



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Rubus sellowii* E MICROPROPAGAÇÃO DE  
*Morus nigra*

WILLIAN NAVES DUARTE

Araras  
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Rubus sellowii* E MICROPROPAGAÇÃO DE  
*Morus nigra***

**WILLIAN NAVES DUARTE**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras  
2018

DUARTE, WILLIAN NAVES

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Rubus sellowii* E  
MICROPROPAGAÇÃO DE *Morus nigra* / WILLIAN NAVES DUARTE. --  
2018.

104 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Araras, Araras

Orientador: JEAN CARLOS CARDOSO

Banca examinadora: JEAN CARLOS CARDOSO; VICTOR AUGUSTO  
FORTI; SIMONE RODRIGUES DA SILVA

Bibliografia

1. DORMÊNCIA. 2. CULTIVO IN VITRO. 3. EMRBIOGÊNESE  
SOMÁTICA. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III.  
Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Willian Naves Duarte, realizada em 28/05/2018:

---

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso  
UFSCar

---

Prof. Dr. Victor Augusto Forti  
UFSCar

---

Profa. Dra. Simone Rodrigues da Silva  
ESALQ/USP

## AGRADECIMENTOS

À **minha família**, por todo apoio durante todos esses anos;

Ao meu orientador, **Jean Carlos Cardoso**, pela paciência, ensinamentos e por sempre nos incentivar a fazer o melhor. Sempre me espelharei em seu profissionalismo e exemplo de pessoa;

À **Maiara Barros de Oliveira**, pelo amor dedicado e companheirismo em todas as circunstâncias;

Aos eternos amigos **Cesar, Gilmar e Luciano**. Vocês possuem um valor inestimável e foram essenciais para que pudesse chegar até aqui;

Às Orientadores que me acompanharam durante minha graduação, **Janáina, Luciana e Katia**. Obrigado pela ajuda, conselhos e pela experiência que pude adquirir ao longo desses anos;

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Horticultura e Paisagismo, **Douglas, Saulo, Naiara, Bárbara e Ana Victória**, pela ajuda, risadas e pelos erros que superamos no dia-a-dia. São com eles que mais aprendemos;

Aos **colegas** do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, pelos momentos de descontração em meio aos estudos;

Aos **membros da banca**, por aceitarem o convite e fazerem parte desse importante momento da minha vida;

Aos meus irmãos de quatro patas, **Tico e Max**. Vocês já não estão mais nesse mundo, mas sempre estarão em meu coração;

À **Capes**, pela bolsa concedida, que pôde tornar esse projeto realidade, e à **UFSCar** pela oportunidade e pela infraestrutura disponibilizada.

**A todos o meu muito obrigado.**

## SUMÁRIO

	Página
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>OBJETIVOS</b> .....	03
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	04
1 Propagação de plantas.....	04
2 <i>Rubus</i> .....	06
3 <i>Morus</i> .....	08
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	10
<b>CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Rubus sellowii</i></b> .....	17
1 Resumo.....	17
2 Introdução.....	18
3 Materiais e Métodos.....	19
3.1 Caracterização morfológica e biometria de sementes de <i>R. sellowii</i> .....	19
3.2 Estabelecimento de curva de embebição em sementes de <i>R. sellowii</i> .....	19
3.3 Germinação de sementes de <i>R. sellowii</i> em bandeja contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação.....	20
3.4 Avaliação da concentração e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO) na escarificação de sementes de <i>R. sellowii</i> .....	20
3.5 Avaliação do tempo de exposição ao ácido sulfúrico na escarificação química de sementes de <i>R. sellowii</i> .....	21
3.6 Tratamentos adicionais para escarificação química de <i>R. sellowii</i> .....	21
3.7 Análise estatística.....	22

4	Resultados e Discussão.....	23
4.1	Caracterização morfológica e biometria de sementes de <i>R. sellowii</i> .....	23
4.2	Estabelecimento de curva de embebição em sementes de <i>R. sellowii</i> .....	23
4.3	Germinação de sementes de <i>R. sellowii</i> em bandeja contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação.....	26
4.4	Avaliação da concentração e tempo de exposição a hipoclorito de sódio (NaClO) na escarificação de sementes de <i>R. sellowii</i> .....	30
4.5	Avaliação do tempo de exposição ao ácido sulfúrico na escarificação química de <i>R. sellowii</i> .....	32
4.6	Tratamentos adicionais para escarificação química de <i>R. sellowii</i> .....	34
5	Conclusões.....	38
6	Literatura citada.....	39
<b>CAPÍTULO 2. MICROPROPAGAÇÃO EFICIENTE DE AMORA PRETA E INFLUÊNCIA DA LUZ NATURAL NA CONDUÇÃO <i>in vitro</i> PARA ACLIMATIZAÇÃO.....</b>		
		42
1	Resumo.....	42
2	Introdução.....	43
3	Materiais e Métodos.....	44
3.1	Introdução <i>in vitro</i> de <i>M. nigra</i> .....	44
3.2	Multiplicação <i>in vitro</i> de amora preta utilizando diferentes concentrações e tipos de reguladores vegetais.....	45
3.3	Condições de cultivo e tempo de condução <i>in vitro</i> na aclimatização de plantas de amora negra.....	45
3.4	Análise estatística.....	46
4	Resultados e Discussão.....	46
4.1	Introdução <i>in vitro</i> de <i>M. nigra</i> .....	46
4.2	Multiplicação <i>in vitro</i> de amora preta utilizando diferentes concentrações e tipos de reguladores vegetais.....	46

4.3	Condições de cultivo e tempo de condução <i>in vitro</i> na aclimatização de plantas provenientes de cultivo <i>in vitro</i> .....	50
4.3.1	Desenvolvimento <i>in vitro</i> ou pré-aclimatização.....	50
4.3.2	Desenvolvimento <i>ex vitro</i> (aclimatização).....	51
5	Conclusões.....	54
6	Literatura citada.....	55
<b>CAPÍTULO 3 - EXPERIMENTOS VISANDO EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE</b>		
	<i>M. nigra</i> .....	61
1	Resumo.....	61
2	Introdução.....	62
3	Materiais e métodos.....	63
3.1	Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de amora preta em diferentes concentrações e reguladores vegetais visando a indução de calos.....	64
3.2	Indução de calos embriogênicos em meios de cultura contendo reguladores vegetais e com adição de água de coco.....	65
3.3	Cultivo <i>in vitro</i> de calos embriogênicos visando a obtenção e maturação dos embriões somáticos.....	65
3.4	Análise estatística.....	66
4	Resultados e Discussão	67
4.1	Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de amora preta em diferentes concentrações e reguladores vegetais visando a indução de calos.....	67
4.2	Indução de calos embriogênicos em meios de cultura contendo reguladores vegetais e com adição de água de coco.....	69
4.3	Cultivo <i>in vitro</i> de calos embriogênicos visando a obtenção e maturação dos embriões somáticos.....	74
5	Conclusões.....	79
6	Literatura citada.....	80
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	88

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Média das temperaturas máxima e mínima observadas durante os meses de condução das sementes de <i>R. sellowii</i> em bandeja preenchida com substrato e mantida em casa de vegetação.....	27
<b>Tabela 2.</b> Taxa de germinação de sementes de <i>R. sellowii</i> submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico 98% pelos tempos de 10, 20 e 30 minutos.....	36
<b>Tabela 3.</b> Índice de velocidade de germinação de sementes de <i>R. sellowii</i> submetidas à escarificação e mantidas em BOD para germinação <i>in vitro</i> .....	37

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Reguladores vegetais no desenvolvimento e multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>M. nigra</i> .....	49
<b>Tabela 2.</b> Influência do tempo de cultivo <i>in vitro</i> em dois ambientes, sala de crescimento e casa de vegetação, na aclimatização de plantas de <i>M. nigra</i> .....	53

### Capítulo 3

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de segmentos nodais vivos, que desenvolveram calos e seus respectivos diâmetros médios de acordo com a presença de cada regulador no meio de cultivo e suas diferentes concentrações.....	67
<b>Tabela 2.</b> Efeitos de reguladores vegetais e água de coco na indução de calos embriogênicos em <i>M. nigra</i> e na porcentagem de formação de calos do Tipo 2 e 3 em cada um dos tratamentos avaliados, referentes à cada duplicata do experimento.....	71
<b>Tabela 3.</b> Tipo de calo desenvolvido e número de embriões obtidos a partir de cada fonte de carbono e concentração de 2,4-D adicionado ao meio de cultivo....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Figura 1.</b> Semente de <i>R. sellowii</i> . Barra equivalente a 1 mm.....	23
<b>Figura 2.</b> Sementes de <i>R. sellowii</i> antes (A) e após a imersão em água (B). Barra = 1mm.....	24
<b>Figura 3.</b> Curva de absorção de água por sementes de <i>R. sellowii</i> ao longo das primeiras 12 horas após a imersão.....	25
<b>Figura 4.</b> Curva de absorção de água por sementes de <i>R. sellowii</i> ao longo de 120 horas após a imersão.....	26
<b>Figura 5.</b> (A) Plântulas de <i>R. sellowii</i> emergidas, com aproximadamente 80 dias após semeadura em bandeja contendo substrato à base de casca de pinus e mantidas em casa de vegetação. (B) Raízes de plântula de <i>R. sellowii</i> 110 dias após semeadura (30 dias após emergência) .....	28
<b>Figura 6.</b> Porcentagem de germinação de sementes de <i>R. sellowii</i> ao longo do tempo em duas condições de condução.....	29
<b>Figura 7.</b> Sementes de <i>R. sellowii</i> germinadas. Exposição à 75% de hipoclorito por 6 h (A) e exposição a 100% de hipoclorito por 6 h (B). Barras equivalentes a 1 mm.....	32
<b>Figura 8.</b> Sementes de <i>R. sellowii</i> (A) antes do processo de escarificação química. (B) Carbonização do endocarpo da semente de <i>R. sellowii</i> após ser submetida ao processo de escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por duas horas. Barras equivalentes a 1 mm.....	33
<b>Figura 9.</b> Sementes de <i>R. sellowii</i> após serem submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por uma hora e posterior fricção em peneira, realizado conforme protocolo de Wada & Reed (2011 b). (A) Liberação de partes internas. (B) Semente desintegrada após fricção. (C) Detalhe da parte interna da semente de <i>R. sellowii</i> . Barras equivalentes a 1 mm.....	34
<b>Figura 10.</b> Sementes de <i>R. sellowii</i> apresentando abertura do hilo após serem submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por 3 (A) e 4 (B) horas. Barras equivalentes a 1 mm.....	34

<b>Figura 11.</b> Porcentagem de sementes de <i>R. sellowii</i> germinadas ao longo do tempo após o processo de escarificação com ácido sulfúrico a 98% por 5 e 10 min e com água a 98°C.....	35
<b>Figura 12.</b> Porcentagem de sementes de <i>R. sellowii</i> germinadas ao longo do tempo após o processo de escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por 10, 20 e 30 minutos.....	36

## Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Explantes de <i>M. nigra</i> cultivados em diferentes reguladores vegetais e concentrações: (A) 0,25 mg L <sup>-1</sup> BA; (B) 0,50 mg L <sup>-1</sup> BA; (C) 1,0 mg L <sup>-1</sup> BA; (D) 0,10 mg L <sup>-1</sup> TDZ; (E) 3,0 mg L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> . (F) MS½ sem reguladores (PGR-free) .....	50
<b>Figura 2.</b> Desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>M. nigra</i> em diferentes ambientes de cultivo (sala de crescimento e casa de vegetação). Número de segmentos nodais com brotações (A) e com raízes (B) ao longo dos dias de condução <i>in vitro</i> . Brotações em casa de vegetação: $y = -0,3003x^2 + 9,751x + 0,9714$ R <sup>2</sup> = 0,9954. Brotações em sala de crescimento: $y = -0,2128x^2 + 9,1878x + 5,1429$ R <sup>2</sup> = 0,9653. Raízes em casa de vegetação: $y = 0,1166x^2 - 2,1224x + 3,4286$ R <sup>2</sup> = 0,8571. Raízes em sala de crescimento: $y = 3,4243x - 5,48$ R <sup>2</sup> = 0,9265. (C) Plantas de amora cultivadas por 30 dias após aclimatização em casa de vegetação, provenientes de cultivo <i>in vitro</i> por 28 dias em: Sala de crescimento (Esquerda) e Casa de vegetação (Direita).....	54

## Capítulo 3

<b>Figura 1.</b> Fluxograma das etapas de indução de embriogênese somática.....	64
<b>Figura 2.</b> Tipos de calos obtidos após cultivo de calos provenientes de explantes de <i>M. nigra</i> em diferentes meios de cultura. (A) Calo Tipo 1: calo sem crescimento e de coloração marrom-escuro; Tipo 2: calo com crescimento e coloração marrom-escuro; Tipo 3: calo em crescimento, coloração creme e com aspecto friável, característico de calos embriogênicos.....	70
<b>Figura 3.</b> Visualização do desenvolvimento de estruturas globulares esbranquiçadas por toda a periferia do calo Tipo 4 em um calo mantido em desenvolvimento em tubo contendo meio de maturação líquido com água de coco em agitação orbital, fotoperíodo 16h de luz e temperatura de 25 ± 2°C.....	76

<b>Figura 4.</b> Visualização de calo Tipo 5, obtido após cultivo de calo Tipo 4 em meio contendo glicose como fonte de carbono.....	77
<b>Figura 5.</b> Calos Tipo 5 oxidados após cultivo em meio MS $\frac{1}{2}$ + 0,05 mg L <sup>-1</sup> ANA + 0,10 mg L <sup>-1</sup> de BAP e 30g L <sup>-1</sup> de sacarose.....	78

## **GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Rubus sellowii* E MICROPROPAGAÇÃO DE *Morus nigra***

**Autor: WILLIAN NAVES DUARTE**

**Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO**

### **RESUMO**

Propagação sexual e vegetativa são os principais métodos de perpetuação das espécies vegetais. Apesar de sua importância na propagação, sementes de algumas espécies não germinam mesmo em condições favoráveis, como é o caso de sementes do gênero *Rubus*, situação denominada dormência. Foram realizados experimentos visando caracterizar e superar a dormência em sementes de *R. sellowii*. Durante o processo de embebição das sementes foi observada uma camada impeditiva de absorção de água. Para a escarificação química das sementes foram avaliados NaClO e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O NaClO não foi eficiente para escarificação do tegumento. O tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 20 min mostrou 50% de germinação das sementes e maior índice de velocidade de germinação. Foi também realizada a semeadura, sem escarificação, em bandeja contendo substrato a base de casca de pinus e mantidas em casa de vegetação. A emergência de plântulas teve início 70 dias após semeadura, chegando a 50% após 370 dias. Também foram realizados experimentos com a micropropagação de *Morus nigra*, visto a inviabilidade na propagação comercial por sementes. Observou-se que o cultivo *in vitro* de explantes na ausência de fitorreguladores produziu mudas prontas para a fase de aclimatização. Na aclimatização buscou-se verificar qual melhor ambiente de cultivo (sala de crescimento ou casa de vegetação) e tempo de cultivo *in vitro*. O cultivo por 28 dias em sala de crescimento resultou em plantas com maior altura (9,2 cm), número (4,8) e diâmetro de folhas (3,23 cm), condição essencial para uma aclimatização eficiente. Para os trabalhos de embriogênese somática, foram obtidos calos de explantes nodais de *M. nigra* com o uso de ácido naftaleno-acético (ANA) ou benziladenina (BA), em condições de luz ou escuro. Ambos apresentaram taxas semelhantes de indução de calos. Para a indução da embriogênese somática foram utilizados doze meios de cultura visando a indução de calos embriogênicos. Foi possível obtê-los em meios contendo BA, 2,4-D e água de coco. Esses foram cultivados em meio líquido de

maturação, no qual apresentaram desenvolvimento de estruturas globulares de coloração creme. Essas estruturas globulares adquiriram pigmentação verde e se multiplicaram quando cultivados em sacarose ou glicose como fonte de carbono. Porém, não houve posterior desenvolvimento ou regeneração em plântulas.

Palavras-chave: dormência, escarificação, fitorreguladores, cultivo *in vitro*, embriogênese somática.

**SEED GERMINATION OF *Rubus sellowii* AND MICROPROPAGATION OF *Morus nigra***

**Author: WILLIAN NAVES DUARTE**

**Adviser: Prof. PhD. JEAN CARLOS CARDOSO**

**ABSTRACT**

Sexual and vegetative propagation are the main methods of perpetuating plant species. Despite its importance in propagation, seeds of some species do not germinate even under favorable conditions, as is the case of seeds of the genus *Rubus*, situation called dormancy. Experiments were carried out to characterize and overcome dormancy in *R. sellowii* seeds. During the seed imbibition process, was observed a barrier for water absorption. For the chemical scarification of the seeds, NaClO and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were evaluated. NaClO was not efficient for tegument scarification. Treatment with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 20 min showed 50% seed germination and a higher rate of germination. It was also carried out the sowing, without scarification, in a tray containing substrate the base of pinus bark and kept in greenhouse. Seedling emergence started 70 days after sowing, reaching 50% after 370 days. Experiments were also carried out with the micropropagation of *Morus nigra*, considering the non-viability of commercial seed propagation. It was observed that in vitro cultivation of explants in the absence of phyto-regulators produced seedlings ready for the acclimatization phase. In the acclimatization, we tried to verify the best growing environment (growing room or greenhouse) and in vitro culture time. Growing for 28 days in the growing room resulted in plants with higher height (9.2 cm), number (4.8) and leaf diameter (3.23 cm), an essential condition for efficient acclimatization. For the somatic embryogenesis, calli of nodal explants of *M. nigra* were obtained with the use of naphthalene-acetic acid (ANA) or benzyladenine (BA), under light or dark conditions. Both presented similar callus induction rates. For the induction of somatic embryogenesis, twelve culture media were used for the induction of embryogenic calli. It was possible to obtain them in media containing BA, 2,4-D and coconut water. These were cultivated in liquid medium of maturation, in which they presented the development of globular structures of cream coloring. These globular structures have multiplied, acquiring green pigmentation when grown on sucrose or glucose as a

carbon source. However, there was no subsequent development or regeneration in seedlings.

Key-words: dormancy; scarification; plant growth regulator; *in vitro* culture; somatic embryogenesis.

## INTRODUÇÃO

Os métodos de propagação comerciais utilizados se resumem a propagação seminífera e propagação vegetativa. No primeiro, ocorrido por meio de sementes, a variabilidade genética atua, apresentando variações entre os genitores e entre si (MARCOS-FILHO, 2005; BORÉM; MIRANDA, 2013). No segundo, utilizando-se de ramos ou brotações, ocorre a multiplicação do mesmo material genético da planta mãe (JUSTAMANTE et al., 2017).

Como método de propagação, o uso de sementes é de grande importância, pois ocorre naturalmente, apresentando facilidades na sua obtenção, transporte e usabilidade. A contrapartida é que algumas espécies são difíceis de propagar por esse método, pois podem possuir mecanismos que as impedem de germinar mesmo em condições favoráveis, característica denominada dormência (SHU et al., 2016).

Comercialmente, as plantas do gênero *Rubus* são propagadas vegetativamente, porém o uso das sementes é de grande importância para o melhoramento genético e programas de conservação (CLARK et al., 2007). Contudo, sua germinação é normalmente dificultada pela presença de um revestimento impeditivo, restringindo a absorção de água e as trocas gasosas (WADA; REED, 2011b). A espécie *Rubus sellowii* é uma framboesa nativa do Brasil (LORENZI, 2006) da qual se tem pouco conhecimento sobre sua reprodução e propagação.

Existe uma falta de protocolos para superação de dormência de espécies não comerciais (selvagens) desse gênero. Esse fato faz com que o uso dos protocolos padrão (utilizados para espécies comerciais) para esses indivíduos selvagens apresentem uma resposta muito discrepante na superação da dormência de suas sementes.

Quando há limitações para a obtenção de plântulas por propagação sexuada, a propagação vegetativa serve como alternativa para estabelecimento de maior número de indivíduos baseando-se na totipotência celular: capacidade regenerativa de partes da planta a partir de células meristemáticas (MISRA; CHAKRABARTY, 2009).

No caso da amoreira *Morus nigra*, uma frutífera nativa da Ásia, essa também demonstra problemas em sua reprodução sexuada, sendo que a propagação por sementes é dificultada devido à alta heterozigose e pelo longo período juvenil, atrasando a idade reprodutiva e de produção de frutos, sendo utilizadas técnicas de reprodução assexuada para propagação comercial dessa espécie (VIJAYAN, 2014).

Para a propagação vegetativa de espécies do gênero *Morus* são utilizadas diversas técnicas como: estaquia caulinar, enxertia, mergulhia e as técnicas de cultivo *in vitro* por micropropagação.

As técnicas de propagação *in vitro* possuem vantagens sobre os demais métodos convencionais por permitirem a obtenção de maior taxa de multiplicação de propágulos, redução do tempo para a obtenção das mudas, possibilidade de propagação em qualquer época do ano devido às condições controladas em laboratório, além da produção de mudas isentas de pragas e doenças (VIJENDRA et al., 2017).

Dentre as diversas técnicas *in vitro*, a embriogênese somática surge como uma opção para obtenção de um grande número de indivíduos em curto período de tempo e espaço. Porém não há protocolos que descrevam com sucesso a utilização da técnica para o gênero *Morus*, havendo poucos trabalhos na literatura que avaliam a técnica, e nenhum descrito para a espécie *M. nigra* (SHAJAHAN et al., 1995; AGARWAL et al., 2004).

## OBJETIVOS

Compreender e avaliar a propagação de plantas das espécies *R. selowii*, por meio de experimentos de superação da dormência de sementes, e *M. nigra*, utilizando experimentos com objetivo de aprimorar os protocolos de micropropagação comercial visando produção de mudas clonais.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Rubus selowii*
- Realizar a caracterização morfológica e biométrica de sementes de *R. sellowii*;
- Avaliar a capacidade de emergência de plântulas de *R. selowii* em bandejas com substrato em condição de casa de vegetação;
- Avaliar o tempo de exposição de sementes de *R. sellowii* ao ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e hipoclorito de sódio (NaClO) visando a escarificação química;
  
- MICROPROPAGAÇÃO DE *Morus nigra*
- Avaliar diferentes reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura na micropropagação de *M. nigra*;
- Avaliar os efeitos do tipo e concentração de reguladores vegetais, bem como a presença ou ausência de luz para indução de calos em segmentos nodais de *M. nigra*;
- Iniciar os trabalhos de indução da embriogênese somática em *M. nigra*.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 Propagação de plantas

As espécies vegetais são propagadas de duas maneiras: por via sexual, através de sementes ou por via assexuada ou vegetativa, através de ramos, brotações, folhas, estolões e raízes (BOWMAN; ALBRECHT, 2017; ESKANDARI et al., 2017). Plantas propagadas por sementes apresentam grandes variações tanto em relação a seus parentais como entre si. Isso se deve ao fato de haver segregação e recombinação gênica durante o processo de fecundação (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Ainda assim, o uso de sementes é de grande importância por ocorrer de forma natural e ter um baixo custo em relação a outros métodos de propagação. A propagação por sementes é ainda utilizada para propagação de plantas que não podem ser propagadas por outros meios e também para obtenção de porta-enxertos como, por exemplo, em citros, manga e abacate, além da obtenção de novas variedades (SIMÃO, 1998; DAYAL et al., 2016; BOWMAN; ALBRECHT, 2017).

