causam a doença conhecida como declínio da goiabeira (GOMES et al., 2011; GOMES et al. 2013; ALMEIDA et al., 2013). A cultivar mais plantada no Brasil, a goiabeira Paluma, é também a mais susceptível ao *M. enterolobii* (PEREIRA, 2008). O impacto econômico direto desta doença na última década foi estimado em mais de 112,7 milhões de reais no Brasil (PEREIRA et al.

(2009), reduzindo drasticamente os plantios de goiabeiras, principalmente nas regiões de maior produção, particularmente nos perímetros irrigados de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA).

Nematicidas têm sido utilizados no controle destes fitonematoides, porém, o período de carência é longo e não tem nenhum produto registrado para o controle nesta cultura. Mesmo assim, o controle não tem sido efetivo, devendo-se buscar fontes de resistência na goiabeira ou em seus parentes silvestres, como nos araçazeiros.

No bioma Caatinga ocorrem diferentes espécies de araçás silvestres, principalmente em regiões de maiores altitudes. Santos et al. (2014), constataram a ocorrência das espécies *Psidium schenckianum* Kiarsk., *P. guineense* Swartz. e *P. grandifolium* Mart. em seis municípios do semiárido baiano, com maior frequência das duas primeiras.

O *P. guineense* é uma espécie nativa do Brasil (SANTOS et al., 2014 e SOBRAL et al., 2015), popularmente conhecida como araçá verdadeiro, araçá do campo, goiabinha selvagem, dentre outras denominações. Esta espécie apresenta um grande potencial de uso, seja em seu consumo *in natura* ou após processado pela indústria. Como planta de potencial medicinal tem marcante atividade antimicrobiana (GONZALEZ et al., 2005; FERNANDES et al., 2012), farmacológica e antibacteriana (RODRIGUES et al., 2014), antioxidante (HAMINIUK et al., 2011 e BALISTEIRO et al., 2013), além de possuir grande quantidade de óleos essenciais (SILVA et al., 2003).

No consumo *in natura* ou industrializado, o fruto do araçazeiro pode ser utilizado na forma de sucos, doces, compotas, geleias, sorvetes, apresentando boas características de fruto, como quantidade de vitamina C (197,98 a 227,04 mg/ 100g polpa) (SANTOS et al., 2014), superiores aos encontrados em tangerina-murcote (21,47 mg ácido ascórbico.100 mL⁻¹ de suco) e laranja-natal (84,03 mg ácido ascórbico.100 mL⁻¹ de suco) (COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010), consideradas tradicionalmente como ricas em vitamina C. Outra elevada potencialidade de uso do araçazeiro é como fonte de resistência ao *Meloidogyne enterolobii* (PESSANHA et al., 2011), que vem dizimando os plantios de goiabeira por várias regiões do Brasil, podendo ser utilizado no melhoramento de goiabeiras, seja na transferência interespecífica de genes de resistência ou por meio da técnica de enxertia, como porta enxerto resistente.

A espécie *P. schenckianum*, endêmica do Brasil, ocorre de forma silvestre na região Nordeste (Bahia, Pernambuco e Ceará) (SOBRAL et al., 2015), principalmente no bioma Caatinga, sendo conhecida popularmente como araçá do mato ou araçá mirim. Santos et al. (2014), caracterizaram a diversidade genética de diferentes acessos de araçazeiros e

encontraram acessos com potencial de uso como porta enxerto para goiabeira e boas características de fruto, como acidez titulável (1,01 a 9,62 g/100 mL de suco), sólidos solúveis (10,94 a 13,5 °Brix), vitamina C (132 a 607,2 mg/100 g polpa), dentre outras características, para uso *in natura* ou industrializado. Também foram encontrados acessos resistentes ao *Meloidogyne enterolobii* (dados não publicados), demonstrando as potencialidades desta espécie para usos futuros em programas de melhoramento da espécie.

Fontes de resistência ao *M. enterolobii* tem sido encontradas também em outras espécies de araçá (CARNEIRO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; PESSANHA et al., 2011; CASTRO et al., 2012; MIRANDA et al., 2012; MARTINS et al., 2013; FREITAS et al., 2013; SOUZA et al., 2014). No entanto, o processo de avaliação da reação a nematóides é destrutivo, pois a planta é destruída para se extrair as raízes e, destas, extrair os nematóides (HUSSEY e BARKER, 1973). Dessa forma, se faz necessário desenvolver protocolos de propagação vegetativa das plantas a serem avaliadas em relação a resistência ao nematoide e, desse modo, as plantas imunes ou resistentes possam ser selecionadas.

Outro problema a ser enfrentado são os constantes desmatamentos nas áreas de ocorrência dos araçazeiros, principalmente para formação de pastagens, podendo levar à extinção dos mesmos, sem um estudo mais aprofundado, devendo ser formadas coleções para conservar a variabilidade para estudos futuros.

Neste sentido, foi criado o Banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia (BAG-UNEB), onde são conservados cerca de 103 acessos de araçazeiros, de diferentes espécies na forma de sementes, coletados em alguns municípios do semiárido baiano (SANTOS et al., 2014). Entretanto, a conservação feita a partir de sementes coletadas de plantas nativas, apresentam dois inconvenientes: primeiro, por serem de polinização livre, não representam as mesmas características das plantas mãe, conduzindo a uma germinação lenta, desuniforme e alta heterozigosidade entre as progênies (dados ainda não publicados); e segundo, há o risco de perda da viabilidade das sementes, devido ao tempo e condições de armazenamento, como observado em testes de germinação realizados com alguns acessos de araçá mantidos no BAG-UNEB.

Desse modo, há uma necessidade premente da formação de uma coleção de germoplasma de araçazeiros provenientes do bioma Caatinga por meio de estacas ou micropropágulos *in vitro*, necessários para que se possam fazer estudos futuros.

A propagação vegetativa por estaquia é uma das técnicas mais difundidas, no entanto, para a clonagem de araçá é inviável, visto que esta espécie apresenta dificuldades no

enraizamento (NACHTIGAL et al., 1994). Contudo, para as espécies que apresentam dificuldades pelos métodos de propagação convencional, a propagação *in vitro* é um método viável, proporcionando a multiplicação em massa de plantas geneticamente uniformes e formação de plantas com melhores condições sanitárias (ERIG e SCHUCH, 2005), constituindo-se numa alternativa promissora para clonagem, conservação e resgate de germoplasma de araçazeiros, assegurando a disponibilidade de material vegetal para os métodos convencionais de melhoramento, sem perda de sua viabilidade.

A cultura de tecidos possibilita a rápida multiplicação a partir de um único indivíduo, com alta fidelidade genética, em qualquer época do ano, em tempo e espaço físico reduzido e com maior controle sobre a sanidade do material propagado (ERIG e SCHUCH, 2005; THAKUR e KARNOSY, 2007; GEORGE, 2008; BHOJWANI e DANTU, 2013). Além disso, esta técnica pode acelerar os trabalhos de melhoramento pela multiplicação de clones e pode atuar como base para outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética e a produção de metabólitos secundários (OLIVEIRA et al., 2013).

A goiabeira é uma espécie de fácil propagação vegetativa. No Brasil, praticamente todas as mudas de goiabeira são produzidas por estaquia (PEREIRA e NACHTIGAL, 2009). No entanto, em trabalhos de melhoramento convencional se torna inconveniente devido ao período juvenil longo (JAISWAL e AMIN, 1992), sendo desejável a propagação clonal a partir das técnicas de propagação *in vitro*, obtendo plantas livres de patógenos e mais vigorosas em um menor espaço de tempo (HUSMAM et al., 2012).

A micropropagação das espécies florestais brasileiras tem sido realizada basicamente utilizando-se propágulos provenientes de sementes germinadas *in vitro*, dada a dificuldade em se obter material de plantas adultas, livre de microrganismos e de serem responsivas à propagação em condições controladas (OLIVEIRA et al., 2013). Além da vantagem da obtenção de tecidos menos contaminados, a utilização de material juvenil já estabelecido *in vitro* pode ser vantajosa, pois estes tecidos são mais responsivos à aplicação de fitorreguladores (SOUZA et al., 2011). E, potencialmente, podem originar explantes com elevada capacidade de desenvolvimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Logo, esse tipo de explante pode orientar e auxiliar a elaboração de protocolos para posterior aplicação em tecidos de plantas adultas (SOUZA et al., 2011).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores, como o genótipo, a fonte e as condições fisiológicas do explante, a utilização de combinação de fitorreguladores de crescimento, o meio de cultura utilizado, as condições de cultivo

(LUCIANI et al., 2006; DUTRA et al., 2009), trocas gasosas, vias morfogênicas, dentre outros fatores.

O meio de cultura é composto essencialmente de combinações de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e hidratos de carbono (DAVEY e ANTHONY, 2010), devendo o mesmo promover condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* do tecido vegetal (CORDEIRO et al., 2014). E, o equilíbrio nutricional do meio de cultura e sua interação com o material genético ou explante, representa um dos fatores que mais influenciam no sucesso da propagação *in vitro* (ALMEIDA, 2012).

Existem uma grande variedade de meios de cultura adaptados para diversas espécies, diferindo, sobretudo na constituição e concentração de nutrientes (MANTOVANI; FRANCO, 1998). No entanto, a maioria dos protocolos estabelecidos para a micropropagação utilizam meios de culturas com composição nutricional estabelecida e definida sem considerar as necessidades nutricionais da espécie a ser cultivada, podendo representar um fator limitante às respostas morfogênicas, ocasionando o insucesso do processo para espécies mais exigentes (ALMEIDA, 2012). Dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de espécies florestais lenhosas destacam-se o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

Na propagação *in vitro* convencional, em que as plantas são produzidas em recipientes fechados, com reduzidas trocas gasosas, elevada umidade relativa, elevada concentração de etileno e baixos níveis de CO₂ no *headspace* (espaço livre) do frasco podem resultar em plantas com parte aérea pouco desenvolvida, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, redução nos tecidos com resistência mecânica, estômatos não funcionais, reduzida atividade fotossintética e dificuldades na absorção de água e nutrientes pelos explantes, podendo causar redução nas taxas de crescimento dos mesmos (NGUYEN e KOZAI, 2005; XIAO et al., 2011; SHIN et al., 2014). Além destes, há problemas anatômicos, interferindo diretamente nas taxas fotossintéticas das plantas *in vitro* e em seu processo de aclimatização *ex vitro* (ALVAREZ et al., 2012).

Diferentes métodos têm sido utilizados para solucionar as dificuldades da micropropagação convencional, dentre eles o uso de tampas com membranas permeáveis a gases com ventilação natural, em sistemas fotoautotrófico ou fotomixotrófico, que permitem trocas gasosas mais elevadas, reduzindo a umidade relativa dentro dos recipientes de cultivo e aumentando a transpiração e absorção de água e nutrientes pelas plantas, podendo resultar em maior fotossíntese e consequentemente, numa maior taxa de

crescimento e melhoria no processo de aclimatização *ex vitro* (KITAYA et al., 2005; KOZAI 2010; IVANOVA e STADEN, 2010, XIAO et al., 2011).

Atualmente, várias membranas que permitem maiores trocas gasosas entre o ambiente externo e o *headspace* do recipiente de cultura na propagação *in vitro* estão disponíveis comercialmente (ZOBAYED, 2005), como a membrana MilliSeal[®]. Esta membrana tem sido utilizada com êxito na melhoria das trocas gasosas na propagação *in vitro* de várias espécies como em *Azadirachta indica* (RODRIGUES et al. 2012), *Solanum melongena* (RIBEIRO et al. 2009), *Pfaffia glomerata* (IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012), *Capsicum annuum* (BATISTA, 2012) e *Ruta graveolens* (RIOS, 2014).

A micropropagação *in vitro* pode ser realizada via proliferação de gemas axilares, organogênese adventícia e embriogênese somática (XAVIER et al., 2013). Porém, para espécies florestais tem sido utilizada com mais frequência a partir de gemas axilares pela maior facilidade, e em menor expressão por organogênese. A organogênese corresponde à indução de gemas adventícias diretamente sobre o explante ou calo (direta ou indireta, respectivamente), mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, levando à formação de uma planta completa a partir da atividade meristemática em células maduras diferenciadas (XAVIER et al., 2013).

Diversas partes da planta-matriz podem ser utilizadas como fonte de explantes para a regeneração *in vitro*, como segmentos nodais, ápices caulinares, discos foliares (LUCIANI et al., 2006; CAMPOS et al., 2007), segmentos internodais, caulinares, raiz, dentre outros. No entanto, o sucesso na determinação de protocolos de propagação *in vitro* e o melhor tipo de explante a ser utilizado, depende de vários fatores intrínsecos ao material propagativo e ao processo, como genótipo, posição dos explantes, balanço quantitativo dos reguladores vegetais (COSTA et al., 2006), além de outros fatores.

A morfogênese *in vitro* é altamente dependente da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (GEORGE, 2008), a exemplo de as auxinas e as citocininas. As citocininas são indispensáveis para a indução da proliferação de gemas axilares, seu tipo e concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009), assim como na indução de gemas adventícias. Entre as citocininas, a benziladenina (BA), é a mais utilizada e mais eficiente na regeneração de plantas do gênero *Psidium* (SINGH et al., 2002; SHAH et al., 2008; RAI et al., 2009; USMAN et al., 2012).

Além disso, faz-se necessário o uso da ação combinada de BA com pequenas concentrações de auxinas, o ácido naftalenoacético (ANA), por exemplo, é usado em combinação com BA na micropropagação de *P. guajava* (RAI et al., 2009; LIU e YANG, 2011), *Ocimum canum* (SAHA et al., 2014) e de *Origanum vulgare* (OANA et al., 2008).

Um outro fator importante na micropropagação de espécies florestais lenhosa é a rizogênese, processo de formação de raízes adventícias nas partes aéreas dos propágulos, possibilitando seu transplantio para o ambiente *ex vitro* (SOUZA e PEREIRA, 2007). A aplicação exógena de auxinas no meio de cultura sinaliza as células responsivas, simulando o mecanismo hormonal natural das plantas inteiras (SILVA et al., 2007). Em geral, o tipo e concentração de auxina são as variáveis que mais influenciam o enraizamento, sendo as respostas dependentes do material genético (OLIVEIRA et al., 2013). Dentre as auxinas, o ácido indolbutírico (AIB) tem sido muito utilizado em razão da baixa fitotoxicidade aos explantes, proporcionando resultados positivos ao enraizamento *in vitro*, como reportado em espécies da família Myrtaceae (SINGH et al., 2002; NASCIMENTO et al 2008; SHAH, et al., 2008; Rai et al., 2009).

Protocolos de propagação *in vitro* de *Psidium* tem sido estabelecidos para *P. guajava*, pelos métodos convencionais de cultivo, utilizando meio de cultura MS suplementado com BA na regeneração de brotos, e AIB, no enraizamento das brotações, em recipientes fechados, a partir de explantes de hipocótilo (SINGH et al., 2002), de plântulas (SHAH et al., 2008), de segmentos nodais (RAI et al., 2009; USMAN et al., 2012) e de segmentos apicais (USMAN et al., 2012). Porém, não se sabe se estas condições são as melhores para a micropropagação desta espécie. Para araçazeiro, não há relatos de pesquisas de micropropagação, podendo a determinação de protocolos de micropropagação do mesmo, constituir-se em avanços significativos para o seu estabelecimento, clonagem, conservação de recursos genéticos, e como técnica de apoio a futuros trabalhos de melhoramento genético, como na conservação das plantas imunes ou resistentes ao *M. enterolobii* e na rápida detecção de compatibilidade e/ou incompatibilidade entre o araçá e goiabeira com a enxertia *in vitro*, como tem sido realizado entre o marmeleiro e pereira (TOMAZ et al., 2009), além de outras aplicações.

Dessa forma, esta pesquisa tem como principais objetivos: Determinar o meio de cultura que melhor atendem às necessidades morfogênicas no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* e *P. guajava* cv. Paluma e examinar se há variações nas respostas aos meios de cultura entre estas espécies; Determinar a influência de diferentes níveis de trocas gasosas sob ventilação natural, no crescimento e nas características

morfofisiológicas, anatômicas e histoquímicas de plântulas de *Psidium guineense* Swartz e *P. guajava* L. *in vitro*; Estabelecer um protocolo de micropropagação de *P. guineense*, utilizando diferentes tipos de explantes de plântulas assépticas germinadas *in vitro* e Avaliar a responsividade organogênica de explante de raiz de acessos de araçá das espécies *P. guineense* e *P. schenckianum* do Banco Ativo de Germoplasma da UNEB.

A tese foi organizada em quatro capítulos, redigidos na forma de artigos científicos, descritos abaixo, que serão futuramente submetidos.

Capítulo I - Crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* Sw. e *P. guajava* L. sob diferentes meios de cultura

Capítulo II - Crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* Sw. e *P. guajava* L. sob diferentes níveis de trocas gasosas com ventilação natural

Capítulo III - Micropropagação de *Psidium guineense* Sw. utilizando diferentes tipos de explantes de plântulas germinadas *in vitro*

Capítulo IV - Organogênese *in vitro* a partir de explantes radiculares de *Psidium schenckianum* Kiaersk e *P. guineense* Sw.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.; SOUZA, R.M.; GOMES, V.M.; FERREIRA, T.F.; MUSSI-DIAS, V. Field assessment of meat and bone meal for management of orchards affected by guava decline. **Nematropica**, v.43, n. 2, p.247-253, 2013.

ALMEIDA, E.J.; SANTOS, J.M.; MARTINS, A.B.G. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.421-423, 2009.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.93-101, 2012.

AULAR, J.; CASARES, M. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Volume Especial, p.187-198, 2011.

BALISTEIRO, D.M.; ALEZANDRO, M.R.; GENOVESE, M.I. Characterization and effect of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) juice on post prandial glycemia in healthy subjects. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p. 66–74, 2013.

BATISTA, D.S. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese in vitro de pimenteira ornamental** (*Capsicum annuum* L.). 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. **Plant tissue culture: an introductory text**. Springer, 2013. p. 245-274.

CAMPOS, R.A.S.; AÑEZ, L.M.M.; DOMBROSKI, J.L.D.; DIGNART, S.L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Mull. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 30- 36. 2007.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CIROTTA, P.A.; QUINTANILHA, A.P.; SILVA, D.B.; CARNEIRO, R.G. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. Accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.281-284, 2007.

CORDEIRO, G.M.; BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura , BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 103, p. 337-344, 2014.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p.107-116, 1995.

COSTA M.A.P.C, SOUZA A.S, ALMEIDA W.A.B. Morfogênese in vitro. In: SOUZA, A.S, JUNGHANS T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.115-130. 2006.

CASTRO, J.M.C., SANTOS, C.A.F., FLORI, J.E.; SIQUEIRA, S.V.C., NOVAES, P. A.R.; LIMA, R.G. Reaction of *Psidium* accessions to the *Meloidogyne enterolobii* root-knot a nematode. **Acta Horticulturae**, v.959, p.51-57, 2012.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.15-19,

2010.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**: essential methods. Singapore: Markono Print Media Pte., 2010. 341 p.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.488-490, 2005.

FAO – CCP. Food and Agriculture Organization of the United Nations – Committee on Comodity Problems, 2010. **Tropical Fruits Compendium**. Disponível em: < http://www.fao.org/unfao/bodies/ccp/ccp66/index_en.htm >. Acesso em 15/07/2015.

FERNANDES, T.G.; MESQUITA, A.R.C.; RANDAU, K.P.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-7, 2012.

FREITAS, V.M.; CORREA, V.R.; MOTTA, F.C.; SOUSA, M.G.; GOMES, A.C.M.M.; CARNEIRO, M.D.G.; SILVA, D.B.; MATTOS, J.K.; NICOLE, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. Resistant accessions of wild *Psidium* spp. to *Meloidogyne enterolobii* and histological characterization of resistance. **Plant Pathology**, v.63, n. 4, p.738–746, 2013.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht : Springer, 2008. V.1, p.1-28.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M.; MUSSI-DIAS, V.; SILVEIRA, S.F.; DOLINSKI, C. Guava decline: A complex disease involving *Meloidoyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.45-50, 2011.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M.; SILVEIRA, S.F.; ALMEIDA, A.M. Guava decline: effect of root exudates from *Meloidogyne enterolobii*-parasitized plants on *Fusarium solani* *in vitro* and on growth and development of guava seedlings under controlled conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v.137, p.393-401, 2013.

GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZÁLEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Estudio fitoquímico e actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, v.1, n.10, p.3-4, 2005.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON, P.G.; LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2015. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/>> Acesso em: 10/02/2015.

GRATTAPAGLIA D, MACHADO M.A. Micropropagação. In: TORRES A.C, CALDAS L.S, BUSO J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. v.1, p.183-242, 1998.

GUTIÉRREZ I.E.M.; NEPOMUCENO C.F.; LEDO C.A.S.; SANTANA J.R.F. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41, n.2, p.260-265, 2011.

HAMINIUK, C.W.I.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; GUEDES, A.R.; STAFUSSA, A.P.; BONA, E.; CARPES, S.T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.7, p.1529–1537, 2011.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p. 1025-1028. 1973.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, n.2, p.227-238, 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal, 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default.shtm>. Acesso em: 15/07/2015.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, n.2, p.143-150, 2010.

JAISWAL, V.S.; AMIN, M.N. Guava and Jack fruit. In: Hammerschlag FA, Litz RE, (Eds.): **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. WALLINGFORD, U.K: CAB International. p. 421-432, 1992.

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 83, n.3, p. 251–257, 2005.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, n.4, p.188-204, 2010.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n.4, p.508-536, 1997.

LIU, X.; YANG, G. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. **International Journal of Plant Biology**, v.2, n.1, p.7–10, 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LUCIANI, G.F.; MARY, A.K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and**

Organ Culture, v.87, p.39-143, 2006.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998. 123p.

MARTINS, L.S.; MUSSER, R.S.; SOUZA, A.G.; RESENDE, L.R.; MALUF, W.R. Parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* em espécies de Myrtaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.2, p.477-484, 2013.

MIRANDA, G.B.; SOUZA, R.M.; GOMES, V.M.; FERREIRA, T.F.; ALMEIDA, A.M. Avaliação de acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterolobii*. **Bragantia**, v.71, n.1, p.52-58, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-493, 1962.

NACHTIGAL, J.C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R.A.; FACHINELLO, J.C.; MAZZINI, A.R.A. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*P. cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, p.229-235, 1994.

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

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005. p.123-146.

OANA, C.T.; MARCELA, L.; MARIA, P. Considerations regarding the effects of growth regulators over the “*in vitro*” morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. **Journal of Plant Development**, v.15, p.133-138, 2008.

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

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Melhoramento genético da goiabeira. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A. de; AMORIM, D. A. de. (Ed.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jaboticabal: UNESP-FCAV, v. 2, p. 371-398. 2009.

PEREIRA, F.O.M.; SOUZA, R.M.; SOUZA, P.M.; DOLINSKI, C.; SANTOS, G.K. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.176-181, 2009.

PEREIRA, F.M. Goiaba: Antecedentes, progresso e perspectivas. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 375-382, 2008.

PESSANHA, P.G.O.; VIANA, A.P.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SOUZA, R.M.; TEXEIRA,

M.C.; PEREIRA, M.G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.129-136, 2011.

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

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.45, n.4, p.421-428, 2009.

RIOS, A.M.R. **Cultivo in vitro de *Ruta graveolens* (Rutaceae): Efeito de trocas gasosas, de irradiância e de fitorreguladores na morfoanatomia e no metabolismo secundário**. 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

RISTERUCCI, A.M.; DUVAL, M.F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 4, p. 745-748, 2005.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA, P.R.B.; MENDES, C.S.O.; REIS JUNIOR, R.; VALERIO, H.M.; BRANDI, I.V.; OLIVEIRA, D.A. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.8, n.35, p.1095–1100, 2014.

RODRIGUES, M.; COSTA, T.H.F.; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, v.48, n.1, p.67-72, 2012.

SAHA, S.; ROY, S.; SENGUPTA, C.; GHOSH, P. Micropropagation and analysis of genetic stability in regenerated plantlets of *Ocimum canum* Sims. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 174-183, 2014.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, n.3, p.413-422, 2012.

SANTOS, M.A.C.; QUEIROZ, M.A.; SANTOS, A.S.; SANTOS, L.C.; CARNEIRO, P.C.S. Diversidade genética entre acessos de araçá de diferentes municípios do semiárido baiano. **Revista Caatinga**, v.27, n.2, p.48–57, 2014.

SHAH, S.T.; ZAMIR, R.; AHMAD, J.; ALI, H.; LUTFULLAH, G. *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.1195-1200, 2008.

SHIN, K.; PARK, S.; PAEK, K. Physiological and biochemical changes during

acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014.

SILVA, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2007.

SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, n.3, p.240–243, 2003.

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R.; SHARMA, H.C.; SINGH, S.P. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.213-221, 2002.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae: lista de espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>> Acesso em: 10 fev. 2015.

SOUZA, A.G.; RESENDE, L.V.; LIMA, I.P.; SANTOS, R.M.; CHALFUN, N. N. J. Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v.44, n.5, p.822-829, 2014.

SOUZA, L.S.; FIOR, C.S.; SOUZA, P.V.D.; SCHWARZ, S.F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuazeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.BERG) D. LEGRAND. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.

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

THAKUR, R.C.; KARNOSKY, D.F. Micropropagation and germoplasma conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia*) Jacq. 'A/Ross Central Park') trees. **Plant Cell Reports**, v.26, N.8, p.1171-1177, 2007.

TOMAZ, Z. F. P.; RODRIGUES, A. C. VERÍSSIMO, V.; MARAFON, A. C.; HERTER, F. G.; RUFATO, A. R. Compatibilidade de enxertia de cultivares de marmeleiros com pereiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1211-1217, 2009.

USMAN, M.; BUTT, M.; FATIMA, B. Enhanced *in vitro* multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.44, p.10182–10187, 2012.

VILCHEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ALVAREZ, C.; ALBORNOZ, A.; ALBANY, N.; MOLINA, M.; GARCÍA-ÁGUILA, L. Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* *Psidium guajava* L. **Biociencia Vegetal**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2014.

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

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.2, p.149-158, 2011.

ZOBAYED, S. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Springer, Netherlands, pp 147–186, 2005.

CAPÍTULO I



Crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* Sw. e *P. guajava* L. sob diferentes meios de cultura

Crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* Sw. e *P. guajava* L. sob diferentes meios de cultura

RESUMO- O presente estudo teve por objetivo determinar o meio de cultura mais adequado às necessidades morfogênicas no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* (araçá) e *P. guajava* cultivar Paluma (cv. GP). Plântulas de três acessos de araçá e da cv. GP, previamente germinadas *in vitro*, foram inoculadas nos meios de cultura JADS, MS e WPM. Após 110 dias de cultivo foram realizadas as seguintes análises de crescimento: número de folhas, número de nós, área foliar, comprimento de parte aérea e raiz, massa fresca e seca de parte aérea e raiz, índice estomático (IE) nas faces abaxial (AB) e adaxial (AD) das folhas, pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides) e análise nutricional na parte aérea de plântulas (PAP) de araçá. O meio de cultura JADS foi o que promoveu o maior crescimento das plântulas dos acessos de araçá e da cv. GP, apresentando as melhores médias em todas as variáveis analisadas, porém, a depender do genótipo e da variável, não houve diferenças entre os meios de cultura. Maiores IE foram observados na face AB, em meio de cultura JADS para todos os genótipos estudados, exceto para um acesso de araçá que obteve maiores médias em meio de cultura MS. O acúmulo de nutrientes na PAP de araçá não coincidiu com a constituição de cada meio de cultura para a maioria dos nutrientes. O crescimento dos genótipos estudados foi influenciado pela composição nutricional do meio de cultura, sendo indicado o meio de cultura JADS na propagação *in vitro* destas espécies.

Palavras-chave: Myrtaceae, Propagação *in vitro*, Pigmentos fotossintéticos, Índice estomático, Análise nutricional.

***In vitro* growth of seedlings *Psidium guineense* Sw. and *P. guajava* L. under different culture media**

ABSTRACT- This study aimed to determine the most appropriate culture medium to morphogenic needs in the *in vitro* growth of *Psidium guineense* seedlings (strawberry guava) and *P. guajava* Paluma cultivar (cv. GP). Seedlings of three accessions of *P. guineense* and cv. GP, previously germinated *in vitro*, were inoculated in the JADS, MS and WPM culture media. After 110 days of cultured, were realized the following growth analysis: number of leaves, number of nodes, leaf area, shoot length and root, fresh and dry shoot and root matter, stomatal index (SI) in the abaxial and adaxial faces of leaves, photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b*, total, and carotenoids) and nutritional analysis in the shoots seedling (ASS) of strawberry guava. The JADS's culture medium promoted the highest seedling growth of strawberry guava accesses and cv. GP, with the best averages in all variables, however, depending on the genotype and variable, there were no differences between the culture media. The stomatal index largest were observed in the abaxial face, in the JADS's culture medium for all genotypes studied, except for one strawberry guava accession, that had higher averages in MS medium. The accumulation of nutrients in ASS of strawberry guava did not coincide with the constitution of each culture medium for most nutrients. The growth of genotypes analyzed was influenced by the composition of the culture medium, being indicated JADS's culture medium for *in vitro* propagation of this species.

Keywords: Myrtaceae, *In vitro* propagation, Photosynthetic pigments, Stomatal índice, Nutritional analysis.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae, é originário das Américas Tropical e Subtropical (LANDRUM e KAWASAKI, 1997) e apresenta cerca de 92 representantes do gênero no mundo (GOVAERTS et al., 2015). O Brasil é um grande centro de diversidade de *Psidium*, podendo ser encontrado em torno de 60 espécies, das quais 47 são endêmicas (SOBRAL et al., 2015). Alocados neste gênero encontram-se a goiaba (*Psidium guajava*) e os araçás (*Psidium* spp.).

A goiabeira é a espécie de maior importância econômica dentro do gênero *Psidium* e está amplamente difundida em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (RISTERUCCI et al., 2005; RAI et al., 2009). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de goiaba (FAO, 2010). E, devido principalmente, às suas condições edafoclimáticas favoráveis, esta espécie é cultivada em escala comercial em todas as regiões brasileiras, com destaque para as regiões Sudeste (50%) e Nordeste (41.5%), somando juntas mais de 90% da produção nacional (IBGE, 2013). Pernambuco responde por 71,66% e a Bahia por 6,7% (terceiro maior produtor) da produção de goiaba do Nordeste. Os perímetros irrigados no Submédio do Vale do São Francisco de Petrolina-PE e de Juazeiro-BA, respectivamente, respondem pelas maiores produções dessa cultura.

A cultivar de goiaba Paluma é a mais produzida ao nível nacional, porém apresenta o inconveniente de ser a mais susceptível ao nematoide de galha (*Meloidogyne enterolobii*, sin. *M. mayaguensis*) (PEREIRA, 2008), que em associação sinérgica com o fungo *Fusarium solani* Mart. Sacc, causam a doença conhecida como declínio da goiabeira (GOMES et al., 2011; GOMES et al. 2013; ALMEIDA et al., 2013), que vem dizimando os pomares de goiabeira por todo o Brasil. De acordo com Pereira et al. (2009), o impacto econômico direto desta doença na última década foi estimado em mais de 112,7 milhões de reais no Brasil, reduzindo drasticamente os plantios de goiabeiras, principalmente nas regiões de maior produção.

Tentativas de controle destes fitonematoides têm sido realizadas com nematicidas, porém, o período de carência é longo e não tem nenhum produto registrado para o controle nesta cultura. Mesmo assim, o controle não tem sido efetivo, devendo-se buscar fontes de resistência na goiabeira ou em seus parentes silvestres como nos araçazeiros.

Os araçazeiros estão amplamente distribuídos em todos os biomas brasileiros, com algumas espécies nativas (FRANZON et al., 2009; SANTOS et al., 2014; SOBRAL et al.,

2015), como é o caso da espécie *Psidium guineense* Swartz, que juntamente com outras espécies de araçá, tem sido observada em estado silvestre no Bioma Caatinga (SANTOS et al., 2014). Esta espécie apresenta potencial de uso como planta medicinal (SILVA et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005; HAMINIUK et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; BALISTEIRO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014), no consumo *in natura* ou industrializado (SANTOS et al., 2014) e tem sido encontrada fontes de resistência ao *M. enterolobii* (PESSANHA et al., 2011), podendo ser utilizado no melhoramento de goiabeiras, na transferência interespecífica de genes de resistência ou por meio da técnica de enxertia como porta-enxerto resistente. Contudo, no processo de avaliação da reação ao *M. enterolobii* a planta é destruída para se extrair as raízes e destas, extrair os nematoides (HUSSEY e BARKER, 1973), devendo-se desenvolver protocolos de propagação vegetativa das plantas a serem avaliadas em relação à resistência ao nematoide e, desse modo, as plantas imunes ou resistentes possam ser mantidas em avaliações futuras.

Outro problema que surge são os constantes desmatamentos nas áreas onde ocorrem os araçazeiros, principalmente para formação de pastagens, podendo levar à extinção dos mesmos, sem um estudo mais aprofundado, devendo ser formadas coleções para conservar a variabilidade para estudos futuros.

No Banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia (BAG-UNEB) estão sendo conservados cerca de 103 acessos de araçá de diferentes espécies na forma de sementes, coletados em alguns municípios do semiárido baiano (SANTOS et al., 2014). Entretanto, estas sementes podem perder a viabilidade, devido ao tempo e condições de armazenamento, como observado em testes de germinação realizados com alguns acessos de araçá mantidos no BAG-UNEB, obtendo germinação lenta, desuniforme e alta heterozigosidade entre as progênes (dados ainda não publicados), devendo-se buscar novas alternativas de propagação e conservação dos araçazeiros.

A propagação vegetativa por estaquia é uma das técnicas mais difundidas, no entanto, para a clonagem de araçá é inviável, visto que esta espécie apresenta dificuldades no enraizamento (NACHTIGAL et al., 1994). Contudo, para as espécies que apresentam dificuldades pelos métodos de propagação convencional, a propagação *in vitro* é um método viável, proporcionando a multiplicação em massa de plantas geneticamente uniformes e formação de plantas com melhores condições sanitárias (ERIG e SCHUCH, 2005), constituindo-se numa alternativa promissora para clonagem, conservação e resgate de

germoplasma de araçá, assegurando a disponibilidade de material vegetal para os métodos convencionais de melhoramento, sem perda de sua viabilidade.

A goiabeira, embora seja de fácil propagação vegetativa, em trabalhos de melhoramento convencional se torna inconveniente devido ao período juvenil longo (JAISWAL e AMIN, 1992), sendo desejável a propagação clonal a partir das técnicas de cultura de tecidos, obtendo plantas livres de patógenos e mais vigorosas em um menor espaço de tempo (HUSMAM et al 2012).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores, como o genótipo, a fonte e as condições fisiológicas do explante, a utilização de combinação de fitorreguladores de crescimento, o meio de cultura utilizado, as condições de cultivo (LUCIANI et al., 2006; DUTRA et al., 2009), a qualidade e intensidade de luz, trocas gasosas, vias morfogênicas, dentre outros fatores.

O meio de cultura é composto essencialmente de combinações de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e hidratos de carbono (DAVEY e ANTHONY, 2010), devendo o mesmo promover condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* do tecido vegetal (CORDEIRO et al., 2014). Nesse caso, o equilíbrio nutricional do meio de cultura e sua interação com o material genético ou explante, representa um dos fatores que mais influenciam no sucesso da propagação *in vitro* (ALMEIDA, 2012).

Existe uma grande variedade de meios de cultura adaptados para diversas espécies, diferindo, sobretudo na constituição e concentração de nutrientes (MANTOVANI; FRANCO, 1998). No entanto, a maioria dos protocolos estabelecidos para a micropropagação utiliza meios de culturas com composição nutricional estabelecida e definida, sem considerar as necessidades nutricionais da espécie a ser cultivada, podendo representar um fator limitante às respostas morfogênicas, ocasionando o insucesso do processo para espécies mais exigentes (ALMEIDA, 2012). Dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de espécies florestais lenhosas destacam-se o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

Protocolos de propagação *in vitro* de goiabeira têm sido estabelecidos a partir do meio de cultura MS (SINGH et al., 2002; SHAH et al., 2008; RAI et al., 2009; LIU e YANG, 2011; USMAN et al., 2012). Porém, não se sabe se este meio é o que melhor responde nos processos morfogênicos desta espécie. Em outras espécies da família Myrtaceae, como em eucaliptos, tem sido observado trabalhos com sucesso nos meios de cultura MS (BORGES et al., 2011; OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2014), WPM (GLOCKE et al., 2006; PINTO et al.

2008; DIBAX et al. 2010; BRONDANI et al 2012) e JADS (CORREIA et al., 1995; ANDRADE et al., 2006; BRAVO et al., 2008; ALMEIDA, 2012; CORDEIRO et al., 2014). Para o araçá, não foram desenvolvidos trabalhos de micropropagação *in vitro*. Assim, a identificação de um meio de cultura que proporcione o desenvolvimento da micropropagação de araçá pode constituir-se num avanço significativo para o estabelecimento e posterior clonagem, conservação de recursos genéticos, e como técnica de apoio a futuros trabalhos de melhoramento genético, como na conservação das plantas imunes ou resistentes ao *M. enterolobii* e na rápida detecção de compatibilidade e/ou incompatibilidade entre o araçá e goiabeira com a enxertia *in vitro*, como tem sido realizado entre o marmeleiro e pereira (TOMAZ et al., 2009), além de outras aplicações.

Diante da importância e da necessidade de conservação e clonagem de araçá, este trabalho tem como objetivo determinar o meio de cultura que melhor atendem às necessidades morfogênicas no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* e *P. guajava* cv. Paluma e examinar se há variações nas respostas aos meios de cultura entre estas espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da realização do experimento e material experimental utilizado

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a instalação dos experimentos, utilizaram-se sementes de três acessos de araçá da espécie *Psidium guineense* Swartz, coletados em 2010 nos municípios de Senhor do Bonfim (Y93) e Jacobina (Y95 e Y97), no estado da Bahia, os quais encontram-se armazenados a 10 °C e 40 % de umidade relativa no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UNEB, Juazeiro-BA. Também foram utilizadas sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.), cultivar Paluma.

2.2. Desinfestação e germinação de sementes

Em câmara de fluxo laminar, as sementes de cada acesso de araçá do BAG e as sementes de goiaba foram desinfestadas em etanol 70% por um minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) a 1,25% de cloro ativo (Super Globo[®],

Rio de Janeiro, Brasil) por 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, 200 sementes de cada acesso de araçá e de goiabeira foram transferidas para frascos de 250 mL de capacidade, com tampas rígidas (dez sementes por frasco), previamente autoclavados, contendo dois discos de papel Germitest[®] reduzidos ao tamanho do diâmetro do fundo do frasco, umedecidos com 5 mL de água destilada. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter)] e fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), até a completa germinação (60 dias).