No entanto, uma das dificuldades na propagação por sementes tem sido os processos de dormência, que se tratam de mecanismos fisiológicos de preservação, influenciados por muitos genes e fatores ambientais. A dormência e a germinação são determinadas pela ação conjunta do potencial de desenvolvimento do embrião e os impedimentos impostos pelos tecidos ao seu redor (KOORNNEEF et al., 2002).

A dormência tem sido atribuída a diversos fatores como impermeabilidade do tegumento à água e a trocas gasosas, resistência mecânica do tegumento, presença de substâncias inibidoras nas partes internas da semente que podem ser encontradas nas polpas dos frutos, nos tegumentos das sementes ou mesmo no endosperma (SHU et al., 2016), servindo como exemplo a cafeína e fenóis (PEREIRA et al., 2002;

TOKUHISA et al., 2007) e presença de embrião rudimentar, morfológicamente imaturo, ou embrião fisiologicamente imaturo. Não obstante à grande diversidade de fatores, a dormência ainda pode ocorrer devido à combinação de um ou mais desses fatores (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Hormônios vegetais também apresentam papel importante na dormência. O ácido abscísico (ABA) tem efeito direto sobre a germinação (NÉE et al., 2017), uma vez que a aplicação de inibidores de sua biossíntese, como norflurazon, promoviam a germinação (DEBEAUJON; KOORNNEEF, 2000), assim como mutantes que não codificavam uma das enzimas da via sintética de ABA (AGRAWAL et al., 2001).

Por outro lado, as giberelinas (GA) são antagonistas à ação de ABA, mostrando serem promotoras da germinação (KOYUNCU, 2005; FEITOSA, 2015), em parte pela mobilidade de reservas do endosperma para o embrião (TAIZ; ZEIGER, 2013), em parte pela ativação de genes de retomada do desenvolvimento (SONG et al., 2011).

Além dos fatores bioquímicos, a dormência também pode ser causada por tegumentos rígidos e impermeáveis à água e é, em alguns casos, contornada pela quebra do tegumento, de forma que ocorra entrada de água na semente e haja retomada dos processos metabólicos (MENDONÇA et al., 2002; MARTINS et al., 2014; FREIRE et al., 2015).

Devido a essas dificuldades apresentadas em relação à germinação de sementes e obtenção de plântulas por métodos de propagação sexuada, é de se esperar que a propagação vegetativa possa servir como alternativa para a propagação da espécie visando a produção comercial de amoras e produção de maior número de indivíduos. Esse é um método já utilizado para a propagação comercial de amoras, tanto dos gêneros *Rubus*, quanto de *Morus* (CHITRA; PADMAJA, 1999, 2005; PELIZZA et al., 2016).

A propagação assexuada baseia-se na capacidade de regeneração de parte da planta a partir de células somáticas, na qual ocorre multiplicação dos cromossomos e citoplasma mantendo o mesmo genótipo, que se regeneram e se desenvolvem em uma nova planta. Para isso são utilizadas diversas técnicas como: enraizamento de estacas, enxertia e técnicas de cultivo *in vitro* (SIMÃO, 1998; JUSTAMENTE et al., 2017).

As técnicas de cultivo *in vitro* se destacam em relação a outros métodos de propagação vegetativa, devido à possibilidade de obtenção de grande número de plantas a partir de um material inicial; redução de tempo e área para propagação;

obtenção de propágulos isentos de doenças e multiplicação de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (CAMARGO et al., 2015; DIDONÉ et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016).

As técnicas de cultivo *in vitro* fundamentam-se na totipotência das células vegetais, onde cada célula possui a informação genética para reconstrução de uma nova planta e de suas funções, por meio da regeneração *in vitro*, via organogênese ou embriogênese somática para originar novas plantas (JAIN; NAKHOODA, 2017; JUSTAMENTE et al., 2017).

Dentre essas, a embriogênese somática é o processo pelo qual as células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos, com uma série de estágios embriológicos característicos (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar), sem fusão de gametas e não tendo conexão vascular ao tecido parental (JIMÉNEZ, 2001; VENKATAIAH et al., 2016).

Dois grupos de reguladores vegetais estão relacionados com a embriogênese somática. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), do grupo das auxinas, é o principal e mais eficiente regulador sintético indutor de embriogênese somática descrito, assim como o 6-benzilaminopurina (BAP), do grupo das citocininas, podendo atuar isoladamente ou em conjunto (PEREIRA et al., 2007; NARANJO et al., 2015; REYES-DÍAZ et al., 2017).

## **2 Rubus**

*Rubus sellowii* é uma espécie de framboesa nativa do Brasil (LORENZI, 2006) da qual se tem pouco conhecimento sobre sua biologia, incluindo sua reprodução e propagação. O gênero pertence à família Rosaceae, possuindo mais de 750 espécies distribuídas por todos os continentes (FINN, 2008), o qual também inclui espécies cultivadas bem conhecidas como a amora preta (*R. ulmifolius*) e framboesa vermelha (*R. idaeus*) (LORENZI, 2006).

No gênero *Rubus* as sementes geralmente apresentam dormência de duas naturezas, sendo: dormência embrionária – induzida por inibidores de germinação específicos dentro do embrião ou a presença de um embrião dormente, ocasionando atraso ou até mesmo ausência de germinação; e/ou dormência imposta pela estrutura que envolve o embrião (tegumento rígido ou impermeável), isolando a semente do ambiente externo, impedindo sua embebição e realização de trocas gasosas (TAYLOR, 2005; ZASADA; TAPPEINER, 2008; WADA; REED, 2011a).

A dormência mecânica ocorre por causa de um revestimento impermeável da semente, que impõe uma resistência mecânica à germinação. O endocarpo deve ser enfraquecido para permitir que água e oxigênio entrem em contato com o embrião (BASKIN; BASKIN, 2004; ZASADA; TAPPEINER, 2008). Após sua escarificação, ocorre o desenvolvimento da radícula e liberação dos cotilédones (HALL et al., 2009).

Substâncias como hipoclorito de sódio, ácido sulfúrico, nitrogênio líquido são utilizados para escarificação (PEACOCK; HUMMER, 1996). Escarificações mais eficientes foram obtidas utilizando-se ácido sulfúrico em alta concentração (WADA; REED, 2011a; HALL et al., 2009).

A dormência fisiológica está associada ao embrião imaturo, incapaz de reconhecer os estímulos para iniciar seu desenvolvimento. Nessas situações, é necessário que se mantenha essas sementes em estratificação a frio, por algumas semanas, após a superação da dormência mecânica (REHMAN et al, 2011; CONTRERAS et al, 2016). Esse tratamento melhora consideravelmente a germinação em espécies de *Rubus* (HALL et al., 2009).

Em trabalhos realizados com oito espécies selvagens de *Rubus* (*R. arcticus*, *R. chamaemorus*, *R. leucodermis*, *R. niveus*, *R. odoratus*, *R. parviflorus*, *R. sanctus*, *R. urticifolius*), Wada & Reed (2011a) observaram grandes diferenças nos requerimentos para germinação, sendo a espessura e dureza do tegumento fatores chave. Somente utilizando escarificação química com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 98% seguido de tratamento de imersão em soluções de  $KNO_3$  (34 mg  $L^{-1}$ ) e  $GA_3$  (2 mg  $L^{-1}$ ), em tempos que foram de 30 minutos a três horas, foi possível obter taxas de germinação de 40 a 97% nas espécies avaliadas. Já utilização de hipoclorito de sódio (NaClO) para a escarificação não se mostrou eficiente para as espécies avaliadas, apresentando taxas de germinação inferiores às obtidas com a utilização de ácido sulfúrico, mesmo utilizando-se de tempos de exposição superiores, que variaram de seis a 20 horas (WADA; REED, 2011a).

Existe uma falta de protocolos para superação de dormência de espécies selvagens deste gênero. Esse fato faz com que o uso dos protocolos padrão (utilizados para espécies comerciais) para esses indivíduos selvagens apresentem uma resposta muito discrepante na superação da dormência. Além disso, não há descrição na literatura de protocolos para germinação da maioria das espécies de *Rubus* (WADA & REED, 2011a), incluindo *R. sellowii*. WADA et al. (2011) realizaram pesquisas com diversas espécies de *Rubus*, analisaram suas morfologias, espessura

do endocarpo e avaliaram protocolos para superação de dormência, porém, seus estudos não incluíam *R. sellowii*.

### 3 *Morus*

A amoreira (*Morus* spp.), pertencente à família Moraceae, é uma frutífera exótica nativa da Ásia (LORENZI, 2006), possuindo mais de 68 espécies catalogadas (VIJAYAN et al., 2011b) estão distribuídas pela Ásia, Europa, Américas e África (TIKADER & DANDIN, 2005). Além dos diferentes usos, são encontrados também diferentes morfismos cromossômicos entre as espécies, sendo: diplóides (*Morus alba* e *M. nigra*;  $2n$ ,  $2x=28$ ), triploides (*M. alba* e *M. indica*;  $2n$ ,  $3x=42$ ), tetraploides (*M. laevigata*, *M. cathayana*, e *M. boninensis*;  $2n$ ,  $4x=56$ ), hexaplóides (*M. serrata* e *M. tiliaefolia*;  $2n$ ,  $6x=84$ ), octaploides (*M. cathayana*;  $2n$ ,  $8x=112$ ), e decosaploides (*M. nigra*;  $2n$ ,  $22x=308$ ) (DANDIA, et al., 1990; AWASTHI et al., 2004; VIJAYAN et al., 2012).

A espécie *M. alba* possui grande importância mundial na sericultura, pois sua folhagem constitui a dieta principal para o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) (VIJAYAN, 2010). As folhas também podem ser utilizadas na alimentação de ruminantes, pois é altamente palatável (BENAVIDES et al, 1994; ALMEIDA; FONSECA, 2002), além de possuir propriedades medicinais, incluindo compostos antioxidantes e hipoglicêmicos (KELKAR et al, 1996; YEN et al, 1996).

A espécie *M. nigra* é utilizada na arborização urbana e como frutífera (SILVA & TASSARA, 2005). Com seus frutos, além do consumo *in natura*, podem ser preparados diversos produtos como geleias, compotas, sucos, sorvetes e vinho (KOYUNCU, 2004). Assim como as folhas, os frutos também possuem compostos medicinais, sendo usados na medicina popular contra disenteria, constipação e diabetes (LEE et al., 2011), e são uma fonte de compostos fenólicos e flavonoides (ARFAN et al., 2012).