2.3. Efeito do meio de cultura no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium* spp.

Plântulas previamente germinadas sob papel Germitest[®] (item 2.2) foram inoculadas em frascos com capacidade de 350 mL, contendo 60 mL dos meios de cultura JADS (CORREIA, et al., 1995), MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) (Tabela 1), os quais foram gelificados com 6 g L⁻¹ de ágar (Merck[®], Alemanha). O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$ antes da adição do ágar e em seguida autoclavados a 121 °C, 1,1 Pa por 20 min.

Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm cada) cobertos com membranas de 0,45 μm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent)(taxa de troca de CO₂: $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$), vedados com filme plástico transparente de cloreto de polivinil (PVC) (Goodyear, São Paulo, Brazil) e mantidos em sala de crescimento por 110 dias nas mesmas condições citadas acima para germinação (item 2.2).

Tabela 1. Constituição dos meios de cultura JADS, MS e WPM utilizados no crescimento de acessos de *Psidium guineense* e de *P. guajava*.

Componente	-----g L ⁻¹ -----	----- mg L ⁻¹ -----		
Macronutrientes	Peso molecular	JADS	MS	WPM
NH ₄ NO ₃	80,04	324,00	1650,00	400,00
KNO ₃	101,11	809,00	1900,00	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	-	440,00	96,00
Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	236,15	1.181,00	-	556,00
KH ₂ PO ₄	136,09	408,00	170,00	170,00
K ₂ SO ₄	174,26	-	-	990,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	739,50	370,00	370,00
Micronutrientes	Peso molecular	JADS	MS	WPM
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,90	16,90	22,3
H ₃ BO ₃	61,83	3,10	6,20	6,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	4,32	8,60	8,60
NaMoO ₄ .2H ₂ O	372,24	0,15	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	1,25	0,025	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	237,93	0,25	0,025	-
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372,24	74,5	37,3	37,3
KI	165,99	-	0,83	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	55,6	27,8	27,8
Vitaminas	Peso molecular	JADS	MS	WPM
Tiamina HCl	337,3	0,50	0,10	0,10
Piridoxina HCl	205,6	0,50	0,50	0,50
Ácido nicotínico	123,11	0,50	0,50	0,50
Glicina	75,07	2,00	2,00	2,00
L- Arginina	174,19	7,00	-	-
L- Glutamina	146,13	146,00	-	-
L- Cistina	240,30	2,50	-	-
Pantotenato de Ca ²⁺	476,54	2,50	-	-
Fonte de carbono	Peso molecular	JADS	MS	WPM
Mio-inositol	180,16	100,00	100,00	100,00
Sacarose	342,3	30.000,00	30.000,00	30.000,00
Antioxidante	Peso molecular	JADS	MS	WPM
Polivinilpirrolidona (PVP)	111,143	800,00	-	-

2.4. Análises de crescimento das plântulas

Após 110 dias de cultivo, foram avaliados número de folhas (NF), número de nós (NN), área foliar total da planta (AF, em cm²), obtida com o auxílio do medidor de área foliar “Area Meter” (modelo Li-CorBiosciences, Inc Lincoln, Nebraska), comprimento de parte aérea (CPA, em cm), comprimento de raiz (CR, em cm), índice estomático (%), pigmentos fotossintéticos por área foliar (µg cm⁻²) e massa fresca e seca de parte aérea (MFPA e MSPA)

e raiz (MFR e MSR) (g), sendo as massas secas obtidas em estufa com ventilação forçada (ACB Larbor) a 60°C, por 72 horas.

2.4.1. Índice estomático

Para determinação do índice estomático (IE), foi realizada a impressão epidérmica das faces abaxial (AB) e adaxial (AD) do terceiro par de folhas de três plantas diferentes, seguindo a técnica de Segatto et al. (2004). Posteriormente, foram capturadas as imagens, selecionando três campos por folha de forma aleatória. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio Olympus Optical (modelo AX70TRF, Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital (Spot Insight Color 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) e, em seguida, as imagens foram analisadas no software Anati Quanti (AGUIAR et al. 2007) para o cálculo IE, utilizando a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{\text{Nº de estômatos}}{\text{Nº estômatos} + \text{Nº células epidérmicas}} \times 100$$

2.4.2. Pigmentos fotossintéticos

Na quantificação dos pigmentos fotossintéticos, três discos foliares (7 mm cada) foram excisados do segundo par de folhas (a partir do ápice) totalmente expandida, em seguida incubados em tubos contendo 3,0 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO, VETEC) saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃) e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 48 horas (SANTOS et al., 2008). A absorbância das amostras foi determinada nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm, utilizando um espectrofotômetro GenesysTM Scanning 10 UV/Visível (ThermoScientific, EUA). A concentração das clorofilas *a* (Cla), *b* (Clb), clorofila total (Cl_t) e carotenoides (Ct) foi calculada de acordo com a metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.4.3. Análise nutricional

Para as análises químicas do teor nutricional, as massas secas de parte aérea das plantas de *P. guineense* crescidas sob os meios de cultura JADS, WPM e MS, após secagem em estufa de circulação de ar a 60°C, por 72 horas e mensuração das suas respectivas massas,

foram pulverizadas em moinho analítico (QUIMIS) e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Plantas, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. As análises foram realizadas seguindo a metodologia desenvolvida pela Embrapa (2009).

2.5. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x4 (meios de cultura x genótipos). Foram utilizadas cinco repetições, três plântulas por frasco, sendo cada repetição representada por um frasco. Para as análises de pigmentos fotossintéticos e índice estomático, foram utilizadas três repetições, uma planta por repetição. Em relação às análises nutricionais, devido à baixa produção de biomassa *in vitro*, foi preparada uma amostra composta dos acessos de *P. guineense* e realizada as análises, utilizando três repetições para cada meio de cultura.

Os dados foram submetidos às análises de variância e quando houve significância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do meio de cultura no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium* spp.

As análises de variâncias indicaram efeito significativo da interação para a maioria das variáveis de crescimento, exceto para número de nó (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância das variáveis de crescimento, índice estomático e pigmentos fotossintéticos, analisadas em acessos de *P. guineense* e em *P. guajava* crescidas *in vitro* sob diferentes meios de cultura (MC).

Fonte de variação	Quadrados médios								
	Análises de crescimento								
	N.N	NF	AF	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Genótipos (G)	17,78**	13,06*	158,43**	33,49**	135,0**	0,78**	1,18**	0,02**	0,01**
MC	11,28**	107,0**	1875,6**	110,0**	325,8**	0,47**	0,45**	0,05**	0,01**
G x MC	1,06 ^{ns}	10,29*	139,16**	9,40**	30,03**	0,09**	0,16**	0,01**	0,00**
Resíduo	-	3,74	17,41	1,13	9,32	0,015	0,028	0,0022	0,0004
Média	5.97	11,78	15,69	6,2	9,52	0,461	0,36	0,11	4,46
CV (%)	21.19	17,46	26,6	17,19	32,07	26,42	46,25	43,6	43,03

Fonte de variação	Estômatos			Pigmentos fotossintético			
	IEAD	IEAB	Cl _a	Cl _b	Cl _t	C _t	
Genótipos (G)	72,68**	80,96**	77,82**	400,15**	820,11**	314,53**	
MC	3,23 ^{ns}	4,09 ^{ns}	2108,15**	578,61**	4864,33**	79,49**	
G x MC	4,44*	16,60*	79,98**	18,34*	161,39**	13,26**	
Resíduo	1,43	4,55	14,22	-	38,74	3,52	
Média	2,29	22,1	40,27	21	61,27	14,67	
CV (%)	52,19	9,66	9,36	13,12	10,16	12,79	

^{ns}Não significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro, pelo teste F. * e ** Significativo ao nível de 5 e 1 % de probabilidade de erro respectivamente, pelo teste F. N.NÓ - Número de nó; NF - Número de folhas; AF - Área foliar; CPA - Comprimento parte aérea; CR - Comprimento raiz; MFPA - Massa fresca parte aérea; MFR - Massa fresca raiz; MSPA - Massa seca parte aérea; MSR - Massa seca raiz; IEAD - Índice estomático face adaxial; IEAB - Índice estomático face abaxial; Cl_a - Clorofila a; Cl_b - Clorofila b; Cl_t - Clorofila total e Ct - Carotenoides.

Os meios de cultura influenciaram no crescimento *in vitro* de plântulas de *P. guineense* e *P. guajava* (Tabela 3, Figura 1). Dentre estes, o meio de cultura JADS foi o que promoveu o maior crescimento das plântulas dos acessos de araçá (Figura 1A e 1D) e da cv. GP, apresentando as melhores médias em todas as variáveis de crescimento analisadas, principalmente para área foliar e comprimento de parte aérea, que todos os genótipos avaliados obtiveram as melhores médias neste meio de cultura (Tabela 3). Porém, para as demais variáveis, a depender do genótipo e da variável analisada, não houve diferenças estatísticas entre os três meios de cultura, JADS e WPM e/ou JADS e MS (Tabela 3).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os três meios de cultura para número de folhas e massa fresca de raiz para o acesso Y95 e para comprimento de raiz e massa seca de raiz para cv. GP (Tabela 3). Os meios de cultura JADS e WPM foram iguais estatisticamente para número de folhas para o acesso Y93, massa fresca de parte aérea para os acessos Y95 e Y97, massa fresca e seca de raiz para o acesso Y97 e massa seca de parte aérea para o acesso Y97 e a cv. GP (Tabela 3). Já os meios de cultura JADS e MS foram iguais estatisticamente apenas para comprimento de raiz para o acesso Y97 e para massa fresca de

raiz para a cv. GP (Tabela 3). Mesmo assim, as plantas crescidas sob os meios de culturas MS (Figura 1B e 1E) e WPM (Figura 1C e 1F) apresentaram clorose, necrose nas folhas e crescimento reduzido, quando comparado as plantas crescidas sob o meio de cultura JADS (Tabela 3, Figura 1A e 1D).

O acesso de aração Y97 foi o genótipo que apresentou as maiores médias para todas as variáveis de crescimento analisadas no meio de cultura JADS, exceto para massa fresca de raiz, que a maior média foi obtida pela cv. GP (Tabela 2). Entretanto, o acesso Y97, apresentou médias iguais estatisticamente: a cv. GP para número de folhas, comprimento de parte aérea e massa fresca de parte aérea, e ao acesso Y93 para área foliar, comprimento de parte aérea e raiz e massa seca de parte aérea (Tabela 3).

Tabela 1. Médias das variáveis de crescimento analisadas em acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e em *P. guajava* (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes meios de cultura.

Genótipos/ meios de cultura	Número de folhas			Área foliar (cm ²)			Comprimento Parte aérea (cm)		
	JADS	MS	WPM	JADS	MS	WPM	JADS	MS	WPM
Y93	12,50 Ab	10,0 Ba	12,3 Aa	30,6 Aa	14,4 Ba	12,4 Ba	9,80 Aa	6,36 Ba	6,92 Ba
Y95	11,00 Ab	7,80 Aa	10,4 Aa	21,6 Ab	3,5 Cb	9,1 Ba	5,66 Ab	2,65 Cb	4,13 Bb
Y97	15,73 Aa	7,53 Ca	10,3 Ba	33,3 Aa	3,5 Cb	8,9 Ba	11,0 Aa	3,36 Cb	5,73 Ba
GP	14,20 Aa	9,60 Ba	11,6 Ba	21,8 Ab	16,2 Ba	12,7 Ba	9,06 Aa	5,75 Ba	3,98 Cb

Genótipos/ meios de cultura	Comprimento raiz (cm)			Massa fresca parte aérea (g)			Massa fresca raiz (g)		
	JADS	MS	WPM	JADS	MS	WPM	JADS	MS	WPM
Y93	18,9 Aa	12,9 Ba	5,93 Ca	0,57 Ab	0,35 Bb	0,28 Bb	0,34 Ac	0,16 Bb	0,11 Bb
Y95	9,98 Ab	5,77 Bb	3,38 Ba	0,25 Ac	0,10 Bd	0,17 Ac	0,16 Ad	0,08 Ab	0,09 Ab
Y97	16,4 Aa	12,0 Aa	6,03 Ba	0,82 Aa	0,23 Bc	0,70 Aa	0,57 Ab	0,11 Bb	0,44 Aa
GP	8,07 Ab	8,86 Ab	5,89 Aa	0,87 Aa	0,61 Ba	0,60 Ba	1,06 Aa	0,81 Aa	0,38 Ba

Genótipos/ meios de cultura	Massa seca parte aérea (g)			Massa seca raiz (g)		
	JADS	MS	WPM	JADS	MS	WPM
Y93	0,17 Aa	0,09 Ba	0,10 Bb	0,06 Ab	0,02 Bb	0,01 Bb
Y95	0,07 Ab	0,03 Bb	0,10 Bb	0,04 Ab	0,01 Bb	0,01 Bb
Y97	0,22 Aa	0,03 Bb	0,21 Aa	0,10 Aa	0,02 Bb	0,07 Aa
GP	0,11 Ab	0,05 Bb	0,09 Ab	0,07 Ab	0,04 Aa	0,08 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade

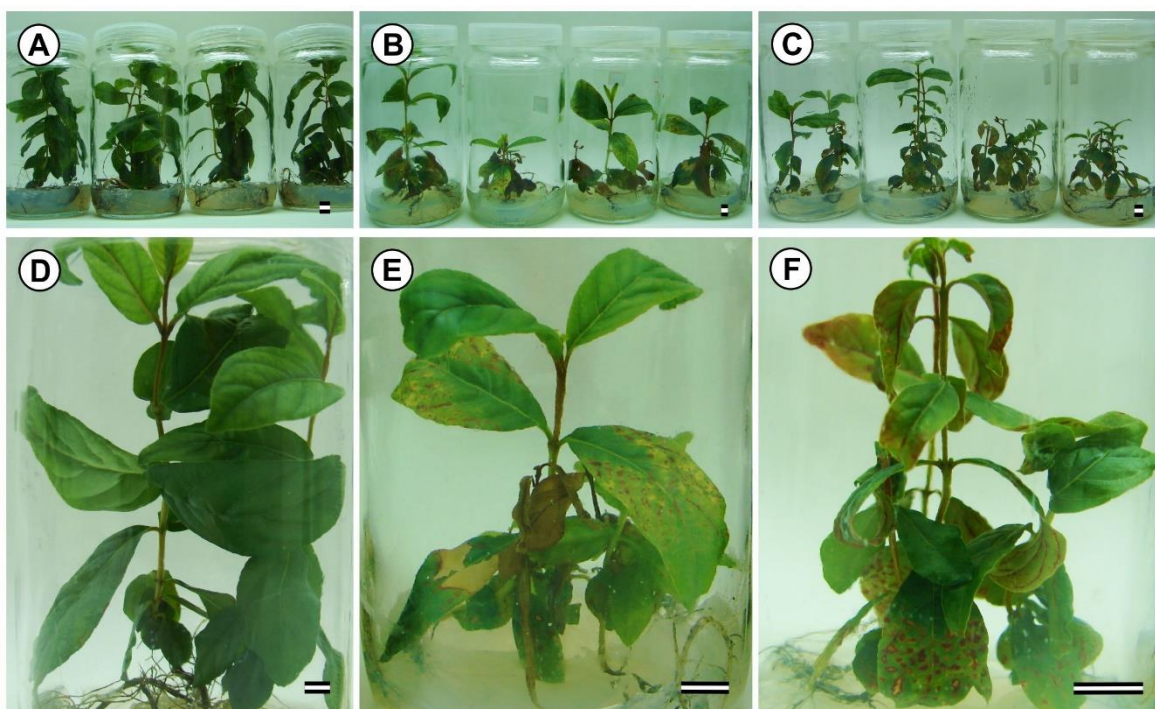


Figura 1. Plantas do acesso Y97 de *Psidium guineense*, crescidas *in vitro*, nos meios de cultura JADS (A e D), MS (B e E) e WPM (C e F), após 110 dias de cultivo. Barras 0,5cm.

Em relação ao número de nó, não foram observadas diferenças estatísticas para o fator meio de cultura. Porém, para genótipo, a maior média foi observada para o acesso de araçá Y97 (Figura 2).

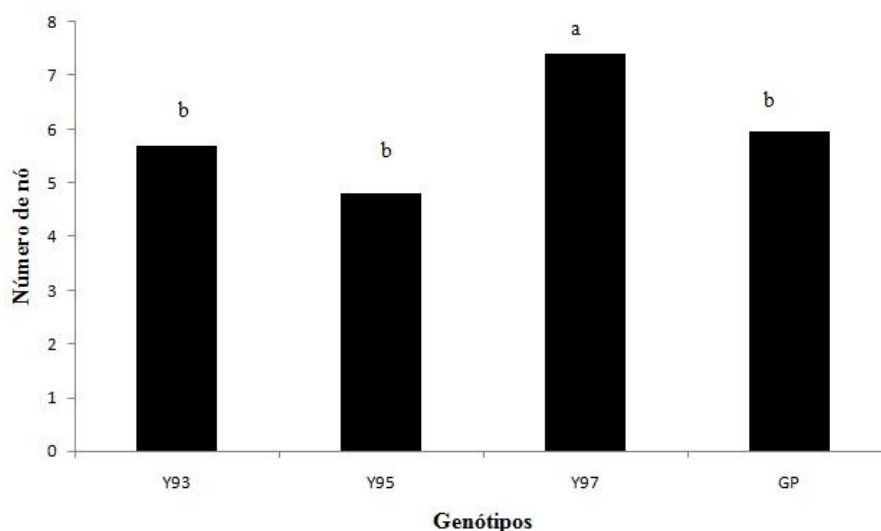


Figura 2. Médias do número de nó para o fator genótipo, de plântulas dos acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e de *P. guajava* (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes meios de cultura. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Estômatos foram observados em ambas as faces das folhas de todos os genótipos de *Psidium* spp., exceto para o acesso de araçá Y97, que não apresentou estômatos na face adaxial em nenhuma das condições de meio de cultura (Figura 3A).

A cv. GP apresentou os maiores índices estomáticos na face adaxial, principalmente quando crescidos sob o meio de cultura JADS (8,06%), porém, não diferiu estatisticamente do meio de cultura MS (7,22%) (Figura 3A).

Por outro lado, os maiores percentuais de índice estomático foram observados na face abaxial para todos os genótipos de *Psidium* spp. (Figura 3B). No entanto, apenas o acesso Y97 apresentou diferenças estatísticas entre os três meios de cultura, com as maiores médias no meio de cultura MS (Figura 2B). O acesso Y93 e cv. GP apresentaram as maiores porcentagens de índice estomático na face abaxial no meio de cultura JADS (26,05 e 26,37%, respectivamente), não havendo diferenças estatísticas entre estes dois genótipos (Figura 3B).

Observou-se também que as plantas de *Psidium* spp. crescidas sob o meio de cultura JADS apresentaram as maiores médias para o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides (Figura 3C, 3D, 3E e 3F). Todavia, ao analisar cada genótipo dentro deste meio de cultura, não foram observadas diferenças estatísticas entre os acessos de araçá e cv. GP para clorofila *a* (Figura 3C). Em relação a clorofila *b* e carotenoides, os maiores conteúdos foram observados para a cv. GP (39,5 e 26,52 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectivamente) (Figuras 3D e 3F). Já para clorofila total, as maiores médias foram observadas no acesso de araçá Y97 (85,49 $\mu\text{g cm}^{-2}$) e na cv. GP (90,04 $\mu\text{g cm}^{-2}$), não havendo diferenças estatísticas entre estes dois genótipos (Figura 3E).

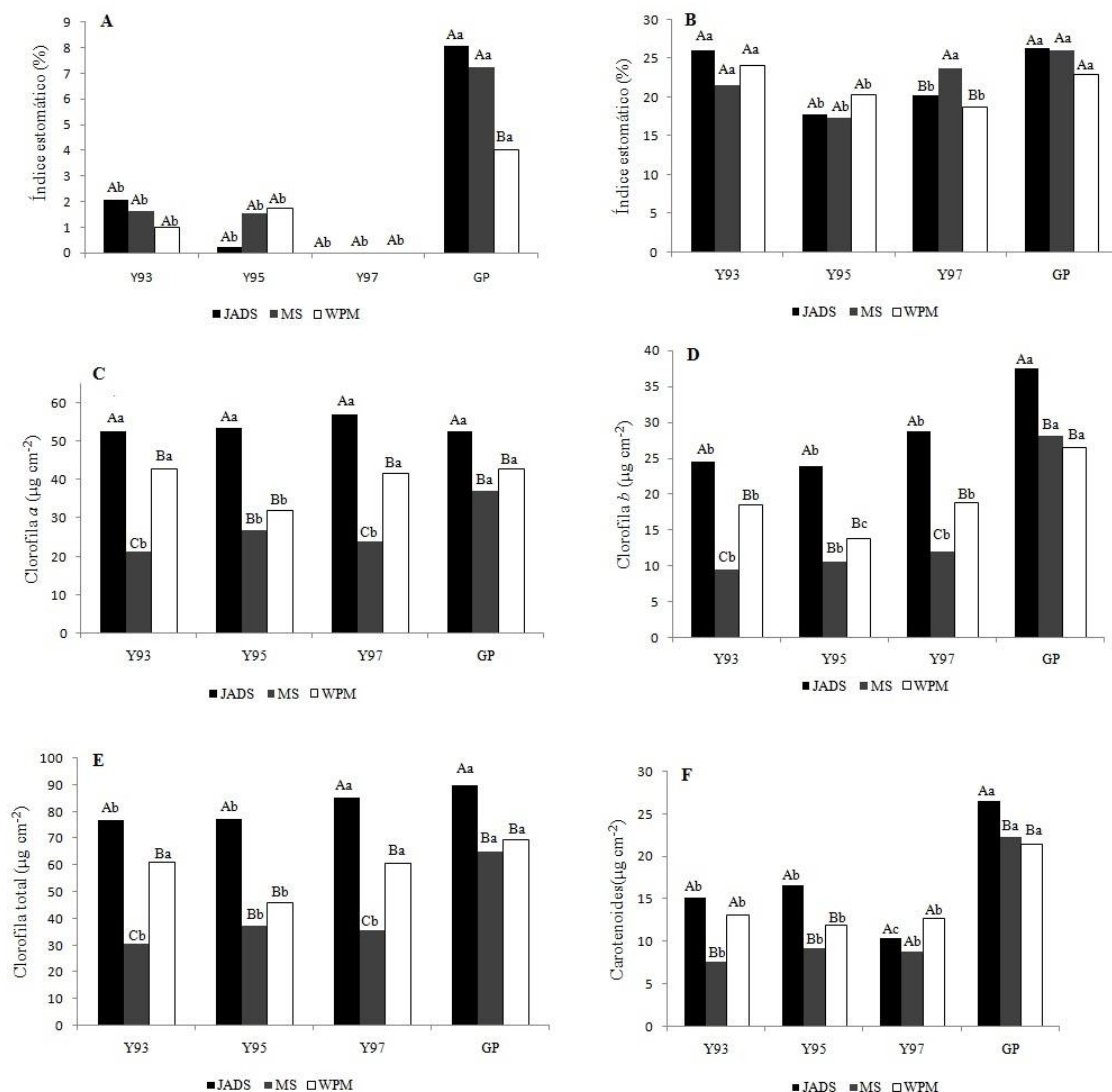


Figura 3. Índice estomático das faces adaxial (A) e abaxial (B), conteúdo de clorofila *a* (C), clorofila *b* (D), clorofila total (E) e carotenoides (F) das folhas dos acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e de *P. guajava* cv. Paluma (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes meios de cultura (JADS, MS e WPM). Médias seguidas pela mesma letra na interação meios de cultura x acessos de *P. guineense* e cv. Paluma (GP): letras maiúsculas iguais para os meios de cultura e minúscula para os genótipos, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade.

A análise nutricional de parte aérea de plantas de *P. guineense*, crescidas por 110 dias sob os meios de cultura JADS, MS e WPM, apresentaram variação quanto ao acúmulo de macro e micronutrientes (Tabela 4).

As plântulas crescidas no meio de cultura JADS apresentaram as maiores concentrações de Ca e Cu, porém, não foram observadas diferenças estatísticas entre os meios de cultura JADS e MS para as concentrações de Ca (Tabela 4). Maiores concentrações dos macronutrientes N e K, e dos micronutrientes Fe, Mn e Zn, foram observados no meio de

cultura MS, não havendo diferenças estatísticas entre os meios de cultura MS e JADS apenas para o micronutriente Mn (Tabela 4). Em relação ao S, as maiores concentrações foram observadas no meio de cultura WPM (Tabela 4).

Tabela 4. Acúmulo dos macronutrientes e micronutrientes na parte aérea de plantas de *Psidium guineense* após 110 dias de cultivo nos meios de cultura JADS, MS e WPM.

Meio de cultura	Macronutrientes (dag/Kg)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
JADS	2,80 b	0,23 a	1,54 b	0,28 a	0,093 a	0,19 b
MS	4,21 a	0,28 a	2,53 a	0,24 a	0,073 a	0,22 b
WPM	2,25 b	0,23 a	1,57 b	0,15 b	0,053 a	0,47 a

Meio de cultura	Micronutrientes (mg/Kg)				
	Cu	Fe	Zn	Mn	B
JADS	6,57 a	82,5 b	25,77 b	161,0 a	60,1 a
MS	2,88 b	128,67 a	65,97 a	191,33 a	51,07 a
WPM	3,58 b	66,10 b	27,27 b	100,87 b	44,6 a

Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e boro (B). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho relata pela primeira vez a influência dos meios de cultura JADS, MS e WPM no crescimento *in vitro* de plântulas de *P. guineense* (acessos Y93, Y95 e Y97) e *P. guajava* (cv. GP). O crescimento das plântulas nos diferentes meios de cultura resultou em diferenças evidentes nos parâmetros de crescimento, de forma qualitativa e quantitativa.

O meio de cultura JADS provou ser o meio de cultura mais apropriado para o crescimento dos acessos de araçá (Y93, Y95 e Y97) e cv. GP, evidenciando as melhores respostas para praticamente todas as variáveis de crescimento, em comparação com os meios de cultura MS e WPM. Resultados satisfatórios utilizando meio de cultura JADS também foram relatados para *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (CORREIA et al., 1995), *Eucalyptus grandis* (ANDRADE et al., 2006; BRAVO et al., 2008), *Eucalyptus citriodora* (ALMEIDA, 2012) e *Eucalyptus globulus* (CORDEIRO et al., 2014).

O meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) foi desenvolvido para cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e apresenta em sua constituição maiores concentrações de cálcio, magnésio, fósforo, ferro e cobre, em comparação com os outros meios de cultura testados neste trabalho (MS e WPM) (Tabela 1). No entanto, para alguns

nutrientes, as respostas aos meios de cultura contradizem a constituição destes, pois plântulas crescidas em meio MS, apresentaram maior acúmulo de ferro e fósforo em relação aquelas cultivadas nos meios JADS e WPM, mesmo o meio JADS apresentando a maior quantidade destes nutrientes, nas formas de sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de potássio (KH_2PO_4). Uma possível explicação seria à interação entre os demais nutrientes que compõem o meio MS, tornando-os mais disponíveis do que aqueles no meio JADS. O mesmo pode ter acontecido com o boro, uma vez que as menores concentrações deste nutriente são observadas no meio JADS, e as plântulas que cresceram nesse meio, foram as que mais acumularam boro. Adicionalmente, na constituição do meio de cultura MS e WPM, a concentração de magnésio e cálcio é em torno de 50% ou mais, inferior a do meio de cultura JADS (Tabela 1). Apesar de não haver diferenças estatísticas significativas entre os três meios de cultura para magnésio e entre os meios MS e WPM para cálcio, a pequena superioridade do acúmulo destes nutrientes nas plântulas que cresceram no meio de cultura JADS, aliados aos demais nutrientes, pode ter contribuído com um maior desenvolvimento das plântulas dos genótipos de *Psidium* spp. neste meio de cultura, e provavelmente esteja numa faixa ideal de absorção. Estes resultados podem ser explicados através da lei do mínimo de Liebig, que afirma que as plantas utilizam os nutrientes numa proporção definida, prevendo uma estreita relação entre a adição limitante de um nutriente no crescimento e desenvolvimento das plantas (NOVAIS et al., 2007). E a velocidade de absorção de um mineral pode sofrer aumento, diminuição ou não ser influenciada pela presença do outro elemento, através dos efeitos interiônicos, dentre eles o antagonismo, que ocorre quando a presença de um elemento diminui a absorção de outro, cuja a toxidez é evitada; a inibição, quando ocorre diminuição da absorção de um elemento, sendo esta provocada pela presença de outro íon; e o sinergismo, quando a presença de um mineral aumenta a absorção de outro mineral (MALAVOLTA, 2006). O mesmo autor, afirma que a absorção de ferro pode ser influenciada por outros cátions como potássio, cálcio e magnésio, cobre, zinco e manganês, por inibição competitiva.

O maior acúmulo de cobre nas plantas crescidas sob o meio de cultura JADS está de acordo com a constituição deste meio de cultura, que apresenta a maior quantidade de cobre na forma de sulfato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Tabela 1). Segundo Tripathi (2015), o crescimento das plantas é altamente dependente da disponibilidade de cobre, uma vez que este desempenha um papel crucial na regulação de várias reações bioquímicas nas plantas. Dessa forma, o cobre pode ter contribuído com o maior crescimento das plantas dos acessos de arará e da cv.

GP.

O meio de cultura MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) foi originalmente desenvolvido e otimizado para o cultivo *in vitro* de calos de tabaco, apresenta em sua constituição as maiores concentrações de nitrogênio, potássio, boro, zinco e sódio (Tabela 1), e têm sido amplamente utilizado na micropropagação *in vitro* de uma grande variedade de plantas, devido às elevadas concentrações de nitrogênio (GEORGE e DE KLERK, 2008), obtendo sucesso para muitas espécies. No entanto, para o presente estudo, este meio de cultura interferiu negativamente no desenvolvimento das plantas dos acessos de arará e da cv. GP, promovendo redução no crescimento, na síntese dos pigmentos fotossintéticos e clorose, seguida de necrose nas folhas de todos os genótipos, podendo está relacionado a constituição nutricional deste meio de cultura.

O meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN 1980), desenvolvido para induzir brotações axilares em ápices de *Kalmia latifolia*, apresenta 50% da força iônica do meio MS, e elevado nível de enxofre, porém, o nível de nitrogênio é extremamente baixo (Tabela 1). As elevadas concentrações das duas fontes distintas de enxofre, sulfato de potássio (K_2SO_4) e sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), presente na constituição do meio de cultura WPM, justifica o maior acúmulo deste nutriente nas plantas crescidas sob o referido meio de cultura, fatores que podem ter influenciado negativamente no crescimento das plântulas dos genótipos de *Psidium* spp., possivelmente causando toxicidade. O enxofre é um macronutriente extremamente importante no metabolismo vegetal, envolvido na formação da clorofila, na síntese de vitaminas, transferência de elétrons e atua na fotossíntese (MALAVOLTA, 2006). Os sintomas de deficiência deste nutriente são similares aos da deficiência de nitrogênio, incluindo clorose, e redução do crescimento da planta (TAIZ e ZEIGER, 2013). Embora o meio de cultura WPM tenha sido idealizado para suportar cultura de tecidos de espécies lenhosas como o meio de cultura JADS, os resultados não foram satisfatórios no crescimento do arará e da cv. GP, apresentando características similares às observadas no meio MS, podendo a constituição destes meios está em excesso ou sob o estado de deficiência para alguns nutrientes, não suprimindo as necessidades destes genótipos. O estado de deficiências ou quantidades excessivas de um elemento pode induzir deficiências ou acúmulo excessivos de outros elementos, devendo os elementos essenciais serem supridos de forma adequada (TAIZ e ZIGER, 2013), de acordo com as necessidades de cada espécie ou genótipo.

A insuficiência na quantidade de um determinado elemento químico essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta, ou combinações que o tornem pouco disponível,

provocará distúrbios no metabolismo, que podem ser evidenciados externamente por meio da redução do crescimento, clorose foliar ou outras anomalias (HARTMANN et al., 2011; TAIZ e ZEIGER, 2013), como observado neste trabalho nos meios de cultura MS e WPM. Para Tripathi (2015), a deficiência de cobre é um dos fatores que causa redução no crescimento da planta e clorose das folhas, estando de acordo com o observado nas plantas crescidas nos meios de cultura MS e WPM, uma vez que estes meios apresentam menores concentrações de cobre em suas constituições.

Clorose e necrose nas folhas, tem sido observado em outros trabalhos de propagação *in vitro*, desenvolvido com o meio de cultura MS, como em *Eucalyptus benthamii* (BRONDANI et al., 2012), *Eucalyptus globulus* (CORDEIRO et al., 2014), *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* (OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2014), híbridos de *Prunus* sp. (ALANAGH et al., 2014), dentre outros, corroborando com os dados desta pesquisa, podendo também está relacionado à concentração e às formas de nitrogênio que constituem este meio.

O nitrogênio é o elemento mineral requerido em maior quantidade pelas plantas e constituem-se no nutriente que mais limita o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (FERNANDES 2006; TAIZ e ZIGER, 2013), constituindo-se no componente principal dos meios nutritivos (STACHEVSKI et al., 2013). Este nutriente desempenha funções estruturais, fazendo parte de muitos componentes das células, como aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, enzimas, coenzimas, vitaminas e pigmentos, e participa de processos como absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (MALAVOLTA, 2006). Sua deficiência resulta em clorose gradual das folhas mais velhas e redução do crescimento da planta (FERNANDES 2006; TAIZ e ZIGER, 2013), características observadas nas plantas crescidas sob os meios de cultura MS e WPM. Entretanto, o meio de cultura MS apresenta grandes quantidades de nitrogênio, podendo os sintomas está relacionado ao excesso deste nutriente.

No meio de cultura MS, o nitrogênio está presente na forma de nitrato de amônia (NH_4NO_3) e nitrato de potássio (KNO_3), apresentando concentrações superiores às observadas nos meios de cultura JADS e WPM (Tabela 1), justificando o maior acúmulo deste nutriente nas plantas crescidas neste meio para o presente estudo (Tabela 2) e, assim, corroborando com Sotiropoulos et al. (2005), os quais reportaram que no crescimento *in vitro* de cultivares de maçã, obtiveram maior acúmulo de nitrogênio nos tecidos quando crescidos neste meio de cultura.

O meio de cultura JADS disponibiliza nitrogênio nas formas de NH_4NO_3 , KNO_3 e

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e o meio WPM, nas formas de NH_4NO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Tabela 1). Porém, as concentrações de NH_4NO_3 no meio de cultura WPM são muito baixas, disponibilizando pouco nitrogênio na forma de NH_4^+ , sendo esta, a forma de absorção mais rápida, exaurindo rapidamente do meio de cultura, dificultando assim, o desenvolvimento da planta, uma vez que o suprimento de nitrogênio de forma balanceada de cátion e ânions tende a reduzir o rápido aumento no pH do meio, que é comumente observado quando o nitrogênio é fornecido na forma de ânion nitrato (ASHER e EDWARDS, 1983). A maioria das plantas, tecidos e órgãos absorvem mais N e crescem mais rapidamente em soluções que contenham as duas fontes de N, NH_4^+ e NO_3^- (GEORGE e DE KLERK, 2008), promovendo um balanço cátion-ânion dentro da planta.

Além disso, a disponibilidade dos nutrientes às plantas está diretamente relacionada à quantidade de cátions e ânions disponíveis no meio de cultura, levando em consideração as relações existentes entre cada íon, interferindo na capacidade das plantas em assimilar os nutrientes, sendo essencial a tentativa de alcançar o equilíbrio iônico (ALMEIDA, 2012).

O nitrogênio é um nutriente que também influencia os teores de clorofila das folhas (MAGHREBI 2014) e no crescimento das plantas, a depender da disponibilidade, quantidade e forma disponível no meio de cultura. No meio de cultura JADS, além das fontes inorgânicas de nitrogênio, estão presentes em sua constituição os aminoácidos L-Argenina, L-cistina e L-glutamina, sendo em maior concentração a glutamina (Tabela 1). Segundo George e De Klerk (2008), a absorção de aminoácidos pelos tecidos vegetais promove uma diminuição do pH do meio, semelhante ao que ocorre quando Íons NH_4^+ são absorvidos, estando a glutamina diretamente envolvida na assimilação de NH_4^+ e consequentemente, na assimilação de nitrato, interferindo assim nas atividades fisiológicas das plantas. No presente trabalho, o meio de cultura JADS, promoveu a síntese de elevadas concentrações de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides) em todos os genótipos. Yu et al. (2010) observaram melhorias na capacidade fotossintética e no crescimento das plantas de *Crataegus pinnatifida* com aplicação exógena de glutamina, podendo este composto ter contribuído com uma maior síntese dos pigmentos fotossintéticos e maior crescimento das plântulas dos genótipos de *Psidium* crescidos no meio de cultura JADS.

Dessa forma, tanto no meio MS como no meio WPM, as proporções e formas disponíveis de nitrogênio não favoreceram o crescimento das plantas de araçá e cv. GP, apresentando nestes dois meios, sintomas de deficiência e toxidez. George e De Klerk (2008), citam que os íons das duas formas de nitrogênio (nitrato e amônia) devem ser ajustados

especificamente para cada espécie de planta. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, demonstram que a constituição de nitrogênio do meio de cultura JADS se ajusta às necessidades de crescimento das plântulas dos acessos de araçá e da cv. GP.

As respostas ao tipo e composição do meio de cultura variam não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie, e até entre explantes de um mesmo genótipo, que apresentam demandas específicas (BRONDANI et al., 2012). Dessa forma, acredita-se que as variações observadas para número de folhas, comprimento de raiz, massa fresca e seca de parte aérea, massa fresca e seca de raiz e índice estomático na face abaxial, entre os genótipos e entre e dentro dos meios de cultura, possivelmente estão relacionados a características intrínsecas de cada genótipo, a capacidade genotípica de resposta frente à constituição de cada meio, e a variabilidade genética existente entre os genótipos, principalmente para os acessos de araçá que são oriundos de sementes, de plantas de polinização livre e que ainda não passaram por processos de seleção no melhoramento genético.

Outro fator que pode ter influenciado nas pequenas variações observadas entre os genótipos, principalmente entre os meios de cultura WPM e JADS para comprimento de raiz e massa fresca e seca de raiz podem estar relacionada à quantidade de nitrogênio adicionado ao meio de cultura, uma vez que, sob deficiência de nitrogênio, em detrimento das reservas da parte aérea, a planta promove alongamento do sistema radicular, como uma tentativa de buscar o nutriente (FERNANDES, 2006), promovendo assim um maior crescimento e acúmulo de biomassa de raiz, no entanto, este fato também é altamente dependente do genótipo.

5. CONCLUSÕES

1. O crescimento de araçá (acessos Y93, Y95, Y97) e de goiabeira (cv. GP) na micropropagação *in vitro* é um processo extremamente regulado pela composição do meio de cultura;
2. Apesar de haver interação entre os genótipos e meio de cultura para a maioria das variáveis estudadas, as respostas não foram genótipos e/ou espécies dependentes, todos apresentaram maior crescimento no meio de cultura JADS;
3. A constituição nutricional do meio de cultura JADS é indicada para o crescimento e desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *P. guineense* e *P. guajava* para usos futuros em trabalhos de melhoramento genético dessas espécies.

6. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. Anati Quanti: Quantitative Analysis Software for Plant Anatomy Studies. **Planta Daninha**, v. 25, p. 649 - 659, 2007.
- ALANAGH, E.N.; GAROOSI, G.; HADDAD, R.; MALEKI, S.; LANDÍN, M.; GALLEGÓ, P.P. Design of tissue culture media for efficient *Prunus* rootstock micropropagation using artificial intelligence models. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 349–359, 2014.
- ALMEIDA, A.M.; SOUZA, R.M.; GOMES, V.M.; FERREIRA, T.F.; MUSSI-DIAS, V. Field assessment of meat and bone meal for management of orchards affected by guava decline. **Neematropica**, v.43, n. 2, p.247-253, 2013.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G. Modern solution culture techniques. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R. L. (Ed.). **Inorganic plant nutrition**. New York: Spriger-Verlag, p. 94-119, 1983.
- BALISTEIRO, D.M.; ALEZANDRO, M.R.; GENOVESE, M.I. Characterization and effect of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) juice on post prandial glycemia in healthy subjects. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p. 66–74, 2013.
- BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, A.M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 425-434, 2011.
- BRAVO, V.C.D.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; VENCOSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênes de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.
- BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, n. 5, p. 478–487, 2012.
- CORDEIRO, G.M.; BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura , BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 103, p. 337-344, 2014.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p.107-116, 1995.

CRUZ, C.D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, p.271-276, 2013.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**: essential methods. Singapore: Markono Print Media Pte., 2010. 341 p.

DIBAX, R.; QUISEN, R.C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ed. Re. Ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubusidaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.488-490, 2005.

FAO – CCP, Food and Agriculture Organization of the United Nations – Committee on Comodity Problems, 2010. **Tropical Fruits Compendium**. Disponível em: < http://www.fao.org/unfao/bodies/ccp/ccp66/index_en.htm >. Acesso em 15/07/2015

FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432p.

FERNANDES, T.G.; MESQUITA, A.R.C.; RANDAU, K.P.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-7, 2012.

FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.Z.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. **Araças do gênero *Psidium*: Principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2009, 48 p. (Documentos, n. 266).

GEORGE, E.F.; DE KLERK G.J. The components of plant tissue culture media. I: Macroand micro-nutrients. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, p. 65-114, 2008.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'urbrbrae gem'. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, p. 139-143, 2006.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M.; MUSSI-DIAS, V.; SILVEIRA, S.F.; DOLINSKI, C. Guava

decline: A complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.45-50, 2011.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M.; SILVEIRA, S.F.; ALMEIDA, A.M. Guava decline: effect of root exudates from *Meloidogyne enterolobii*-parasitized plants on *Fusarium solani* *in vitro* and on growth and development of guava seedlings under controlled conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v.137, p.393-401, 2013.

GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZÁLEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Estudio fitoquímico e actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v.1, n.10, p.3-4, 2005.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON, P.G.; LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2015. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/>> Acesso em: 10/02/2015

HAMINIUK, C.W.I.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; GUEDES, A.R.; STAFUSSA, A.P.; BONA, E.; CARPES, S.T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.7, p.1529–1537, 2011.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JUNIOR. F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, v.57, p. 1025-1028. 1973.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default.shtm>>. Acesso em: 15/07/2015.

JAISWAL, V.S.; AMIN, M.N. Guava and Jack fruit. In: Hammerschlag FA, Litz RE, (Eds.): **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. WALLINGFORD, U.K: CAB International. p. 421-432, 1992.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n.4, p.508-536, 1997.

LIU, X.; YANG, G. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. **International Journal of Plant Biology**, v.2, n.1, p.7–10, 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1980.

LUCIANI, G.F.; MARY, A.K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.39-143, 2006.

MAGHREBI, M.; NOCITO, F.F.; SACCHI, G.A. Nutrient Use Efficiency in Plants. **Plant Ecophysiology**. v. 10, p. 253–272, 2014.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998. 123p.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-493, 1962.

NACHTIGAL, J.C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R.A.; FACHINELLO, J.C.; MAZZINI, A.R.A. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*P. cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, p.229- 235, 1994.

NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.V.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa 2007, 1017p.

PEREIRA, F.M. Goiaba: Antecedentes, progresso e perspectivas. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 375-382, 2008.

PEREIRA, F.O.M.; SOUZA, R.M.; SOUZA, P.M.; DOLINSKI, C.; SANTOS, G.K. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.176-181, 2009.

PESSANHA, P.G.O.; VIANA, A.P.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SOUZA, R.M.; TEXEIRA, M.C.; PEREIRA, M.G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.129-136. 2011.

PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.S; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 1, p. 79-88, 2008.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y.; ADAMUCHIO, L. G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, v.24, n.2, p. 347- 355, 2014.

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

RISTERUCCI, A.M.; DUVAL, M.F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 4, p. 745-748, 2005.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA, P.R.B.; MENDES, C.S.O.; REIS JUNIOR, R.; VALERIO, H.M.; BRANDI, I.V.; OLIVEIRA, D.A. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.8, n.35, p.1095–1100, 2014.

SANTOS, M.A.C.; QUEIROZ, M.A.; SANTOS, A.S.; SANTOS, L.C.; CARNEIRO, P.C.S. Diversidade genética entre acessos de araçá de diferentes municípios do semiárido baiano. **Revista Caatinga**, v.27, n.2, p.48–57, 2014.

SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v. 55, p. 356 - 364, 2008.

SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.; RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1597 - 1601, 2004.

SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, n.3, p.240–243, 2003.

SHAH, S.T.; ZAMIR, R.; AHMAD, J.; ALI, H.; LUTFULLAH, G. *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of Guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.1195-1200, 2008.

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R.; SHARMA, H.C.; SINGH, S.P. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, v.95 p.213-221, 2002.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae: lista de espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://flora.do.brasil.jbrj.gov.br>> Acesso em: 10 fev. 2015.

SOTIROPOULOS, T.E.; MOUHARIDOU, G.N.; THOMIDIS, T.; TSIRAKOGLU, V.; DIMASSI, K.N.; THERIOS, I.N. Effects of different N-sources on growth, nutritional status, chlorophyll content, and photosynthetic parameters of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 297–299, 2005.

STACHEVSKI, T.W.; FRANCISCON, L.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Efeito do meio de cultura na calogênese *in vitro* a partir de folhas de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p. 339–342, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954p.

TOMAZ, Z. F. P.; RODRIGUES, A. C. VERÍSSIMO, V.; MARAFON, A. C.; HERTER, F. G.; RUFATO, A. R. Compatibilidade de enxertia de cultivares de marmeleiros com pereiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1211-1217, 2009.

TRIPATHI, D.K.; SINGH, S.; SINGH, S.; MISHRA, S. CHAUHAN, D.K.; DUBEY, N.K. Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 7, p. 139, 2 jul. 2015.

USMAN, M.; BUTT, M.; FATIMA, B. Enhanced *in vitro* multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.44, p.10182–10187, 2012.

YU, C.; LV, D. G.; QIN, S.J.; YANG, L.; MA, H. Y.; LIU, G.C. Changes in photosynthesis, fluorescence, and nitrogen metabolism of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) in response to exogenous glutamic acid. **Photosynthetica**, v. 48, n. 3, p. 339-347, 2010.

CAPÍTULO II

**Crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense*
Sw. e *P. guajava* L. sob diferentes níveis de trocas gasosas
com ventilação natural**

Crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium guineense* Sw. e *P. guajava* L. sob diferentes níveis de trocas gasosas com ventilação natural

RESUMO – Objetivou-se com o presente estudo, determinar a influência de diferentes níveis de trocas gasosas sob ventilação natural, sobre o crescimento e as características morfofisiológicas, anatômicas e histoquímica de plantas de *Psidium guineense* (araçá) e *P. guajava* cultivar Paluma (cv. GP) *in vitro*. Plântulas de três acessos de araçá (Y93, Y95 e Y97) e da cv. GP, previamente germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura JADS, vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana (SM), TRP com um orifício coberto com uma membrana (1M) e com duas membranas (2M), com taxas de trocas de CO₂ (TTCO₂) de 14; 21 e 25 µL L⁻¹ s⁻¹, respectivamente. Após 110 dias de cultivo, observou-se que a condição de cultivo SM interferiu negativamente no crescimento das plântulas e promoveu altos índices de mortalidade para a cv. GP (80%) e para os acessos de araçá Y95 e Y97 (100%). O aumento da ventilação (1M e 2M) nos recipientes de cultura resultou no desenvolvimento das plântulas com melhores características morfofisiológicas e anatômicas, e na biossíntese de compostos de reservas nas folhas de ambas as espécies. O crescimento em função das TTCO₂ de 21 e 25 µL L⁻¹ s⁻¹ no ambiente de cultura *in vitro* foi dependente da característica avaliada, da espécie e do genótipo dentro da mesma espécie, porém, com TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹ foram observados melhores resultados para a maioria das variáveis analisadas. Assim, a condição de cultivo TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹ é indicada para o crescimento e desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *P. guineense* e de *P. guajava* para usos futuros em trabalhos de melhoramento genético dessas espécies.

Palavras-chave: Myrtaceae, Propagação *in vitro*, Membranas permeáveis a gases, Análises morfofisiológicas e anatômicas, Histoquímica.

***In vitro* growth of seedlings *Psidium guineense* Swartz and *P. guajava* L. under different levels of gas exchange with natural ventilation**

ABSTRACT. The present study aimed to determine the influence of different levels of gas exchange under natural ventilation, on the growth and morphological, physiological, anatomical and histochemical characteristics of seedlings *Psidium guineense* (strawberry guava) and *P. guajava* Paluma cultivar (cv. GP) cultured *in vitro*. Seedlings of three accessions of strawberry guava (Y93, Y95 and Y97) and cv. GP, previously germinated *in vitro* were inoculated in JADS's culture medium, sealed with rigid cover of polypropylene (CPP) without membrane (WM), CPP with a covered hole with a membrane (1M) and with two membranes (2M), with rates CO₂ exchanges (TTCO₂) 14; 21 and 25 uL L⁻¹ s⁻¹, respectively. After 110 days of cultured, it was observed that culture condition SM influenced negatively on the growth of seedlings and promoted high mortality rates for cv. GP (80%), and the accessions of strawberry guava Y95 and Y97 (100%). Increased ventilation (1M, and 2M) in culture containers resulted in better development of seedling with morphological, physiological and anatomical characteristics and in the biosynthesis compounds of reserves in the leaves of both species. The growth due to TTCO₂ 21 and 25 uL L⁻¹ s⁻¹ *in vitro* culture environment was dependent on the evaluated characteristic, of the species, and genotype within the same species, but with TTCO₂ 25 uL L⁻¹ s⁻¹ were observed better results for most variables. Thus, culture condition of TTCO₂ 25 µL L⁻¹ s⁻¹ 25 uL is indicated for the growth

and development of propagation protocols *in vitro* for *P. guineense* and *P. guajava*, in future use in breeding program of these species.

Keywords: Myrtaceae, *In vitro* propagation, Membranes gaseous exchanges, morphological analysis, physiological, Anatomical, and Histochemical

1.INTRODUÇÃO

A propagação clonal de plantas é uma prática comum na silvicultura para preservar as características desejáveis dos genótipos ou variedades selecionadas (BHOJWANI e DANTU, 2013), sendo a propagação vegetativa por estaquia uma das técnicas mais difundidas na clonagem de espécies florestais e ou/frutíferas. Entretanto, a propagação de araçá por estaquia tem sido limitada pelas dificuldades de enraizamento (NACHTIGAL et al., 1994).

Técnicas de propagação *in vitro* têm sido utilizadas na clonagem de espécies de difícil propagação vegetativa pelos métodos convencionais *in vivo* (ERIG e SCHUCH, 2005; BHOJWANI e DANTU, 2013; OLIVEIRA et al., 2013), oferecendo como vantagens: obtenção de várias plantas a partir de um pequeno explante inicial; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; limpeza clonal, produzindo plantas livres de microorganismos; reprodução do genótipo da planta mãe; possibilidades de manipulação das condições de cultivo (ERIG e SCHUCH, 2005; BHOJWANI e DANTU, 2013), dentre outros, constituindo-se numa alternativa promissora para clonagem, conservação e resgate de germoplasma de araçá, assegurando a disponibilidade de material vegetal para os métodos de melhoramento, sem perda de sua viabilidade.

A goiabeira é uma espécie de fácil propagação vegetativa. No Brasil, praticamente todas as mudas de goiabeira são produzidas por estaquia (PEREIRA & NACHTIGAL, 2009). No entanto, em trabalhos de melhoramento convencional se torna inconveniente devido ao período juvenil longo (JAISWAL e AMIN, 1992), sendo desejável a propagação clonal a partir das técnicas de propagação *in vitro*, obtendo plantas livres de patógenos e mais vigorosas em um menor espaço de tempo (HUSMAM et al., 2012).

Entretanto, a regeneração de plantas *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores, como o genótipo, a fonte e as condições fisiológicas do explante, a utilização de combinação de fitorreguladores de crescimento, o meio de cultura utilizado, as condições de cultivo (LUCIANI et al., 2006; DUTRA et al., 2009), trocas gasosas, dentre outros fatores.

Na propagação *in vitro* convencional, em que as plantas são produzidas em recipientes fechados, com reduzidas trocas gasosas, elevada umidade relativa, elevada concentração de etileno e baixos níveis de CO₂ no ambiente interno do frasco, podem resultar em plantas com parte aérea pouco desenvolvida, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, redução nos tecidos com resistência mecânica, estômatos não funcionais, reduzido fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e dificuldades na absorção de água e nutrientes pelos explantes, podendo causar redução nas taxas de crescimento dos mesmos (NGUYEN e KOZAI, 2005; XIAO et al., 2011; SHIN et al., 2014). Além desses, há problemas anatômicos, interferindo diretamente nas taxas fotossintéticas das plantas *in vitro* e em seu processo de aclimatização *ex vitro* (ALVAREZ et al., 2012).

Diferentes métodos têm sido utilizados para solucionar as dificuldades da micropropagação convencional, dentre eles, o uso de tampas com membranas permeáveis a gases com ventilação natural, que permitem trocas gasosas mais elevadas, reduzindo a umidade relativa dentro dos recipientes de cultivo e aumentando a transpiração e absorção de água e nutrientes pelas plantas, podendo resultar em maior fotossíntese e, conseqüentemente, numa maior taxa de crescimento e melhoria no processo de aclimatização *ex vitro* (KITAYA et al., 2005; KOZAI 2010; IVANOVA e STADEN, 2010, XIAO et al., 2011).

Atualmente, várias membranas que permitem maiores trocas gasosas entre o ambiente externo e o interno do recipiente de cultura na propagação *in vitro* estão disponíveis comercialmente (ZOBAYED, 2005), como a membrana MilliSeal®. Esta membrana tem sido utilizada com êxito na melhoria das trocas gasosas na propagação *in vitro* de várias espécies como em *Azadirachta indica* (RODRIGUES et al. 2012), *Solanum melongena* (RIBEIRO et al. 2009), *Pfaffia glomerata* (IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012), *Capsicum annuum* (BATISTA, 2012) e *Ruta graveolens* (RIOS, 2014).

Para *Psidium* spp., trabalhos de propagação *in vitro* tem sido conduzido com *P. guajava*, pelos métodos convencionais de cultivo, em recipientes fechados (ALI et al., 2007; SHAH et al., 2008; RAI et al., 2009; LIU et al., 2011; USMAN et al., 2012). Porém, não se sabe se esta condição é a que favorece maior crescimento e desenvolvimento morfofisiológicos e anatômicos desta espécie, uma vez que algumas espécies são sensíveis à dessecação e apresentam maior crescimento em recipientes fechados, como observado para os clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (GALO, 2014), *Solanum tuberosum* (MOHAMED e ALSADON, 2010) e *Herreria salsaparilha* (GONÇALVES et al., 2008).

Em relação ao *P. guineense*, não há relatos de trabalhos de micropropagação *in vitro*. Assim, a determinação da melhor condição de trocas gasosas, sob ventilação natural na propagação *in vitro* de *P. guineense* e *P. guajava* pode constituir-se num avanço significativo para a determinação de protocolos de propagação *in vitro* destas espécies e posterior clonagem, conservação de recursos genéticos, e como técnica de apoio a futuros trabalhos de melhoramento genético, como na conservação das plantas imunes ou resistentes ao *M. enterolobii* e na rápida detecção de compatibilidade e/ou incompatibilidade entre o arará e goiabeira com a enxertia *in vitro*, além de outras aplicações.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo determinar a influência de diferentes níveis de trocas gasosas sob ventilação natural, no crescimento e nas características morfofisiológicas, anatômicas e histoquímicas de plântulas de *Psidium guineense* Sw. e *P. guajava in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da realização do experimento e material experimental utilizado

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório Anatomia Vegetal e no Núcleo de Microscopia e Microanálises, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a instalação dos experimentos, utilizaram-se sementes de três acessos de arará da espécie *P. guineense* Swartz, coletados em 2010, nos municípios de Senhor do Bonfim (Y93) e Jacobina (Y95 e Y97), no estado da Bahia, os quais encontram-se armazenados a 10 °C e 40 % de umidade relativa no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UNEB, Juazeiro-BA. Também foram utilizadas sementes de goiaba (*P. guajava*), cultivar Paluma.

2.2. Desinfestação e germinação de sementes

Em câmara de fluxo laminar, as sementes de cada acesso de arará do BAG e as sementes da goiabeira foram desinfestadas em etanol 70% por um minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) a 1,25% de cloro ativo (Super Globo[®], Rio de Janeiro, Brasil) por 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas por três vezes

consecutivas em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, 200 sementes de cada acesso de araçá e de goiabeira, foram transferidas para frascos de 250 mL de capacidade, com tampas rígidas (dez sementes por frasco), previamente autoclavados, contendo dois discos de papel Germitest[®] reduzidos ao tamanho do diâmetro do fundo do frasco, umedecidos com 5 mL de água destilada. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter)] e fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), até a completa germinação (60 dias).

2.3. Efeito dos níveis de trocas gasosas no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium* spp.

Plântulas previamente germinadas (item 2.2) foram transferidas para frascos com capacidade de 350 mL, contendo 60 mL de meio de cultura JADS (CORREIA, et al., 1995) (Tabela 1), acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar (Merck[®], Alemanha). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$ antes da adição do ágar e em seguida autoclavado a 121 °C, 1,1 Pa por 20 min.

Foram utilizados três tipos de vedações para os frascos, constituindo-se em três tratamentos **SM** - tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂(TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; **1M** - TRP com um orifício (10 mm) coberto com uma membrana de 0,45 μm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$], e **2M** - TRP com dois orifícios cobertos com membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$] e vedados com filme plástico transparente de cloreto de polivinil (PVC) (Goodyear, São Paulo, Brazil), sendo mantidos em sala de crescimento por 110 dias, nas mesmas condições citadas acima para germinação (item 2.2).

2.4. Análises de crescimento das plântulas

Após 110 dias de cultivo, foram avaliados número de folhas (NF), número de nós (NN), área foliar total da planta (AF, em cm²), obtida com o auxílio do medidor de área foliar “Area Meter” (modelo Li-Cor Biosciences, Inc Lincoln, Nebraska), comprimento de parte aérea (CPA, em cm), comprimento de raiz (CR, em cm), índice estomático (%), pigmentos

fotossintéticos por área foliar ($\mu\text{g cm}^{-2}$) e massa fresca e seca de parte aérea (MFPA e MSPA) e raiz (MFR e MSR) (g), sendo as massas secas obtidas em estufa com ventilação forçada (ACB Larbor) a 60°C, por 72 horas.

2.4.1. Índice estomático

Para determinação do índice estomático, foi realizada a impressão epidérmica das faces abaxial (AB) e adaxial (AD) do terceiro par de folhas de três plântulas diferentes, seguindo a técnica de Segatto et al. (2004). Posteriormente, foram capturadas as imagens, selecionando três campos por folha de forma aleatória. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio Olympus Optical (modelo AX70TRF, Tóquio, Japão) acoplado à câmera digital (Spot Insight Color 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) e em seguida, as imagens foram analisadas no software Anati Quanti (AGUIAR et al. 2007). Para o cálculo do índice estomático (IE), foi utilizado a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{\text{Nº de estômatos}}{\text{Nº estômatos} + \text{Nº células epidérmicas}} \times 100$$

2.4.2. Pigmentos fotossintéticos

Na quantificação dos pigmentos fotossintéticos, três discos foliares (7 mm) foram excisados do segundo par de folhas (a partir do ápice) totalmente expandida, em seguida incubados em tubos contendo 3,0 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO, VETEC) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 48 horas (SANTOS et al. 2008). A absorbância das amostras foi determinada nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480nm, utilizando um espectrofotômetro GenesysTM Scanning 10 UV/Visível (Thermo Scientific, EUA). A concentração das clorofilas *a* (Cl_a), *b* (Cl_b), clorofila total (Cl_t) e carotenóides (Ct) foi calculada de acordo com a metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.5. Aclimatização das plantas

Após 110 dias do cultivo *in vitro*, três plântulas de cada tratamento foram submetidas à aclimatização, transferindo-as para copos plásticos (300 mL), preenchidos com substrato

Plantmax[®] HT (Eucatex, Brasil) e, subsequentemente, cobertos com sacos transparentes de polietileno para manter a alta umidade relativa do ar. As plantas foram mantidas em mini-estufa de vidro, com irrigação manual diária. Os sacos foram removidos de forma gradual ao longo de 45 dias até a completa aclimatização das plantas. Após 75 dias foram avaliados a sobrevivência das plantas (%), o comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR) (cm) e a massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA) e da raiz (MFR e MSR) (g).

2.6. Estudos anatômicos e histoquímicos de folhas de *Psidium* spp.

Para os estudos anatômicos e histoquímicos, seguimentos da porção mediana do segundo par de folhas (do ápice para a base) do acesso de arará Y93 e da cultivar de goiabeira Paluma (GP) aos 110 dias de cultivo sob os tratamentos de trocas gasosas, foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5 % de glutaraldeído e 2,5 % de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato a pH 7,0) (KARNOVSKY, 1965), seguida de desidratação em série etílica em concentrações crescentes de 10 a 100% (v/v) e infiltradas em resina metacrilato (Historesin, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL). Posteriormente, foram obtidos cortes transversais das amostras de 5 µm de espessura, utilizando um micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL). Os cortes foram dispostos em lâminas, secos em temperatura ambiente e em seguida foram corados com azul de toluidina 0,05 % e pH 4,4 por 15 min (O'BRIEN e MCCULLY, 1981) para caracterização estrutural; reagente de Lugol, para localização de amido (JOHANSEN, 1940); reagente de Schiff/ácido periódico (PAS) para polissacarídeos neutros (O'BRIEN e MCCULLY, 1981); Sudan black B (PEARSE, 1972) e Vermelho neutro (KIRK, 1970) para lipídeos; Xilidine ponceau (XP) para proteínas (VIDAL, 1977) e Vermelho de rutênio para pectinas (JOHANSEN, 1940).

As lâminas foram montadas em resina sintética Permout[®] e em seguida foram capturadas as imagens utilizando um fotomicroscópio Olympus Optical (modelo AX70TRF, Tóquio, Japão) acoplado à câmera digital (Spot Insight Color 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA), do Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

Para as análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras de folhas dos acessos Y93 e Y97, anteriormente fixadas em Karnovsky (1965), foram desidratadas em série crescente de acetona, secas em ponto crítico com CO₂ em um Bal-Tec 030, montadas em *stubs* e metalizadas com ouro, usando um revestidor de pulverização catódica FDU 010 (Bal-

Tec, Balzers, Liechtenstein). As imagens foram capturadas com auxílio de microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP, Cambridge, Inglaterra), equipado com câmera digital, no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa.

2.7. Avaliações e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3 (trocas gasosas) x 4 (genótipos) para as análises de crescimento, índice estomático e aclimatização e outro fatorial 2 (trocas gasosas) x 4 (genótipos) para os pigmentos fotossintéticos. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, três plântulas por frasco, sendo cada repetição representada por um frasco. Em relação às análises de pigmentos fotossintéticos, índice estomático e aclimatização das plântulas, foram utilizadas três repetições, sendo cada repetição representada por uma plântula.

Os dados foram submetidos às análises de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2013).

No que diz respeito aos estudos anatômicos e histoquímicos, as observações foram avaliadas de forma qualitativa e comparativa, de acordo com a natureza das reações, se positiva ou negativa e intensidade de coloração de cada classe de metabólito estudado. Foram utilizadas três repetições por teste, sendo cada repetição representada por uma lâmina com seis cortes.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito dos níveis de trocas gasosas no crescimento *in vitro* de plântulas de *Psidium* spp.

A análise de variância dos dados indicou efeito significativo para a interação entre genótipos e trocas gasosas para a maioria das variáveis estudadas, exceto para carotenoides (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis de crescimento analisadas em genótipos (G) de *P. guineense* e em *P. guajava* crescidas in vitro sob diferentes níveis de trocas gasosas (TG).

Fonte de variação	Quadrados médios										
	Análises de crescimento										
	NFL	NN	AF	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR	IEAD	IEAB
G	51,4**	29**	58,54 ^{ns}	77,3**	59,35*	0,1**	0,06*	0,01**	0,002**	85,2**	469**
TG	802,8**	118**	4422**	486**	1319**	1,6**	0,9**	0,13**	0,03**	2,04ns	498**
G x TG	54,7**	45**	89,85*	50,1**	86,6**	0,1**	0,44*	0,01**	0,001**	6,04**	199**
Média	9,90	5,14	17,89	7,24	11,09	0,33	0,221	0,099	0,037	2,45	21,21
CV (%)	15,46	27,04	30,89	20,59	35,43	37,54	55,03	45,76	51,64	51,67	13,77

Fonte de variação	Pigmentos fotossintéticos			
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides
Genótipos (G)	169,57**	162,99**	462,68**	24,45ns
TG	76,55*	106,96*	390,68**	138,43ns
G x TG	173,66*	49,41*	611,40*	1,35ns
Resíduo	16,59	19,72	41,55	-
Média	47,81	29,73	77,72	12,46
CV (%)	8,52	14,93	8,29	27,15

^{ns}Não significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro, pelo teste F. * e ** Significativo ao nível de 5 e 1 % de probabilidade de erro respectivamente, pelo teste F. NN -Número de nó; NF - Número de folhas; AF - Área foliar; CPA - Comprimento parte aérea; CR - Comprimento raiz; MFPA - Massa fresca parte aérea; MFR - Massa fresca raiz; MSPA - Massa seca parte aérea; MSR - Massa seca raiz; IEAD - Índice estomático face adaxial; IEAB - Índice estomático face abaxial; Cla - Clorofila a; Clb - Clorofila b; Clt - Clorofila total e Ct - Carotenoides. **SM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; **1M:** TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; **2M:** TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹].

As diferentes taxas de trocas gasosas influenciaram o crescimento das plântulas de *Psidium* spp. (Tabelas 1 e 2; Figura 1). O tratamento SM comprometeu o desenvolvimento das plântulas, promovendo amarelecimento das folhas, seguido de senescência, elevando os índices de mortalidade, acima de 80% para a cv. GP e 100% para os acessos Y95 e Y97 (dados não mostrados).

Apenas o acesso Y93 conseguiu se desenvolver na ausência de membranas permeáveis, porém, houve redução no seu crescimento (Figura 1A e 1D). Em contrapartida, ao utilizar membranas permeáveis a gases (1M e 2M) (Figura 1B e 1C), houve um incremento significativo de duas a seis vezes nas médias das variáveis de crescimento (área foliar, massa seca e fresca de parte aérea, massa fresca de raiz e maior comprimento de parte aérea e raiz, quando comparado com as médias das variáveis de crescimento das plântulas crescidas em ambiente SM, havendo diferenças estatísticas para comprimento de raiz, massa fresca e seca de raiz e massa seca de parte aérea sob estas duas condições de cultivo, obtendo as melhores médias sob 1M apenas para massa seca de parte aérea (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças estatísticas para número de nó e número de folhas

entre os tratamentos de trocas gasosas 1M e 2M para todos os genótipos (Tabela 2). Índices de área foliar superiores foram obtidos pela cv. GP sob 2M, porém para os acessos de araçá, não foram observadas diferenças estatísticas entre estes dois sistemas de trocas gasosas. Para as demais variáveis, houve diferenças estatísticas sob 1M e 2M, para todos os genótipos a depender da variável estudada (Tabela 2).

Em relação aos acessos dentro dos tratamentos, houve diferenças estatísticas entre os genótipos em todas as variáveis, nas três condições de cultivo e as respostas foram dependentes dos genótipos (Tabela 2). O acesso de araçá Y97 e a cv. GP foram superiores aos demais genótipos sob 2M, para a maioria das variáveis, exceto para área foliar, comprimento de parte aérea, massa fresca de parte aérea e massa seca de raiz para o acesso Y97 e para comprimento de raiz para a cv. GP (Tabela 2).

Tabela 2. Médias das variáveis de crescimento analisadas em acessos de *P. guineense* e em *P. guajava* crescidas *in vitro* sob diferentes níveis de trocas gasosas.

Acessos/ Vedações	Número de nós			Número de folhas			Área foliar (cm ²)		
	SM	1M	2M	SM	1M	2M	SM	1M	2M
Y93	9,40 Aa	5,4 Ab	6,4 Ab	10,00 Ba	12,4 Ab	13,8 Aa	3,62 Ba	26,5 Aa	27,4 Ab
Y95	0,00 Bb	5,3 Ab	5,9 Aa	0,00Bb	10,9 Ab	12,1 Ab	0,00Ba	24,9 Aa	20,7 Ac
Y97	0,00 Bb	7,1 Aa	7,4 Aa	0,00Bb	14,3 Aa	15,2 Aa	0,00Ba	23,0 Aa	30,0 Ab
GP	0,00 Bb	7,2 Aa	7,6 Aa	0,00Bb	14,7 Aa	14,9 Aa	0,00Ca	22,5 Ba	36,1 Aa
Acessos/ Vedações	Comprimento parte aérea (cm)			Comprimento raiz (cm)			Massa fresca parte aérea (g)		
	SM	1M	2M	SM	1M	2M	SM	1M	2M
Y93	6,26 Ba	8,7 Ab	9,4 Ab	6,89 Ba	10,6 Bb	21,2 Aa	0,08Ba	0,41 Aa	0,52 Ac
Y95	0,00Bb	6,1 Ac	6,0 Ac	0,00Cb	16,1 Aa	11,0 Bb	0,00Ba	0,28 Aa	0,33 Ad
Y97	0,00Cb	12,2 Aa	10,3 Bb	0,00Ba	19,4 Aa	18,6 Aa	0,00Ca	0,46 Ba	0,61 Ab
GP	0,00Cb	12,0 Ba	16,0 Aa	0,00Bb	15,6 Aa	13,6 Ab	0,00Ca	0,44 Ba	0,81 Aa
Acessos/ Vedações	Massa fresca raiz (g)			Massa seca parte aérea (g)			Massa seca raiz (g)		
	SM	1M	2M	SM	1M	2M	SM	1M	2M
Y93	0,06 Ba	0,21 Ba	0,38 Ac	0,03Ca	0,22 Aa	0,13 Bb	0,01Ba	0,03Ba	0,05 Ac
Y95	0,00Ba	0,17 Aa	0,24 Ac	0,00Ba	0,07 Ab	0,10 Ab	0,00Ba	0,03 Ba	0,05 Ac
Y97	0,00Ca	0,28 Ba	0,46 Aa	0,00Ca	0,11 Bb	0,20 Aa	0,00Ca	0,04 Ba	0,08 Ab
GP	0,00Ca	0,22 Ba	0,62 Aa	0,00Ca	0,11 Bb	0,21 Aa	0,00Ca	0,04 Ba	0,12 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade. **SM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; **1M:** TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; **2M:** TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹].

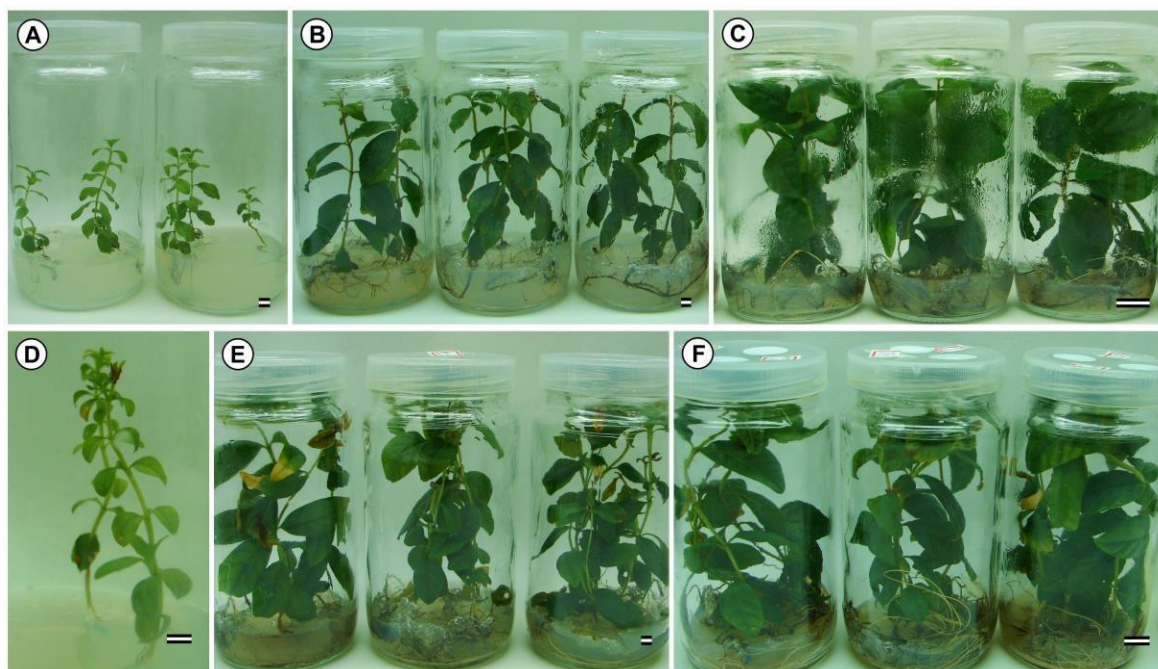


Figura 1. Plantas de *Psidium guineense*, acesso Y93 (A, B, C e D) e de *Psidium guajava*, cv. Paluma (E e F), crescidas in vitro, sob diferentes níveis de trocas gasosas SM (A e D), 1M (B e E) e 2M (C e F). SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Barras = 0,5cm.

Em relação ao índice estomático, não foram observados estômatos na face adaxial para o acesso Y97 sob as condições de trocas gasosas testadas (Figura 2A). A cv. GP apresentou os maiores índice estomático na face adaxial, nas três condições de trocas gasosas em relação aos demais genótipos, porém, a melhor média foi observada no tratamento SM (8,68%) (Figura 2A).

No geral, os maiores índice estomático foram observados na face abaxial, não havendo diferenças estatísticas entre as condições de cultivo SM (29,5%) e 2M (30,45%) para o acesso Y93 e entre as três condições de crescimento para a cv. GP (25,57; 27,22 e 28,59%, respectivamente). Para o acesso Y95, o maior índice estomático foi observado sob 1M (25,94%), já para o acesso Y97, não houve diferenças estatísticas sob os dois tratamentos de trocas gasosas (23,28 e 21,72%, respectivamente) (Figura 2B). Houve diferenças estatísticas entre os genótipos apenas sob a condição 2M, com as maiores médias sendo observadas no acesso Y93 (30,45%) e cv. GP (28,59%) (Figura 2B).

A síntese de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e

carotenoides) foi afetada pelas condições de crescimento do presente trabalho (Figura 2C-D). Para clorofila *a*, houve diferenças estatísticas entre os tratamentos de trocas gasosas apenas para a cv. GP, apresentando as maiores médias sob 2M (55,16 mg.cm⁻²) (Figura 2C). O acesso Y93, apresentou os menores conteúdos de clorofila *a*, tanto sob 1M (38,39 mg.cm⁻²) como com 2M (41,37 mg.cm⁻²), em relação aos demais genótipos (Figura 2C). Já para clorofila *b*, apenas o acesso Y95 apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos de trocas gasosas, porém, os maiores conteúdos de clorofila *b* foram obtidos pela cv. GP (39,06 mg.cm⁻²), seguido do acesso Y95 (37,64 mg.cm⁻²) sob o tratamento 2M, não havendo diferenças estatísticas entre estes dois genótipos (Figura 2D). Para clorofila total, observou-se diferenças estatísticas entre os tratamentos de trocas gasosas apenas para o acesso Y95 e a cv. GP, obtendo as maiores médias sob 2M (90,99 e 95,30 mg.cm⁻², respectivamente) (Figura 2E). O conteúdo de carotenoides não diferiu estatisticamente entre os tratamentos de trocas gasosas e entre os genótipos.