A propagação de espécies do gênero *Morus* pode ser feita tanto por meio de sementes como por estacas. Contudo, a propagação comercial via métodos sexuais é inviável devido à alta heterozigose das linhagens parentais e também por apresentar longos períodos de juvenilidade (VIJAYAN, 2014), sendo, portanto, sua propagação realizada principalmente através de estacas. No entanto, o sucesso da propagação vegetativa é muito dependente do genótipo, condições ambientais, e idade das plantas matrizes (VIJAYAN et al., 2011b).

Outro método já utilizado para o gênero é a micropropagação, normalmente realizada com a utilização do cultivo *in vitro* de ápices caulinares seguido da multiplicação e enraizamento de suas brotações sendo o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) o mais utilizado, com adição de BA, em concentrações de 0,5 a 2,5 mg L<sup>-1</sup>, visando a indução de múltiplas brotações. No desenvolvimento de raízes adventícias, a adição de AIB ou ANA se mostra como mais eficiente para diferentes genótipos desse gênero (CHITRA & PADMAJA, 2005; KASHYAP; SHARMA, 2006; AHMAD et al., 2007; JI et al., 2008; CHATTOPADHYAY et al., 2011).

Para indução de calos em *Morus*, segmentos nodais jovens são o melhor tipo de explante quando cultivados em meio MS contendo 2,4-D. A adição de auxinas (AIA, ANA) facilita a proliferação tornando os calos mais friáveis, assim como a água de coco que desempenha função para aumento da indução de calos. Sucessivos subcultivos dos calos os tornam mais friáveis e diminuem a oxidação fenólica (SUSHEELAMMA et al., 1996; VIJAYAN et al., 2011b).

Em *Morus*, a micropropagação a partir de ápices e segmentos nodais é bem estabelecida, porém ainda não se conseguiu obter sucesso na indução de embriogênese somática. São escassos os trabalhos avaliando o uso da técnica, sendo que os únicos registros iniciais de indução e regeneração foram realizados com *Morus alba*. Shajaham et al. (1995) obtiveram embriões cordiformes a partir de segmentos de hipocótilo de *Morus alba* cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D (0.45-4.52 µM) e BA (2.2 µM), porém não houve desenvolvimento posterior dos embriões. Agarwal et al. (2004) utilizando embriões somáticos de *M. alba*, obtidos através da cultura de embriões zigóticos, cultivados em meio MS contendo 0,05mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,1mg L<sup>-1</sup> de BA e 6% de sacarose, obtiveram 17% de embriões cotiledonares bem desenvolvidos. Não houve posterior avaliação da conversão dos embriões em plântulas.

### LITERATURA CITADA

AGARWAL, S. KANWAR, K. SHARMA, D.R. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. **Scientia Horticulturae**. v. 102, p. 359–368. 2004.

AGRAWAL, G.K. YAMAZAKI, M. KOBAYASHI, M. et al. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel OsTATC gene. **Plant Physiol**. v. 125, p. 1248-1257, 2001.

AHMAD, P. SHARMA, S. SRIVASTAVA, P.S. *In vitro* selection of NaHCO<sub>3</sub>-tolerant cultivars of *Morus alba* (Local and Sujanpuri) in response to morphological and biochemical parameters. **Horticultural Science**. v. 34, p.114-122, 2007.

ALMEIDA, J.E. FONSECA, T.C. **Mulberry germplasm and cultivation in Brazil**. In: Mulberry for animal production. SÁNCHEZ, M.D. FAO, N. 147. Rome. 2002.

ARFAN, M. KHAN, R. RYBARCZYK, A. et al. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. **Int. J. Mol. Sci**. v. 13, p. 2472–2480, 2012.

AWASTHI, A.K. NAGARAJA, G.M. NAIK, G.V. et al. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. **BMC Genetics**, v. 5, p. 1-8. 2004.

BASKIN, J. BASKIN, C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Res**. v. 14, n. 01, p. 1–16. 2004.

- BENAVIDES, J. LACHAUX, M. FUENTES. M. Efecto de la aplicación de estiércol de cabra em el suelo sobre la calidad y producción de biomasa de Morera (*Morus* sp.). **Árboles y arbustos forrajeros en América Central**. Technical Report No 236. Turrialba, Costa Rica, p. 495-514. 1994.
- BORÉM, A. MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG. Ed. UFV, 523p. 2013.
- BOWMAN, K.D. ALBRECHT, U. Efficient propagation of citrus rootstocks by stem cuttings. **Scientia Horticulturae**. v. 225, p. 681-688. 2017.
- CAMARGO, S. S. RODRIGUES, D. B. RODRIGUES, C.M. et al. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Cienc. Rural**. v. 45, n. 11, p. 2007-2012. 2015.
- CHATTOPADHYAY, S. DOSS, S.G. HALDER, S. A. ALI, K. BAJPAI, K. Comparative micropropagation efficiency of diploid and triploid mulberry (*Morus alba* cv. S1) from axillary bud explants. **Afr. Journ. Biotech**. v. 10, p. 18153-18159. 2011.
- CHITRA, D.S.V. PADMAJA, G. Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) through *in vitro* culture of nodal explants. **Scientia Horticulturae**, v. 80, p. 289–298, 1999.
- CHITRA, D.S.V. PADMAJA, G. Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae**. v.106, p. 593-602, 2005.
- CLARK, J.R. ERIC, J.S. HALL, H.K. FINN, C.E. **Blackberry breeding and genetics**. In: JANICK, J. (Ed.). Plant Breeding. John Wiley and Sons Inc. New Jersey. p. 19–144. 2007.
- CONTRERAS, E. GREZ, J. GAMBARDELLA, M. Scarification and stratification protocols for raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed germination. **Acta Hortic**. v. 1133, p.153-158. 2016.
- DANDIA, S.D. DHAR, A. SENGUPTA, K. Meiosis in Natural Decosaploid (22x) *Morus nigra* L. **Cytologia, Tokyo**. v. 55, p. 505-509. 1990.

DAYAL, V. DUBEY, A.K. SINGH, S.K. et al. Growth, yield and physiology of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars as affected by polyembryonic rootstocks. **Scientia Horticulturae**. V. 199, p. 186-197. 2016.

DEBEAUJON, I. KOORNNEEF, M. Gibberellin requirement for *Arabidopsis thaliana* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic ABA. **Plant Physiol**. v.122, p. 415-424, 2000.

DIDONÉ, S. F. GRANDO, M.F. CALVETE, E.O. et al. Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas germinadas *in vitro*. **Hortic. Bras**. v. 33, p. 311-318. 2015.

ESKANDARI, B.S. GHADERIAN, S.M. GHASEMI, R. SCHAT, H. Optimization of seed germination in an Iranian serpentine endemic, *Fortuynia garcinii*. **Flora**. v. 231, p. 38-42. 2017.

FEITOSA, F. M. JUNIOR, I.O.A. DAVID, A.M.S.S. et al. Effect of gibberellin and cytokinin regulators in overcoming dormancy of grass *Andropogon*. **Rev. de Ciências Agrárias**. Lisboa, v. 38, p. 34-40. 2015.

FINN, C.E. ***Rubus* spp., blackberry**. In: JANICK, J., PAULL, R.E. (Eds.), The Encyclopedia of Fruits and Nuts. CABI, Cambridge, MA, p. 348–351, 2008.

FREIRE, J. M. PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. SANTOS, A.L.F. et al. Intra-and inter-population variation in seed size and dormancy in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake in the Atlantic forest. **Ciênc. Florest**. v. 25, p. 897-907. 2015.

HALL, H., HUMMER, K., JAMIESON, A.R., JENNINGS, S.N., WEBER, C.A. **Raspberry breeding and genetics**. In: Plant Breeding Review. JANICK, J. Ed, Vol. 32, (USA: American Society for Horticultural Science), p.39–313. 2009.

JAIN, S.M. NAKHOODA, M. **Clonal and Micropropagation**. Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition). v.2, p. 428-432. 2017.

JI, T. SHUANG, F. AIZHEN, Y. et al. The primary study of mulberry rapid propagation by culture of side bud tissue. **Chin. Agric. Sci. Bullet**. Article No. 47. 2008.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Rev. Bras. Fisiol. Veg**. v. 13, n. 2, p. 196-223. 2001.

JUSTAMANTE, M.S. IBÁÑEZ, S. VILLANOVA, J. et al. Vegetative propagation of argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) using *in vitro* germinated seeds and stem cuttings. **Scientia Horticulturae**. v. 225, p. 81-87. 2017.

KASHYAP, S. SHARMA, S. *In vitro* selection of salt tolerant *Morus alba* and its field performance with bioinoculants. **Hort. Sci.** v. 33, p. 77-86. 2006.

KELKAR, S. M. BAPAT, V. A. GANAPATHI, T. R. et al. *Morus indica* L. shoot cultures: detection of hypoglycemic activity. **Curr. Sci.** v. 71, p. 71-72. 1996.

KOORNNEEF, M. BENTSINK, L. HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology**, n.5, p. 33–36, 2002.

KOYUNCU, F. Breaking seed dormancy in black mulberry (*Morus nigra* L.) by cold stratification and exogenous application of gibberellic acid. **Acta Biologica Cracoviensia**. n.47, p. 23–26, 2005.

KOYUNCU, F. Organic acid composition of black mulberry. **Chem. Nat. Comp.**, n. 40, p.368-369, 2004.

LEE, Y. LEE, D.E. LEE, H.S. et al. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** n. 105, p.9-19. 2011.

LORENZI, H. BACHER, L. LACERDA, M. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: (de consumo *in natura*). São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2006.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARTINS, A.S. BIANCHI, V.J. ZANANDREA, I. et al. Efeito da estratificação de sementes na emergência e desenvolvimento inicial de plântulas de porta-enxertos de pessegueiro. **Científica**. v.42, p.366–375, 2014.

MENDONÇA, V. RAMOS, J.D. ARAÚJO NETO, S.E. et al. Substratos e quebra de dormência da semente na formação do porta-enxerto de gravioleira CV. RBR. **Revista Ceres**, v. 46, n. 286, p. 657-668, 2002.

- MISRA, P. CHAKRABARTY, D. Clonal propagation of *Rosa clinophylla* Thory. through axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**. v. 119, n. 2, p. 212-216. 2009.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. v. 15, p. 473-497. 1962.
- NARANJO, E. J. BETIN, O.F. URREA, A.I. et al. Effect of genotype on the *in vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* via somatic embryogenesis. **Acta Biol. Colomb.** v. 21, p. 87-98. 2016.
- NÉE, G. XIANG, Y. SOPPE, W.J.J. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 35, p. 8-14. 2017.
- PEACOCK, D. HUMMER, K. Pre-germination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. **Hort. Science**, v. 31, p. 238–239. 1996.
- PELIZZA, T. R. SILVEIRA, F.N. RIBEIRO, R.S. et al. *In vitro* establishment of blackberry (*Rubus* sp.) cultivar 'Xavante'. **Ciênc. Rural**. v. 46, p. 1542-1545. 2016.
- PEREIRA, A.R. CARVALHO, S.P. PASQUAL, M. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* Cv. Acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciênc. agrotec**. v. 31, p. 332-336. 2007.
- PEREIRA, C.E. von PINHO, E.V.R. OLIVEIRA, D.F. et al. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**. vol. 24, p.306-311, 2002.
- REHMAN, S. CHOI, H. JAMIL, M. JOONG YUN, S. Effect of GA and ABA on germination behavior of black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) seeds. **Pak. J. Bot.** v. 43, p. 2811–2816. 2011.
- REYES-DÍAZ, J.I. ARZATE-FERNÁNDEZ, A.M. PIÑA-ESCUZIA, J.L. et al. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. **Industrial Crops and Products**. v. 108, p. 81-85. 2017.
- SHAJAHAN, A. KATHIRAVAN, K. GANAPATHI, A. Induction of embryo-like structures by liquid culture in mulberry (*Morus alba* L.). **Breed. Sci.** v. 45, p. 413-417, 1995.

SHU, K. LIU, X. XIE, Q. et al. Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. **Molecular Plant**. v. 9, p. 34-45. 2016.

SILVA, S., TASSARA, H. **Frutas Brasil frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 321p. 2005.

SILVEIRA, S. S. CORDEIRO-SILVA, R. GOLDBACH, J.D. et al. Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. **Braz. J. Biol.** v. 76, p. 656-663. 2016.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 760 p.1998.

SONG, J. GUO, B. SONG, F. et al. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. **Gene**. v. 482, p. 34-42, 2011.

SUSHEELAMMA, B. N. SHEKHAR, K. R. SARKAR, A. RAO, M. R. DATTA, R. K. Genotypes and hormonal effects on callus formation and regeneration in mulberry. **Euphytica**. V. 90, p.25-29. 1996.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed., Porto Alegre: Artmed, 918p.2013.

TAYLOR, K. Biological flora of the British Isles: *Rubus vestitus* Weihe. **J. Ecol.** v. 93, p. 1249–1262, 2005.

TIKADER, A. DANDIN. S. B. Biodiversity, geographical distribution, utilization and conservation of wild mulberry *Morus eserrata* Roxb. **Caspian J. Env. Sci.** v. 3, p. 179-186. 2005.

TOKUHISA, D. DIAS, D.C.F.S. ALVARENGA, E.M. et al. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, p. 180-188, 2007.

VENKATAIAH, P. BHANUPRAKASH, P. KALYAN, S.S. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 14, p. 55-60. 2016.

- VIJAYAN, K. Biotechnology of mulberry (*Morus* L.) - A review. **Emir. J. Food Agric.** v.26, p.472-496. 2014.
- VIJAYAN, K. SRIVASTAVA, P.P. JAYARAMARAJU, P. et al. Breeding for higher productivity in mulberry. **Czech J. Genet. Plant Breed.** v. 48, p.147-156. 2012.
- VIJAYAN, K. The emerging role of genomics tools in mulberry (*Morus*) genetic improvement. **Tree Genet. Genom.** v.6, p. 613–625, 2010.
- VIJAYAN, K. TIKADER, A. WEIGUO, Z. et al. **Mulberry**. In: KOLE, C. (Ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 75-95, 2011b.
- VIJENDRA, P. D. JAYANNA, S.G. KUMAR, V. et al. Rapid *in vitro* propagation of *Lucas aspera* Spreng. A potential multipurpose Indian medicinal herb. **Industrial Crops and Products**. v. 107, p. 281-287. 2017.
- WADA, S. KENNEDY, J.A. REED, B.M. Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p. 762–768, 2011.
- WADA, S. REED, B.M. Optimized scarification protocols improve germination of diverse *Rubus* germplasm. **Scientia Horticulturae**. v. 130, p. 660–664, 2011a.
- WADA, S. REED, B.M. Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species. **Scientia Horticulturae**. v. 132, p. 42-49, 2011b.
- YEN, G. C. WU, S. C. DUH, P. D. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of mulberry (*Morus alba* L.). **J. Agric. Food. Chem.** v. 44, p.1687-1690. 1996.
- ZASADA, J. TAPPEINER, J. **Rubus** L. In: BONNER, F. KARRFALT, R. (eds.) *The woody plant seed manual*. Agriculture Handbook 727. USDA Forest Service, Washington, D.C., USA. 2008.

## **CAPÍTULO 1. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Rubus sellowii***

### **1 RESUMO**

Dois tipos principais de dormência foram reportados em sementes do gênero *Rubus*: mecânica, pela presença de uma camada rígida e impermeável à entrada de água e trocas gasosas e, fisiológica, na qual a continuidade do processo germinativo requer condições específicas de temperatura. No entanto, devido à grande variabilidade genética entre as espécies do gênero, não há protocolos de superação de dormência descritos para todas as espécies, principalmente para aquelas selvagens. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar, compreender e superar a dormência de sementes de *R. sellowii*, uma framboesa nativa do Brasil, utilizando para isso experimentos com tratamentos de escarificação química do tegumento, buscando aumentar a taxa e a velocidade de germinação. Durante o processo de embebição das sementes foi observada a existência de uma camada impeditiva de absorção de água. Foi realizada a semeadura em bandejas contendo substrato a base de casca de pinus e mantidas em casa de vegetação. A emergência de plântulas nas bandejas teve início 70 dias após semeadura, chegando a 50% de germinação após 370 dias de cultivo. Para escarificação química foram utilizados hipoclorito de sódio e ácido sulfúrico. O hipoclorito não foi eficiente para promoção da escarificação, resultando em baixa ou não germinação das sementes. Já o ácido sulfúrico com tempo de exposição acima de 60 minutos promoveu intensa carbonização dos tegumentos, resultando em baixa germinação possivelmente pela morte dos embriões. Utilizando tempos de exposição reduzidos (10 a 20 min), a ação do ácido foi benéfica a germinação, o que resultou em porcentagem de germinação de até 50%, 150 dias após o processo de escarificação.

## 2 INTRODUÇÃO

O gênero *Rubus* inclui mais de 750 espécies em 12 subgêneros e ocorre em todos os continentes, exceto Antártica (THOMPSON, 1995; HUMMER, 1996). São plantas de porte herbáceo-arbustivo com sistemas de propagação variado, como reprodução sexuada via sementes e também por modos de propagação vegetativa, abaixo do solo com desenvolvimento de rizomas, e também por brotações a partir de estolões acima do solo (ZASADA; TAPPEINER III, 2008).

A propagação comercial de espécies do gênero *Rubus* é realizada vegetativamente. No entanto, as sementes de espécies selvagens são utilizadas no melhoramento genético para introduzir novas características e produzir cultivares melhoradas (CLARK et al, 2007). O revestimento de sementes desempenha um papel importante no ciclo de vida da planta, controlando o desenvolvimento do embrião e fatores relacionados a dormência e germinação da semente (MOISE et al., 2005). As sementes de espécies desse gênero apresentam grande variação na espessura e na estrutura do revestimento (DAUBNEY, 1996).

Sementes do gênero *Rubus* possuem dormência causada por um revestimento impermeável e um ou mais mecanismos adicionais, como inibidores químicos ou presença de um embrião dormente (TAYLOR, 2005; ZASADA; TAPPEINER III, 2008).

A dormência mecânica restringe a absorção de água e oxigênio, impedindo mecanicamente a expansão do embrião. Esta dormência é superada pela remoção ou escarificação do endocarpo, enquanto a dormência interna é regulada por processos bioquímicos ou biofísicos que ocorrem durante um período pós-amadurecimento (DESAI, 2004; TAYLOR, 2005).

A escarificação química, com a utilização de ácido sulfúrico a 98% pode ser uma alternativa para remoção do endocarpo visto que se mostrou eficiente para a germinação, elevando essa a 75% das sementes de *Rubus* spp., comparado com sementes não escarificadas (WADA; REED, 2011b). Em protocolos de germinação de sementes de espécies comerciais, as sementes de *Rubus* são geralmente germinadas em areia ou solo, em condições de estufa (HUMMER; PEACOCK, 1994; CLARK et al. 2007), mas também podem ser germinadas *in vitro* (MIAN et al., 1995).

Os tempos de exposição ao ácido sulfúrico variam de acordo com a espécie, indo desde 15 a 20 minutos para subgênero *Idaeobatus* (*R. idaeus*; *R. occidentalis*), até três horas para o subgênero *Rubus* (HUMMER; PEACOCK 1994; ZASADA; TAPPEINER III, 2008). A escarificação com NaClO (14%) se mostrou eficaz para

sementes de *R. cuneifolius*, apresentando redução da espessura e resultando em enfraquecimento estrutural do endocarpo (CAMPBELL et al., 1988).

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar as causas e superar a dormência em sementes de *R. sellowii*, uma espécie nativa do Brasil.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos (DBPVA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, campus Araras – SP.

As sementes de *R. sellowii* utilizadas nos experimentos foram obtidas de plantas nativas de mata ciliar, localizadas no município de Itaberá – SP, Brasil, e obtidas de frutos que já se encontravam em plena maturação (coloração roxa a preta), coletadas em outubro de 2015. A cidade se encontra localizada a 23°51'51"S e 49°8'25"O. As sementes foram previamente lavadas em água corrente para remoção da polpa do fruto e secas a temperatura ambiente, armazenadas em saco de papel e mantidas em refrigerador a 4°C.

#### **3.1 Caracterização morfológica e biometria de sementes de *R. sellowii***

Para a caracterização foram utilizadas imagens feitas em lupa com auxílio de câmera digital acoplada (SCMOS Series Camera (Compact USB2.0 CMOS Camera with 23.2mm DIA for Ocular Tube. ToupTek Photonics, Zhejiang, P.R.China) com auxílio do software de captura de imagens (ToupTek – ToupView. ToupTek Photonics, Zhejiang, P.R.China) para determinar as dimensões (comprimento e largura na região equatorial) das sementes. Foram utilizadas para o cálculo da média medidas realizadas em 30 sementes. Para estimativa de massa de mil sementes e número de sementes por quilo foram utilizados os valores da pesagem de 100 sementes em balança de precisão de quatro casas decimais (Mettler Toledo Inc., Modelo MS204//A01 - Suíça).

#### **3.2 Estabelecimento de curva de embebição em sementes de *R. sellowii***

As sementes foram divididas em quatro repetições de 100 sementes cada, previamente pesadas em balança com precisão de quatro casas decimais (Mettler Toledo Inc., Modelo MS204//A01 - Suíça) para obtenção da massa inicial. Em seguida foram imersas em água destilada, na proporção de 100 sementes em 50 ml de água.

Para avaliação do incremento de massa as sementes foram retiradas da água com auxílio de peneira plástica e secas em papel absorvente, seguido de medição da massa em balança de precisão. Nas primeiras 12 horas as pesagens foram feitas em intervalos de uma em uma hora e, após 12 horas, foram medidas a cada 24 horas até que houvesse estabilização da massa.

### **3.3 Emergência de plântulas de *R. sellowii* em bandeja contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação**

A semeadura em bandeja contendo substrato comercial à base de casca de pinus ocorreu no dia 09/03/2017 e foram mantidas em casa de vegetação coberta com plástico difusor de 150  $\mu\text{m}$ , sem sombreamento adicional e irrigação diária de aproximadamente 4-5 mm por dia por meio de micro-aspersão. Foram semeadas duas sementes por célula em bandeja de 40 células, totalizando 80 sementes. A contagem de plântulas foi realizada uma vez por mês, durante nove meses, sendo considerada emergida as que apresentaram início de desenvolvimento de parte aérea externamente ao substrato.

No dia 17/05/2017 foi realizada nova semeadura em bandeja contendo 100 células sendo mantidas a semeadura de duas sementes por célula e cultivadas em condições de casa de vegetação nas mesmas condições acima descritas, e outra bandeja foi mantida em BOD com alternância de temperatura e fotoperíodo de 16 horas, sendo  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no período luminoso e  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  no período escuro. A contagem de plântulas foi realizada uma vez por mês, durante dez meses, sendo considerada germinada aquelas que apresentaram início de desenvolvimento de parte aérea externamente ao substrato.