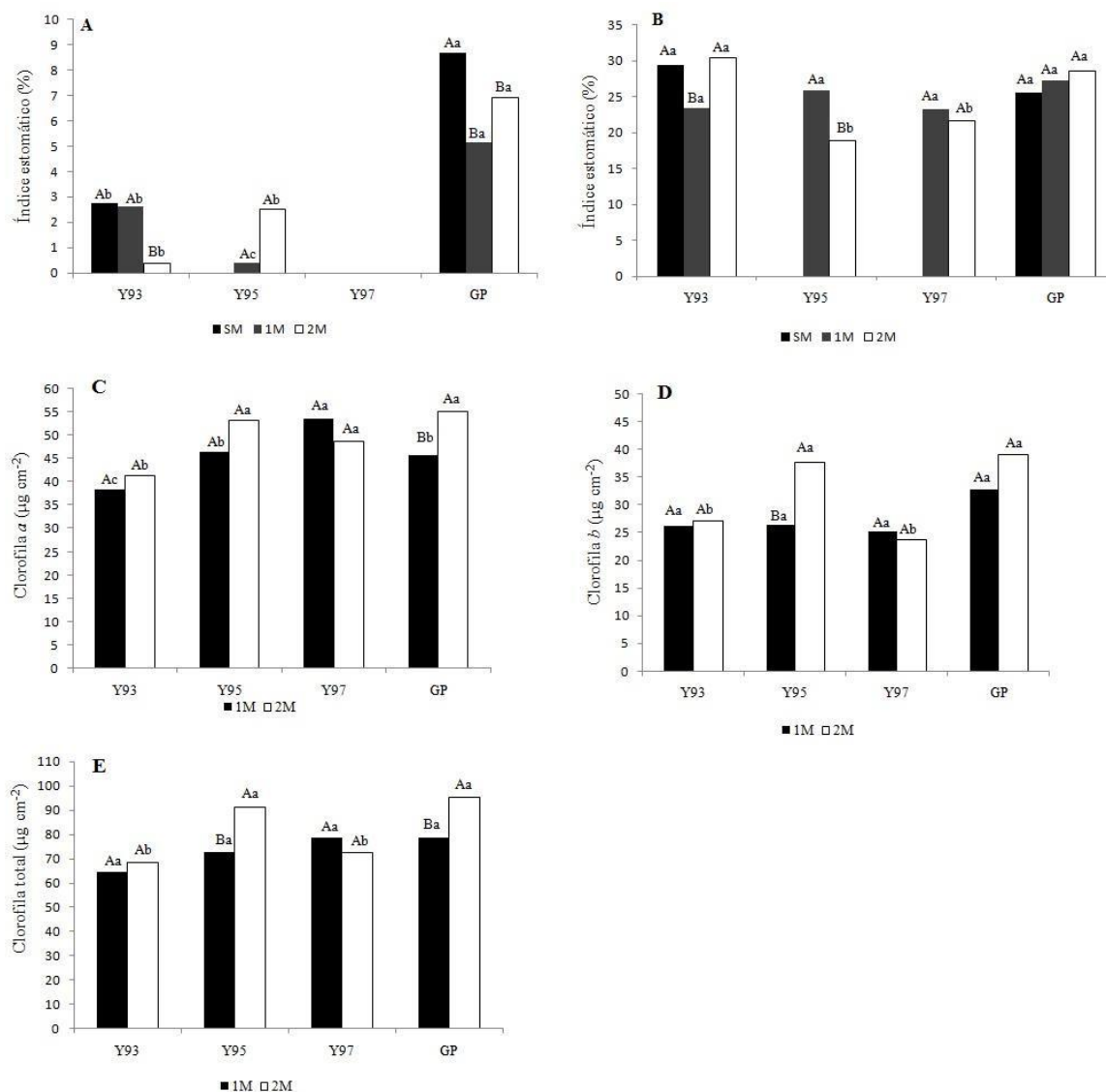


Figura 2. Índice estomático das faces adaxial (A) e abaxial (B), conteúdo de clorofila *a* (C), clorofila *b* (D) e clorofila total (E) das folhas dos acessos de *P. guineense* (Y93, Y95 e Y97) e *P. guajava* cv. Paluma (GP) crescidas *in vitro* sob diferentes níveis de trocas gasosas (SM, 1M e 2M). Médias seguidas pela mesma letra na interação trocas gasosas x acessos de *P. guineense* e cv. Paluma: letras maiúsculas iguais para as vedações e minúsculas para os genótipos, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Após aclimatização das plantas, observou-se que não houve diferenças estatísticas para interação apenas para comprimento de parte aérea e raiz (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis de crescimento após aclimatização em acessos de *P. guineense* e em *P. guajava* crescidas in vitro sob diferentes níveis de trocas gasosas (TG).

Fonte de variação	Quadrados médios					
	Análises de crescimento					
	CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Genótipos (G)	92,76**	182,31**	6,41**	0,287**	0,090**	0,91**
Trocas gasosas (TG)	1739,34**	4007,74**	45,27**	2,98**	0,95**	2,96**
G x TG	23,88 ^{ns}	49,11 ^{ns}	2,22**	0,187**	0,059**	0,32**
Resíduo	12,07	25,49	0,260	0,024	0,012	0,035
Média	17,53	23,96	2,23	0,56	0,31	0,57
CV (%)	19,81	21,07	22,84	27,52	34,44	32,45

^{ns}Não significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro, pelo teste F. * e ** Significativo ao nível de 5 e 1 % de probabilidade de erro respectivamente, pelo teste F. CPA - Comprimento parte aérea; CR - Comprimento raiz; MFPA - Massa fresca parte aérea; MFR - Massa fresca raiz; MSPA - Massa seca parte aérea e MSR - Massa seca raiz. **SM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; **1M:** TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; **2M:** TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹].

A taxa de sobrevivência das plantas alcançou 100%, exceto para as plantas da cv. GP oriundas da condição SM, que obteve uma taxa de sobrevivência de 67%. O tratamento SM apresentou as menores médias para todas as variáveis de crescimento analisadas (Tabela 4). Por conseguinte, as plantas crescidas sob uma maior taxa de troca de CO₂ (2M) apresentaram as maiores médias em todas as variáveis de crescimento estudadas após a aclimatização, porém, houve variação na responsividade genotípica, não havendo diferenças estatísticas sob as condições 1M e 2M, a depender do genótipo (Tabela 4).

O acesso Y93, apresentou as maiores médias para massa fresca e seca de parte aérea e raiz sob 2M (Tabela 4). Para o fator genótipo, este acesso também apresentou as maiores médias, embora não tenha diferido estatisticamente da cv. GP para massa fresca de parte aérea e raiz, e do acesso Y97 para massa seca de parte aérea (Tabela 4).

Em relação ao comprimento de parte aérea, não foram observadas diferenças estatísticas entre os genótipos estudados (Tabela 4). Diferente do observado para comprimento de raiz, que a cv. GP e o acesso Y93 apresentaram as maiores médias (Tabela 4).

Para os tratamentos de vedações, maior comprimento de parte aérea foi observado sob 2M, porém, para comprimento de raiz, não foram observadas diferenças estatísticas sob 1M e 2M (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da interação (acessos x vedações) para massa fresca e seca de parte aérea e raiz e médias dos fatores acessos e tratamentos para comprimento de parte aérea e raiz, analisados após a aclimatização, em acessos de *Psidium guineense* (Y93, Y95 e Y97)

Acessos/Vedações	Massa fresca parte aérea (g)			Massa fresca parte aérea (g)		
	SM	1M	2M	SM	1M	2M
Y93	0,28 Ca	2,78 Bb	5,58 Aa	0,28 Ca	2,78 Bb	5,58 Aa
Y95	0,00Ba	2,04 Ab	2,35 Ab	0,00Ba	2,04 Ab	2,35 Ab
Y97	0,00Ba	1,93 Ab	2,71 Ab	0,00Ba	1,93 Ab	2,71 Ab
GP	0,086 Ba	4,20 Aa	4,88 Aa	0,086 Ba	4,20 Aa	4,88 Aa
Acessos/Vedações	Massa seca parte aérea (g)			Massa seca raiz (g)		
	SM	1M	2M	SM	1M	2M
Y93	0,03 Ca	0,39 Ba	0,79 Aa	0,08 Ca	0,88 Ba	1,71 Aa
Y95	0,00Ba	0,32 Aa	0,35 Ab	0,00Ba	0,25 Bc	0,56 Ac
Y97	0,00Ca	0,41 Ba	0,78 Aa	0,00Ba	0,59 Ab	0,42 Ac
GP	0,004 Ba	0,37 Aa	0,32 Ab	0,00 Ba	1,13 Aa	1,28 Ab
Acessos	Comprimento parte aérea (cm)			Comprimento raiz (cm)		
Y93	21,14 a			27,47 a		
Y95	14,17 a			20,87 b		
Y97	15,61 a			19,33 b		
GP	19,22 a			28,14 a		
Vedações	Comprimento parte aérea (cm)			Comprimento raiz (cm)		
SM	4,0 c			2,86 b		
1M	21,29 b			34,13 a		
2M	27,25 a			34,87 a		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade. **SM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; **1M:** TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; **2M:** TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹].

3.2. Estudos anatômicos e histoquímicos de secções de folhas de *Psidium* spp. sob diferentes níveis de trocas gasosas

3.2.1. Estudos anatômicos de secções de folhas de *P. guineense*

Os tratamentos de trocas gasosas promoveram alterações anatômicas na estrutura foliar de *P. guineense*. A utilização de tampas com membranas permeáveis a gases ocasionou diferenças na estrutura celular do limbo foliar e da nervura mediana das folhas de *P. guineense* (Figura 3). No sistema convencional de cultivo, utilizando frascos vedados com tampas SM, observou-se que as células epidérmicas em ambas as faces da folha, apresentaram formato irregular, uniestratificada, com sinuosas ondulações ao longo

da lâmina foliar (Figura 3A, 3D e 3E). As alterações mais evidentes na estrutura celular da epiderme foram observadas no tratamento 1M, com alterações morfológicas na camada de cera epicuticular em ambas as faces da folha, as quais apresentaram-se rugosas dando aspecto sinuoso às células epidérmicas (Figura 3I, 3L e 3M). Além disso, na epiderme da lâmina foliar, observou-se, em ambas as faces da folha, precipitação de cristais de oxalato de cálcio, predominantemente na face abaxial do limbo foliar no tratamento 1M (Figura 3M). As folhas de *P. guineense* apresentam-se anfi-hipoestomática para os acessos Y93 (Figura 3B, 3C, 3D, 3E, 3G, 3H, 3J, 3K, 3R e 3S) e Y95, com estômatos predominantemente do tipo paracítico (Figura 3B-3E, 3G, 3H, 3J, 3K, 3M, 3P, 3R, 3S, 3U e 3Y). Entretanto, as folhas do acesso Y97 demonstraram-se hipoestomática (Figura 3L, 3M, 3O, 3P, 3T, 3U, 3X e 3Y). Os estômatos apresentaram-se de forma mais arredondada no tratamento SM (Figura 3B-3E, 3G e 3H), e a medida que aumentou as $TTCO_2$ os estômatos foram se tornando mais elípticos (Figura 3J, 3K, 3M, 3P, 3R, 3S, 3U e 3Y) e encontram-se levemente acima do nível das demais células epidérmicas (Figura 3B-3E, 3H, 3J, 3K, 3M, 3P, 3Q, 3R, 3S, 3U e 3Y).

No tratamento SM, o mesofilo apresentou-se de forma heterogênea com estrutura dorsiventral, sendo observado células de formato irregular, com maiores espaços intercelulares e maior desorganização dos parênquimas clorofilianos, estando estes frouxamente distribuídos, com o parênquima paliçádico descaracterizado, com menor diferenciação entre os parênquimas paliçádico e lacunoso, quando comparado com as mesmas células de plantas cultivadas em frascos vedados com tampas com membranas, principalmente com 1M (Figura 3A e 3I). No tratamento, com 2M, também foram detectadas desorganização dos parênquimas clorofilianos e espaços intercelulares aparentes, porém com menor intensidade (Figura 3Q). O tratamento 1M, resultou na produção de folhas com mesofilo dorsiventral característico, apresentando diferenciação dos parênquimas clorofilianos, além de grande quantidade de amido nestas células (Figura 3I).

Cavidades secretoras foram observadas ao longo da lâmina foliar (Figura 3). Essas estruturas possuem epiderme secretora unisseriada, lúmen isodiamétrico e localizaram-se adjacentes a ambas as faces da epiderme de todos os tratamentos (Figura 3).

Em relação à nervura mediana, observou-se que as plantas crescidas em frascos vedados com tampas SM apresentaram tecidos de suporte menos desenvolvidos, com poucas camadas de células colenquimáticas (uma na face adaxial e duas na face abaxial), apresentando células nos parênquimas clorofilianos de formato irregular e sistema vascular

desorganizado, exibindo uma organização típica de células e tecidos encontrados em plantas crescidas heterotroficamente (Figura 3F). Entretanto, quando as plantas de *P. guineense* foram submetidas às condições de trocas gasosas, houve um maior desenvolvimento dos tecidos de suporte, apresentando uma a duas camadas de colênquima na face adaxial e duas a três camadas na face abaxial da folha (Figura 3N e 3V). Observou-se também variação no tamanho da nervura mediana e na disposição e arranjo celular nos tratamentos 1M e 2M (Figura 3N e 3V). Nas plantas cultivadas em recipientes vedados com 1M, foi observada nervura mediana menor, em comparação com as folhas de plantas cultivadas em recipientes vedados com 2M (Figura 3N), apresentando arranjo celular mais organizado, quando comparado aos sistemas convencionais de cultivos (SM) (Figura 3F). Porém, o tratamento 2M apresentou estrutura celular mais desenvolvida, principalmente do sistema vascular (Figura 3V).

O arranjo dos feixes vasculares foi do tipo bicolateral, de contorno biconvexo (Figura 3F e 3N). No entanto, o tratamento 2M apresentou arranjo do tipo anficrival (Figura 3V). Fibras esclerenquimáticas foram observadas nos tratamentos 1M e 2M, circundando parcialmente os feixes vasculares, formando uma única camada ((Figura 3N e 3V).

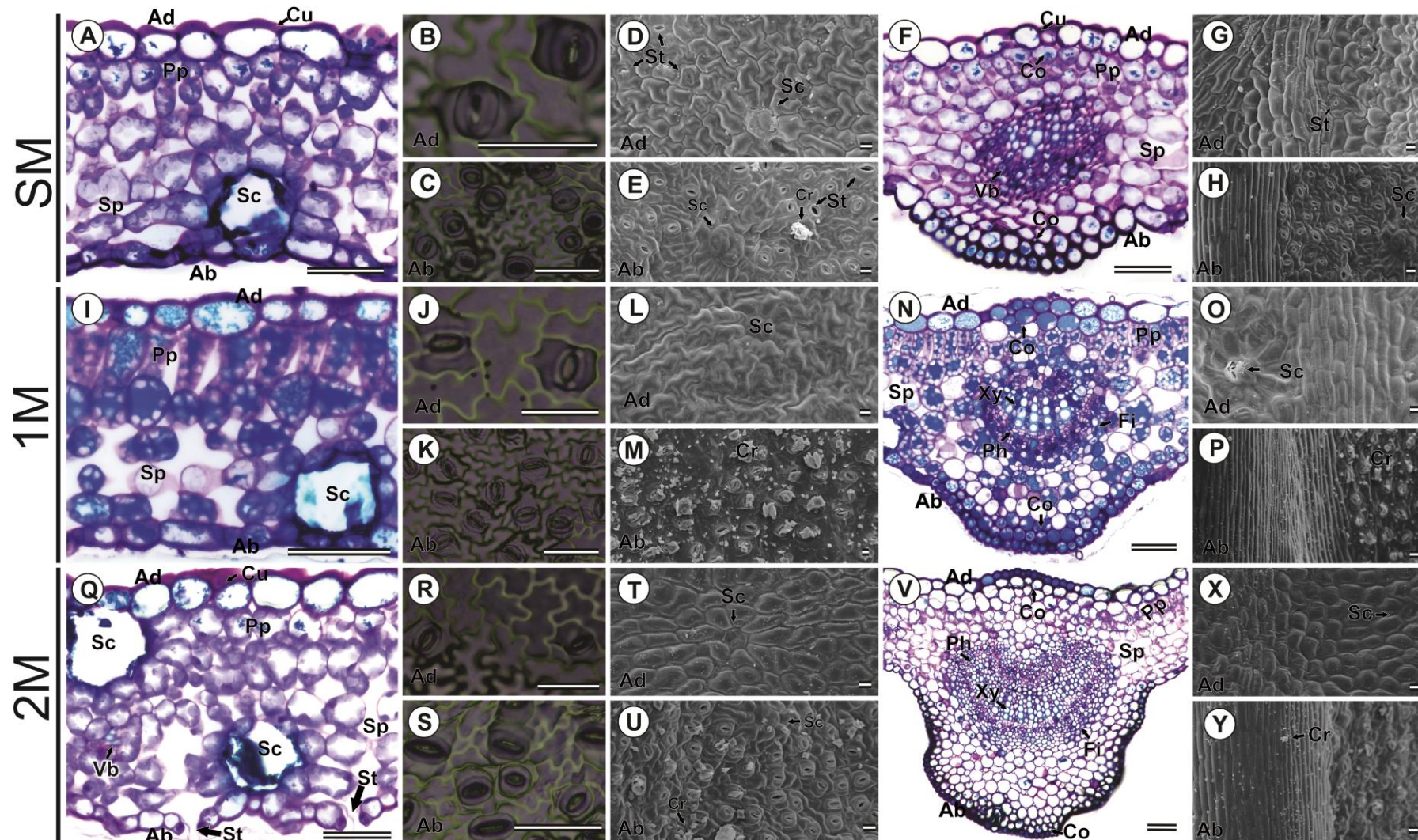


Figura 3. Cortes transversais da secção mediana (A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, O, P, Q, T, U, V, X e Y) e impressão epidérmica (A, C, J, K, R e S) de folhas de *Psidium guineense* (acesso Y93), crescidas *in vitro* por 110 dias, sob diferentes níveis de trocas gasosas: SM: Tampas

rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 μL L⁻¹ s⁻¹]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 μL L⁻¹ s⁻¹]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 μL L⁻¹ s⁻¹], sob irradiância de 41 μmol m.⁻² s.⁻¹. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Cu: cutícula; Cr: cristais; Pp: parênquima paliçádico; Sp: parênquima lacunoso; Sc: cavidade secretora; Co: colênquima; Tr: tricomas; Fi: feixes vasculares; Xy: xilema; Ph: floema; St: estômato. Microscopia deluz - Barra = 50 μm e microscopia eletrônica de varredura - Barra = 10μm.

3.2.2. Estudos histoquímicos de secções de folhas de *P. guineense*

Os testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva nas células do limbo foliar e da nervura mediana das secções medianas de folhas de *P. guineense* crescidas sob os diferentes tratamentos de trocas gasosas (Figura 4). A presença de grãos de amido foi evidenciada somente nas folhas de plantas do tratamento 1M, presente nas células parenquimáticas clorofilianas do mesofilo e da nervura mediana (Figura 4.3 e 4.4). Polissacarídeos e proteínas foram detectados em todos os tratamentos de trocas gasosas, porém, com maior intensidade de coloração no tratamento 1M, sendo detectado principalmente nas paredes celulares e no citoplasma das células do limbo foliar e nervura mediana (Figura 4.9, 4.10, 4.15 e 4.16). Substâncias lipídicas foram evidenciadas pelos testes de Sudan Black B (Figura 4.21-4.24) e Vermelho neutro somente nos tratamentos 1M e 2M, estando presente na constituição da cutícula delgada do limbo foliar e nervura mediana, e nas paredes das cavidades secretoras do limbo foliar no tratamento 1M e da nervura mediana do tratamento 2M. Pectinas foram detectadas na epiderme das células do limbo foliar e nervura mediana de todos os tratamentos de troca gasosa, não havendo uma nítida diferenciação entre os tratamentos (Figura 4.25–4.30).

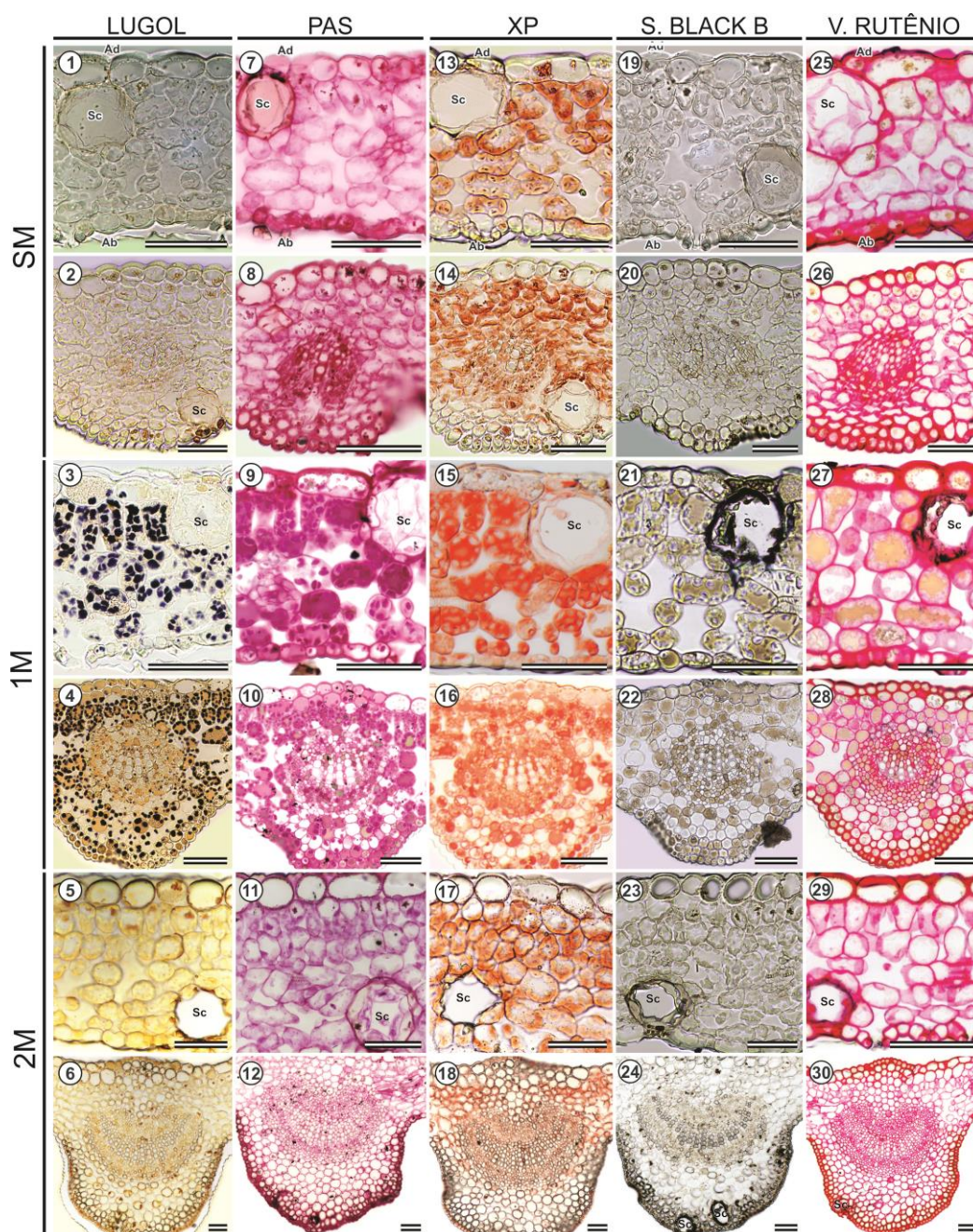


Figura 4. Estudo histoquímico de secções transversais da porção mediana de folhas de *Psidium guineense* (acesso Y93), crescidas in vitro por 110 dias, sob os diferentes níveis de trocas gasosas e irradiância de 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO_2 (TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Lugol: coloração roxa ou negra, evidenciando amido (3 e 4); Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS): coloração magenta, evidenciando polissacarídeos neutros (7-12); Xylidine Ponceau (XP): coloração avermelhada, evidenciando proteínas (13-18); Sudan Black B: coloração negra, evidenciando lipídios totais (21-24); Vermelho de rutênio: coloração rosa, evidenciando pectinas (25-30). Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Sc: cavidade secretora. Barra = 50 μm .

2.3.2.3. Estudos anatômicos de secções de folhas de *P.guajava*

Para a goiabeira também foram observadas mudanças anatômicas na estrutura foliar das plantas cultivadas *in vitro* sob os diferentes tratamentos de trocas gasosas. A utilização de tampas com membranas permeáveis a gases ocasionaram diferenças na estrutura celular do limbo foliar e da nervura mediana das folhas de *P. guajava* comparado ao sistema convencional de cultivo *in vitro* SM (Figura 5).

No sistema convencional de cultivo, utilizando frascos vedados com tampas SM, observaram-se células epidérmicas uniestratificadas de formato irregular em ambas as faces da folha, mesofilo heterogêneo, dorsiventral, porém, descaracterizado, apresentando vários espaços intercelulares, células de diferentes formatos, parênquima paliçádico uniestratificado e pouco diferenciado do parênquima lacunoso (Figura 5A), como observado acima para *P. guineense* nestas mesmas condições de cultivo. Entretanto, quando as plantas foram crescidas com membranas permeáveis a gases, as células epidérmicas apresentaram-se mais definidas em ambas as faces da folha, contendo menos espaços intercelulares e maior diferenciação entre o parênquima paliçádico e lacunoso nas células do mesofilo, principalmente nas plantas crescidas sob 2M (Figura 5I).

Nas plantas crescidas sob 1M, foram detectadas desorganização dos parênquimas clorofilianos, assimetria nas células parenquimáticas e espaços intercelulares aparentes, principalmente entre as células do parênquima lacunoso, porém com menor intensidade, comparado ao sistema convencional de cultivo (Figura 5E).

Diferentemente do observado em *P. guineense*, o tratamento 2M resultou na produção de folhas com melhor arranjo celular e diferenciação dos parênquimas clorofilianos, apresentando as células do parênquima paliçádico alongadas anticlinalmente, justapostas, com um a dois estratos celulares e com menores espaços intercelulares nas células parenquimáticas clorofilianas, principalmente entre as células do parênquima paliçádico (Figura 5I).

Cavidades secretoras encontraram-se distribuídas ao longo de toda a extensão da lâmina foliar, indistintamente adjacentes às faces adaxial e abaxial, entre as células do parênquima clorofiliano de todos os tratamentos de trocas gasosas (Figura 5A, 5C, 5D, 5E, 5H e 5I).

As folhas foram caracterizadas do tipo anfi-hipoestomática (Figura 5B, 5C, 5F, 5G, 5J e 5K) com estômatos predominantemente do tipo paracítico e encontraram-se

ligeiramente acima do nível das demais células epidérmicas (Figura 5A-5H, 5J e 5K). Observaram-se variações no formato dos estômatos, sendo mais arredondados sob o tratamento SM (Figura 5B e 5C) e à medida que aumentou as TT CO_2 tornaram-se mais elípticos (Figura 5F, 5G, 5J e 5K), como observado em *P.guineense*.

Na nervura mediana, observou-se no tratamento SM, tamanho reduzido e estrutura diferenciada, com os tecidos de sustentação pouco desenvolvidos (menor formação de células colenquimáticas), exibindo uma organização típica de células e tecidos encontrados em plantas crescidas heterotroficamente (Figura 5D), como observado em *P.guineense* sob estas mesmas condições de cultivo.

Os feixes vasculares encontraram-se descaracterizados, sem uma nítida distinção do arranjo e disposição dos feixes e fibras (Figura 5D). Entretanto, o crescimento de plantas de *P. guajava* sob membranas permeáveis a gases, resultou na produção de folhas com maior nervura mediana, maior grau de organização e diferenciação celular, maior formação de tecidos de suporte, apresentando células dos feixes vasculares melhor organizadas, com arranjo dos feixes vasculares do tipo anficrival de contorno biconvexo no tratamento SM e convexo para os tratamentos 1M e 2M (Figura 5D, 5H e 5L). Foram observadas fibras esclerenquimáticas circundando os feixes vasculares apenas nos tratamentos 1M e 2M (Figura 5H e 5L). Porém, o tratamento 2M resultou em tecidos de suporte e vascular mais desenvolvidos, formando duas a três camadas de colênquima e três a quatro camadas de esclerênquima (Figura 5L).

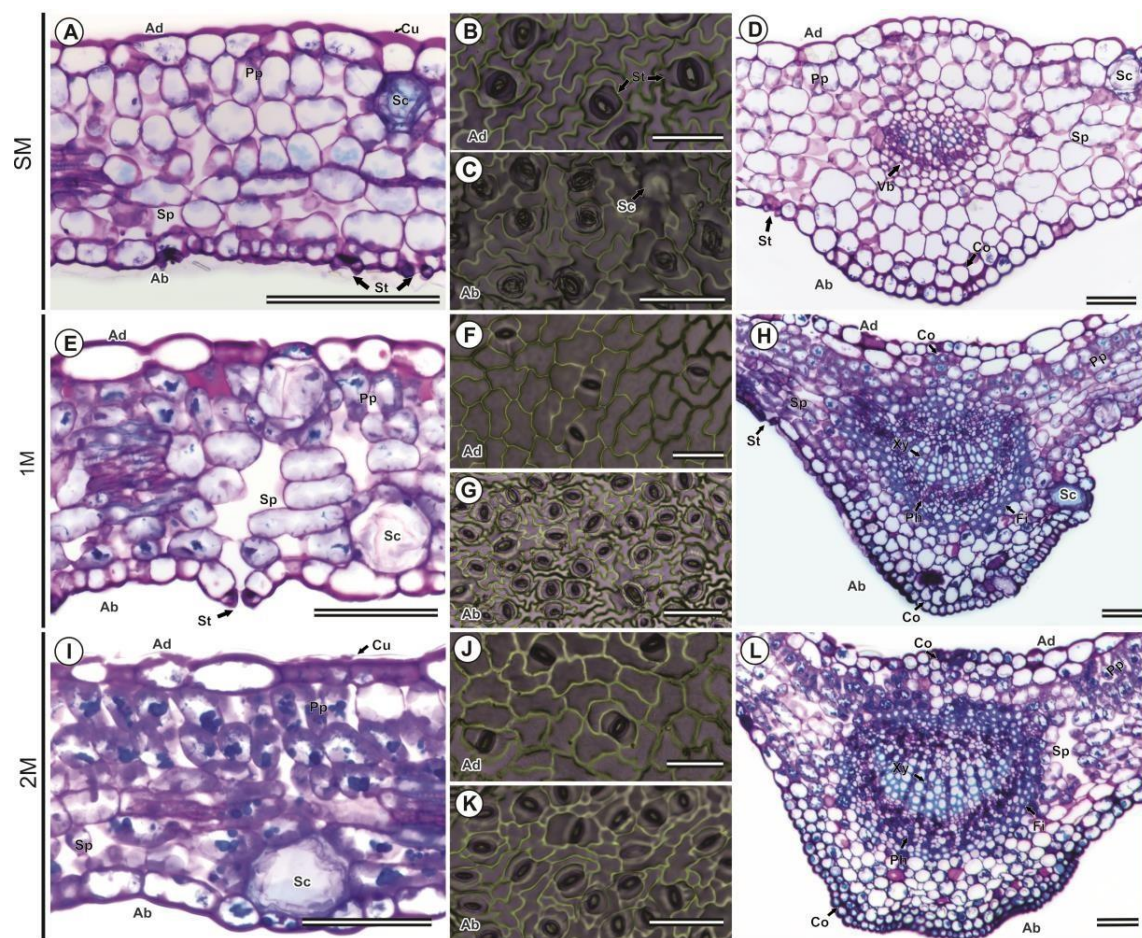


Figura 5. Cortes transversais da secção mediana (A, D, E, H, I e L) e impressão epidérmica (B, C, F, G, J e K) de folhas *Psidium guajava*, crescidas in vitro por 110 dias, sob diferentes níveis de trocas gasosas: SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$], sob irradiância de 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Cu: cutícula; Pp: parênquima paliçádico; Sp: parênquima lacunoso; Sc: cavidade secretora; Co: colênquima; Fi: feixes vasculares; Xy: xilema; Ph: floema; St: estômato. Barra = 50 μm .

3.2.4. Estudos histoquímicos de secções de folhas de *P. guajava*

Na caracterização histoquímica dos cortes transversais das secções medianas das folhas de *P. guajava*, crescidas sob os diferentes tratamentos de trocas gasosas, também foram detectadas variações na presença de compostos de reserva nas células do limbo foliar e da nervura mediana (Figura 6). Grãos de amido foram detectados apenas no

tratamento 2M, corando as células parenquimáticas do mesofilo e em menor intensidade as células da nervura mediana (Figura 6.5 e 6.6). Parapolissacarídeos, pectinas e proteínas, os testes foram positivos para todos os tratamentos, corando principalmente as paredes celulares (polissacarídeos e pectinas) e o citoplasma das células (proteínas) do mesofilo e nervura mediana, porém, com maior intensidade de coloração no tratamento 2M (Figura 6.11, 6.12, 6.23, 6.24, 6.29 e 6.30). Sudan black B (Figura 6.15-6.18) e vermelho neutro reagiram positivamente apenas para os tratamentos 1M e 2M, sendo detectadas substâncias lipídicas na constituição da cutícula delgada do limbo foliar e nervura mediana, não havendo diferenciação na intensidade de coloração entre estes dois tratamentos. Lipídeos foram detectados também na epiderme secretora das cavidades pelo teste Sudan black B no tratamento 1M (Figura 6.16).

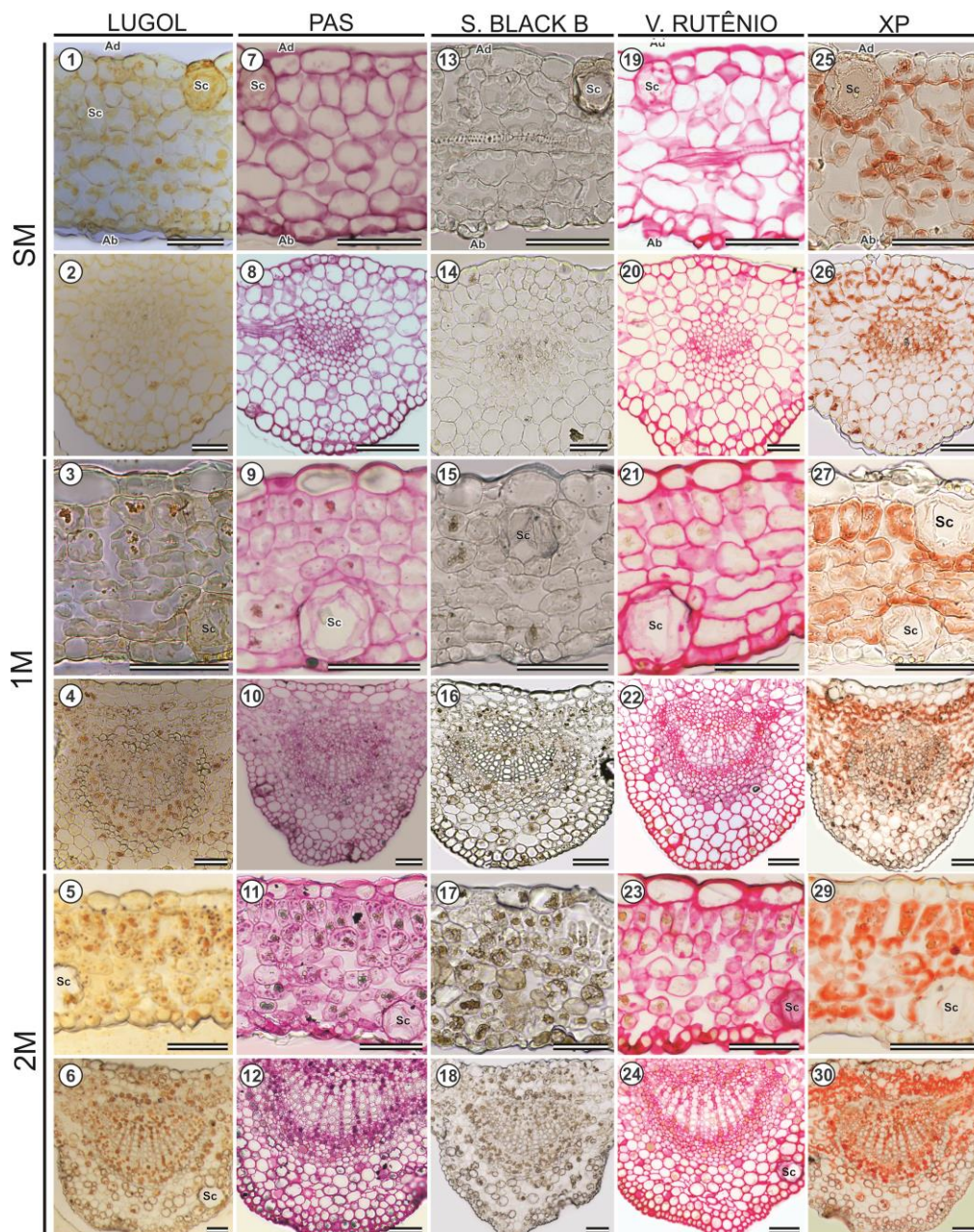


Figura 6. Estudo histoquímico de secções transversais da porção mediana de folhas de *P. guajava*, cv. Paluma (GP), crescidas in vitro por 110 dias, sob diferentes níveis de trocas gasosas e irradiância de $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. SM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO_2 (TTCO₂): $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 1M: TRP com uma membrana [TTCO₂: $21 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]; 2M: TRP com duas membranas [TTCO₂: $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Lugol: coloração roxa ou negra, evidenciando amido (5 e 6); Ácido periódico/reagente de Schiff (PAS): coloração magenta, evidenciando polissacarídeos neutros (7-12); Sudan Black B: coloração negra, evidenciando lipídios totais (15-18); Vermelho de rutênio: coloração rosa, evidenciando pectinas (19-24); Xylidine Ponceau (XP): coloração avermelhada, evidenciando proteínas (25-30). Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; Sc: cavidade secretora. Barra = $50 \mu\text{m}$.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve pela primeira vez o efeito de trocas gasosas no crescimento *in vitro* de plântulas de *P. guineense* (acessos Y93, Y95 e Y97) e *P. guajava* (cv. GP). O sistema de propagação *in vitro*, utilizando recipientes de cultivo fechados com tampas sem membrana (SM), uma membrana (1M) e duas membranas (2M) comerciais MilliSeal® permeáveis a gases, com taxas de trocas de dióxido de carbono (TTCO₂) de 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ (SM), 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ (1M) e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ (2M), resultaram em diferenças significativas nos parâmetros morfofisiológicos, estruturais e histoquímicos de plântulas de *Psidium* spp., interferindo no seu crescimento e posterior aclimatização *ex vitro*.

As técnicas de propagação *in vitro* convencionais, sob condições heterotróficas, em que as plantas são cultivadas em ambientes fechados SM, previnem a desidratação das culturas e do meio de cultivo e evita contaminações por microorganismos (SALDANHA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2013). No entanto, neste tipo de sistema de cultivo, ocorrem reduzidas trocas gasosas, alta umidade relativa, elevadas concentrações de etileno, reduzidas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) e dificuldades na absorção de água e nutrientes pelos explantes, podendo causar redução nas taxas de crescimento dos mesmos (NGUYEN e KOZAI, 2005; XIAO et al., 2011; SHIN et al., 2014), como observado para as plantas do acesso de araçá Y93, que apresentaram reduzido crescimento nestas condições de cultivo (Tabela 2).