### **3.4 Avaliação da concentração e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO) na escarificação de sementes de *R. sellowii***

Foi utilizado o protocolo de Wada & Reed (2011b) com modificações.

Sementes de *R. sellowii* foram imersas em soluções de hipoclorito de sódio (NaClO, produto comercial contendo 2,0 a 2,5% de cloro ativo), em três diferentes concentrações: 50, 75 e 100%, durante duas; quatro ou seis horas de exposição por imersão das sementes nas diferentes soluções. Após os tempos de imersão, as sementes foram lavadas por três vezes em água deionizada e colocadas para germinar em placas de petri de polietileno de 90 mm de diâmetro forradas com papel

filtro umedecido com 5 ml de água destilada e mantidas em BOD com alternância de temperatura e fotoperíodo de 16 horas, sendo  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  na luz e  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro.

Para o experimento foram utilizadas quatro repetições (placas de petri) com 20 sementes cada, totalizando 80 sementes por tratamento. O experimento foi realizado em esquema fatorial 4x3 (concentração x tempo de imersão) em blocos inteiramente casualizados (cada prateleira da BOD foi considerada como um bloco). O tratamento controle consistiu apenas na imersão das sementes em água destilada previamente autoclavada durante os mesmos tempos acima mencionados. O número de sementes germinadas foi avaliado mensalmente até o 12º mês de manutenção nas placas de petri.

### **3.5 Avaliação do tempo de exposição ao ácido sulfúrico na escarificação química de sementes de *R. sellowii***

Como referência, foi utilizado o protocolo estabelecido por Wada & Reed (2011b) com modificações.

As sementes foram imersas em ácido sulfúrico a 98% durante 1; 2; 3 ou 4 horas. Após a escarificação as sementes foram lavadas em água corrente durante uma hora e posteriormente imersas em solução de  $3 \text{ g L}^{-1}$  de hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) por cinco minutos e em seguida imersas por mais cinco minutos em solução de  $3 \text{ g L}^{-1}$  de hidróxido de potássio (KOH). Após os tratamentos as sementes foram colocadas para germinação, conforme descrito no item 3.4, em distribuição inteiramente casualizada. Após a primeira semente germinada, a contagem de germinação foi realizada mensalmente durante nove meses.

### **3.6 Escarificação química de *R. sellowii* em tempos reduzidos de exposição das sementes ao ácido sulfúrico**

Devido à baixa eficiência observada com os tratamentos descritos no item 3.5 para a germinação de sementes de *R. sellowii*, provavelmente ocorrido pelos tempos excessivos de exposição ao ácido sulfúrico, houve necessidade de avaliação de exposição a tempos mais curtos.

Para isso as sementes de *R. sellowii* foram imersas em ácido sulfúrico 98% durante cinco ou dez minutos, além de um tratamento em cinco minutos em água a  $98^\circ\text{C}$  (escarificação por temperatura) e do tratamento controle com água destilada. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e

posteriormente imersas em solução de 3 g L<sup>-1</sup> de hipoclorito de cálcio (Ca (ClO)<sub>2</sub>) por cinco minutos, seguida de imersão por mais cinco minutos em solução de 3 g L<sup>-1</sup> de hidróxido de potássio (KOH) e lavadas por mais cinco minutos em água corrente. Após os tratamentos as sementes foram colocadas para germinação em placas de petri de polietileno, forradas com papel filtro, umedecidas com água e mantidas em BOD com alternância de temperatura com fotoperíodo de 16 horas, sendo 25 ± 2°C na luz e 15 ± 2°C no escuro. Foram utilizadas quatro repetições com 20 sementes por repetição, totalizando 80 sementes por tratamento. Foi realizado também a determinação da curva de absorção de água das sementes sendo, contudo, esses resultados apresentados juntamente com os do item 3.2.

Posteriormente, numa última tentativa de uso da escarificação química com ácido sulfúrico, foram avaliados os tempos de exposição ao ácido sulfúrico 98%, por dez, vinte ou trinta minutos. As sementes passaram pelos mesmos procedimentos acima descritos e mantidas em BOD com alternância de temperatura com fotoperíodo de 16 horas, sendo 25 ± 2°C na luz e 15 ± 2°C no escuro. Foram utilizadas quatro repetições com 20 sementes por repetição, totalizando 80 sementes por tratamento.

Foi calculado também o índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), dado pela seguinte fórmula:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde:

G<sub>1</sub>; G<sub>2</sub>; G<sub>n</sub> = número de plântulas na primeira, segunda até n contagens;

N<sub>1</sub>; N<sub>2</sub>; N<sub>n</sub> = número de dias após semeadura após primeira, segunda até n contagens.

### 3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância ANOVA e as médias foram submetidas ao teste de Duncan a 5% de significância. Dados em porcentagem foram submetidos à transformação pela equação  $\arcsen\sqrt{x+1}$  antes de serem analisados. O software estatístico ASSISTAT versão 7.7beta (SILVA & AZEVEDO, 2006) foi utilizado para realização das análises.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica e biometria de sementes de *R. sellowii*

Sementes de *R. sellowii* possuem coloração bege (#ffd9c1) à salmão (#ffb48c) (padrão RGB) e depressões por sua extensão (Figura 1). Os valores médios de dimensões e massa das sementes foram: comprimento = 2,04 mm ( $\pm 0,08$ ); largura na região equatorial (maior largura) = 1,25 mm ( $\pm 0,12$ ); massa de mil sementes = 1,43 g; número de sementes por quilo  $\cong 699\ 300$ .



**Figura 1.** Semente de *R. sellowii*. Barra equivalente a 1mm

Para as oito espécies do gênero *Rubus* avaliadas, Wada & Reed (2011a) encontraram valores de massa de 100 sementes entre 0,09g (*R. odoratus*) até 0,86g (*R. chamaemorus*). Ou seja, os valores aqui observados, 0,143g para 100 sementes de *R. sellowii*, indicam que essa espécie segue a característica do gênero, possuindo sementes muito pequenas e leves. Os mesmos autores ainda indicam que a dureza do tegumento destas espécies também está relacionada com a massa, sendo que aquelas que possuem menor massa também apresentam menor rigidez.

### 4.2 Estabelecimento de curva de embebição em sementes de *R. sellowii*

A maior taxa de absorção de água (14%), ocorreu logo na primeira hora após a imersão (Figura 3). As medições foram realizadas até a estabilização, ocorrida após 120 horas, porém, da 24<sup>a</sup> até a 120<sup>a</sup> hora, houve incremento de menos de 1% na massa e incremento de menos de 10% da primeira hora até a 120<sup>a</sup> hora, indicando grande limitação na absorção de água pelas sementes. A massa final obtida com 120h

de imersão em água não resultou em incrementos consideráveis e que se assimilassem a uma curva de embebição típica com padrão trifásico (BEWLEY; BLACK, 1994).

Nesse sentido, e utilizando observações com estereoscópio no aumento de 40x, notou-se que o incremento de massa parece não ter ocorrido em resposta à embebição, e sim proveniente da hidratação do endocarpo (Figura 2A e 2B). A presença de um revestimento rígido, descrito como o endocarpo, já foi reportado como limitante da entrada de água e trocas gasosas na semente, causando dormência em sementes de outras espécies do gênero *Rubus* (WADA; REED, 2011a).

De acordo com nossas observações em estereoscópio, o tecido do qual houve hidratação (Figuras 2A e 2B) se assemelhou a tecidos de arilo, pelas características mucilaginosas e similares a de ocorrência em outras espécies como maracujá (SILVA et al., 2015), porém ainda não relatadas para *Rubus*.



**Figura 2.** Sementes de *R. sellowii* antes (A) e após a imersão em água(B). Barra = 1mm.

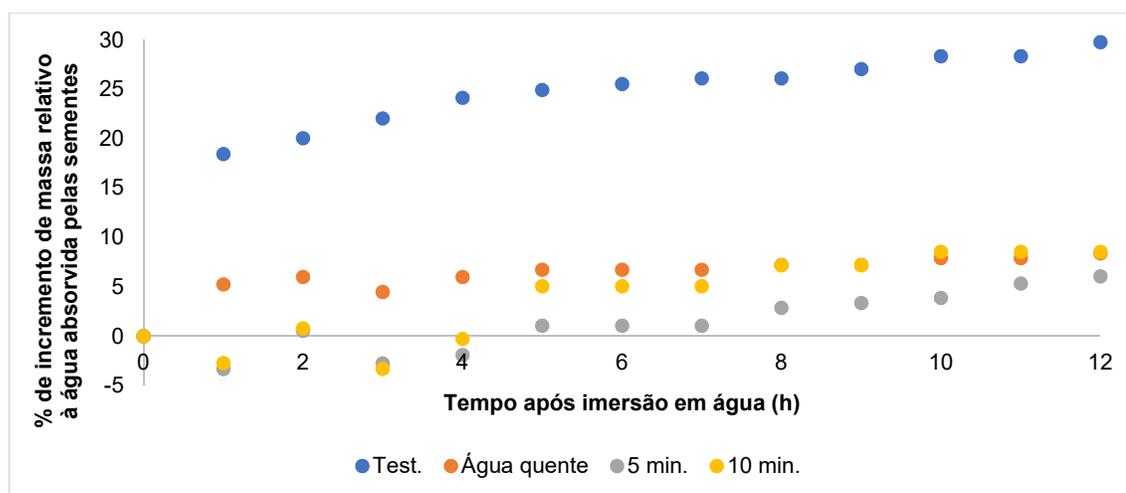
Diez et al. (2013) relataram que não houve diferença significativa devido à absorção de água em teste de embebição de sementes de *R. glaucus*, indicando impermeabilidade do tegumento e, conseqüentemente, dormência mecânica. A presença de um endocarpo impermeável é característica do gênero *Rubus*

(OURECKY, 1975; WARR et al., 1979; NYBOM, 1980; JENNINGS, 1988; PEACOCK; HUMMER, 1996).

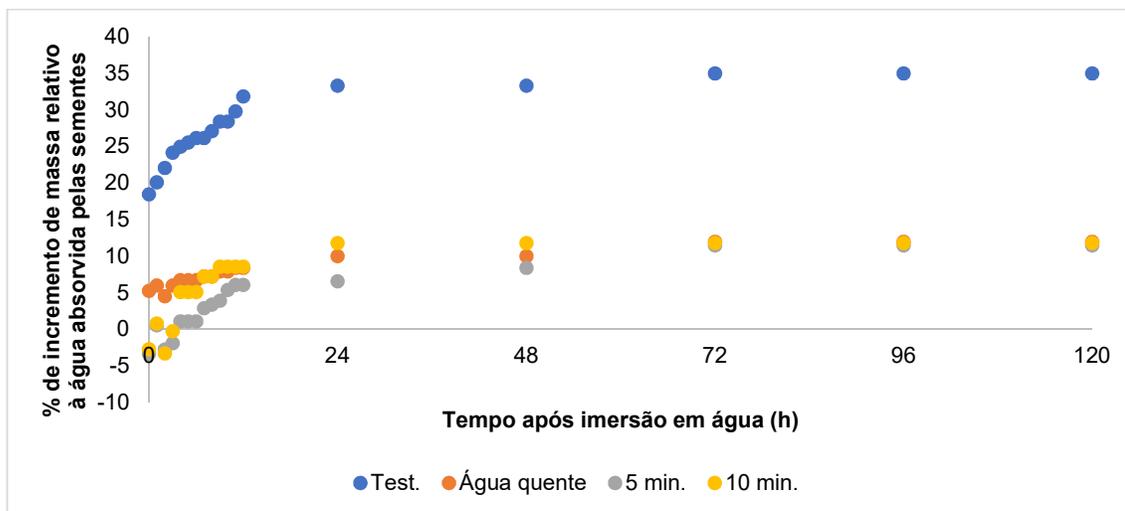
É possível notar uma diferença na capacidade de incremento de massa pela absorção de água ao longo do tempo entre as sementes do tratamento testemunha e as que foram submetidas aos processos de escarificação (Figura 3, Figura 4). Isso pode ter ocorrido devido à ação da água a 98°C no tratamento de escarificação térmica e à ação corrosiva do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no endocarpo das sementes, fato já relatado na literatura.