As plântulas dos acessos de araçá Y95 e Y97, quando submetidas ao crescimento em ambiente SM, nem completaram seu crescimento, pois ocorreu amarelecimento e clorose das folhas, seguido de senescência e morte, promovendo também a morte de 80% das plantas da cv. GP. Estes fatos estão possivelmente associados à fitotoxidez causada pelas altas concentrações de etileno no ambiente interno do recipiente de cultivo, demonstrando que estes genótipos são sensíveis a este fitormônio. Rodrigues et al. (2012) na propagação *in vitro* de *Azadirachta indica* pelas técnicas convencionais, também observaram amarelecimento, clorose e senescência foliar, sendo este fato atribuído ao acúmulo de etileno no ambiente interno do recipiente de cultivo. O etileno é sintetizado *in vitro* por cultura de tecidos, em resposta a condições de estresse (YASMIN et al., 2014) e, pode estimular ou inibir o crescimento das plantas (BIDDINGTON, 1992).

Por outro lado, a alta taxa de mortalidade observada nas plantas dos acessos de araçá Y95 e Y97 e da cv. GP, quando crescidas em frascos SM, evidenciam a variabilidade

genética existente entre os acessos da mesma espécie e entre genótipos de espécies diferentes, demonstrando que cada acesso/ou genótipo, apresenta sua capacidade de resposta frente às situações de estresse às quais são submetidas.

A utilização de membranas permeáveis a gases sobre a tampa dos recipientes de cultivo, em sistemas mixotróficos, pode aumentar a concentração de CO₂ no ambiente interno do recipiente de cultivo durante o fotoperíodo, diminuir as concentrações de etileno e os níveis de umidade relativa, aumentando a transpiração e a absorção efetiva de água e nutrientes pelas plantas, resultando em maior fotossíntese e, conseqüentemente, maior taxa de crescimento e melhoria no processo de aclimatização *ex vitro* (KITAYA et al., 2005; IVANOVA e STADEN, 2010, XIAO et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado os benefícios do aumento das taxas de ventilação nos frascos com o uso de membranas permeáveis a gases, resultando em plantas maiores e mais vigorosas, com maior área foliar, maior acúmulo de biomassa, maior biossíntese de pigmentos fotossintéticos e estômatos normais (LUCCHESINI et al.; 2006; RIBEIRO et al., 2009; ARIGITA et al., 2010; KOZAI, 2010; BADR et al., 2011; IAREMA et al., 2012; BATISTA, 2012; SALDANHA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; SALDANHA et al., 2013; SALDANHA et al., 2014; RIOS, 2014, SHIN et al., 2014; PINHEIRO, 2014). Corroborando com os dados desta pesquisa, particularmente o acesso de arará Y93, que ao aumentar as T_{TCO₂} de 14 µL L⁻¹ s⁻¹ (SM) para 21 (1M) e 25 µL L⁻¹ s⁻¹ (2M), apresentou um aumento significativo para todas as variáveis de crescimento avaliadas, principalmente para área foliar, que obteve um aumento de mais de seis vezes. Dessa forma, a manutenção de concentrações de CO₂ dentro de um recipiente de cultura desempenha um papel essencial no crescimento da planta, em especial no aumento da área foliar (SALDANHA et al., 2013), demonstrando que o crescimento foliar é altamente sensível à disponibilidade de CO₂ (VYAS e PUROHIT, 2006).

Diferente do observado no presente trabalho, na propagação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, a maioria das características não foram influenciadas pelos ambientes com e sem trocas gasosas (GALO, 2014). Em *Pfaffia glomerata*, maior número de folhas foi notada em frascos sem membranas (SALDANHA et al 2012). Em *Solanum tuberosum* (MOHAMED e ALSADON, 2010) e *Herreria salsaparilha* (GONÇALVES et al., 2008), foram observados menor crescimento, menor número de nó e menor massa fresca, quando as plantas foram crescidas em ambiente ventilado, porém, a massa seca de mudas cultivadas em vasos ventilados foi maior. Segundo Mohamed e

Alsadon (2010), o maior peso seco das plântulas em recipientes ventilados pode estar relacionado ao aumento da concentração de CO₂ que proporciona uma maior atividade fotossintética das plântulas.

O arejamento da cultura em frascos com membranas comerciais MilliSeal® favoreceu o crescimento de plântulas de araçá e goiaba, porém, mesmo havendo variação na responsividade genotípica frente às variáveis testadas sob TTCO₂ de 21 e 25 µL L⁻¹ s⁻¹, para os acessos de araçá, no geral, o sistema com maior TTCO₂ apresenta as melhores médias de crescimento e de pigmentos fotossintéticos para todos os genótipos, principalmente, para as plantas da cv. GP, que mostraram maior área foliar, comprimento de parte aérea, e maior acúmulo de massa fresca de parte aérea e raiz e massa seca de parte aérea, nestas condições de cultivo (Tabela 2). A mesma tendência foi observada em *P. glomerata* (SALDANHA et al., 2012) e em *Capsicum annuum* (BATISTA, 2012), indicando a importância do aumento das trocas gasosas no crescimento *in vitro*. O maior estímulo de crescimento pode estar relacionado a uma melhor nutrição das plantas com o aumento das trocas gasosas *in vitro*, promovendo um maior transporte de íons absorvido a partir do meio de cultura e, com base no fluxo da seiva, que é estimulada com a diminuição da umidade relativa no ambiente interno do recipiente de cultivo, devido à perda de água por transpiração (SALDANHA et al., 2012). Acredita-se que um aumento da transpiração nas folhas das plantas é necessário para que ocorra o transporte de nutrientes na seiva do xilema em longas distâncias (TANNER e BEEVERS, 2001).

Assim, a propagação *in vitro* com ventilação natural, utilizando membranas permeáveis a gases, resulta em maior aumento do crescimento e das taxas fotossintéticas das plântulas, desde que a concentração de CO₂ seja adequada (KOZAI, 2010). Entretanto, o fluxo máximo de gás de uma cultura é dependente das taxas requeridas pelos tecidos para o desenvolvimento das suas atividades metabólicas normais (JACKSON, 2003), sendo a TTCO₂ ótima dependente de cada espécie ou genótipo dentro de cada espécie. TTCO₂ acima do máximo requerido para cada espécie pode inibir o crescimento das plântulas, como observado para *Simmondsia chinensis* (MILLS et al., 2004), *H. salsaparilha* (GONÇALVES et al., 2008) e *Ruta graveolens* (RIOS, 2014) que o desenvolvimento das plântulas não foi diretamente proporcional ao aumento dos níveis de ventilação, sendo necessárias taxas de trocas de CO₂ intermediárias para atingir o crescimento desejado. Rios (2014), na propagação *in vitro* de *R. graveolens*, obteve maior crescimento das plântulas, sob 1 M, com TTCO₂ de 21 µL L⁻¹ s⁻¹.

Os pigmentos fotossintéticos são considerados bons indicadores do estado funcional do aparato fotossintético das plantas (ALVAREZ et al., 2012). Níveis reduzidos de CO₂ e alta umidade relativa no recipiente de cultivo durante o fotoperíodo inibem a eficiência fotossintética da planta, resultando num saldo líquido negativo de absorção de CO₂ por dia (MARTINS et al., 2015), reduzindo assim, as taxas fotossintéticas das folhas das plantas. Dessa forma, para aumentar a atividade fotossintética das plantas, é necessário aumentar a concentração de CO₂ e reduzir a umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo, aumentando a ventilação (KOZAI et al 2005;. ZOBAYED 2005), e maior ventilação nos recipientes de cultivo, promove um maior desenvolvimento do aparato fotossintético e aumenta os teores de clorofila, consequentemente, aumenta as taxas fotossintéticas (HAZARIKA, 2006).

Várias pesquisas têm demonstrado que a biossíntese de pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas crescidas *in vitro* é reforçada pelo aumento das taxas de ventilação, utilizando membranas permeáveis a gases nas tampas dos recipientes de cultivo (IVANOVA e STADEN, 2010; MOHAMED e ALSADON, 2010; SALDANHA et al., 2012, BATISTA, 2012; RIOS, 2014; PINHEIRO, 2014). Entretanto, os níveis ideais de ventilação são dependentes da espécie ou genótipo dentro da mesma espécie. Maior estímulo na produção das clorofilas *a*, *b* e carotenoides em plântulas de *R. graveolens*, foram obtidos em ambiente com 1M (RIOS, 2014). Contrário, ao reportado por Batista (2012) para plântulas de *C. annuum*, em que maior biossíntese dos pigmentos fotossintéticos foi observada sob 2M. Por outro lado, em *P. glomerata*, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos 1M e 2M para clorofilas *a*, *b* e carotenoides (IAREMA et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, para os acessos de arará Y93 e Y97. Porém, para a cv. GP, com o aumento da T_{TCO₂} houve um aumento significativo do conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, principalmente para clorofila *a* e clorofila total, coincidindo com as maiores taxas de crescimento das plantas sob estas condições de cultivo. Dessa forma, a concentração de CO₂ atmosférico é limitante para o crescimento da planta e o fluxo de CO₂ deve ser o máximo para ser alcançada uma máxima taxa fotossintética (KHAN et al. 2011), dentro do ótimo de cada espécie.

Os níveis de trocas gasosas nos recipientes de cultivo conduziram a alterações na anatomia foliar das plantas de *P. guineense* e *P. guajava* crescidas *in vitro*. Na propagação *in vitro* convencional, são produzidas plântulas com características anatômicas

desfavoráveis ao crescimento, tais como: epiderme irregular; maiores espaços intercelulares no mesofilo; reduzida diferenciação entre o parênquima paliádico e lacunoso do mesofilo e dos tecidos vasculares; reduzida deposição de cera cuticular e epicuticular nas folhas; resultando em uma estrutura mais delgada, com reduzida resistência mecânica (colênquima e esclerênquima) e estômatos não funcionais (RIBEIRO et al., 2009; MOHAMED e ALSADON, 2010; IVANOVA e STADEN 2010; ALVAREZ et al., 2012; SALDANHA et al., 2013; SHIN et al., 2014), como observado no presente trabalho para as folhas de *P. guineense* e *P. guajava*, tornando-se mais susceptíveis a sofrer danos mecânicos. Em contraste, estudos anatômicos de folhas de plantas cultivadas *in vitro*, com maiores TTCO₂ tem demonstrado maior espessura da cutícula, células e espaços intercelulares menores, mesofilo heterogêneo, com parênquima paliádico e lacunoso mais definidos e tecidos vasculares mais desenvolvidos (RIBEIRO et al. 2009; MOHAMED e ALSADON, 2010; IAREMA et al., 2012; SHIN et al., 2014; RIOS, 2014), corroborando com os resultados obtidos para folhas de *P. guineense*, principalmente sob 1M (Figura 3I-3P) e para *P. guajava* sob 2M (Figura 5I-5L).

O sistema de ventilação natural atua de forma positiva na maioria das características de crescimento e de anatomia foliar, que são diretamente relacionados aos processos fotossintéticos, promovendo o crescimento das plantas sob estas condições (SILVA et al., 2014). Mesofilo mais desenvolvido apresenta uma maior diferenciação celular (FRESCHI et al., 2010), proporcionando uma maior eficiência fotossintética e, conseqüentemente, maior acúmulo de biomassa (ARAUJO et al., 2009), como observado no presente trabalho, principalmente para a cv.GP.

O colênquima e esclerênquima fornecem suporte mecânico para os tecidos das plantas. Estas estruturas proporcionam rigidez em folhas e oferecem proteção de estruturas específicas como feixes vasculares pelo esclerênquima e epiderme da nervura mediana pelo colênquima. No presente trabalho, observou-se maior formação de colênquima e esclerênquima em folhas crescidas em recipientes com membranas permeáveis a gases, onde houve uma maior estruturação e desenvolvimento da nervura mediana e do sistema vascular. Estes resultados foram semelhantes aos observados em folhas de *Billbergia zebrina* para esclerênquima (MARTINS et al 2015) e em folhas de *P. glomerata* para colênquima (IAREMA et al., 2012) em que nos recipientes com ventilação resultaram em maior formação destas estruturas.

Assim, o aumento da ventilação nos recipientes de cultura resulta no desenvolvimento de plantas com melhores características anatômicas e morfofisiológicas, se aproximando das características de plantas produzidas sob condições de campo.

São características gerais da família Myrtaceae mesofilo dorsiventral heterogêneo, folhas hipoestomáticas com estômatos anomocíticos e em menor frequência paracíticos, cavidades secretoras, drusas, cristais prismáticos de oxalato de cálcio e feixe vascular do tipo bicolateral (METCALFE e CHALK, 1950). Em folhas de campo de *P. guineense* foram observados mesofilo dorsiventral, com numerosas cavidades secretoras ao longo do mesofilo foliar, folha hipoestomática com estômatos paracítico e feixe vascular bicolateral (FERREIRA et al., 2011). E, para folhas de campo de *P. guayava* são apontados estômatos paracíticos e anomocíticos (TANTAWY, 2004), corroborando com os dados desta pesquisa, em que os estômatos apresentaram-se predominantemente paracítico tanto para *P. guineense* como para *P. guayava*, não sofrendo influência do ambiente de cultivo. A distribuição dos estômatos no acesso Y97 é hipoestomática, com estômatos somente na face abaxial. Os estômatos observados na face adaxial dos demais genótipos podem estar relacionado a uma característica inerente ao próprio genótipo.

Também foi observado que os diferentes níveis de trocas gasosas interferiram no arranjo dos feixes vasculares das folhas das plantas crescidas *in vitro*, onde o arranjo dos feixes vasculares foi do tipo bicolateral somente nas folhas de *P. guineense* crescidas sob 1M. Em contraste, ao observado no presente trabalho, em folhas de *S. melongena* a organização bicolateral de feixes vasculares permaneceu intacta nas diferentes condições de trocas gasosas (RIBEIRO et al., 2009). O que demonstra que esta variação é dependente do genótipo e/ou da espécie.

A função dos cristais de oxalato de cálcio, observados na epiderme da lâmina foliar das plantas de *P. guineense*, crescidas *in vitro* sob os diferentes níveis de trocas gasosas não é completamente claro, mas tem sido relacionado com a regulação de cálcio e outros minerais (VOLK et al., 2002), bem como na proteção contra herbívoros e patógenos (FRANCESCHI e NAKATA 2005; KORTH et al., 2006) e como mecanismo de adaptação fisiológica, uma vez que em altas concentrações, os íons de cálcio são tóxicos às plantas (PAIVA e MACHADO, 2005). A maior precipitação destes cristais em recipientes com 1M pode estar relacionado a uma maior nutrição das plantas neste ambiente de cultivo, proporcionado pelas maiores $TTCO_2$, como citado anteriormente.

Testes histoquímicos têm evidenciado a presença de compostos de reserva em folhas

de plantas crescidas em recipientes com maiores TTCO_2 (RIOS, 2014; PINHEIRO, 2014), como observado no presente trabalho. Em *P. guineense*, grãos de amido foram observados apenas nas folhas das plantas crescidas sob 1M (Figura 4.3 e 4.4). Esta mesma tendência foi observada para polissacarídeos e pectinas, com maior intensidade de coloração sob 1M (Figuras 4.9-4.10 e 4.15-4.16). Já para *P. guajava*, foram evidenciados grãos de amido apenas sob 2M, assim como maior intensidade de coloração para polissacarídeos, pectinas e proteínas, coincidindo com o maior crescimento, melhor estruturação da folha e maior biossíntese de pigmentos fotossintéticos, demonstrando a natureza péctico-celulósica das paredes celulares sob estas condições de cultivo. O aumento em carboidratos observado no tratamento com maior TTCO_2 pode ser explicado pelo aumento das concentrações de CO_2 no ambiente interno do recipiente de cultura (BADR et al., 2011), resultando em atividade fotossintética durante as condições *in vitro* (PINHEIRO, 2014) e maior biossíntese de pigmentos fotossintéticos (SUTHAR et al., 2009). No entanto, para Yoon et al. (2009), em plantas crescidas em recipientes com maiores TTCO_2 a presença de amido ocorre apenas durante a aclimatização *ex vitro*, o que pode ter ocorrido com as plantas de *P. guineense* crescidas sob 2M.

Os estômatos desempenham um papel fundamental na regulação das trocas gasosas e transpiração, influenciando na capacidade fotossintética das plântulas e aclimatização (IAREMA et al., 2012). O número de estômatos e o funcionamento estomático normal são características importantes para a sobrevivência das plantas no processo de aclimatização (RIBEIRO et al., 2009). Em mudas de *S. tuberosum*, maiores índices estomáticos foram observados em recipientes SM (MOHAMED e ALSADON, 2010). Em *R. graveolens*, maiores índice estomático foram observados sob 1M (RIOS, 2014). Já para *S. melongena*, maiores índices estomáticos foram observados em recipientes com trocas gasosas, utilizando 2M (RIBEIRO et al., 2009), demonstrando que é variável de acordo com a espécie. Esta variação foi observada também no presente trabalho, para os acessos de araçá e para a cv. GP (Figura 2B).

Vários trabalhos têm reportado que os estômatos das folhas cultivadas no sistema convencional com baixas trocas gasosas apresentam morfologia alterada, com um formato mais arredondado, enquanto que nas folhas que crescem em recipientes com trocas gasosas, os estômatos apresentam-se de forma mais elíptica (DECCETTI et al., 2008; MOHAMED e ALSADON, 2010; RIOS, 2014; SILVA et al., 2014), corroborando com os dados deste

trabalho, tanto em *P. guineense* (Figura 3B-C, 3J-K e 3R-S) quanto para *P. guajava* (Figuras 5B- C, 5F-G e 5J-K). De acordo com Khan et al. (2003), a forma elíptica é característica de estômato funcional, enquanto que a forma arredondada está frequentemente associada com estômatos que não funcionam normalmente. Em folhas de *Annona glabra* cultivadas no sistema convencional, os estômatos permaneceram abertos após a remoção da tampa do recipiente de cultura, enquanto que os estômatos presentes nas folhas que se desenvolveram sob a ventilação natural fecharam rapidamente quando exposto ao ambiente *ex vitro*, com reduzida umidade relativa, o que indica que as plantas dos sistemas convencionais podem ter problemas que modulam a perda de água durante a aclimatização devido aos estômatos disfuncionais (DECCETTI et al., 2008). Segundo SCHMILDT et al. (2015), em sistemas de propagação *in vitro* com ventilação, a circulação do ar em torno das folhas dos explantes podem tornar os estômatos mais sensíveis à umidade relativa do ar e quando transferidas para condições *ex vitro*, estes podem abrir e fechar de forma mais eficiente e evitar a perda de água em comparação com mudas cultivadas em recipientes fechados. Assim, o aumento da disponibilidade de trocas gasosas melhora a capacidade de regulação da perda de água, favorecendo sua sobrevivência e o crescimento após a transferência para condições *ex vitro* (DECCETTI et al., 2008).

O acúmulo de umidade relativa e altas concentrações de etileno no recipiente de cultivo podem ter promovido nas plantas da cv. GP, um maior índice estomático em ambas as superfícies foliares, menor deposição de cutícula e desenvolvimento de estômatos anormais, podendo ter contribuído com a maior taxa de mortalidade observada no presente trabalho durante a aclimatização. Dessa forma, a funcionalidade aprimorada dos estômatos sob ventilação natural pode prevenir ressecamento excessivo das plantas micropropagadas após o transplante, aumentando as chances de sobrevivência no ambiente natural (DECCETTI et al., 2008).

O uso de tampas com membranas permeáveis a gases tem efeito positivo durante a aclimatização das plantas *ex vitro*, aumentando a taxa de sobrevivência (ALVAREZ et al., 2012), devido ao estímulo da capacidade fotossintética das plantas (KOZAI, 2010; XIAO et al., 2011; ALVAREZ et al., 2012).

No sistema convencional de propagação *in vitro*, podem ocorrer elevadas taxas de mortalidade das plantas durante a fase de aclimatização (PINHEIRO, 2014), como observado no presente trabalho para as plantas da cv. GP. No entanto, o acesso Y93 obteve 100% de sobrevivência das plantas nestas condições de cultivo, podendo estar relacionado a

ganhos morfofisiológicos no período de transferência das condições *in vitro* para *ex vitro* no processo de aclimatização, embora tenha interferido no seu posterior crescimento.

5. CONCLUSÕES

1. Os diferentes níveis de trocas gasosas entre o ambiente interno e externo do recipiente de cultivo influenciam no crescimento e nas características morfofisiológicas, anatômicas e histoquímica de plantas de *Psidium* spp. crescidas *in vitro* e na capacidade de adaptação às condições *ex vitro* no processo de aclimatização;
2. O sistema de propagação *in vitro* convencional SM, interfere negativamente nas características de crescimento, morfofisiológicas, anatômicas, histoquímica e nas taxas de sobrevivência ainda *in vitro* e no processo de aclimatização das plântulas de *P. guineense* (acessos Y93, Y95, Y97) e de *P. guajava* (cv. GP), demonstrando alta sensibilidade a estas condições de cultivo, sendo o grau de sensibilidade genótipo/dependente;
3. O crescimento em função das TTCO_2 de 21 e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ no ambiente de cultura *in vitro* é dependente da característica a ser avaliada, da espécie e do genótipo dentro da mesma espécie;
4. A utilização de membranas permeáveis a gases com TTCO_2 de 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ é indicada para o crescimento e desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *P. guineense* (acessos Y93, Y95, Y97) e de *P. guajava* (cv. GP) para usos futuros em trabalhos de melhoramento genético dessas espécies.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. Anati Quanti: Quantitative Analysis Software for Plant Anatomy Studies. **Planta Daninha**, v. 25, n.4, p. 649 - 659, 2007.

ALI, N.; MULWA, R.M.S.; NORTON, M.A.; SKIRVIN, R.M. Radical disinfestation protocol eliminates *in vitro* contamination in Guava (*Psidium guajava* L.) seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 3, p. 295-298, 2007.

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana*

mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.93-101,2012.

ARAUJO, A.G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L.Y; CASTRO, E.M.; ROCHA, H.S. Qualidade de luz na biometria e anatomia de plântulas *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 39, n.9, p. 2506-2511,2009.

ARIGITA, L.; CAÑAL, M.J.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLEZ, A. CO₂-enrichedmicroenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.46, p.312-322, 2010.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.13-24, 2011.

BATISTA, D.S. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese in vitro de pimenteira ornamental** (*Capsicum annuum* L.). 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 11, n.2, p. 173-187, 1992.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. **Plant tissue culture: an introductory text**. Springer, 2013. p.245-274.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptusurophyllana* multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p.107- 116, 1995.

CRUZ, C.D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DECCETTI, S.F.C.; SOARES, A.M.; PAIVA,R.; CASTRO, E.M. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cell sand water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**, v.117, n. 4, p.341-344, 2008.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p.488-490, 2005.

FERREIRA, P.R.B.; MENDES,C.S.O.; REIS,S.B.; RODRIGUES,C.G.; OLIVEIRA, D.A.; MERCADANTE-SIMOES, M.O. Morphoanatomy, Histochemistry and Phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) Leaves. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 4, p. 942-944, 2011.

FRANCESCHI, V.; NAKATA, P. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual review of plant biology**, v.56, p. 41-71, 2005.

FRESCHI, L.; TAKAHASHI, C.A.; CAMBUI, C.A.; SEMPREBOM, T.R.; CRUZ, A.B.; MIOTO, P.T.; VERSIEUX, L.M.; CALVENTE, A.; LATANSIO-AIDAR, S.R.; AIDAR, M.P.M.; MERCIER, H. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 7, p.526-533, 2010.

GALO, R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *eucalyptus* spp. pela micropropagação**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

GONÇALVES, L.A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, E.A.T.; VENDRAME, W.A.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 92, n.3, p. 243-250, 2008.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105-120, 2006.

IAREMA, L.; CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, n.2, p.227-238, 2012.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, n.2, p.143-150, 2010.

JACKSON, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 29, n.3-4, p. 96-109, 2003.

JAISWAL, V.S.; AMIN, M.N. Guava and Jack fruit. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; Litz, R.E. (Eds.): **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. WALLINGFORD, U.K: CAB International., 1992, p.421-432.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Books: New York, 1940.

KARNOVSKY, M.J.A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.

KHAN, P.S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, v.46, n.2, p.161-166, 2003.

KHAN, T.A.; MAZID, M.; MOHAMMAD, F. Status of secondary plant products under abiotic stress. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.7, n.2, p.75-98, 2011.

KIRK, P.W. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-4, 1970.

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell, Tiss and Organ Cult**, v. 83, n.3, p. 251–257, 2005.

KORTH, K.; DOEGE, S.; PARK, S.; GOGGIN, F.; WANG, Q.; GOMEZ, S.; LIU, G.; JIA, L.; NAKATA, P. Medicago truncatula mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. **Plant Physiology**, v. 141, p.188-195, 2006.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, n.4, p.188-204, 2010.

KOZAI, T.; XIAO, Y.; NGUYEN, Q.T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation systems for large-scale commercialization. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n.1, p. 23-34, 2005.

LIU, X.; YANG, G. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. **International Journal of Plant Biology**, v.2, n.1, p.7–10, 2011.

LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 161-168, 2006.

LUCIANI, G.F.; MARY, A.K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.39-143, 2006.

MARTINS, J. P. R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; PROFT, M. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 1, p. 121-132, 2015.

METCALFE, C.R.; CHALK, R. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, v.1, 1950. 560p.

MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, v.40, p. 386- 402, 2004.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.123, n.3, p.295-300, 2010.

NACHTIGAL, J.C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R.A.; FACHINELLO, J.C.; MAZZINI, A.R.A. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*P. cattleianum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, p.229-235, 1994.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free**

medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Dordrecht: Springer, 2005.p.123-146.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods.** Melbourne: Termarcaphi Pty Ltd, 1981.45p.

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

PAIVA, E.A.S.; MACHADO, S.R. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.1, p.147-153, 2005.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**, v. 2, third ed. London: Churchill-Livingstone 1972.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Melhoramento genético da goiabeira. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Ed.). **Culturada goiaba: do plantio à comercialização.** Jaboticabal: UNESP-FCAV, v. 2, p. 371-398, 2009.

PINHEIRO, M.V.M. **Potencial fotoautotrófico em *Etlingera elatior* 'Porcelana' e embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel': caracterização anatômica e da expressão do gene SERK.** 2014. 129 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v.37, n.1, p.19-29, 2013.

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

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.45, n.4, p.421-428, 2009.

RIOS, A.M.R. **Cultivo in vitro de *Ruta graveolens* (Rutaceae): Efeito de trocas gasosas, de irradiância e de fitorreguladores na morfoanatomia e no metabolismo secundário.** 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

RODRIGUES, M.; COSTA, T.H.F.; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, v.48, n.1, p.67-72, 2012.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal

cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, n.3, p.413-422, 2012.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.M.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L.L.C.; OTONI, W.C. A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, n.4, p.433-444, 2013.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; ROCHA, D.I.; CAVATTE, P.C.; DETMANN, K.D.S.C.; TANAKA, F.A.O.; DIAS, L.L.C.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. CO₂ enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014.

SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v. 55, n.4, p. 356 - 364, 2008.

SCHMILDT, O.; TORRES NETTO, A.; SCHMILDT, E.R.; CARVALHO, V.S.; OTONI, W.C.; CAMPOSTRINI, E. Photosynthetic capacity, growth and water relations in “Golden” papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 1, p. 7-18, 2015.

SHAH, S.T.; ZAMIR, R.; AHMAD, J.; ALI, H.; LUTFULLAH, G. *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of Guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.3, p.1195-1200, 2008.

SHIN, K.; PARK, S.; PAEK, K. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a Doritaenopsis hybrid cultivated in different microenvironments in vitro. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilationsystem. **Revista Ceres**, v. 61, n.6, p. 883-890, 2014.

SUTHAR, R.K.; RATHORE, P.; PUROHIT, S.D. *In vitro* growth and shoot multiplication in *Terminalia bellerica* Roxb under controlled carbon dioxide environment. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, n.3, p.204-209, 2009.

TANNER, W.; BEEVERS, H. Transpiration, a prerequisite for long- distance transport of minerals in plants? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n.16, p. 9443-9447, 2001.

TANTAWY, M.E. Morpho-anatomical study on certain taxa of Myrtaceae. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 3, n.3, p. 274-285,2004.

USMAN, M.; BUTT, M.; FATIMA, B. Enhanced *in vitro* multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.44, p.10182–10187, 2012.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell and Molecular Biology**, v.22, n.1, p.45-64, 1977.

VOLK, G.; LYNCH-HOLM, V.; KOSTMAN, T.; GOSS, L.; FRANCESCHI, V. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, v. 4, n.1, p.34-45, 2002.

VYAS, S.; PUROHIT, S. D. Effect of controlled carbon dioxide on in vitro shoot multiplication in *Feronia limonia* (L.) Swingle. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 28, n. 6, p.605–611, 2006.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.2, p.149-158, 2011.

YOON, Y-J.; MOBIN, M.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.2-3, p.183-188, 2009.

YASMIN, S.; MENSUALI-SODI, A.; PERATA, P.; PUCCIARIELLO, C. Ethylene influences *in vitro* regeneration frequency in the FR13A rice harbouring the SUB1A gene. **Plant Growth Regulation**, v. 72, n. 1, p. 97-103, 2014.

ZOBAYED, S. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Springer, Netherlands, pp 147–186, 2005.

CAPÍTULO III



Micropropagação de *Psidium guineense* Sw. utilizando diferentes tipos de explantes de plântulas germinadas *in* *vitro*

Micropropagação de *Psidium guineense* Sw. utilizando diferentes tipos de explantes de plântulas germinadas *in vitro*

RESUMO. A cultura de tecidos é uma técnica viável na determinação de protocolos de propagação *in vitro* de espécies de difícil multiplicação pelos métodos convencionais de propagação. Assim, objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de micropropagação de *P. guineense*, utilizando diferentes explantes de plântulas germinadas *in vitro*. Foram desenvolvidos os seguintes experimentos: 1) rizogênese, a partir de explantes de parte aérea, induzidos em diferentes concentrações de AIB (0; 2,46; 4,92 e 9,84 μM); 2) multiplicação *in vitro* a partir de explantes caulinares; 3) multiplicação *in vitro* a partir de segmentos apicais e nodais; e 4) organogênese de segmentos foliares e internodais. Para indução das brotações, foram utilizadas diferentes concentrações de BA (0,0; 2,2 e 4,44 μM) e as combinações BA + ANA (2,22 μM BA + 0,054 μM ANA e 4,44 μM BA + 0,054 μM ANA) em meio de cultura JADS. Após 45 dias, avaliou-se enraizamento (%), número de raízes (NR), número de brotações por explante (NB), comprimento de brotações (CP) e massa fresca (MF) e seca (MS) de brotações. Houve enraizamento em todos os tratamentos de rizogênese e o maior NR ocorreu a 0,00 AIB. Observou-se maior NB a 2,22 e 4,44 μM de BA em segmentos caulinares. Houve interação para NB e MF entre os dois fatores no experimento 3. Maior NB e MF foram observados em segmentos nodais a 0,0 BA e a 0,00 e 4,44 μM de BA, respectivamente. Em segmentos apicais, as melhores médias de NB foram observadas com adição de fitorreguladores. Para os segmentos foliares e internodais, não houve organogênese em nenhum dos tratamentos. Os brotos obtidos foram alongados, enraizados e aclimatizados com 100% de sobrevivência. Portanto, este trabalho representa o primeiro protocolo de propagação *in vitro* de *P. guineense* a partir de segmentos caulinares, apicais e nodais.

Palavras-chave: Araçá, Propagação *in vitro*, Multiplicação gemas axilares, Organogênese, Rizogênese, Fitorreguladores.

Micropropagation of *Psidium guineense* Swartz using different types of explants from *in vitro* germinated seedlings

ABSTRACT. Tissue culture is a viable technique for the determination of *in vitro* propagation protocols of species hard multiplication by conventional methods of propagation. Thus, the aim of this study was to establish a protocol for micropropagation of *P. guineense* using different explants from *in vitro* germinated seedlings. The following experiments were carry out: 1) rhizogenesis, from shoot explants induced in different concentrations of IBA (0; 2.46; 4.92 and 9.84 μM); 2) *in vitro* multiplication from stem explants; 3) *in vitro* multiplication from apical and nodal segments; and 4) organogenesis of leaf and internodal segments. For induction of the shoots, were used different concentrations of BA (0.0, 2.2 and 4.44 μM) and BA + ANA combinations (2.22 μM BA + 0.054 μM ANA and 4.44 μM BA + 0.054 μM ANA) in the JADS's culture medium. After 45 days, was evaluated rooting (%), number of roots (NR), shoots number per explant (SN), length of shoots (LS) and fresh matter (FM) and dry (MD) of shoots. There was rooting in all treatments of rhizogenesis and the largest NR was observed in the treatment 0.00 of IBA. The rate higher SN was found in the 2.22 and 4.44 μM of BA in stem segments. There was interaction for SN and FM between the

two factors in the experiment 3. Higher SN and FM were observed in the nodal segments when cultured in medium with 0,0 BA and 0.00 and 4.44 mM of BA, respectively. In apical segments, the best averages of SN were observed with addition of plant hormones. For leaf and internodal segments, no organogenesis was observed in any of the treatments. The shoots obtained were elongated, rooted and acclimatized with 100% survival. So, this work is the first protocol on the *in vitro* propagation of *P. guineense* from stem segments, apical and nodal.

Keywords: Strawberry guava, *In vitro* propagation, Multiplication axillary buds, Organogenesis, Rhizogenesis, Growth regulators.

1.INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos é uma técnica importante que pode ser utilizada na determinação de protocolos de propagação *in vitro* de espécies nativas passíveis de extinção (THAKUR e KARNOSY, 2007) e aos genótipos considerados de difícil multiplicação pelos métodos convencionais de propagação vegetativa (PELEGRINI et al., 2011), a exemplo do araçazeiro (*Psidium* spp.) (NACHTIGAL et al., 1994), uma vez que esta técnica possibilita a rápida multiplicação a partir de um único indivíduo, com alta fidelidade genética, em qualquer época do ano, em tempo e espaço físico reduzido e com maior controle sobre a sanidade do material propagado (THAKUR e KARNOSY, 2007; GEORGE, 2008). Além disso, esta técnica pode acelerar os trabalhos de melhoramento pela multiplicação de clones e pode atuar como base para outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética e a produção de metabólitos secundários (OLIVEIRA et al., 2013).

A micropropagação das espécies florestais brasileiras tem sido realizada basicamente utilizando-se propágulos provenientes de sementes germinadas *in vitro*, dada a dificuldade em se obter material de plantas adultas, livre de microrganismos e de serem responsivas à propagação em condições controladas (OLIVEIRA et al., 2013). Além da vantagem da obtenção de tecidos menos contaminados, a utilização de material juvenil já estabelecido *in vitro* pode ser vantajosa, pois estes tecidos são mais responsivos à aplicação de fitorreguladores (SOUZA et al., 2011). E, potencialmente, podem originar explantes com elevada capacidade de desenvolvimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), logo, esse tipo de explante pode orientar e auxiliar a elaboração de protocolos para posterior aplicação em tecidos de plantas adultas (SOUZA et al., 2011).

A micropropagação *in vitro* pode ser realizada via proliferação de gemas axilares, organogênese adventícia e embriogênese somática (XAVIER et al., 2013). Porém, para

espécies florestais tem sido utilizada com mais frequência a partir de gemas axilares pela maior facilidade, e em menor expressão por organogênese.

A organogênese corresponde à indução de formação de gemas adventícias diretamente sobre o explante ou calo (direta ou indireta, respectivamente), mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, levando à formação de uma planta completa a partir da atividade meristemática em células maduras diferenciadas (XAVIER et al., 2013).

Diversas partes da planta-matriz podem ser utilizadas como fonte de explantes para a regeneração *in vitro*, como segmentos nodais, ápices caulinares, discos foliares (LUCIANI et al., 2006; CAMPOS et al., 2007), segmentos caulinares, dentre outros. No entanto, o sucesso na determinação de protocolos de propagação *in vitro* e o melhor tipo de explante a ser utilizado depende de vários fatores intrínsecos ao material propagativo e ao processo, como genótipo, posição dos explantes, balanço quantitativo dos reguladores vegetais (COSTA et al., 2006), além de outros fatores.

A morfogênese *in vitro* é altamente dependente da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (GEORGE, 2008), como as auxinas e as citocininas.

As citocininas são indispensáveis para a indução da proliferação de gemas axilares, sendo o tipo de citocinina e sua concentração os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009), assim como na indução de gemas adventícias. O 6-benziladenina (BA) corresponde à citocinina mais utilizada nos trabalhos de micropropagação de espécies de Myrtaceae (MOHAMED-YASSEEN et al., 1995; SINGH et al., 2002; SHAH et al., 2008; SOUZA et al., 2007; RAI et al., 2009; SOUZA et al., 2011; USMAN et al., 2012), podendo ser atribuído à capacidade de tecidos vegetais para metabolizar BA mais facilmente de que outros reguladores de crescimento sintético ou a capacidade de BA para induzir a produção de hormônios naturais, tal como zeatina, dentro dos tecidos (MALIK et al., 2005). Além disso, faz-se o uso da ação combinada de BA com pequenas concentrações de ANA (ácido naftalenoacético), como por exemplo na micropropagação de *P. guajava* (RAI et al., 2009; LIU e YANG, 2011), *Ocimum canum* (SAHA et al., 2014) e de *Origanum vulgare* (OANA et al., 2008).

Um outro fator importante na micropropagação de espécies florestais lenhosas é a rizogênese, que consiste no desenvolvimento de raízes adventícias nas partes aéreas, possibilitando o transplântio para o ambiente *ex vitro* (SOUZA e PEREIRA, 2007). A

aplicação exógena de auxinas no meio de cultura sinaliza as células responsivas, simulando o mecanismo hormonal natural das plantas inteiras (SILVA et al., 2007). Em geral, o tipo e concentração de auxina são as variáveis que mais influenciam o enraizamento, sendo as respostas dependentes do material genético (OLIVEIRA et al., 2013). Dentre as auxinas, o ácido indolbutírico (AIB) tem sido muito utilizado em razão da baixa fitotoxicidade aos explantes, proporcionando resultados positivos ao enraizamento *in vitro*, como reportado em espécies da família Myrtaceae (SINGH et al., 2002; NASCIMENTO et al 2008; SHAH, et al., 2008; Rai et al., 2009). Entretanto, até o presente momento, não existem referências de pesquisas realizadas com propagação *in vitro* de araçá, espécie frutíferas que vem sendo utilizada de forma extrativista pelas populações locais em seus ambientes de ocorrência natural e apresenta potencial de usos para diversos fins (SILVA et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005; HAMINIUK et al., 2011; PESSANHA et al., 2011; FERNANDES et. al., 2012; BALISTEIRO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; SANTOS et. al., 2014). Porém, esta espécie está em risco de perda de sua diversidade genética devido aos constantes desmatamentos em suas áreas de ocorrência natural.