A escarificação com ácido sulfúrico causou diminuição da espessura do endocarpo das sementes de *R. occidentalis*, uma espécie com revestimento espesso (0,176 mm) a qual teve redução de 37% na espessura do endocarpo após três horas de escarificação em ácido sulfúrico e em *R. hoffmeisterianus*, uma espécie com revestimento mais fino (0,087 mm), com redução de 22% na espessura do endocarpo após meia hora de escarificação com ácido sulfúrico a 98% (WADA; REED, 2011b).

Essa perda de tecido do endocarpo resultou também em menor capacidade de retenção de água das sementes de *R. sellowii* que foram submetidas à escarificação química ou térmica (Figura 3, Figura 4). As sementes que não foram submetidas à escarificação incrementaram em até 35% sua massa relativo à absorção de água, enquanto que nas sementes escarificadas esse incremento foi de menos de 12% (Figura 4).



**Figura 3.** Curva de absorção de água por sementes de *R. sellowii* ao longo das primeiras 12 horas após a imersão.



**Figura 4.** Curva de absorção de água por sementes de *R. sellowii* ao longo de 120 horas após a imersão.

Só há um trabalho na literatura que relata sobre a absorção de água ao longo do tempo em sementes do gênero *Rubus* (DIEZ et al., 2013), porém, os valores apresentados pelos autores mostram variações positivas e negativas no incremento de massa nas 24 horas analisadas, não se assemelhando aos obtidos neste trabalho.

#### 4.3 Emergência de sementes de *R. sellowii* em bandeja contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação

Nesse experimento o objetivo foi avaliar a emergência das sementes de *R. sellowii* em bandeja preenchidas com substrato em condições de casa de vegetação, técnica utilizada para propagação comercial de plantas provenientes de sementes. O início da emergência em substrato ocorreu aproximadamente 70 dias após a semeadura (Figura 5 A). Até o dia 17/03/2018 (370 dias após semeadura) das 80 sementes semeadas, haviam 39 plântulas emergidas, totalizando aproximadamente 50% de emergência. As plântulas demonstraram desenvolvimento lento da parte aérea logo após o período de emergência, priorizando o crescimento radicular, fato observado pela retirada da plântula da célula e lavagem do substrato, sendo que suas raízes apresentavam quase três vezes o comprimento da parte aérea (Figura 5B). Esse tipo de desenvolvimento também foi observado em outras plantas nativas, como lobeira (*Solanum lycocarpum*) (VIDAL et al., 1999).

Durante a época de condução das bandejas em casa de vegetação (meses de março a setembro de 2017), a variação da temperatura ambiente (Tabela 1)

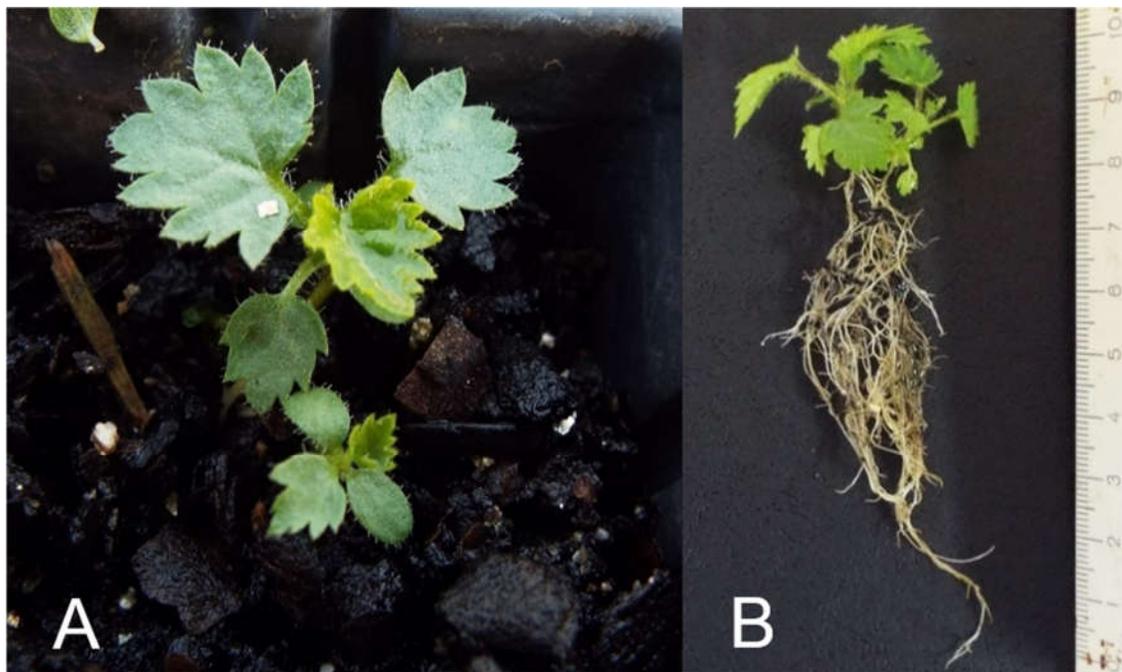
assemelhou-se com a temperatura utilizada nos protocolos *in vitro* para germinação de sementes do gênero *Rubus* por Wada & Reed (2011).

Essa condição de temperaturas diurnas mais elevadas (24,3 a 31,2°C) e noturnas mais frias (11,4 a 18,5°C), com amplitude térmica mínima de 10°C, parece ser fator essencial para a germinação rápida de sementes do gênero *Rubus* coincidindo com os resultados obtidos por Wada & Reed (2011 b) com diferentes espécies desse gênero, sendo a melhor época para semeadura dessas espécies no final do verão ou no início do outono (WROBLOWNA, 1949).

**Tabela 1.** Média das temperaturas máxima e mínima observadas durante os meses de cultivo (2017/2018) das sementes de *R. sellowii* em bandeja preenchida com substrato e mantidas em casa de vegetação.

<b>Mês</b>	<b>Média das máximas (°C)</b>	<b>Média das mínimas (°C)</b>
<b>Março</b>	30,2	18,5
<b>Abril</b>	27,6	17,0
<b>Mai</b>	25,5	15,5
<b>Junho</b>	24,7	13,5
<b>Julho</b>	24,3	11,4
<b>Agosto</b>	25,4	13,7
<b>Setembro</b>	31,2	15,9
<b>Outubro</b>	30,1	17,9
<b>Novembro</b>	29,0	17,5
<b>Dezembro</b>	29,6	19,4
<b>Janeiro</b>	29,3	19,3
<b>Fevereiro</b>	29,2	18,8
<b>Março</b>	31,1	19,6

Fonte: Estação Meteorológica Automática – EMA. CCA/UFSCar – Araras.



**Figura 5.** (A) Plântulas de *R. sellowii* emergidas, com aproximadamente 80 dias após sementeira em bandeja contendo substrato à base de casca de pinus e mantidas em casa de vegetação. (B) Raízes de plântula de *R. sellowii* 110 dias após sementeira (30 dias após emergência).

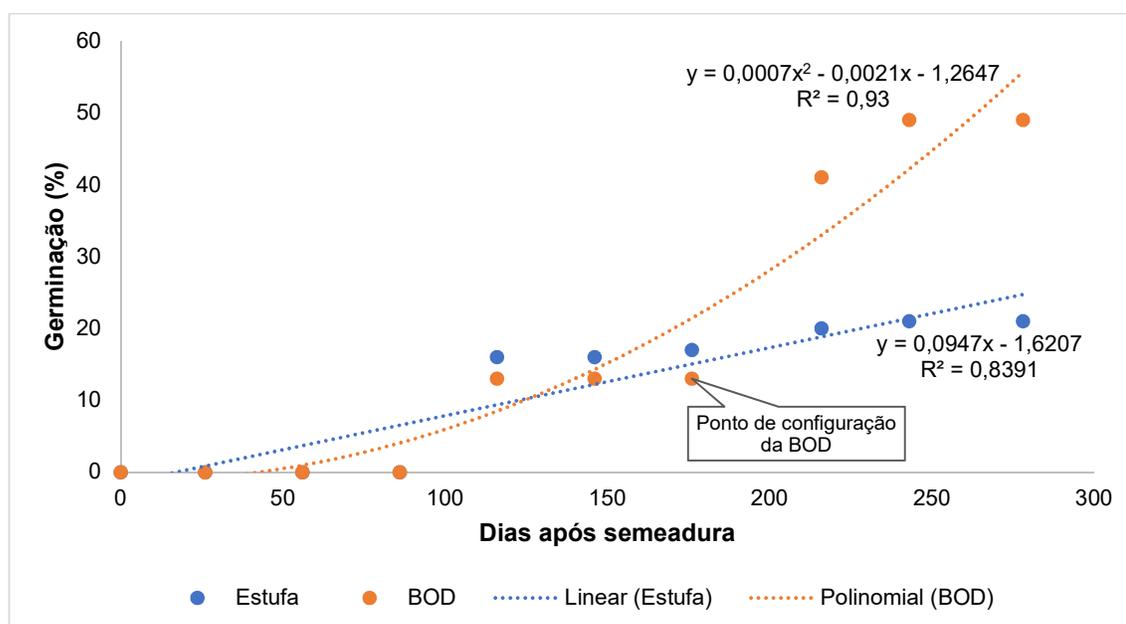
A porcentagem de germinação de 50% obtida neste trabalho pode estar relacionada com as características de dormência dessas sementes, as quais não permitem a germinação de forma sincronizada, pois o estímulo necessário para iniciar a germinação pode variar amplamente até mesmo em sementes provenientes de um mesmo indivíduo (BEWLEY, 1997). Em sementes do gênero *Rubus*, mesmo após as sementes passarem por processos de escarificação para superação de dormência, não foi relatada uniformidade de germinação nem mesmo entre sementes de uma mesma espécie (SUZUKI, 1993; ZASADA; TAPPEINER III, 2008).

As sementes colhidas de uma única planta geralmente mostram variação em seus níveis de dormência, sendo que o processo de dormência impede que todas as sementes germinem simultaneamente, aumentando as chances de sobrevivência de plântulas germinadas em ambientes com variações climáticas naturais (SIMONS; JOHNSTON, 2006; BURGHARDT et al., 2015).