Neste contexto, a relevância desses aspectos demonstra a necessidade urgente do estabelecimento de programas voltados à sua conservação, assim como aumentam a necessidade de pesquisas com alternativas de propagação. Assim, objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de micropropagação de *P. guineense*, utilizando diferentes tipos de explantes de plântulas assépticas germinadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da realização do experimento, germinação e desenvolvimento de plântulas

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Para a instalação do experimento utilizou-se sementes do acesso de araçá Y97 (*Psidium guineense* Swartz), pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Juazeiro-BA.

Inicialmente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em etanol 70% por um minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial

(NaOCl) a 1,25% de cloro ativo (Super Globo[®], Rio de Janeiro, Brasil) por 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, 200 sementes foram inoculadas em frascos de 250 mL, vedados com tampas rígidas (dez sementes por frasco), contendo dois discos de papel Germitest[®] reduzidos ao tamanho do diâmetro do fundo do frasco, umedecidos com 5 mL de água destilada, previamente autoclavados. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter) e fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), até a completa germinação (60 dias).

Após a germinação, as plântulas foram transferidas para frascos com capacidade de 350 mL, contendo 60 mL de meio de cultura JADS (CORREIA, et al., 1995), suplementado com 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mgL^{-1} de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar (Merck[®], Alemanha). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$ antes da adição do ágar e, em seguida, autoclavado a 121 °C, 1,1 Pa por 20 min, antes da inoculação das plântulas.

Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm cada) cobertos com membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) (taxa de troca de CO_2 : $25 \mu\text{L L}^{-1}\text{s}^{-1}$) e vedados com filme plástico transparente de cloreto de polivinil (PVC) (Goodyear, São Paulo, Brazil). Estes frascos foram mantidos em sala de crescimento por 90 e 110 dias para o crescimento das plantas, nas mesmas condições citadas acima para germinação.

O meio de cultura e o sistema de vedação (trocas gasosas) dos frascos foram previamente determinados para o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *P. guineense* (dados ainda não publicados).

2.2. Tipo de explante para indução de rizogênese e brotações

Após 90 e 110 dias de crescimento *in vitro* das plantas de *P. guineense*, em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, foram extraídos os explantes para indução das fases de rizogênese, multiplicação e organogênese.

Foram realizados quatro experimentos, um para determinação prévia da rizogênese adventícia a partir de plantas crescidas *in vitro* por 90 dias e três experimentos para indução de brotações, com as plantas crescidas por 110 dias *in vitro*, utilizando segmentos caulinares

na multiplicação *in vitro*, em meio de cultura líquido; segmentos nodais e apicais na indução de brotações e segmentos internodais e seções de folhas na indução de organogênese, ambos os experimentos em meio de cultura semi-sólido.

2.3. Meio de cultura

Todos os experimentos foram conduzidos em meio de cultura JADS, suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, exceto para o meio de cultura líquido, que não foi adicionado ágar. Para indução de raízes adventícias foram adicionados ao meio de cultura diferentes concentrações de AIB (0; 2,46; 4,92 e 9,84 µM) e distribuídos 60 mL em frascos de 350 mL, com seus respectivos tratamentos. Na indução de brotações foram adicionados aos meios de cultura diferentes concentrações de BA (6-benziladenina), de forma isolada (0,0; 2,22 e 4,44 µM) e em associação com ANA (ácido α-naftalenoacético) (2,22 µM de BA + 0,054 µM de ANA e 4,44 µM de BA + 0,054 µM de ANA) e distribuídos 10 mL em frasco Erlenmeyer de 250 mL (Vidrolabor, Paulínia, Brazil) para o meio líquido. Os meios semi-sólidos foram distribuídos 25 mL em placas de Petri esteril de poliestireno cristal (90 x 15 mm; J. Prolab, Brasil) e 60 mL em frascos de vidro com capacidade para 350 mL, nos seus respectivos tratamentos. O pH de todos os meios de cultura foram ajustados para 5,7 ± 0,01 antes da adição do ágar para os meios semi-sólidos e em seguida vedados e autoclavados a 121 °C, 1,1 Pa por 20 min.

2.4. Experimento 1: Indução de rizogênese

Plantas crescidas *in vitro*, aos 90 dias de cultivo, tiveram suas raízes excisadas e parte aérea inoculadas em frascos com o meio de cultura JADS, contendo diferentes concentrações de AIB (0; 2,46; 4,92 e 9,84 µM). Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm cada) cobertos com membranas de 0,45 µm (MilliSeal® AVS-045 Air Vent) (taxa de troca de CO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹) e vedados com filme plástico transparente PVC. Estes frascos foram mantidos em sala de crescimento por 45 dias.

2.5. Experimento 2: Multiplicação *in vitro* utilizando explante caulinar em meio de cultura líquido

Na indução da multiplicação *in vitro* em meio de cultura líquido, segmentos caulinares com cinco pares de gemas axilares da secção mediana das plantas crescidas *in vitro* por 110 dias foram excisados e inoculados horizontalmente em frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo uma lâmina de 10 mL do meio de cultura JADS líquido, suplementado com diferentes concentrações de BA (0,0; 2,2 e 4,44 μM) e BA+ANA (2,22 μM de BA + 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BA + 0,054 μM de ANA). Os erlenmeyers foram selados com filme plástico transparente de PVC, mantidos em mesa agitadora orbital (Tecnal, Piracicaba, Brazil), a 100 rpm, sob imersão contínua e mantidas em sala de crescimento por 45 dias.

2.6. Experimento 3: Multiplicação *in vitro* utilizando explante nodal e apical em meio de cultura semi-sólido

Segmentos nodais e apicais (sem o meristema apical) com aproximadamente 15 mm de comprimento, um par de gemas axilar, foram excisados e inoculados verticalmente em frasco com meio de cultura JADS semi-sólido, suplementado com diferentes concentrações de BA (0,0; 2,2 e 4,44 μM) e BA+ANA (2,22 μM de BA + 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BA + 0,054 μM de ANA). Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm cada) cobertos com membranas de 0,45 μm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) (taxa de troca de CO_2 : 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e vedados com filme plástico transparente de PVC. Estes frascos foram mantidos em sala de crescimento por 45 dias.

2.7. Experimento 4: Indução de organogênese em explantes internodais e secções foliares

Para indução de organogênese, foram utilizados segmentos internodais de aproximadamente 10 mm e segmentos da secção mediana foliar ($\cong 10 \text{ mm}^2$), extraídas do segundo par de folhas (do ápice para a base da planta), inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de BA (0,0; 2,2 e 4,44 μM) e BA+ANA (2,22 μM de BA + 0,054 μM de ANA e 4,44 μM de BA + 0,054 μM de ANA). Os segmentos internodais foram inoculados de forma horizontal e os segmentos foliares com a face abaxial para baixo. As placas foram vedadas com filme plástico transparente de PVC e mantidos em sala de crescimento por 45 dias de cultivo.

As concentrações de AIB, BA e BA + ANA foram determinadas de acordo com as

concentrações utilizadas na propagação *in vitro* de outras espécies da família Myrtaceae (MOHAMED-YASSEEN et al., 1995; ALI e LÜDDERS, 2001; SINGH et al., 2002; SOUZA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; SHAH et al., 2008; BRONDANI et al., 2009; RAI et al., 2009; LIU e YANG, 2011; SOUZA et al., 2011; USMAN et al., 2012).

2.8. Condições de cultivo, avaliações e análises estatísticas

Após a inoculação dos explantes em todos os experimentos, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [quantificada por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter)], fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados porcentagem de enraizamento e número de raízes adventícias para o experimento 1. Para os experimentos 2 e 3 foram avaliados número médio de brotações por explante, comprimento médio de brotações (cm) e massa fresca e seca de brotações (g).

O delineamento experimental utilizado para todos os experimentos foi o inteiramente casualizado. Para indução de rizogênese foram utilizados quatro tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição representada por um frasco com um explante por frasco.

Em relação à multiplicação *in vitro* em meio de cultura líquido, foram utilizados cinco tratamentos e quatro repetições, um Erlenmeyer por repetição com um explante com cinco pares de gemas laterais ($\cong 5$ cm).

A multiplicação *in vitro* em meio semi-sólido com explantes nodais e apicais, e indução de organogênese com segmentos internodais e secções foliares foram arranjados em esquema fatorial 2×5 (2 tipos de explantes e 5 reguladores de crescimento), com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de um frasco com cinco explantes por frasco e uma placa de Petri com dez explantes por placa, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2013). Para os dados de indução de rizogênese, foi realizada análise de regressão para ajustar os modelos aos dados observados.

2.9. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização

Após 45 dias, as brotações obtidas dos experimentos 2, 3 e 4, com tamanho variando de 1 a 3 cm de comprimento, foram excisadas e inoculadas no meio de cultura JADS semi-sólido, sem adição de fitorreguladores, para alongamento e enraizamento, conforme item 2.1. Após 60 dias, quando atingiram de 5 a 7 cm de comprimento, foram submetidas à aclimatização. Nesse processo, as plantas foram transferidas para bandejas plásticas multicelulares, preenchidas com substrato Plantmax[®] HT (Eucatex, Brasil), cobertos com uma câmara transparente de polietileno para manter a alta umidade relativa do ar e foram mantidas em mini-estufa de vidro de aclimatização, com irrigação manual diária. Os sacos foram removidos de forma gradual ao longo de 45 dias, sendo iniciado a partir da segunda semana de aclimatização das plantas multiplicadas, até a sua completa aclimatização.

3. RESULTADOS

3.1. Indução de rizogênese

Na indução de rizogênese em explantes de parte aérea de plântulas de *P. guineense*, houve formação de raízes em todas as concentrações de AIB a partir de oito dias de cultivo (Figuras 1 e 2), e os valores de porcentagem de enraizamento (Figura 1A) e número de brotações (Figura 1B) ajustaram-se ao modelo de regressão quadrático.

Observou-se que 100% dos explantes formaram raízes em todos os tratamentos, exceto para a concentração de 9,84 μ M de AIB, onde apenas 75% das plântulas formaram raízes (Figura 1A). Por outro lado, as diferentes concentrações de AIB interferiram negativamente no número de raízes adventícias nos explantes de *P. guineense*, de modo que ao aumentar as concentrações de AIB até 4,92 μ M, houve uma redução gradual no número de raízes, sendo observado maior número de raízes adventícias em meio de cultura JADS sem adição deste fitorregulador (Figuras 1B e 2A).

As raízes formadas nos meios de cultura com AIB, apresentaram-se mal formadas e com menor formação de raízes laterais e pelos absorventes (Figura 2B a D).

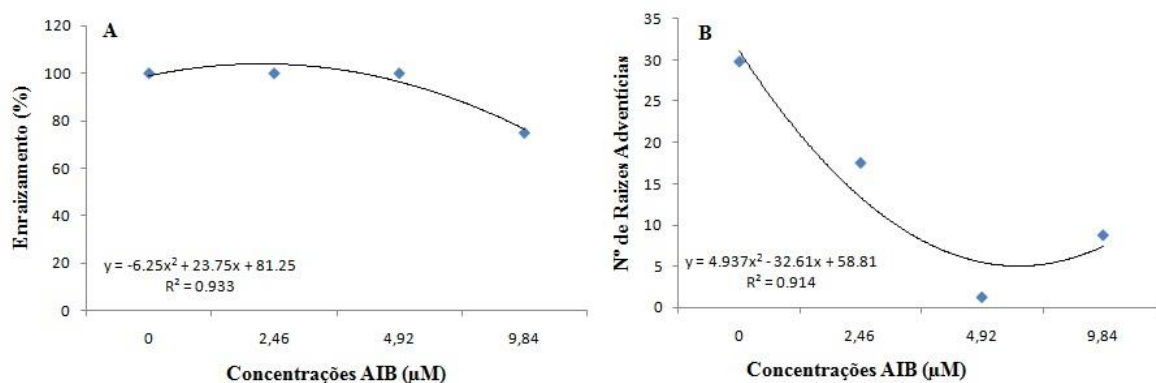


Figura 1. Porcentagem de enraizamento (A) e Número de raízes adventícias (B) emitidas por explantes de *Psidium guineense*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de AIB.

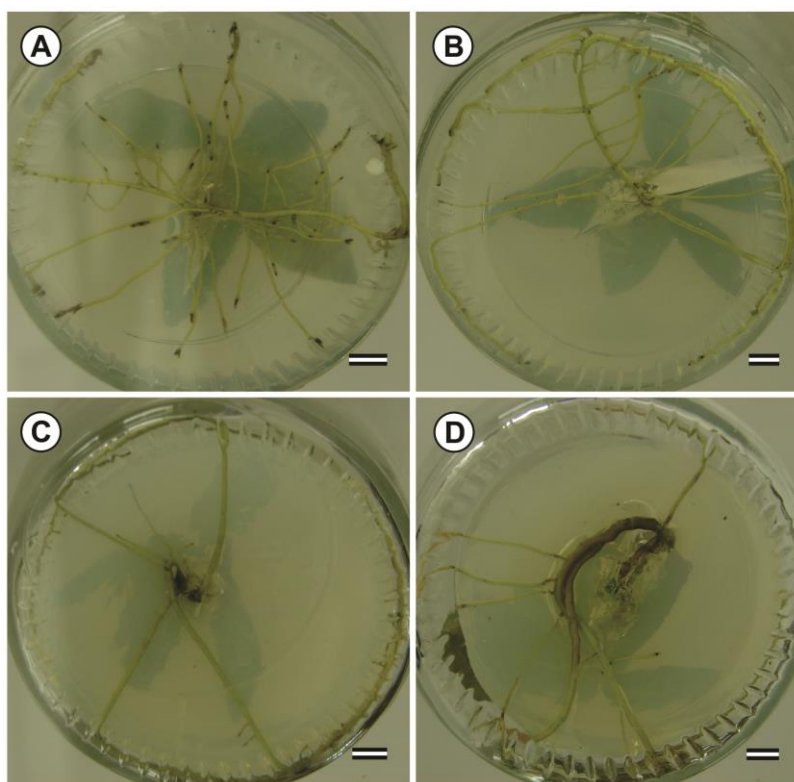


Figura 2. Rizogênese de parte aérea de plantas de *P. guineense* aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS, suplementado com AIB nas concentrações de 0,0 (A); 2,46 (B); 4,92 (C) e 9,84 µM (D). Barras de 0,5cm.

3.2. Multiplicação *in vitro* de explante caulinar em meio de cultura líquido

Na multiplicação *in vitro* com segmentos caulinares (Figura 5A), houve indução de brotações em todas as concentrações de fitoreguladores (BA e BA+ANA), após cinco dias de

inoculação, inclusive na ausência destes (Figuras 3A e 5B-F). Entretanto, a maior formação de brotos foi observada para 2,22 (9,5 brotos) e 4,44 μM de BA (11,5 brotos), não havendo diferenças estatísticas entre estas duas concentrações de BA (Figuras 3A e 5C-D).

Maior comprimento de brotações foi observado com 2,22 μM de BA + 0,054 μM de ANA (2,18cm), seguido de 4,44 μM de BA (2,08 cm), porém, não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (Figuras 3B e 5D-E). Para massa fresca e seca de brotações, maior acúmulo foi observado na concentração de 4,44 μM de BA (0,314 e 0,079g, respectivamente), entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 3C-D), como observado para comprimento de brotações.

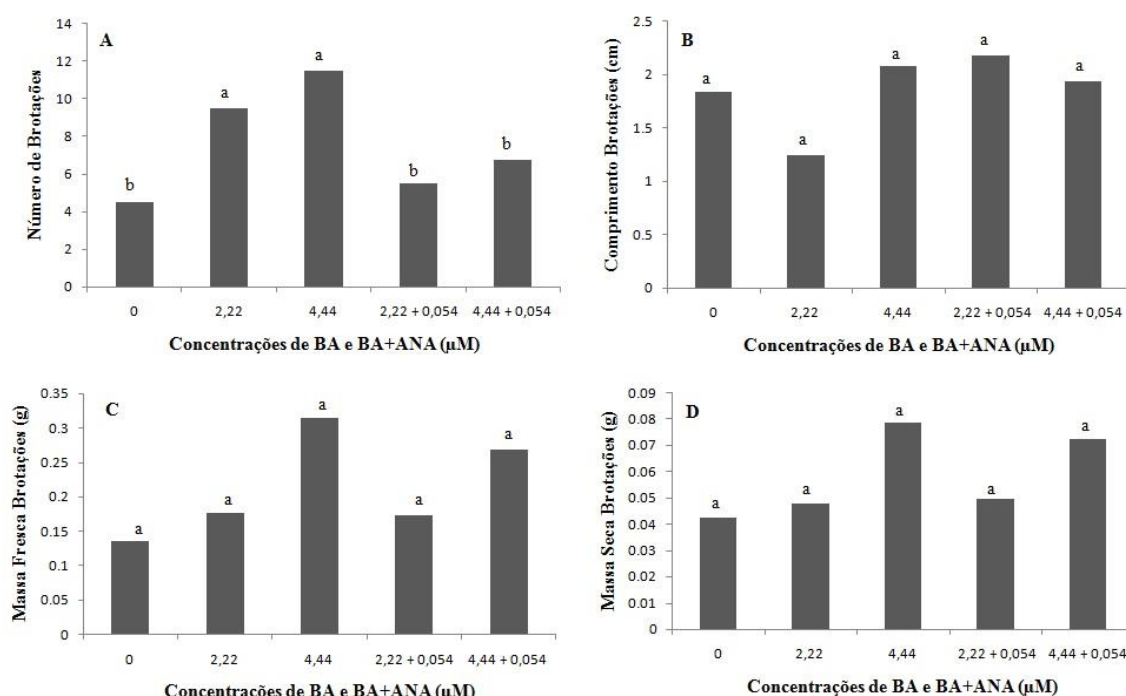


Figura 3. Número de brotações (A), Comprimento de brotações (B), Massa fresca (C) e seca (D) de brotações em segmentos caulinares de *Psidium guineense*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS líquido, suplementado com diferentes concentrações de BA e BA+ANA. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

3.3. Multiplicação *in vitro* de explante nodal e apical em meio de cultura semi-sólido

Conforme os dados apresentados na análise de variância, observa-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para a interação entre as concentrações de fitorreguladores e tipo de

explante, para as variáveis número de brotações e massa fresca de brotações (Tabela 1, Figura 4).

Quando analisada a interação, tratamentos (T) dentro de explante (E) (Tabela 1 e Figura 4), observou-se diferenças significativas apenas para número de brotações para explante nodal, e para massa fresca de brotações, para explante apical.

Por outro lado, quando analisados os explantes (E) dentro dos tratamentos (T) (Tabela 1 e Figura 4), observa-se que houve diferenças significativas apenas a 0,0 BA para número de brotações, e a 0,0 BA e 4, 44 µM de BA, para massa fresca de brotações.

Tabela 1. Resumo da análise de variância do número de brotações por explante (NB), comprimento médio de brotações (CB), massa fresca (MFB) e seca de brotações (MSB) aos 45 dias de cultivo, em segmentos nodais e apicais de plantas de *Psidium guineense*, cultivados em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de BA e BA+ANA (µM).

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		NB	CB	MFB	MSB
Explante (E)	4	0,374*	0,061 ^{ns}	0,002*	0,0003 ^{ns}
Tratamentos (T, em µM)	1	1,11**	0,041 ^{ns}	0,010**	0,0003 ^{ns}
E x T	4	0,315*	0,053 ^{ns}	0,002*	0,0003 ^{ns}
T/E	8	0,345**	-	0,002**	-
T/Explante Nodal	4	0,625**	-	0,001 ^{ns}	-
T/Explante Apical	4	0,065 ^{ns}	-	0,003**	-
E/T	5	0,475**	-	0,004**	-
E/T – 0	1	1,62**	-	0,012**	-
E/T - 2,22 BA	1	0,014 ^{ns}	-	0,000 ^{ns}	-
E/T - 4,44 BA	1	0,375 ^{ns}	-	0,005*	-
E/T - 2,22 BA + 0,054 ANA	1	0,32 ^{ns}	-	0,000 ^{ns}	-
E/T - 4,44 BA + 0,054 ANA	1	0,045 ^{ns}	-	0,001 ^{ns}	-
Resíduo	30	0,095	0,025	0,001	0,00013
Média	-	1,83	0,8	0,075	0,028
CV (%)	-	16,81	20,03	34,79	40,6

^{ns}Não significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro, pelo teste F. * e ** Significativo ao nível de 5 e 1 % de probabilidade de erro respectivamente, pelo teste F.

Por outro lado, houve emissão de brotos em todos os tratamentos de indução de brotações para os segmentos nodais e apicais após oito dias de indução, porém, o maior número de brotações (1,9) foi observado em segmentos nodais quando os explantes foram inoculados em meio de cultura JADS sem adição de fotorreguladores, quando comparado aos

explantes apicais nestas mesmas condições de cultivo (1,0) (Figuras 4A e 5G-H). Para os demais tratamentos não houve diferenças estatísticas entre os dois tipos de explantes (Figura 4A).

Os segmentos nodais apresentaram maior número de brotações por explante quando inoculados em meio de cultura JADS suplementado com 2,22 μM de BA + 0,054 μM de ANA, porém não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 4A). Em relação ao segmento apical, os maiores números de brotações foram observados em explantes inoculados em meio de cultura JADS com adição de fitorreguladores (Figura 4A).

O comprimento das brotações variou de 0,63 (2,22 μM de BA+0,054 μM de ANA) a 0,92 cm (0,0 μM de BA) para as brotações dos segmentos nodais e de 0,65 (4,44 μM de BA+0,054 μM de ANA) a 1,0 cm (2,22 μM de BA) para os segmentos apicais. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de fitorreguladores, tipo de explante e a interação entre os dois fatores (Tabela 1, Figura 4B). Esta mesma tendência foi observada para massa seca de brotações (Tabela 1, Figura 4D).

Para massa fresca de brotações, os segmentos nodais apresentaram médias superiores aos segmentos apicais em meio de cultura JADS sem adição de fitorreguladores e com 4,44 μM de BA (Figura 4C). Para os segmentos nodais, maior acúmulo de massa fresca foi observado em meio de cultura sem adição de fitorreguladores, não havendo diferenças estatísticas para as médias de massa fresca de brotações quando adicionado fitorreguladores ao meio de cultura (Figura 4C). Em relação aos segmentos apicais, o acúmulo de massa fresca foi semelhante em todos os tratamentos (Figura 4C).

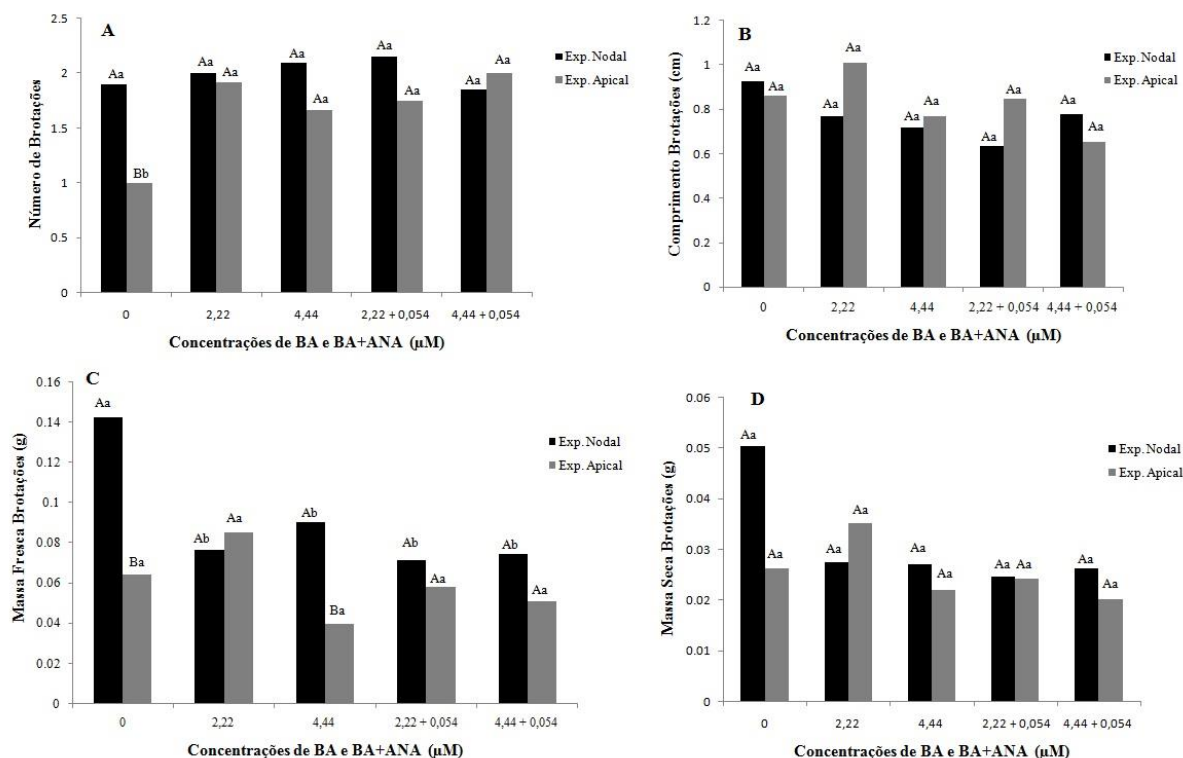


Figura 4. Número de brotações (A), Comprimento de brotações (B), Massa fresca de brotações (C) e Massa seca de brotações (D) em segmentos nodais e apicais de *P. guineense*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes concentrações de BA. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (tipos de explantes) e minúscula (concentrações de fitorreguladores), não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

3.4. Indução de organogênese em explantes internodais e secções foliares

Não foram observados regeneração de brotos adventícios em segmentos internodais e secções de folhas de *P. guineense* em nenhum dos tratamentos de indução de organogênese (Figura 5I-J).

Observou-se a partir da segunda semana de cultivo, em todos os tratamentos de indução de organogênese, explantes internodais e foliares oxidados, murchos, com pontuações amareladas e enegrecidas, seguida de senescência dos tecidos (Figura 5I-J).

3.5. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização

Os brotos produzidos nos experimentos 2 e 3, independente da composição do meio de

cultura de indução de brotações, obtiveram iniciação de indução de raízes a partir de oito dias, em meio de cultura JADS sem adição de auxinas como determinado no experimento 1, e foram alongadas, enraizadas e aclimatizadas com 100% de sobrevivência (Figura 5K-M).

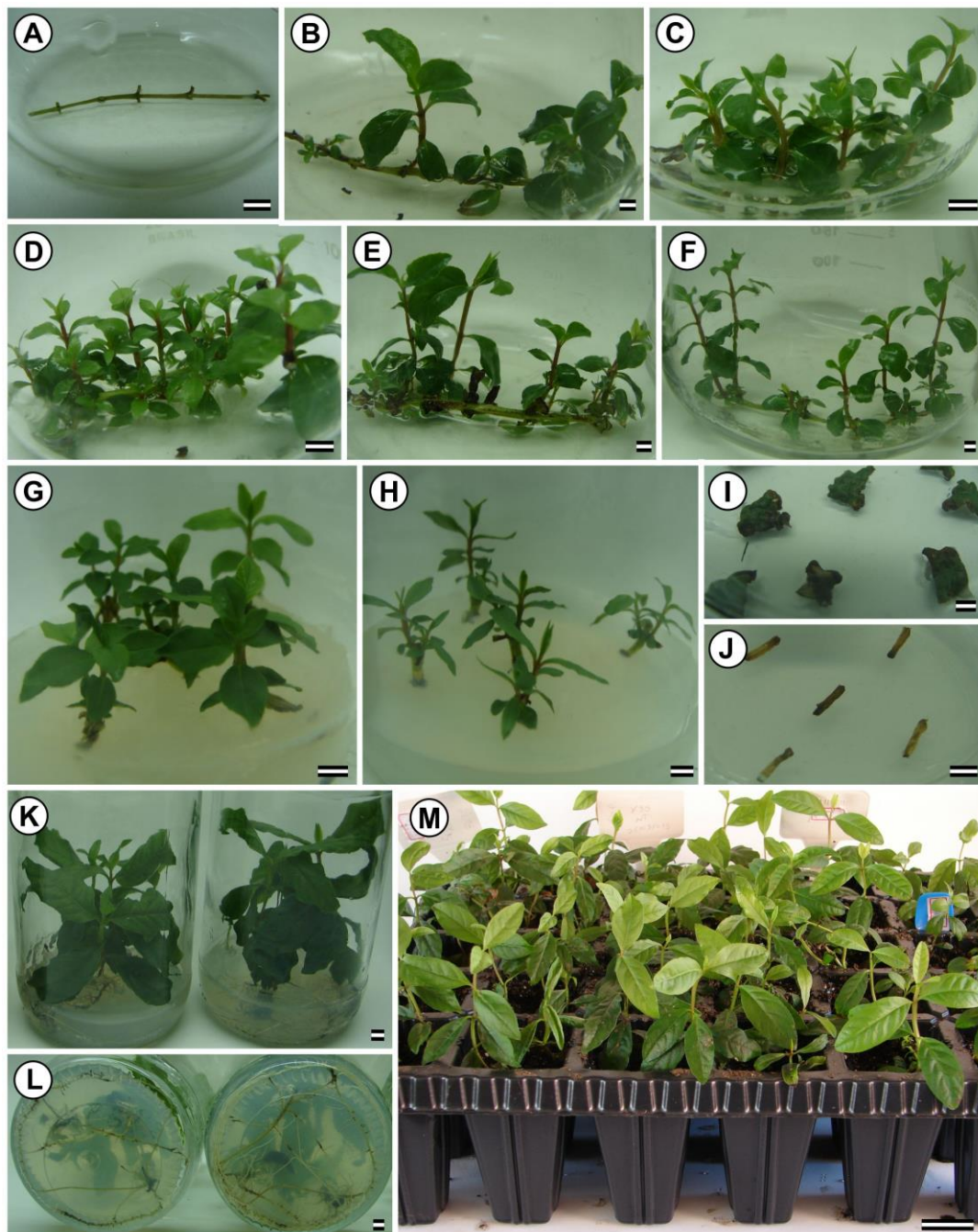


Figura 5. Micropropagação de plantas de *P. guineense* utilizando diferentes explantes: segmentos caulinares em meio de cultura JADS líquido na fase inicial de indução (A) e após 45 dias de indução com 0,0 μM BA (B); na concentração de 2,22 μM BA (C); 4,44 μM BA (D); e em combinação com ANA (2,22 μM BA + 0,054 μM ANA (E) e 4,44 μM BA + 0,054 μM ANA (F); segmentos nodais (G) e apicais (H) a 0,0 μM BA aos 45 dias de indução; organogênese a partir de secções foliares (I) e internodais (J); fase de alongamento (K), enraizamento (L) e aclimatização (M) das plântulas obtidas dos segmentos caulinares, nodais e apicais após 45 dias de aclimatização. Barras = 0,5 cm.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho investiga pela primeira vez o potencial morfogênico de diferentes explantes de plântulas de *P. guineense* na determinação de protocolos de multiplicação *in vitro* desta espécie.

A rizogênese *in vitro* de parte aérea de plantas de *P. guineense* ocorreu em todas as concentrações de AIB, inclusive na sua ausência, o que sugere a existência de concentrações endógenas de auxinas suficientes para induzir o enraizamento destes explantes. Resultados semelhantes tem sido observado no enraizamento de brotos de *Bixa orellana* (CARVALHO et al., 2005), *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008), *P. guajava* (RAI et al., 2009) e *B. cheilantha* (GUTIÉRREZ et al., 2011). Entretanto, em contraste ao observado no presente trabalho, para *Alibertia edulis* (SILVA et al., 2008), *Asparagus racemosus* (BOPANA e SAXENA, 2008) e em *P. guajava* (SHAH, et al., 2008), os níveis endógenos de auxinas não foram suficientes para promover a rizogênese, necessitando da adição exógena deste fitorregulador. Dessa forma, o processo de indução e iniciação de raízes adventícias é regulado pela relação quantitativa entre os níveis de fitorreguladores (auxina e citocinina) na planta, sendo esses teores endógenos variantes para cada genótipo (SOUZA e PEREIRA, 2007).

Maior incremento no número de raízes em espécies da família Myrtaceae tem sido observado em meio de cultura suplementado com 4,92 μ M de AIB (SINGH et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2008; RAI et al., 2009), assim como de outras espécies florestais e/ou medicinais (FERMINO JUNIOR e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012; SAHA et al., 2014). No entanto, a utilização de AIB no meio de cultura nas concentrações testadas, não se mostraram satisfatórias para incremento no número de raízes em parte aérea de *P. guineense*, visto que o maior número de raízes foi observado em meio de cultura sem adição deste fitorregulador. O que demonstra que não há necessidade da aplicação de fitormônio no enraizamento de brotações de *P. guineense*, como observado para *Salix pseudolasiogyne* (PARK et al., 2008). Este comportamento pode ser atribuído além das concentrações endógenas deste fitorregulador, ao balanço de auxina/citocinina que dependendo da concentração pode inibir, promover ou modificar as diferentes respostas fisiológicas.

A indução de brotos de *P. guineense*, a partir de segmentos caulinares, nodais e apicais, ocorreu em todas as concentrações de fitorreguladores utilizadas, inclusive na sua ausência, como observado na indução de raízes, indicando a existência de concentrações

endógenas de citocininas suficientes para a formação de brotos. Concentrações endógenas de fitorreguladores estimulando a regeneração *in vitro* também tem sido reportado para outras espécies, como em *Amburana acreana* (FERMINO JUNIOR e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012), *Parapiptadenia rigida* (KIELSE et al., 2009) *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008) e *Hancornia speciosa*, (SOARES et al., 2007). A formação de brotos mesmo nos explantes inoculados em meio livre de fitorregulador, indica que não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a brotação de diferentes explantes (KIELSE et al., 2009; GANA, 2010). Contudo, no presente trabalho, a adição de BA ao meio favoreceu a formação de maior número de brotos em segmento caulinar. Esta mesma tendência tem sido observada na regeneração *in vitro* de outras espécies, utilizando o mesmo tipo de explante (SOUZA et al., 2007) e outros tipos de explantes (SOARES et al., 2007; RAI et al., 2009; KIELSE et al., 2009; FERNANDO JUNIOR e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012; USMAN et al., 2012), dentre outros.

Na multiplicação *in vitro* por meio de segmentos caulinares, em meio de cultura líquido, e em segmentos nodais e apicais, em meio de cultura semi-sólido, nas diferentes concentrações de fitorreguladores, considerando o número médio de indução de brotações por gema lateral, no melhor tratamento de cada experimento, o número de brotações é praticamente igual (1,15; 1,07 e 1,0, respectivamente) (Figuras 2 e 3), porém, para comprimento médio de brotações e massa fresca e seca de brotações, no meio de cultura líquido, houve um maior incremento (Figuras 2 e 3). Este maior incremento possivelmente esteja relacionado à maior oferta de oxigênio nos tecidos vegetais, proporcionado pelo meio de cultura líquido sob agitação contínua, mantendo-os em contato direto com o meio, facilitando assim, a absorção de nutrientes e fitormônios, estimulando a indução e um maior crescimento das brotações (MEHROTRA et al., 2007). O mesmo autor relata que nestas condições de cultivo, ocorre uma menor expressão da atividade de dominância apical, que geralmente leva à indução e proliferação de numerosas gemas axilares.

Para nosso conhecimento, não há estudos de regeneração *in vitro* de plantas de *P. guineense* em meio de cultura líquido. Entretanto, melhorias na propagação *in vitro* neste sistema de cultivo, também tem sido relatado em outras espécies (KAWIAK et al., 2003; PIATCZAK et al., 2005, SIMÕES et al., 2009). Em segmentos internodais de caule de plantas de *Cleome rosea*, Simões et al. (2009), obtiveram maior número de brotações/explante em meio de cultura MS líquido, sob imersão contínua, suplementado com 2,2 μ M de BA. No presente trabalho, as melhores médias para número de brotações foram observadas com 4,44 e

2,22 μM de BA. Em segmentos caulinares de *Eugenia uniflora*, maior número de brotações foi observada com 5 e 10 μM de BA, porém, foi utilizado o meio de cultura WPM semi-sólido (SOUZA et al., 2007). Ainda no mesmo trabalho, observou-se que o número médio de brotações por explante caulinares de *E. uniflora* foi bem menor que o observado no presente trabalho, de acordo com o número de gemas laterais utilizadas por explante, demonstrando que os explantes caulinares de *P. guineense* foram mais eficientes em meio de cultura líquido JADS suplementado com menores concentrações de BA (2,2 e 4,44 μM).

Para *P. guajava*, também tem sido observado maior regeneração de brotos a 2,22 (ALI e LÜDDERS, 2001) e 4,44 μM de BA (MOHAMED-YASSEEN et al., 1995; ALI e LÜDDERS, 2001; RAI et al., 2009). O mesmo sendo observado em outras espécies da família Myrtaceae, como em *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008) e em *Myrcianthes pungens* (SOUZA et al., 2011).

Na micropropagação *in vitro*, gemas apicais tendem a apresentar maior capacidade de crescimento que gemas axilares, devido ao forte efeito da dominância apical (WENDLING et al., 2006). Entretanto, no presente trabalho, maiores números de brotações foram observados em segmentos nodais.

Diversos estudos têm indicado a eficiência do uso de BA na multiplicação de brotos a partir de segmentos nodais (RIBAS et al., 2005; COSTA et al., 2010; SHARMA et al., 2014). Porém, no presente trabalho, os maiores números de brotações foram observados em segmentos nodais sem adição de fitorreguladores. Usman et al. (2012), observaram maior número de brotos em segmentos nodais em relação aos segmentos apicais apenas quando as concentrações de BA foram inferiores a 6,66 μM de BA. Dessa forma, devem-se testar concentrações superiores de BA em segmentos nodais e apicais de *P. guineense* para verificar melhor a eficiência destes tipos de explantes na multiplicação *in vitro*, em meio de cultura semi-sólido, uma vez que as concentrações de BA testadas, promoveram incremento no número de brotações apenas em segmentos apicais, quando comparado ao tratamento sem fitorreguladores.

BA em associação com ANA tem sido utilizada na multiplicação *in vitro* de várias espécies (OANA et al., 2008; RAI et al., 2009; LIU e YANG, 2011; SAHA et al., 2014). Em segmentos nodais de *P. guajava*, não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de número de brotações em meio de cultura contendo 4,44 μM de BA e 4,44 μM de BA + 0,54 μM de ANA (LIU e YANG, 2011). Corroborando com os dados do presente trabalho, que quando BA está associado a ANA (2,22 μM de BA+0,054 μM de ANA e 4,44 μM de

BA+0,054 μ M de ANA), não foram observadas diferenças estatísticas para número de brotações em segmentos nodais e apicais, em comparação com os tratamentos de BA de forma individual (2,22 e 4,44 μ M de BA). Porém, para explantes caulinares no presente trabalho, BA em associação com ANA, promoveu redução no número de brotações, apresentando maior número de brotações nas concentrações de BA na forma individual (2,22 e 4,44 μ M de BA) como observado em *P. guajava* (RAI et al., 2009) e em *Ocimum canum* (SAHA et al., 2014), evidenciando que o efeito sinérgico da combinação de BA com ANA atuou de forma negativa no incremento da regeneração de brotos em explantes destas espécies. Resultados contrários foram relatados para *Origanum vulgare*, onde o maior número de brotações foi obtido com a utilização de BA associado a ANA (OANA et al., 2008). Dessa forma, a responsividade regenerativa é dependente da espécie e/ou genótipo dentro da mesma espécie.

As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular, e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical (SOARES et al., 2007). A associação de BA com ANA, a depender das concentrações, tem como principal objetivo, promover a indução e o alongamento das brotações, aumentando as taxas de plantas enraizadas e posterior aclimatização em um menor espaço de tempo. Neste trabalho, BA associado a ANA (2,22 μ M de BA+0,054 μ M de ANA) promoveu um pequeno incremento no crescimento das brotações de segmentos caulinares e segmentos nodais, porém, não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Esta mesma tendência foi observada em *P. guajava* (LIU e YANG, 2011). Para *Ocimum canum*, houve redução no comprimento das brotações quando BA foi associado a ANA (SAHA et al., 2014). O efeito adverso de auxina com citocinina pode ser devido ao nível endógeno de auxinas dentro dos explantes, que alteram a resposta de crescimento, uma vez que o equilíbrio de auxina e citocinina é necessário para o aparecimento de regeneração das brotações (SKOOG e MILLER, 1957). É sabido que altas concentrações de citocininas podem inibir o crescimento das brotações, formando brotos menores. Fernando Junior e Scherwinski-Pereira (2012), relataram que a maior altura de brotos, na propagação *in vitro* de *Amburana acreana*, foram observados nos tratamentos isentos de fitorreguladores ou com baixas concentrações de BA. E, a medida que aumentaram as concentrações de BA, houve redução no tamanho dos brotos. Nós não observamos diferenças estatísticas para comprimento de brotações em nosso trabalho. Entretanto, maior massa fresca de brotações foi observada em segmentos nodais, cultivados em meio de cultura sem adição de fitorreguladores, comparado aos segmentos apicais, provavelmente devido este

tipo de explante apresentar menor nível endógeno de citocinina, promovendo um maior acúmulo de biomassa das brotações.

A organogênese *de novo* tem sido amplamente aplicada nos processos de multiplicação *in vitro* (DUCLERCQ et al., 2011), entretanto, no presente trabalho, não foram induzidas brotações a partir de organogênese de secções foliares e segmentos internodais, devendo-se desenvolver novas investigações. Xavier e Otoni (2009), relataram que o processo de organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura, fatores do ambiente, ação de reguladores de crescimento, em particular, auxinas e citocininas, como também da habilidade dos tecidos em responder a mudanças hormonais durante o período de cultivo.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho de micropropagação de *P. guineense*, com protocolos de propagação mais completo, porém, mais pesquisas são necessárias para melhorar a eficiência regenerativa desta espécie, testando outras fontes de fitorreguladores, outras concentrações e tipos de citocininas, combinações de citocininas e /ou com outras auxinas, assim como, outras fases de juvenilidade dos explantes, principalmente para explantes internodais e foliares.

Em relação à fase de aclimatização, o percentual de sobrevivência de *P. guineense* (100%), aos 45 dias de aclimatização *ex vitro*, permite inferir que o protocolo de regeneração *in vitro* estabelecido é eficiente, visto que várias espécies lenhosas têm baixo percentual de sobrevivência, quando transferidas para o ambiente *ex vitro* (ZIV e CHEN, 2008).

5. CONCLUSÕES

1. Na indução de rizogênese em explantes de parte aérea de *P. guineense*, não é necessário a adição de AIB ao meio nutritivo;
2. A propagação clonal de *P. guineense* é possível através de segmentos caulinares, nodais e apicais, com e sem adição de fitorreguladores;
3. Na regeneração *in vitro* de *P. guineense*, é indicado a utilização de segmentos nodais, sem adição de fitorreguladores; segmentos apicais com 2,22 µM de BA e segmentos caulinares com 2,22 e 4,44 µM de BA, sob as condições de cultivo testadas;
4. Não foi possível a regeneração de brotos por organogênese adventícia, a partir de secções foliares e segmentos intermodais, nas condições e concentrações de

fitorreguladores testadas, devendo-se avaliar outras condições de cultivo e fitorreguladores para possibilitar a multiplicação destes tipos de explantes.

6. REFERÊNCIAS

ALI, M.A.; LÜDDERS, P. *In vitro* culture and its application on the cloning of guava (*Psidium guajava* L.). **Journal of Applied Botany**, v.75, p.164-167, 2001.

BALISTEIRO, D.M.; ALEZANDRO, M.R.; GENOVESE, M.I. Characterization and effect of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) juice on postprandial glycemia in healthy subjects. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p. 66–74, 2013.

BOPANA, N.; SAXENA, S. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.44, n.6, p.525-532, 2008.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009.

CAMPOS, R.A.S.; AÑEZ, L.M.M.; DOMBROSKI, J.L.D.; DIGNART, S.L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Mull. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 30- 36. 2007.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 887-895, 2005.

COSTA, G.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

COSTA M.A.P.C, SOUZA A.S, ALMEIDA W.A.B. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A.S, JUNGHANS T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.115-130. 2006.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p.107-116, 1995.

CRUZ, C.D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, p.271-276, 2013.

DUCLERCQ, J.; SANGWAN-NORREEL, B.; CATTEROU, M.; SANGWAN, R.S. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in Plant Science**, v.16, n. 11, p.597–606, 2011.

FERMINO JUNIOR, P.C. P.; PEREIRA, J.E.S. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FERNANDES, T.G.; MESQUITA, A.R.C.; RANDAU, K.P.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-7, 2012.

GANNA, A.S. The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.51, p.10330-10334, 2010.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht : Springer, 2008. V.1, p.1-28.

GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZÁLEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Estudio fitoquímico e actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.1, n.10, p.3- 4, 2005.

GRATTAPAGLIA D, MACHADO MA. Micropropagação. In: TORRES A.C, CALDAS L.S, BUSO J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. v.1, p.183-242, 1998.

GUTIÉRREZ I.E.M.; NEPOMUCENO C.F.; LEDO C.A.S.; SANTANA J.R.F. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41, n.2, p.260-265, 2011.

HAMINIUK, C.W.I.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; GUEDES, A.R.; STAFUSSA, A.P.; BONA, E.; CARPES, S.T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.7, p.1529–1537, 2011.

KAWIAK, A.; KROĆLICKA, A.; LOJKOWSKA, E. Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult**, v. 75, n.2, p.175-178, 2003.

KIELSE, P.; FRANCO, E.T.H.; PARANHOS; J.T.; LIMA, A.P.S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1088-1094, 2009.

LIU, X.; YANG, G. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. **International Journal of Plant Biology**, v.2, n.1, p.7–10, 2011.

LUCIANI, G.F.; MARY, A.K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.39-143, 2006.

MALIK, S.K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R.K. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n.4, p. 539-553, 2005.

MEHROTRA, S.; GOEL, M.K.; KUKREJA, A.K.; MISHRA, B.N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.13, p.1484-1492, 2007.

MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S.A.; SCHNELL, R.J.; SPLITTSTOESSER, W.E. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. **Plant Cell Reports**, v.14, n.8, p.525-528, 1995.

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

NACHTIGAL, J.C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R.A.; FACHINELLO, J.C.; MAZZINI, A.R.A. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*P. cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, p.229- 235, 1994.

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

OANA, C.T.; MARCELA, L.; MARIA, P. Considerations regarding the effects of growth regulators over the “*in vitro*” morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. **Journal of Plant Development**, v.15, p.133-138, 2008.

PARK, S.Y.; KIM, Y.W.; MOON, H.K.; MURTHY, H.N.; CHOI, Y.H.; CHO, H.M. Micropropagation of *Salix pseudolasiogyne* from nodal explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 93, n.3, p. 341-346, 2008.

PELEGRINI, L.L.; RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H.S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1527-1523, 2011.

PESSANHA, P.G.O.; VIANA, A.P.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SOUZA, R.M.; TEXEIRA, M.C.; PEREIRA, M.G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.129-136. 2011

PIATCZAK, E.; WIELANEK, M.; WYSOKINSKA, H. Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurea erythraea* Rafn. **Plant Science**, v.168, n.2, p.431–437, 2005.

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

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA, P.R.B.; MENDES, C.S.O.; REIS JUNIOR, R.; VALERIO, H.M.; BRANDI, I.V.; OLIVEIRA, D.A. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.8, n.35, p.1095–1100, 2014.

SAHA, S.; ROY, S.; SENGUPTA, C.; GHOSH, P. Micropropagation and analysis of genetic stability in regenerated plantlets of *Ocimum canum* Sims. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 174-183, 2014.

SANTOS, M.A.C.; QUEIROZ, M.A.; SANTOS, A.S.; SANTOS, L.C.; CARNEIRO, P.C.S. Diversidade genética entre acessos de araçá de diferentes municípios do semiárido baiano. **Revista Caatinga**, v.27, n.2, p.48–57, 2014.

SHAH, S.T.; ZAMIR, R.; AHMAD, J.; ALI, H.; LUTFULLAH, G. *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of Guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.1195-1200, 2008.

SHARMA, S.; SHAHZAD, A.; KUMAR, J.; ANIS, M. In vitro propagation and synseed production of scarlet salvia (*Salvia splendens*). **Rendiconti Lincei**, v. 25, n. 3, p. 359–368, 2014.

SILVA, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2007.

SILVA, F.A.B.; PEREIRA, L.A.R.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.6, p.1103-1114, 2008.

SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, n.3, p.240–243, 2003.

SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.98, n.1, p.79–86, 2009.

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R.; SHARMA, H.C.; SINGH, S.P. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from in vitro germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae*, v.95 p.213-221, 2002.

SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, V.54, N.11, P.118–131, 1957.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOUZA, L.S.; FIOR, C.S.; SOUZA, P.V.D.; SCHWARZ, S.F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.BERG) D. LEGRAND. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.

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.; SILVA, L.C.; FERRI, J.; SOARES, G.C. Solificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

THAKUR, R.C.; KARNOSKY, D.F. Micropropagation and germoplasma conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia*) Jacq. 'A/Ross Central Park') trees. **Plant Cell Reports**, v.26, N.8, p.1171-1177, 2007.

USMAN, M.; BUTT, M.; FATIMA, B. Enhanced *in vitro* multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.44, p.10182–10187, 2012.

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.; OTONI, W. C.; Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

ZIV, M.; CHEN, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. V.1, p.465-478.

CAPÍTULO IV



**Organogênese *in vitro* a partir de explantes radiculares de
Psidium schenckianum Kiaersk e *P. guineense* Sw.**

Organogênese *in vitro* a partir de explantes radiculares de *Psidium schenckianum* Kiaersk e *P. guineense* Sw.

RESUMO - Objetivou-se com este estudo, avaliar a responsividade organogênica de explantes radiculares de *Psidium schenckianum* (Y01) e *P. guineense* (Y40, Y93 e Y97) inoculados em meio de cultura líquido JADS, com diferentes concentrações de fitorreguladores: 6-benziladenina (BA) (0,0; 2,2 e 4,44 μ M) e BA + ácido α -naftalenoacético (ANA) (2,22 μ M BA + 0,054 μ M ANA e 4,44 μ M BA + 0,054 μ M ANA). Amostras de explantes foram coletadas periodicamente e submetidos à microscopia de luz e de varredura. Após 60 dias de indução foram avaliados o número de brotações (NB) e a porcentagem de explantes com brotações (PEB). Os brotos foram alongados, enraizados e aclimatizados. Após a aclimatização, avaliou-se o nível de ploidia das plantas regeneradas por citometria de fluxo. Observou-se regeneração de brotos em todos os tratamentos de indução para os acessos de *P. guineense*. O acesso de *P. schenckianum* não formou brotos em nenhuma das condições. Houve variação na responsividade organogênica para as concentrações de fitorreguladores dentro dos acessos para o NB (Y40 e Y93) e para PEB (Y93). O acesso Y93 apresentou as maiores médias para NB (9,25 e 8,5) e de PEB (61,67 e 56,67%) a 2,2 μ M BA e 0,0 BA respectivamente, não havendo diferenças entre estas concentrações. Os brotos foram obtidos por organogênese direta a partir de células do periciclo. As plantas regeneradas foram aclimatizadas, obtendo-se 100 % de sobrevivência e mantiveram a mesma ploidia em relação às plantas oriundas da germinação de sementes. Este é o primeiro relato de regeneração de *P. guineense* a partir de explantes radiculares e constitui-se numa alternativa promissora de propagação e clonagem desta espécie para o apoio a futuros trabalhos de melhoramento.

Palavras-chave: Araçá, Regeneração *in vitro*, Meio de cultura líquido, Fitorreguladores, Estabilidade genética

***In vitro* organogenesis from root explants *Psidium schenckianum* Kiaersk and *P. guineense* Sw.**

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the responsiveness of root organogenic explants *Psidium schenckianum* (Y01) and *P. guineense* (Y40, Y93 and Y97) inoculated in JADS liquid culture with different concentrations of growth regulators: 6-benzyladenine (BA) (0.0, 2.2 and 4.44 μ M) and BA + α -naphthalene acetic acid (NAA) (2.22 μ M BA + 0.054 μ M ANA and 4.44 μ M BA + 0.054 μ M ANA). Explant samples were collected periodically and submitted to light microscopy and scanning. After 60 days of induction were assessed the number of shoots (NB) and the percentage of explants with shoots (PEB). The elongated shoots were rooted and acclimatized. After acclimatization, we evaluated the genetic stability of the regenerated plants by flow cytometry. It was observed in all shoot regeneration induction treatment for *P. guineense* accesses. The access *P. schenckianum* not formed shoots in any conditions. There was variation in organogenic responsiveness to the plant growth regulator concentrations within the access for NB (Y40 and Y93) and PEB (Y93). Access Y93 had the highest averages for NB (9.25 and 8.5) and PEB (61.67 and 56.67%) to 2.2 μ M BA BA and 0.0 respectively, with no difference between these concentrations. The shoots were obtained by direct organogenesis from pericycle cells. Regenerated plants were acclimatized to give 100% survival and kept genetic stability

compared to plants grown from seed germination. This is the first report of *P. guineense* regeneration from root explants, and this constitutes a promising alternative propagation and cloning of this species to support the future work of improvement.

Key words Araça, *In vitro* regeneration, Liquid culture medium, Growth regulators, Genetic stability

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande centro de diversidade do gênero *Psidium*, podendo ser encontrado em torno de 60 espécies, das quais 47 são endêmicas (SOBRAL et al., 2015). Alocados neste gênero encontram-se os araçás (*Psidium* spp.), espécies frutíferas, lenhosas, que apresentam muitas espécies nativas do Brasil, com ampla distribuição em todos os biomas brasileiros (FRANZON et al., 2009; SANTOS et al., 2014).

No bioma Caatinga ocorrem diferentes espécies de araçás silvestres, principalmente em regiões de maiores altitudes. Santos et al. (2014) constataram a ocorrência das espécies *Psidium schenckianum* Kiarsk., *Psidium guineense* Swartz. e *Psidium grandifolium* Mart em seis municípios do semiárido baiano, com maior frequência das duas primeiras.

O *P. guineense*, sin. *P. araçá* Raddi (SOBRAL et al., 2015), é uma espécie tetraploide ($2n = 44$) (HIRANO 1967; ÉDER-SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2015), nativa do Brasil (SANTOS et al., 2014 e SOBRAL et al., 2015), popularmente conhecida como araçá verdadeiro, araçá do campo, goiabinha selvagem, dentre outras denominações. Esta espécie apresenta um grande potencial de uso, seja em seu consumo *in natura* ou após processado pela indústria. Como planta de potencial medicinal tem marcante atividade antimicrobiana (GONZALEZ et al., 2005; FERNANDES et al., 2012), farmacológica e antibacteriana (RODRIGUES et al., 2014), antioxidante (HAMINIUK et al., 2011 e BALISTEIRO et al., 2013), além de possuir grande quantidade de óleos essenciais (SILVA et al., 2003).

No consumo *in natura* ou industrializado, o araçá pode ser utilizado na forma de sucos, doces, compotas, geleias, sorvetes, apresentando boas características de fruto, como quantidade de vitamina C (197,98 a 227,04 mg/ 100g polpa) (SANTOS et al., 2014), superiores aos encontrados em tangerina-murcote (21,47 mg ácido ascórbico.100 mL⁻¹ de suco) e laranja-natal (84,03 mg ácido ascórbico.100 mL⁻¹ de suco) (COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010), consideradas tradicionalmente como ricas em vitamina C. Outra elevada potencialidade de uso do araçá é como fonte de resistência ao nematoide de galha

(*Meloidogyne enterolobii*, sin. *M. mayaguensis*) (PESSANHA et al., 2011), que vem dizimando os plantios de goiabeira por várias regiões do Brasil, seja na transferência de genes de resistência ou no uso como porta-enxerto. .

A espécie *P. schenckianum*, por sua vez, é endêmica do Brasil e ocorre de forma silvestre na região Nordeste (Bahia, Pernambuco e Ceará) (SOBRAL et al., 2015), principalmente no bioma Caatinga, sendo conhecida popularmente como araquá do mato e pirim. Até o momento, estudos com esta espécie são incipientes. Santos et al. (2014) caracterizaram a diversidade genética de diferentes acessos de araquá e encontraram acessos com potencial de uso como porta enxerto para goiabeira e boas características de fruto, como acidez titulável (1,01 a 9,62 g/ 100 mL de suco), sólidos solúveis (10,94 a 13,5 °Brix), vitamina C (132 a 607,2 mg/ 100 g polpa), dentre outras características, para uso *in natura* ou industrializado. Também foram encontrados acessos resistentes ao *Meloidogyne enterolobii* (dados não publicados), demonstrando as potencialidades desta espécie para usos futuros em programas de melhoramento da espécie.

Fontes de resistência ao *M. enterolobii* tem sido encontradas também em outras espécies de araquá (CARNEIRO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; PESSANHA et al., 2011; CASTRO et al., 2012; MIRANDA et al., 2012; MARTINS et al., 2013; FREITAS et al., 2013; SOUZA et al., 2014). No entanto, o processo de avaliação da reação a nematóides é destrutivo, pois a planta é destruída para se extrair as raízes e, destas, extrair os nematóides (HUSSEY e BARKER, 1973). Dessa forma, se faz necessário desenvolver protocolos de propagação vegetativa das plantas a serem avaliadas em relação a resistência ao nematoide e, desse modo, as plantas imunes ou resistentes possam ser selecionadas.

A estaquia tem sido a técnica mais difundida na propagação vegetativa. No entanto, essa técnica é inviável para clonagem de araquás que apresentam dificuldades no enraizamento, como observado por Nachtigal et al. (1994). Os araquás são propagados principalmente por sementes (LORENZI et al., 2006), porém a taxa de sucesso é baixa, apresentando germinação desuniforme e alta heterozigosidade entre as progênies, devendo-se buscar novas formas de propagação de araquá. Uma alternativa promissora para clonagem de araquá é a propagação *in vitro* que vem sendo empregada com sucesso para várias espécies frutíferas e florestais na propagação clonal e/ou conservação de germoplasma como em *Erythrina velutina* (COSTA et al., 2010), *Eugenia uniflora* (PILATTI et al., 2011), *Bauhinia cheilantha* (GUTIERREZ et al., 2011), *Amburana acreana* (FERMINO JUNIOR e PEREIRA, 2012), *Amburana cearensis*

(CAMPOS, 2013), *Mimosa caesalpiniiifolia* (BEZERRA et al., 2014), *Cassia occidentalis* (NAZ et al. 2015) e *Bambusa ventricosa* (WEI et al., 2015).

A propagação *in vitro* é um método viável para ser aplicado em espécies que apresentam dificuldades pelos métodos convencionais, proporcionando a multiplicação em massa de plantas geneticamente uniformes e formação de plantas com melhores condições sanitárias (ERIG e SCHUCH, 2005), assegurando a disponibilidade de material vegetal para os métodos convencionais de melhoramento.

O processo de regeneração de plantas *in vitro* é complexo e envolve diversos fatores, como o genótipo, a fonte e as condições fisiológicas do explante, a utilização de combinação de fitorreguladores de crescimento, o meio de cultura utilizado, as condições de cultivo (LUCIANI et al., 2006), dentre outros fatores.

Dentre as vias morfogênicas *in vitro*, a organogênese *de novo* tem sido amplamente aplicada, constituindo-se num processo complexo com requerimento de hormônios vegetais (DUCLERCQ et al., 2011), como as auxinas e citocininas. As auxinas e citocininas desempenham papéis bastante importantes em muitos aspectos de crescimento e desenvolvimento da planta (SU et al., 2011). As citocininas normalmente promovem a divisão celular e induzem a formação de gemas e brotos adventícios, especialmente quando combinadas com uma auxina (GANA, 2010). No entanto, a concentração requerida e o tipo de citocinina diferem de acordo com a espécie e cultivares, em particular (VAN STADEN et al., 2008). Entre as citocininas, a benziladenina (BA), é a mais utilizada e mais eficiente na regeneração de plantas do gênero *Psidium*, em especial a goiabeira (*P. guajava*) que já é uma espécie cultivada comercialmente (SINGH et al., 2002; SHAH et al., 2008; RAI et al., 2009; USMAN et al., 2012).

Protocolos de propagação *in vitro* de *Psidium* tem sido estabelecidos para goiabeira a partir de explantes de hipocótilo (SINGH et al., 2002), de plântulas (SHAH et al., 2008), de segmentos nodais (RAI et al., 2009; USMAN et al., 2012) e de segmentos apicais (USMAN et al., 2012). No entanto, para o araçá ainda não foi desenvolvido nenhum trabalho de regeneração *in vitro*.

Diversos trabalhos de organogênese em segmentos radiculares vêm sendo desenvolvidos com sucesso, como em *Melia azedarach* (VILA et al., 2005), *Passiflora cincinnata* (LOMBARDI et al., 2007) *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009), *Centaurea ultreiae* (MALLÓN et al., 2011), *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis* (SILVA et al. 2011), *Cassia angustifolia* (PARVEEN e SHAHZAD 2011), *Passiflora edulis* (ROCHA et

al., 2012), *Passiflora setacea* (VIEIRA et al., 2014), *Bixa orellana* (CRUZ et al., 2014), *Citrus hystrix* (ENG et al., 2015), *Psoralea corylifolia* (JANI et al., 2015), dentre outros.

Até o momento não foi desenvolvido nenhum trabalho de organogênese a partir de explantes radiculares em espécies do gênero *Psidium*, nem mesmo para a goiabeira que é a cultura de maior importância econômica dentro deste gênero. Assim, o desenvolvimento de um método eficiente para regeneração *in vitro* de araçá, utilizando como explantes segmentos de raiz de material germinado *in vitro*, pode constituir-se em alternativa viável de clonagem, para conservação de recursos genéticos, e como técnica de apoio a futuros trabalhos de melhoramento genético ou mesmo transformação genética.

Dado o potencial do araçá para estudos de melhoramento genético e à falta de informações na literatura sobre a capacidade de formação de brotos *in vitro*, particularmente a partir de explantes radiculares, este trabalho teve como objetivo avaliar a responsividade organogênica de explante de raiz de acessos de araçá das espécies *P. guineense* e *P. schenckianum* do Banco Ativo de Germoplasma da UNEB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da realização do experimento, germinação e desenvolvimento de plântulas

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e de Anatomia Vegetal e no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a instalação do experimento utilizou-se sementes de quatro acessos de araçá das espécies *Psidium guineense* Swartz (Y40, Y93 e Y97) e *Psidium schenckianum* Kiaersk (Y01), coletados em 2010 nos municípios de Campo Formoso, Senhor do Bonfim, Jacobina e Uauá, respectivamente, no estado da Bahia, e encontram-se armazenados a 10 °C e 40 % de umidade relativa no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UNEB, Juazeiro-BA.

Inicialmente, em câmara de fluxo laminar, as sementes de cada acesso do BAG foram desinfestadas em etanol 70 % por um minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) a 1,25 % de cloro ativo (Super Globo[®], Rio de Janeiro, Brasil) por 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas por três consecutivas vezes em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, 50 sementes de cada acesso foram transferidas para

frascos de 250 mL de capacidade, com tampas rígidas (dez sementes por frasco), previamente autoclavados, contendo dois discos de papel Germitest[®] reduzidos ao tamanho do diâmetro do fundo do frasco, umedecidos com 5 mL de água destilada. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter)] e fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), até a completa germinação (60 dias).

Após a germinação, as plântulas foram transferidas para frascos com capacidade de 350 mL, contendo 60 mL de meio de cultura JADS (CORREIA, et al., 1995) suplementado com 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar (Merck[®], Alemanha). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$ antes da adição do ágar e em seguida autoclavado a 121 °C, 1,1 Pa por 20 min, antes da inoculação das plântulas.

Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (TRP) com dois orifícios (10 mm cada) cobertos com membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) (taxa de troca de CO_2 : $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e vedados com filme plástico transparente de cloreto de polivinil (PVC) (Goodyear, São Paulo, Brazil). Estes frascos foram mantidos em sala de crescimento por 110 dias para o crescimento das raízes, nas mesmas condições citadas acima para germinação.

2.2. Indução da organogênese em explantes radiculares *in vitro*

Após o crescimento das plântulas (110 dias), em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, segmentos radiculares (com aproximadamente 15 cm de comprimento), obtidos da região mediana da raiz principal, foram excisados em torno de 10 mm de comprimento e usados como explantes. Estes explantes foram cultivados sob imersão contínua, em frasco Erlenmeyer de 125 mL (Vidrolabor, Paulínia, Brazil), contendo 10 mL de meio de cultura líquido JADS, suplementado com 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L^{-1} de sacarose e concentrações de BA (6-benziladenina), de forma isolada (0,0; 2,2 e $4,44 \mu\text{M}$) e em associação com ANA (ácido α -naftalenoacético) ($2,22 \mu\text{M}$ de BA + $0,054 \mu\text{M}$ de ANA e $4,44 \mu\text{M}$ de BA + $0,054 \mu\text{M}$ de ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$ e em seguida autoclavado a 121 °C, 1,1 Pa por 20 min antes da inoculação dos explantes de raiz. Os erlenmeyers foram selados com filme plástico

transparente de PVC mantidos em mesa agitadora orbital (Tecnal, Piracicaba, Brazil) a 100 rpm em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h, com irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil) por 90 dias. O surgimento e desenvolvimento das brotações foram acompanhadas com o auxílio de fotoestereoscópio (Olympus SZX7) com câmera digital acoplada (modelo Olympus EVOLT-330).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5 (acessos x concentrações de fitormônios) com quatro repetições de 15 explantes de raiz por repetição, sendo cada repetição representada por um frasco erlenmeyer. Foi realizada a contagem das brotações e porcentagem de explantes com brotações aos 60 dias após a instalação do experimento. Os dados de contagem das brotações foram transformados por $\sqrt{x}+0,5$ e os de porcentagem de explantes com brotações por arco seno de $\sqrt{x}/100$. Em seguida, submetidos à análise de variância e, quando houve significância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância, utilizando-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

2.3. Estudos anatômicos da organogênese em explantes radiculares *in vitro* de *Psidium* spp.

A análise estrutural da organogênese de raiz *in vitro* foi realizada com auxílio da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Para a microscopia de luz, foram coletadas amostras de explante de raiz periodicamente, nos tempos de 0, 20 e 40 dias após a inoculação. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5 % de glutaraldeído e 2,5 % de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato a pH 7,0) (KARNOVSKY, 1965) e armazenadas até o processamento das amostras. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e infiltradas em resina metacrilato (Historesin, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL). Posteriormente, foram obtidos cortes transversais dos explantes de 7 μm de espessura, utilizando um micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL). Os cortes foram dispostos em lâminas, secos em temperatura ambiente e em seguida corados com azul de toluidina 0,05 % e pH 4,4 por 15 min (O'BRIEN et al., 1964).

As lâminas foram montadas em resina sintética Permout® e em seguida foram

capturadas as imagens utilizando um fotomicroscópio Olympus Optical (modelo AX70TRF, Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital (Spot Insight Color 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA), do Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras de explante de raiz foram fixadas em Karnovsky (1965), posteriormente desidratadas em série crescente de acetona, secas em ponto crítico com CO₂ em um Bal-Tec 030, montadas em *stubs* e metalizadas com ouro, usando um revestidor de pulverização catódica FDU 010 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As imagens foram capturadas com auxílio de microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP, Cambridge, Inglaterra), equipado com câmera digital, no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa.

2.4. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização

Aos 90 dias em meio de indução de organogênese, as brotações obtidas dos explantes de raiz (2 a 3 cm de comprimento) de cada tratamento foram excisadas e inoculadas no meio de cultura JADS semi-sólido, com a mesma constituição e sob as mesmas condições utilizadas na fase de crescimento das plântulas após a germinação (item 2.1). Estas brotações foram alongadas, enraizadas e, após 60 dias, quando atingiram de 5 a 7 cm de comprimento, foram submetidas à aclimatização. Nesse processo, as plantas foram transferidas para copos plásticos (300 mL), preenchidos com substrato Plantmax[®] HT (Eucatex, Brasil), cobertos com sacos transparentes de polietileno para manter a alta umidade relativa do ar e foram mantidas em mini-estufa de vidro de aclimatização, com irrigação manual diária. Os sacos foram removidos de forma gradual ao longo de 45 dias, sendo iniciado a partir da segunda semana de aclimatização das plantas regeneradas de raiz até a sua completa aclimatização.

2.5. Análises de citometria de fluxo

O nível de ploidia das células das plantas regeneradas foi analisado por citometria de fluxo, utilizando amostras foliares dos cinco diferentes tratamentos de indução de organogênese a partir de explantes de raiz (item 2.2.) que apresentaram as melhores respostas organogênicas, a depender do acesso. Foram avaliadas 80 % das plantas regeneradas após a aclimatização. Como padrão externo tetraplóide (2C = 4x) de cada acesso foram utilizadas

amostras de folhas de plantas germinadas *in vitro* a partir de sementes, dos mesmos acessos de *Psidium* spp. em estudo.

Na obtenção das suspensões nucleares, seguiu-se as metodologias utilizadas por Costa et al. (2008) e Coser et al. (2012) com adaptações, onde as amostras de folhas jovens dos acessos de araçá e suas respectivas amostras padrões foram coletadas, colocadas em água destilada, secas em papel toalha e excisados segmentos foliares de aproximadamente 2 cm². Estes segmentos foram colocados em placas de Petri e os núcleos extraídos pela técnica de *chopping* (GALBRAITH et al., 1983), em 500 µL do tampão de lise OTTO-I (OTTO, 1990). As amostras foram incubadas por 3 min e filtradas (filtro 30 µm) em microtubos de 2 mL. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do mesmo tampão, para lavagem da placa e filtrados novamente. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 100 g e em seguida descartado o sobrenadante. O pellet foi resuspendido e incubado em 100 µL do tampão OTTO-I por 10 min (ABREU et al., 2008; ROSSI et al., 2008). As suspensões nucleares foram coradas com 1,5 mL de tampão OTTO-II suplementado com iodeto de propídeo (IP) (OTTO, 1990) e β-mercaptoetanol (2 µL mL⁻¹). Após 20 min, as suspensões nucleares foram filtradas (filtro 20 µm) em tubos de leitura e mantidas no escuro até o momento da leitura. As suspensões foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSVerse[®] do Núcleo de Microscopia e Microanálises/UFV. Os histogramas foram analisados em escala logarítmica, plotados com ajuda do software FlowJoTree Star Software[®].

3. RESULTADOS

3.1. Indução da organogênese em explantes radiculares *in vitro* de *Psidium* spp.

Segmentos de raízes dos acessos de araçá Y40, Y93 e Y97 de *P. guineense* e do acesso Y01 de *P. schenckianum* foram submetidos ao processo de organogênese *in vitro*, em meio líquido JADS, sob agitação orbital contínua (100 rpm), suplementado com diferentes concentrações de reguladores vegetais (BA e BA + ANA) (Tabela 1).

Pela análise de variância, observou-se que há diferenças significativas entre acessos, ($p < 0,05$) e há interação entre estes dois fatores, porém não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância do número de brotações e porcentagem de explantes com brotações (%) aos 60 dias de cultivo, em explantes de raiz de quatro acessos de araçá, três da espécie *Psidium guineense* (Y40, Y93 e Y97) e um da espécie *P. schenckianum* (Y01), cultivados em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes tratamentos de indução de organogênese de raiz.

Fonte de variação	Quadrados médios		
	GL	Nº de brotações	% Explantes com brotações
Acessos (A)	3	6,14*	0,85*
Tratamentos (T, em µM)	4	1,74ns	0,25ns
A x T	12	1,10**	0,17**
A/T	15	2,11**	0,31**
A/T - 0	3	3,49**	0,53**
A/T - 2,22 BA	3	3,91**	0,61**
A/T - 4,44 BA	3	0,97*	0,12 ^{ns}
A/T - 2,22 BA + 0,054 ANA	3	0,77 ^{ns}	0,10 ^{ns}
A/T - 4,44 BA + 0,054 ANA	3	1,44**	0,18*
T/A	16	1,26**	0,19**
T/Y01	4	0,00 ^{ns}	0,00 ^{ns}
T/Y40	4	0,98*	0,12 ^{ns}
T/Y93	4	3,55**	0,58**
T/Y97	4	0,53 ^{ns}	0,07 ^{ns}
Resíduo	60	0,32	0,053
Média		1,48	0,333
CV (%)		38,27	69,067

^{ns}Não significativo ao nível de 5 % probabilidade de erro, pelo teste F. * e ** Significativo ao nível de 5 e 1 % de probabilidade de erro respectivamente, pelo teste F.

Foi observada regeneração de brotos adventícios e porcentagem de brotos por explante, em todos os tratamentos de indução de organogênese em raiz, para os acessos de *P. guineense* (Y40, Y93, Y97), após 20 dias de cultura (Figuras 1 e 2C-F). Por outro lado, o acesso da espécie *P. schenckianum* (Y01) não formou brotos em nenhuma das condições (Figuras 1; Tabela 2).

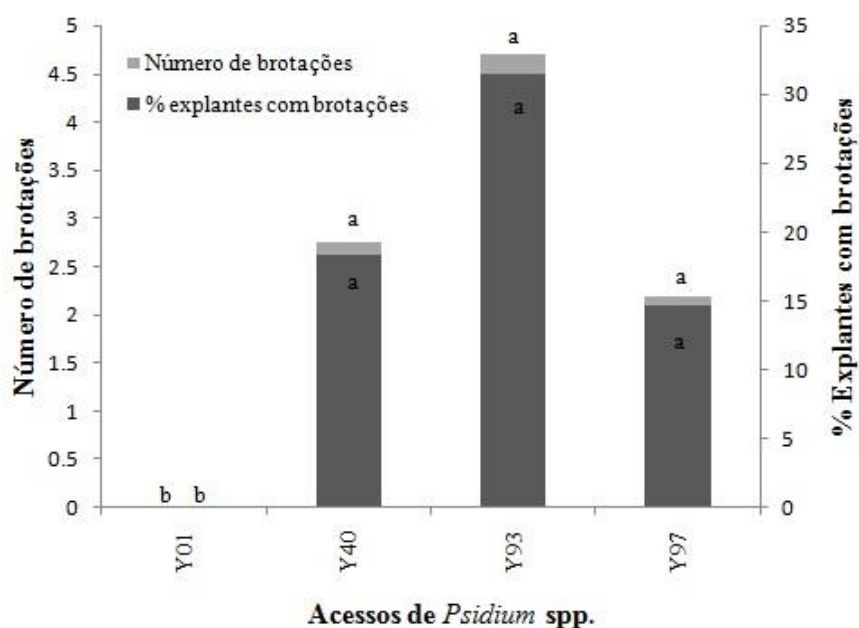


Figura 1. Número médio de brotações adventícias e percentagens de explantes com brotações em explantes radiculares de acessos de araquá da espécie *Psidium guineense* (Y40, Y93 e Y97) e *P. schenckianum* (Y01), aos 60 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

O processo organogênico em explantes radiculares dos acessos de *P. guineense* ocorreu de forma desuniforme, apresentando no mesmo explante e entre explantes brotos em diferentes fases de desenvolvimento ao longo de 60 dias de cultivo (dados não mostrados). Esta diferença também foi observada entre os tratamentos e dentro dos tratamentos de indução de organogênese de raiz, assim como entre os acessos.

Observou-se a partir da segunda semana de cultivo, explantes radiculares oxidados, com coloração de amarronzada a negra nos acessos de ambas as espécies em todos os tratamentos de indução; todavia, essa oxidação não interferiu nas respostas morfogênicas dos acessos da espécie *P. guineense*.

Quando analisada a interação, acessos (A) dentro de tratamentos (T) (Tabelas. 1 e 2), observou-se diferenças significativas para número de brotações entre todos os acessos, exceto no tratamento 2,22 BA + 0,054 ANA. Em relação à porcentagem de explantes com brotações, também houve diferenças significativas nas respostas morfogênicas dos diferentes acessos, particularmente nos tratamentos 4,44 de BA e 2,22 BA+ 0,054 ANA.

Por outro lado, quando analisados os tratamentos (T) dentro dos acessos (A) (Tabelas. 1 e 2), observou-se diferenças significativas para o número de brotações somente nos acessos

Y40 e Y93. O acesso Y93 comportou-se de forma diferente, apresentando as maiores médias de número de brotações (9,25 e 8,5) e de porcentagem de explantes com brotações (61,67 e 56,67%) quando inoculado em meio de cultura JADS, suplementado com 2,2 µM BA e sem adição de fitorreguladores (0,0 BA) respectivamente. Embora, não hajam diferenças estatísticas entre estes dois tratamentos para este acesso (Tabela 2).

O acesso Y97 comportou-se de forma similar em todos os tratamentos de indução de organogênese em raiz para as duas variáveis analisadas (Tabela 2).

Em relação ao acesso Y40, observa-se que suas maiores médias de brotações ocorreram em meio de cultura JADS sem adição de fitorreguladores e com 4,44 BA + 0,054 ANA, não havendo diferenças estatísticas entre esses dois tratamentos (Tabela 2).

O meio de cultura JADS sem suplementação de fitorreguladores é o tratamento mais indicado para indução da organogênese de raiz em acessos de araçá da espécie *P. guineense*, com o acesso Y93 apresentando as melhores médias (Tabela 2), embora este acesso não tenha diferido estatisticamente do acesso Y40 (Figura 1).

Tabela 2. Médias do número de brotações e porcentagem de explantes com brotações (%) aos 60 dias de cultivo, em explantes de raiz de quatro acessos de araçá (*Psidium* spp.), cultivados em meio de cultura JADS, suplementado com diferentes tratamentos de indução de organogênese de raiz.

Fitorreguladores (µM)	Número de brotações			
	Y01	Y40	Y93	Y97
0	0,71 (0)Ac	2,17 (4,25)Aa	2,92 (8,50)Aa	1,61 (2,25)Ab
2,22 BA	0,71 (0)Ac	1,46 (2,25)Bb	3,07 (9,25)Aa	1,86 (3,50)Ab
4,44 BA	0,71 (0)Ab	1,53 (2,25)Ba	1,74 (3,75)Ba	0,92 (0,50)Ab
2,22 BA + 0,054 ANA	0,71 (0)Aa	0,99 (0,75)Ba	0,96 (0,50)Ba	1,72 (2,50)Aa
4,44 BA + 0,054 ANA	0,71 (0)Ab	2,14 (4,25)Aa	1,36 (1,50)Ba	1,61 (2,25)Aa
Fitorreguladores (µM)	% explantes com brotações			
	Y01	Y40	Y93	Y97
0	0,05 (0) Ad	0,56 (28,3) Ab	0,92 (56,66) Aa	0,38 (15,0) Ac
2,22 BA	0,05 (0) Ac	0,30 (15,0) Ab	0,97 (61,66) Aa	0,47 (23,33)Ab
4,44 BA	0,05 (0) Aa	0,30 (15,0) Aa	0,42 (25,00) Ba	0,13 (3,33)Aa
2,22 BA + 0,054 ANA	0,05 (0) Aa	0,15 (5,0) Aa	0,16 (3,33) Ba	0,42 (16,66)Aa
4,44 BA + 0,054 ANA	0,05 (0) Ab	0,56 (28,3) Aa	0,25 (10,00) Bb	0,38 (15,00) Aa

Dados originais entre parênteses e dados transformados fora. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

3.2. Estudos anatômicos da organogênese em explantes de raiz *in vitro* de *Psidium* spp.

As análises estruturais demonstraram que os explantes na fase inicial, com o tempo 0 de cultivo (Figura 2 A e B), apresentavam o sistema vascular intacto, sem nenhuma divisão celular (Figura 2 B).

Após 20 dias de cultivo em meio de indução, foram regenerados brotos por organogênese direta nos três acessos de *P. guineense*, sendo observada uma fissura na superfície do explante, no local da protrusão do broto (Figura 2. C).

Nos tratamentos de indução de organogênese em raiz, utilizando 2,22 BA + 0,054 ANA e 4,44 BA + 0,054 ANA, observou-se no mesmo explante a formação de calos oriundos de células epidérmicas e o surgimento de brotações com primórdios foliares (Figura 2. D, E, F) nos três acessos de *P. guineense*, após 20 dias de cultivo. Porém, os calos não originaram brotações, ficaram escurecidos progressivamente (Figura 2. D), oxidaram e senesceram.

Observou-se a presença de meristemoides (Figura 2 E, F) e de cordões de compostos fenólicos circundando as brotações (Figura 2 F). A proliferação dos brotos ocorreu a partir de células do periciclo e células associadas ao tecido vascular (Figura 1. F), mantendo a conexão com o tecido vascular do explante (Figura 2 F), de forma consistente com o padrão de regeneração organogênica. Após 40 dias de cultivo, os brotos regenerados apresentavam meristemas apicais formados com as folhas totalmente desenvolvidas (Figura 2 G, H e I).

3.3. Alongamento das brotações, enraizamento e aclimatização

As brotações obtidas a partir de explantes radiculares dos diferentes acessos de araçá (Figura 2 J), iniciaram o enraizamento após oito dias em meio JADS, atingindo altura média de 7 cm, aos 60 dias (Figura 2 K), com eficiência de enraizamento de 80 % (Figura 2 L).

Observou-se também que não houve diferenças no alongamento e enraizamento dos brotos regenerados, decorrentes da origem dos explantes (tratamentos de fitorreguladores), sendo mantidos o vigor e o crescimento dos mesmos.

As plantas alongadas e enraizadas dos diferentes tratamentos de indução de organogênese foram aclimatizadas (Figura 2M), obtendo-se 100 % de sobrevivência (Figura 2 N), somando no geral 193 plantas, 0,21 brotações por explante.

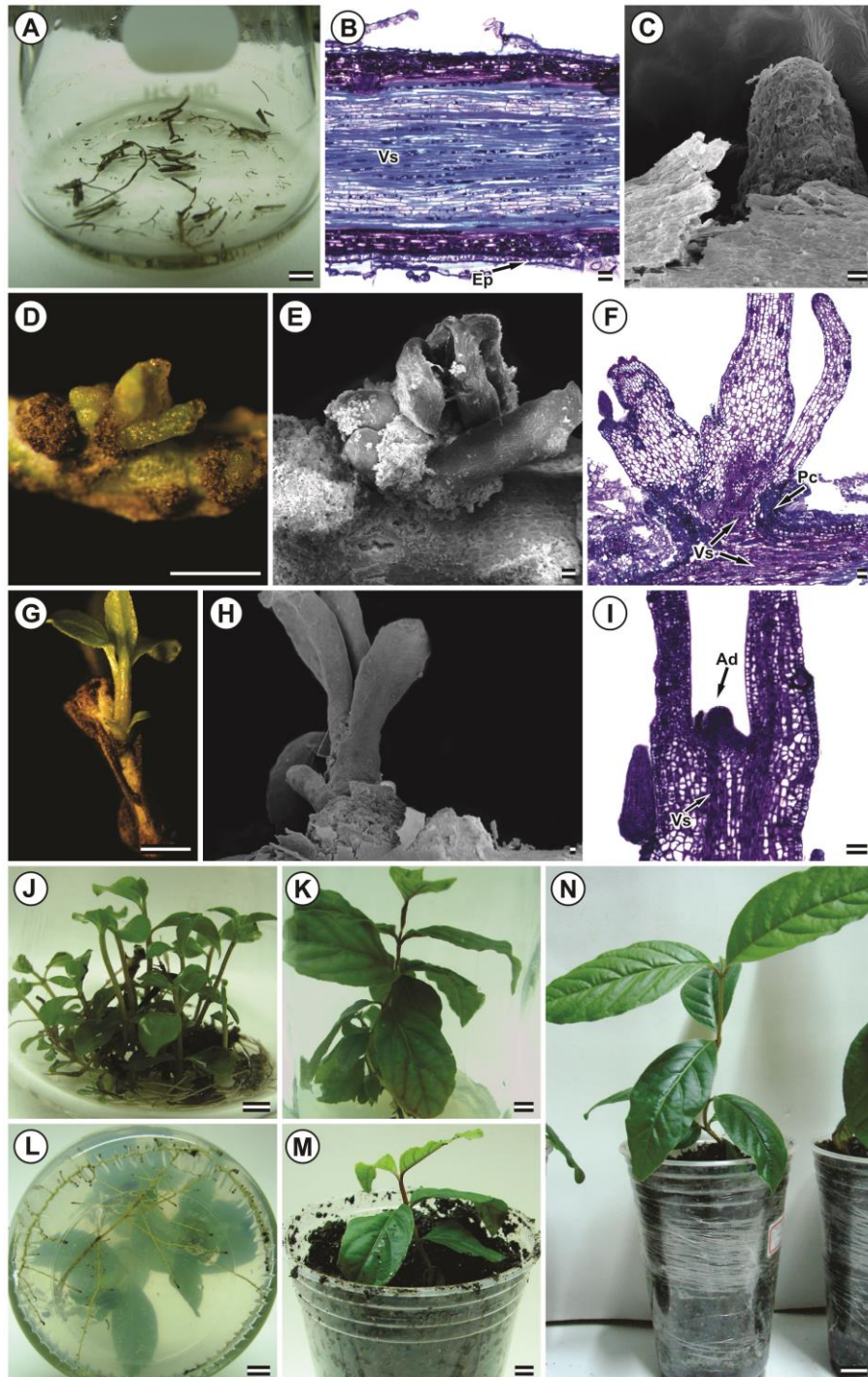


Figura 2. Organogênese in vitro de explante de raiz do acesso Y93 de *P. guineense* na fase inicial de indução a 0 de BA (A e B) e início de brotações após vinte dias de cultivo (C), com formação de calos e brotos diretos no tratamento de indução de 2,22 μ M BA + 0,054 μ M ANA (D, E e F), mostrando a conexão vascular entre o explante e brotação (F); desenvolvimento das brotações após 40 dias de cultivo (G, H e I); brotos oriundos dos explantes de raiz após 90 dias (J); fase de alongamento e enraizamento (K e L) e aclimatização das plantas regeneradas de explantes de raiz sob o meio de indução de 0 BA. Sistema vascular (Vs); Calos (Cl); Compostos fenólicos (Pc) e Domo apical (Ad). Barras de 50 μ m (B, C, E, F, H e I); 500 μ m (D e G) e 5 mm (A, J, K, L, M e N).

3.4. Análises de citometria de fluxo

Plantas regeneradas (80% das plantas aclimatizadas) foram analisadas por citometria de fluxo. As suspensões nucleares obtidas de protocolos adaptados de citometria de fluxo apresentaram núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Os valores de núcleos analisados foram obtidos de 10.000 eventos para todas as plantas.

Na avaliação do nível da ploidia das plantas regeneradas a partir da organogênese de raiz, observou-se nos histogramas de citometria de fluxo que as suspensões nucleares obtidas de folhas dos acessos de *P. guineense*, resultaram em picos de leitura da quantidade de DNA das amostras similares aos seus respectivos padrões tetraploides, não havendo variação na ploidia de DNA das plantas regeneradas dos três acessos de araçá em nenhum dos tratamentos (Figura 3).

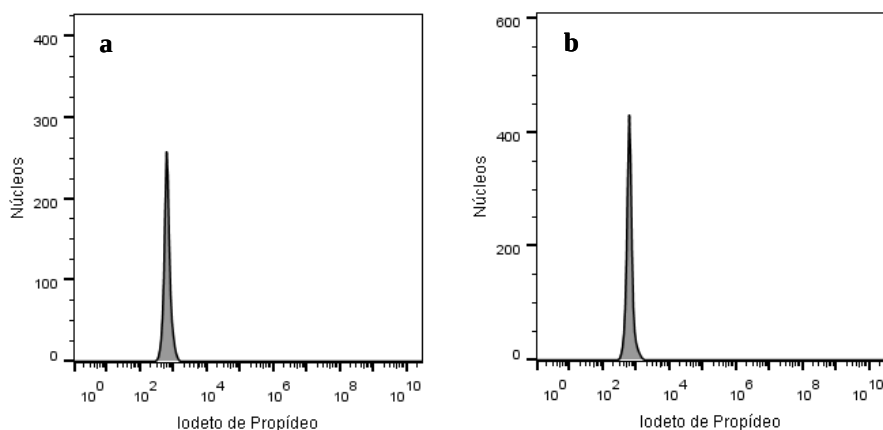


Figura 3. Histogramas representativos de citometria de fluxo em escala logarítmica de núcleos corados com iodeto de propídeo obtidos a partir de folhas dos acessos de *Psidium guineense*. a) Histograma representativo do padrão externo tetraploide germinado *in vitro* a partir de semente (pico G_0/G_1 canal = 604, $2C = 4x$), b) histograma representativo de plantas regeneradas a partir da organogênese de raiz (pico G_0/G_1 canal = 609, $2C = 4x$) (b).

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho é relatado pela primeira vez a eficiente regeneração adventícia de plantas de *P. guineense* a partir de explantes de raízes, em meio de cultura líquido JADS, sob

agitação contínua. A regeneração de brotos a partir de explantes radiculares de *Bixa orellana* foi relatada em meio de cultura líquido MS por nosso grupo (CRUZ et al., 2014). Porém, em meio líquido sob agitação contínua ocorre maior oferta de oxigênio para os explantes e os mantêm em contato direto com o meio, facilitando assim a absorção de nutrientes, estimulando a indução e crescimento de brotos (MEHROTRA et al., 2007).

A organogênese *in vitro* ocorreu em todas as concentrações de reguladores vegetais (BA e BA + ANA), inclusive na ausência destes fitorreguladores, para os acessos de araçá da espécie *P. guineense*. Este comportamento tem sido observado em outros trabalhos de organogênese em raiz como em *Passiflora cincinnata* (LOMBARDI et al., 2007), *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009), *Centaurea ulreiae* (MALLÓN et al., 2011), *Passiflora setacea* (VIEIRA et al., 2014) e *Citrus hystrix* (ENG et al., 2015). Este evento morfogênico pode estar relacionado à existência de concentrações endógenas de citocininas, suficientes para induzir brotações nos explantes radiculares, devendo-se levar em conta que a raiz é um dos sítios de síntese deste hormônio vegetal. Mallón et al. (2011) relacionam este evento a fisiologia do explante, bem como aos níveis endógenos de reguladores vegetais.

A desuniformidade observada na responsividade organogênica em explantes radiculares de *P. guineense* pode estar diretamente ligada ao fator genético, devido à variabilidade genética existente entre os acessos de araçá da mesma espécie, assim como dentro dos acessos. A desuniformidade dentro do acesso pode estar relacionada à posição de onde se extraiu o explante. Sugere-se que seja investigado futuramente se há ocorrência de gradientes e consequentes respostas diferenciais entre as extremidades proximal e distal. Esta desuniformidade também foi notada na organogênese em segmentos de raízes de *Passiflora*, no mesmo explante e entre explantes (LOMBARDI et al., 2007; SILVA et al., 2011; ROCHA et al., 2012) e entre genótipos (SILVA et al., 2011). Para Lombardi et al. (2007) a assincronia da responsividade organogênica no mesmo explante pode ser explicada pelos diferentes estádios de aquisição de competência e determinação celular do explante.

A oxidação e o escurecimento dos explantes de raiz podem ter sido um dos principais problemas que limitou as respostas organogênicas da espécie *P. schenckianum*, não sendo controlado pelo PVP adicionado ao meio de cultura onde foram cultivados estes explantes. Segundo Bezerra et al. (2014) a oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, geralmente devido a danos causados nas células durante a excisão dos explantes. Para Bassan et al. (2006), a ocorrência de compostos fenólicos pode estar ligada a processos de regulação de crescimento, os quais, dependendo da concentração endógena no

tecido, induzem à síntese destes compostos, sendo altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado.

A exsudação de compostos fenólicos é muito comum em espécies de mirtáceas (FACHINELLO, 2005), e tem limitado o cultivo *in vitro* de *Psidium guajava* (LIU e YANG, 2011). Este fenômeno tem sido observado em várias espécies cultivadas *in vitro*, como em *Peltophorum dubium* (BASSAN et al., 2006), *Platanus occidentalis* (TAO et al., 2007), *Pinus sylvestris* (PIRTTILÄ et al., 2008) e *Phoenix dactylifera* (MAZRI; 2014). No processo de organogênese de *P. dactylifera*, o escurecimento do tecido dificultou a eficiência de multiplicação de brotos e levou à morte do material (MAZRI, 2014), o que pode ter ocorrido com os explantes radiculares da espécie *P. schenckianum* neste trabalho.

Outros fatores que podem ter interferido no sucesso da organogênese de explantes radiculares da espécie *P. schenckianum* são às condições de cultivo, como luminosidade, tipo de meio, tipos e concentrações de fitorreguladores, dentre outros, devendo ser desenvolvidos outros trabalhos com esta espécie em outras condições.

Citocininas são necessárias para a manutenção e diferenciação de meristemas apicais da parte aérea e de raízes (RIEFLER et al., 2006; PERILLI et al., 2010), mas durante a organogênese *in vitro*, a alta relação citocinina/auxina promove tradicionalmente a expressão de genes essenciais para a indução da formação *de novo* de brotações (SU et al., 2011).

O efeito de BA na promoção da diferenciação de gemas formadas a partir de explante de raiz tem sido relatado para várias espécies de planta, como *Melia azedarach* (VILA et al., 2005), *Passiflora cincinnata* (LOMBARDI et al., 2007), *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009), *Cassia angustifolia* (PARVEEN e SHAHZAD 2011), *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis* (SILVA et al. 2011), *Centaurea ultreiae* (MALLÓN et al. 2011), *Passiflora edulis* (ROCHA et al., 2012), *Passiflora setacea* (VIEIRA et al., 2014), *Bixa orellana* (CRUZ et al., 2014) e *Citrus hystrix* (ENG et al., 2015).

Em araçá, a adição de diferentes concentrações de BA e BA +ANA ao meio de cultura não promoveu aumento no número de brotações e na porcentagem de explantes com brotações em nenhum dos tratamentos para os acessos Y40 e Y93. Lombardi et al. (2007) reportaram que a eficiência da formação de brotações em explantes de raiz de *P. cincinnata* não diferiu entre as concentrações de BA utilizadas, corroborando com os dados desta pesquisa para estes dois acessos. Em contraste, Perveen e Shahzad (2011) observaram as melhores médias de número de brotações em explantes radiculares de *Albizia lebbbeck* utilizando-se o efeito combinado de BA com ANA.

O acesso Y93 apresentou as maiores médias para número de brotações e porcentagens de explantes com brotações, demonstrando variação na responsividade organogênica entre os acessos de araçá da mesma espécie. Fan et al. (2013) observaram respostas diferenciadas para o mesmo meio de cultura na propagação de *Stevia rebaudiana* com diversas origens genéticas, provavelmente devido ao condicionamento genético.

Embora as citocininas sejam conhecidas por influenciar multiplicação das brotações, seus efeitos variam consideravelmente de genótipo para genótipo (MAZRI, 2014), dentro da mesma espécie, sendo o sucesso da organogênese altamente dependente do genótipo (JAIN, 2012).

Ainda corroborando com os dados desta pesquisa, Lombardi et al. (2007) e Eng et al. (2015) observaram os maiores números de brotações e maiores porcentagens de explantes com brotações na concentração de 2,22 μ M de BA em explantes de raiz de *P. cinnamomum* e em *C. hystrix*, respectivamente. Porém, para o presente trabalho não houve diferença estatística entre 0,0 e 2,2 μ M de BA para o acesso Y93.

Em explantes nodais e/ou explantes apicais de goiabeira as maiores respostas organogênicas foram observadas entre 4,44 e 8,88 μ M de BA (SINGH et al., 2002; SHAH et al., 2008; RAI et al., 2009; USMAM et al., 2012), superior ao observado neste trabalho, podendo estar relacionado ao tipo de explante utilizado e ao genótipo. Rai et al. (2009) observaram que quando BA foi associado com ANA houve redução no número de brotações por explantes na regeneração de brotos de goiabeira (*Psidium guajava*) a partir de segmentos nodais, o que evidencia que o efeito sinérgico da combinação destas fontes de auxina e citocinina atuam de forma negativa na regeneração de brotos de goiabeira, corroborando com os resultados desta pesquisa para o acesso de araçá Y93.

Dessa forma, observa-se que os três acessos de araçá da espécie *P. guineense* foram responsivos na regeneração de brotos a partir de explantes de raiz, e a responsividade organogênica destes acessos foi independente da adição dos fitorreguladores (BA e BA + ANA) utilizados. Gana (2010) relata que explantes que produzem citocininas suficientes não precisam de citocininas extras para ser adicionado ao meio de cultura, o que pode ter ocorrido com os explantes de raiz dos acessos de *P. guineense*.

Brotos formados nas raízes de araçá originaram-se de organogênese direta, a partir de células do periciclo, com uma ligação vascular entre o broto e o explante de raiz. Estando de acordo com o padrão morfogênico descrito nas espécies de plantas de *M. azedarach* (VILA et al., 2005), *P. cinnamomum* (LOMBARDI et al., 2007; SILVA et al., 2011), *P. edulis* (SILVA et

al., 2011; ROCHA et al., 2012), *B. orelana* (CRUZ et al., 2014), *P. setacea* (VIEIRA et al., 2014) e em *P. corylifolia* (JANI et al., 2015). Para Sugimoto et al. (2011), as células do periciclo são consideradas células-tronco distribuídas por todo o sistema vascular da planta e dependendo do tipo de estímulo hormonal, pode gerar raízes laterais ou novas brotações.

Atta et al. (2009) observaram que quando explantes radiculares de *Arabidopsis* foram cultivados diretamente em meios de cultura contendo citocininas, células do periciclo foram capazes de regenerar brotos diretamente nos locais onde raízes laterais deveriam ter sido iniciado, demonstrando assim o amplo caráter pluripotente das células do periciclo.

No que diz respeito ao cordão fenólico observado no processo organogênico de raiz de araçá, Alemanno et al. (2003) em estudos de localização e identificação de compostos fenólicos durante a embriogênese somática de *Theobroma cacao*, observaram após 21 dias de cultivo em estaminoides, um cordão de taninos nas células situadas ao redor dos nódulos meristemáticos. A síntese destes compostos pode ser devido à desdiferenciação celular e/ou em resposta ao ferimento e estresse induzido pelas condições de cultivo *in vitro*, e a formação do cordão fenólico externo funciona como uma barreira química de proteção contra os fatores inerentes as condições de cultivo (ALEMANNO et al., 2003), prejudiciais nos processos de embriogênese e organogênese.

O alongamento de brotos, enraizamento e aclimação, em algumas espécies, o sucesso destas fases depende da suplementação com reguladores vegetais, como giberelinas no alongamento e auxinas no enraizamento dos brotos, em diferentes concentrações, a depender da espécie e das condições de cultivo. Neste trabalho, foram usados meios livres de fitorreguladores nestas fases, apresentando resultados positivos, não sendo influenciado pelas condições anteriores de regeneração dos brotos. Esta mesma tendência foi observada em *Phoenix dactylifera* L. (MAZRI e MEZIANI, 2013 e MAZRI, 2014).

Em relação ao nível de ploidia dos brotos regenerados, o presente trabalho demonstrou que a utilização de β -mercaptoetanol como agente antioxidante na coloração das suspensões nucleares das plantas regeneradas e de seus respectivos padrões, foi extremamente importante na obtenção dos histogramas sem efeito dos metabólitos secundários.

A análise de citometria de fluxo revelou que as plantas derivadas de sementes, padrão tetraploide ($2C = 4x$) e as plantas regeneradas a partir de explantes radiculares de todos os tratamentos de indução mantiveram o mesmo nível de ploidia, não havendo variação na estabilidade genética dos brotos regenerados. Corroborando com os resultados de Silva et al. (2011) e Vieira et al. (2014) na indução de organogênese em explantes radiculares em

Passiflora, utilizando BA.

Atta et al. (2009) ressaltam a capacidade das células do periciclo ao serem induzidas com citocininas a reentrar rapidamente no ciclo celular e após vários ciclos de divisão manter a ploidia e a fidelidade genética das plantas regeneradas. Dessa forma, a indução de organogênese direta a partir de células do periciclo impossibilita a variação somaclonal.

5. CONCLUSÕES

1. Os explantes de raízes dos três acessos de *P. guineense* são responsivos ao processo organogênico direto a todos os tratamentos de indução utilizados, mantendo o nível de ploidia das plantas regeneradas semelhante ao das plantas oriundas de sementes;
2. No geral, foi possível regenerar 193 plantas de *P. guineense*, com uma média de 0,21 brotações por explante de raiz;
3. Na indução de organogênese em explantes de raiz de *P. guineense* é indicada a utilização de meios de cultura sem adição dos fitorreguladores;
4. As respostas organogênicas se mostraram dependentes da espécie, o que leva-nos a sugerir que trabalhos futuros ampliem o número de espécies de araçá, avaliando-se o máximo da diversidade genética em araçá, bem como utilizando outras condições de cultivo e fitorreguladores para otimização de regeneração e determinação de protocolos de regeneração de plantas de araçá;
5. A utilização de explantes radiculares de *P. guineense* constitui-se numa alternativa promissora de propagação e clonagem dessa espécie para o apoio a futuros trabalhos de melhoramento.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, I.S.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. **Plant Cell Reports**, v.27, p.1227–1233, 2008.

ALEMANN, L. RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v.92, n.4, p.613–23, 2003.

ALMEIDA, E.J.; SANTOS, J.M.; MARTINS, A.B.G. Resistência de goiabeiras e araçazeiros

a *Meloidogyne mayaguensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.421-423, 2009.

ATTA R.; LAURENS L.; BOUCHERON-DUBUISSON E.; GUIVARCH A.; CARNERO E.; GIRAUDAT-PAUTO T. V.; RECH P.; CHRIQUI, D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyls explants grown *in vitro*. **Plant Journal**, v.57, p.626–644, 2009.

BALISTEIRO, D.M.; ALEZANDRO, M.R.; GENOVESE, M.I. Characterization and effect of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) juice on postprandial glycemia in healthy subjects. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p. 66–74, 2013.

BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R. S.; ROCHA, B.H.G.; SEVERO, C.R.P.; FLORES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p.381-390, 2006.

BEZERRA, R.M.D.F.; ALOUFA, M.A.I.; FREIRE, F.A.M.; SANTOS, D.D. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, v.38, n.5, p.771-778, 2014.

CAMPOS, V.C.A.; BRITO, A.L.; GUTIERREZ, I.E.M.; SANTANA, J.R.F.; SOUZA, A.V.V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p.639-644, 2013.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CIROTTO, P.A.; QUINTANILHA, A.P.; SILVA, D.B.; CARNEIRO, R.G. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. Accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.281-284, 2007.

CASTRO, J.M.C., SANTOS, C.A.F., FLORI, J.E.; SIQUEIRA, S.V.C., NOVAES, P. A.R.; LIMA, R.G. Reaction of *Psidium* accessions to the *Meloidogyne enterolobii* root-knot a nematode. **Acta Horticulturae**, v.959, p.51-57, 2012.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n.48/49, p.107-116, 1995.

COSER, S.M.; FERREIRA, M.F.S.; FERREIRA, A.; MITRE, L.K.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. **Scientia Horticulturae**, v.148, p.223–229, 2012.

COSTA, I.R.; DORNELAS, M.C.; FORNI-MARTINS, E.R. Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical Myrtaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v.276, n.3-4, p.209–217, 2008.

COSTA, G.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p.1090-1096, 2010.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.15-19, 2010.

CRUZ, A.C.F.; ROCHA, D.I.; IAREMA, L.; VENTRELLA, M.C.; COSTA, M.G.C.; PAIVA NETO, V.B.; OTONI, W.C. *In vitro* organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.50, n.1, p.76–83, 2014.

CRUZ, C.D. GENES - A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, p.271-276, 2013.

DUCLERCQ, J.; SANGWAN-NORREEL, B.; CATTEROU, M.; SANGWAN, R.S. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in Plant Science**, v.16, n. 11, p.597–606, 2011.

ÉDER-SILVA, E.; FELIX, L.P.; BRUNO, R.D.L.A. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n.1, p.110-114, 2007.

ENG, W.H.; AZIZ, M.A.; SINNIH, U.R. *In vitro* regeneration of *Citrus hystrix* DC. **Brazilian Journal of Botany**, 2015.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.488-490, 2005.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas. Brasília**: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

FAN, Q.J.; ZHENG, S.C.; YAN, F.X.; ZHANG, B.X.; QIAO, G.; WEN, X.P. Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of *in vitro*: derived plants using ISSR markers. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.88, n.5, p.631–637, 2013.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; PEREIRA, J.E.S. Germinação e propagação *in vitro* de Cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, v.22, n.1, p.1-9, 2012.

FERNANDES, T.G.; MESQUITA, A.R.C.; RANDAU, K.P.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. The Scientific World Journal, v.2012, p.1-7, 2012.

FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.Z.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. **Araças do gênero *Psidium*: Principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2009, 48 p. (Documentos, n. 266).

FREITAS, V.M.; CORREA, V.R.; MOTTA, F.C.; SOUSA, M.G.; GOMES, A.C.M.M.; CARNEIRO, M.D.G.; SILVA, D.B.; MATTOS, J.K.; NICOLE, M.; CARNEIRO, R.M.D.G. Resistant accessions of wild *Psidium* spp. to *Meloidogyne enterolobii* and histological characterization of resistance. **Plant Pathology**, v.63, n. 4, p.738–746, 2013.

GALBRAITH, D.W. Analysis of higher plants by flow cytometry and cell sorting. **International Review of Cytology**, v.116, p.165-228, 1989.

GANNA, A.S. The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.51, p.10330–10334, 2010.

GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZÁLEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Estudio fitoquímico e actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.1, n.10, p.3-4, 2005.

GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p.260-265, 2011.

HAMINIUK, C.W.I.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; GUEDES, A.R.; STAFUSSA, A.P.; BONA, E.; CARPES, S.T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.7, p.1529–1537, 2011.

HIRANO, R.T. Chromosomal and pollination studies as related to intra-specific and interspecific compatibility in the genus *Psidium*. Master's thesis, University of Hawaii, Honolulu, 1967.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p. 1025-1028. 1973.

JAIN, S.M. Date palm biotechnology: current status and prospective an overview. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.24, p.386–399, 2012.

JANI, J.N.; JHA, S.K.; NAGAR, D.S. Root explant produces multiple shoot from pericycle in *Psoralea corylifolia* – a leprosy destroyer medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v.67, p.324–329, 2015.

KARNOVSKY, M.J.A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137–138, 1965.

LIU, X.; YANG, G. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L) on nodal explants of mature elite cultivar. **International Journal of Plant Biology**, v.2, n.1, p.7–10, 2011.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-da-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.50, n.2, p.239–247, 2007.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640p.

LUCIANI, G.F.; MARY, A.K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.39-143, 2006.

MALLÓN, R., RODRÍGUEZ-TOUBINA, J., GONZÁLEZ, M.L. Shoot regeneration from *in vitro*-derived leaf and root explants of *Centaurea ulreiae*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.106, p.523–530, 2011.

MARTINS, L.S.; MUSSER, R.S.; SOUZA, A.G.; RESENDE, L.R.; MALUF, W.R. Parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* em espécies de Myrtaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.2, p.477-484, 2013.

MAZRI, M.A.; MEZIANI, R. An improved method formicropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.22, p.176–184, 2013.

MAZRI, M.A. Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve in vitro shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Bouffegous. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 2014.

MEHROTRA S.; GOEL M.K.; KUKREJA A.K.; MISHRA B.N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.1484–1492, 2007.

MIRANDA, G.B.; SOUZA, R.M.; GOMES, V.M.; FERREIRA, T.F.; ALMEIDA, A.M. Avaliação de acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterolobii*. **Bragantia**, v.71, n.1, p.52-58, 2012.

NACHTIGAL, J.C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R.A.; FACHINELLO, J.C.; MAZZINI, A.R.A. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*P. cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, p.229- 235, 1994.

NAZ, R.; ANIS, M.; EL ATTA, H.A. Micropropagation of *Cassia occidentalis* L. and the effect of irradiance on photosynthetic pigments and antioxidative enzymes. **Biologia Plantarum**, v.59, n.1, p.1-10, 2015.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981. 45p.

OTTO, F.J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: DARZYNKIEWICZ, Z.; CRISSMAN, H.A (eds) **Method in cell biology**, Academic Press, San Diego, v.133, 1990. p.105-110.

PARVEEN S.; SHAHZAD A.A. micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. from root explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.789–796, 2011.

PERILLI S.; MOUBAYIDIN L.; SABATINI S. The molecular basis of cytokinin function. **Current Opinion in Plant Biology**. v.13, p.21–26, 2010.

PESSANHA, P.G.O.; VIANA, A.P.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SOUZA, R.M.; TEXEIRA, M.C.; PEREIRA, M.G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.129-136, 2011.

PILATTI F.K.; AGUIAR T.; SIMÕES T.; BENSON E.E.; VIANA A.M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.47, p.82-98, 2011.

PIRTTILÄ, A.M.; PODOLICH, O.; KOSKIMÄKI, J.J.; HOHTOLA, E.; HOHTOLA, A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinussylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.47–55, 2008.

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

RIEFLER M.; NOVAK O.; STRNAD M.; SCHMÜLLING T. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, v.18, p.40–54, 2006.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A. O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.111, n.1, p.69–78, 2012.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA, P.R.B.; MENDES, C.S.O.; REIS JUNIOR, R.; VALERIO, H.M.; BRANDI, I.V.; OLIVEIRA, D.A. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.8, n.35, p.1095–1100, 2014.

ROSSI, A.A.B.; CLARINDO, W.R.; CARVALHO, C.R.; OLIVEIRA, L.O. Karyotype and nuclear DNA content of *Psychotria ipecacuanha*: a medicinal species. **Cytologia**, v.73, p.53–60, 2008.

SANTOS, M.A.C.; QUEIROZ, M.A.; SANTOS, A.S.; SANTOS, L.C.; CARNEIRO, P.C.S. Diversidade genética entre acessos de araçá de diferentes municípios do semiárido baiano. **Revista Caatinga**, v.27, n.2, p.48–57, 2014.

SHAH, S.T.; ZAMIR, R.; AHMAD, J.; ALI, H.; LUTFULLAH, G. *In vitro* regeneration of plantlets from seedling explants of Guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.1195-1200, 2008.

SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.3, p.407–416, 26 jun. 2011.

SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, n.3, p.240–243, 2003.

SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.98, n.1, p.79–86, 2009.

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R.; SHARMA, H.C.; SINGH, S.P. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, v.95 p.213-221, 2002.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae**: lista de espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>> Acesso em: 10 fev. 2015.

SOUZA, A.G.; RESENDE, L.V.; LIMA, I.P.; MARTINS, L.S.S.; TECHIO, V.H. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. **Plant Systematics and Evolution**, v.301, n.1, p.231–237, 2015.

SOUZA, A.G.; RESENDE, L.V.; LIMA, I.P.; SANTOS, R.M.; CHALFUN, N. N. J. Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v.44, n.5, p.822-829, 2014.

SU, Y.H.; LIU, Y.B.; ZHANG, X.S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v.4, p.616–625, 2011.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S.P.; MEYEROWITZ, E.M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology**, v.21, n.4, p.212–218, 2011.

TAO, F.; ZHANG, Z.; ZHOU, J.; YAO, N.; WANG, D. Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. **Forestry Studies in China**, v.9, p.279–282, 2007.

USMAN, M.; BUTT, M.; FATIMA, B. Enhanced *in vitro* multiple shoot induction in elite Pakistani guava cultivars for efficient clonal plant multiplication. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.44, p.10182–10187, 2012.

VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A; KLERK, G.J (eds) **Plant propagation by tissue culture, vol I the background**, 3rd edn. Springer, Dordrecht, 2008. p.205–226.

VIEIRA, L.M.; ROCHA, D.I.; TAQUETTI, M.F.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F; OTONI, W.C. *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.50, n.6, p.738–745, 2014.

VILA S.; GONZALEZ A.; REY H.; MROGINSKI L. Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.41, p.746–751, 2005.

WEI, Q.; CAO, J.; QIAN, W.; XU, M.; LI, Z.; DING, Y. Establishment of an efficient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2015.

CONCLUSÕES GERAIS

1. O crescimento de araçá (acessos Y93, Y95, Y97) e de goiabeira (cv. GP) na micropropagação *in vitro* é um processo extremamente regulado pela composição do meio de cultura;
2. Apesar de haver interação entre os genótipos e meio de cultura para a maioria das variáveis estudadas, as respostas não foram genótipos e/ou espécies dependentes, todos apresentaram maior crescimento no meio de cultura JADS;
3. A constituição nutricional do meio de cultura JADS é indicada para o crescimento e desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *P. guineense* e *P. guajava* para usos futuros em trabalhos de melhoramento genético dessas espécies;
4. Os diferentes níveis de trocas gasosas entre o ambiente interno e externo do recipiente de cultivo influenciam no crescimento e nas características morfofisiológicas, anatômicas e histoquímica de plantas de *Psidium* spp. crescidas *in vitro* e na capacidade de adaptação às condições *ex vitro* no processo de aclimatização;
5. O sistema de propagação *in vitro* convencional SM, interfere negativamente nas características de crescimento, morfofisiológicas, anatômicas, histoquímica e nas taxas de sobrevivência ainda *in vitro* e no processo de aclimatização das plântulas de *P. guineense* (acessos Y93, Y95, Y97) e de *P. guajava* (cv. GP), demonstrando alta sensibilidade a estas condições de cultivo, sendo o grau de sensibilidade genótipo/dependente;
6. O crescimento em função das TT CO_2 de 21 e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ no ambiente de cultura *in vitro* é dependente da característica a ser avaliada, da espécie e do genótipo dentro da mesma espécie;

7. A utilização de membranas permeáveis a gases com TTCO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1}$ é indicada para o crescimento e desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de *P. guineense* (acessos Y93, Y95, Y97) e de *P. guajava* (cv. GP) para usos futuros em trabalhos de melhoramento genético dessas espécies;
8. Na indução de rizogênese em explantes de parte aérea de *P. guineense*, não é necessário a adição de AIB ao meio nutritivo;
9. A propagação clonal de *P. guineense* é possível através de segmentos caulinares, nodais e apicais, com e sem adição de fitorreguladores;
10. Na regeneração *in vitro* de *P. guineense*, é indicado a utilização de segmentos nodais, sem adição de fitorreguladores; segmentos apicais com $2,22 \mu\text{M}$ de BA e segmentos caulinares com $2,22$ e $4,44 \mu\text{M}$ de BA, sob as condições de cultivo testadas;
11. Não foi possível a regeneração de brotos por organogênese adventícia, a partir de secções foliares e segmentos intermodais, nas condições e concentrações de fitorreguladores testadas, devendo-se avaliar outras condições de cultivo e fitorreguladores para possibilitar a multiplicação destes tipos de explantes;
12. Os explantes de raízes dos três acessos de *P. guineense* são responsivos ao processo organogênico direto a todos os tratamentos de indução utilizados, mantendo o nível de ploidia das plantas regeneradas semelhante ao das plantas oriundas de sementes;
13. No geral, foi possível regenerar 193 plantas de *P. guineense*, com uma média de 0,21 brotações por explante de raiz;
14. Na indução de organogênese em explantes de raiz de *P. guineense* é indicada a utilização de meios de cultura sem adição dos fitorreguladores;
15. As respostas organogênicas se mostraram dependentes da espécie, o que leva-nos a sugerir que trabalhos futuros ampliem o número de espécies de araquá, avaliando-se o máximo da diversidade genética em araquá, bem como utilizando outras condições de cultivo e fitorreguladores para otimização de regeneração e determinação de protocolos de regeneração de plantas de araquá;
16. A utilização de explantes radiculares de *P. guineense* constitui-se numa alternativa promissora de propagação e clonagem dessa espécie para o apoio a futuros trabalhos de melhoramento.