A segunda sementeira em bandejas, ocorrida no período de maio de 2017 a março de 2018, compreendendo as estações de final de outono a final de verão, foi observado apenas 13% de germinação após 180 dias em condições de BOD e 16% de sementes emergidas na bandeja mantida em casa de vegetação. A baixa porcentagem de germinação em BOD ocorreu em especial pelo fato de que a mesma

não estava configurada para alternância de temperatura, mantendo a temperatura constante de 25°C (dia/noite) tanto em condições de luz como no escuro.

Interessantemente, após a reconfiguração da BOD para a alternância de temperatura (25°C diurno/15°C noturno), a porcentagem de germinação passou de 13% para 41% logo após quatro semanas, atingindo um máximo de 50% aos 280 dias (Figura 6). Portanto, a porcentagem de germinação observada em BOD com alternância de temperatura (25°C/15°C) foi similar àquela obtida durante a primeira semeadura em condições de casa de vegetação com amplitude térmica mínima de 10°C.



**Figura 6.** Porcentagem de germinação de sementes de *R. sellowii* ao longo do tempo em duas condições de condução.

Esse fato evidencia que, além da presença de um tegumento rígido, há a necessidade de alternância de temperatura devido aos diferentes tipos de dormência existente em sementes do gênero *Rubus* – dormência mecânica e fisiológica – exigindo amplitude térmica mínima de 10°C para que a semente possa germinar (OURECKY, 1975; ZASADA; TAPPEINER III, 2008; WADA; REED, 2011 a).

Para a bandeja mantida em casa de vegetação sob condições naturais, a semeadura, ocorrida no final do outono, não apresentou bons resultados, como já relatado na literatura para sementes deste gênero (WROBLOWNA, 1949), apresentando 21% de germinação após 280 dias. Essas sementes, sendo semeadas em período prévio ao inverno, ou seja, ainda mantendo amplitude térmica (Tabela 1), não germinaram. Esse fato deve ser melhor elucidado em trabalhos futuros com a

espécie *R. sellowii* para que se possa determinar a melhor época de semeadura em condições naturais.

Não há relatos de qual é a porcentagem mínima ou máxima sobre a germinação de sementes de *R. sellowii* para se considerar a porcentagem de 50% de germinação observada neste trabalho satisfatória ou não.

Das espécies do gênero *Rubus* nas quais Wada & Reed (2011 a) estudaram a germinação, *R. arcticus* e *R. chamaemorus*, mostraram menos de 15% de germinação e *R. leucodermis* e *R. niveus* apresentaram taxas de germinação inferiores a 50% mesmo após todas essas serem submetidas à escarificação química. *R. sanctus* apresentou 50% de germinação sem necessidade de escarificação. Já para as espécies *R. odoratus*, *R. parviflorus* e *R. urticifolius*, os autores relatam taxas de 86; 68 e 96% de germinação, respectivamente, obtidas após escarificação química com NaClO (*R. odoratus*) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*R. parviflorus* e *R. urticifolius*).

Wada & Reed (2011 b) relatam 57% de germinação para *R. caucasicus*, 60% para *R. swinhoeii* e 99% para *R. setchuenensis*, todas sem necessidade de procedimentos de escarificação.

As taxas de germinação obtidas nas diferentes espécies se mostram variáveis, indicando a heterogeneidade das espécies do gênero tanto em relação à dureza do endocarpo e o tratamento necessário para escarificá-lo quanto para a taxa de germinação obtida.

#### **4.4 Avaliação da concentração e tempo de exposição a hipoclorito de sódio (NaClO) na escarificação de sementes de *R. sellowii***

Nesse experimento, somente três tratamentos apresentaram sementes germinadas, sendo estes 100% por 4 (2,5%) e 6 horas (2,5 %), e 75% por 6 horas (1,25%). A baixa taxa de germinação observada em placas de petri pode ter ocorrido devido a fraca ação escarificante do hipoclorito de sódio no endocarpo das sementes do gênero *Rubus*, não o degradando e impossibilitando a embebição da semente. Isso pode ser observado pelos experimentos realizados por Wada & Reed (2011 b), em que os autores necessitaram utilizar a imersão das sementes em ácido sulfúrico, um ácido mais forte que o hipoclorito de sódio, a 98% e por 60 minutos para promoção da germinação.

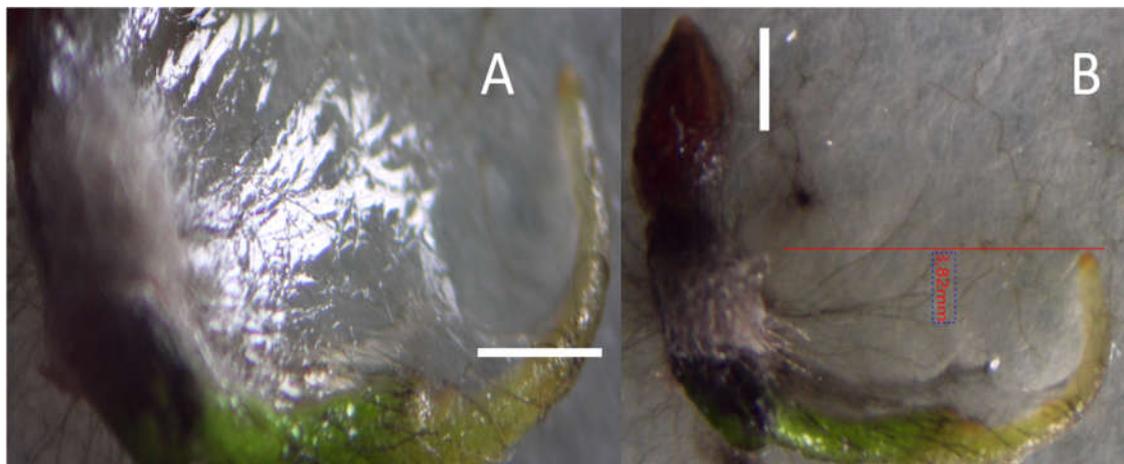
Também foi observado desenvolvimento fúngico nas sementes que passaram pelos tratamentos de maior tempo de exposição e concentração de hipoclorito, em

especial nos tratamentos com 100% de NaClO (Figura 7 A; B). Interessantemente, as sementes germinadas foram associadas à maior concentração de NaClO, nas quais ocorreu o desenvolvimento fúngico. Nesse sentido, além do próprio NaClO, a presença do fungo pode ter contribuído para degradação do endocarpo e início da germinação de algumas sementes neste tratamento.

Wada & Reed (2011b) relatam que a utilização de NaClO não foi eficiente na germinação de sementes de *Rubus* spp. As germinações iniciaram-se apenas após seis meses e, ao final de 12 meses, a germinação total obtida foi muito baixa (29%) quando comparada com as sementes escarificadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (81,6%). Wada et al. (2011) observaram que houve redução da espessura do tegumento das sementes de *Rubus* spp. escarificadas com NaClO a 14% em taxa similar às escarificadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, porém, a germinação final se mostrou significativamente inferior. Os autores ainda cogitam que isso possa indicar que a espessura do endocarpo da semente não é o único fator que restringe a germinação e que a ação do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pode exercer efeitos adicionais na estrutura química da camada de semente.

Os tempos de escarificação com NaClO utilizados no presente trabalho foram baixos para promover uma escarificação eficiente nas sementes. Autores relatam que são necessários tempos de 48 a 96 horas para escarificação de sementes de *Rubus* spp. quando utilizado alvejante comercial com 5% de cloro ativo (GALLETTA et al., 1989), ou 18 horas quando utilizado NaClO a 15% (CAMPBELL et al., 1988).

Utilizando NaClO a 5,25% durante 16 a 21 horas, obteve-se o máximo de germinação (77~83%) em sementes de *R. glaucus*. Após esse período o tempo de exposição se tornou prejudicial, causando danos ao embrião e prejudicando a germinação (DIEZ et al., 2013).



**Figura 7.** Sementes de *R. sellowii* germinadas. Exposição à 75% de hipoclorito por 6 h (A) e exposição a 100% de hipoclorito por 6 h (B). Barras equivalentes a 1 mm.

#### 4.5 Avaliação do tempo de exposição ao ácido sulfúrico na escarificação química de *R. sellowii*

Com a escarificação utilizando ácido sulfúrico houveram sementes germinadas apenas nos tratamentos de escarificação por uma hora (8,75%) e por duas horas (1,25%). Essa baixa taxa de germinação nos tempos de uma e duas horas de exposição ao ácido sulfúrico e ausência de germinação nos tempos de três e quatro horas mostram o resultado da exposição excessiva, podendo ter ocasionado dano ao embrião, como observado pelo próprio autor no momento de realização dos tratamentos.

Durante o processo de escarificação com ácido sulfúrico foi observada a carbonização da camada externa das sementes em todos os tratamentos, ocorrendo mais intensamente nos tratamentos acima de uma hora de exposição (Figura 8 A; B).

Observações em microscópio estereoscópio mostraram que, nas sementes submetidas à escarificação por uma hora e friccionadas em peneira, houve o desmanche e, em alguns casos, até mesmo a desintegração das sementes, sendo observados a liberação de partes internas da semente e provável dano aos embriões (Figura 9 A; B; C).

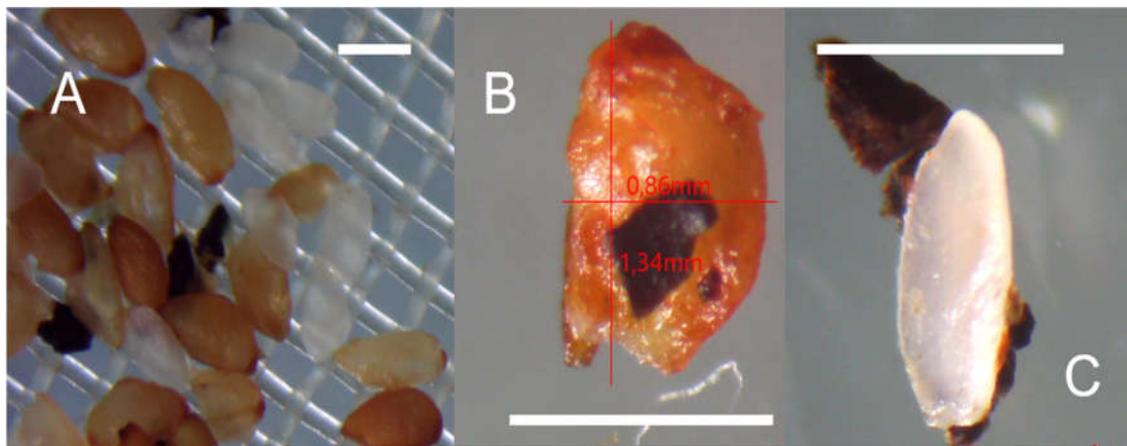
A ausência de germinação nas sementes submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico pode ser um indicativo da ocorrência de dano ao embrião, visto que a maior intensidade de carbonização das sementes e à abertura das sementes na região do hilo, pode ter levado à penetração do ácido no interior da semente e, portanto, em contato com o embrião (Figura 10 A; B). Foi relatado na espécie *R. chamaemorus* que escarificações utilizando ácido sulfúrico em tempos acima de 4,5

horas causaram danos aos embriões, inviabilizando a germinação (WADA; REED, 2011 a). É importante salientar que o tempo utilizado por esses autores foi no mínimo 4,5x que o menor tempo utilizado em nosso experimento com *R. sellowii* (1 hora), sendo que mesmo nesse tempo, a exposição ao  $H_2SO_4$  parece ter sido danosa à semente (Figuras 8, 9 e 10).

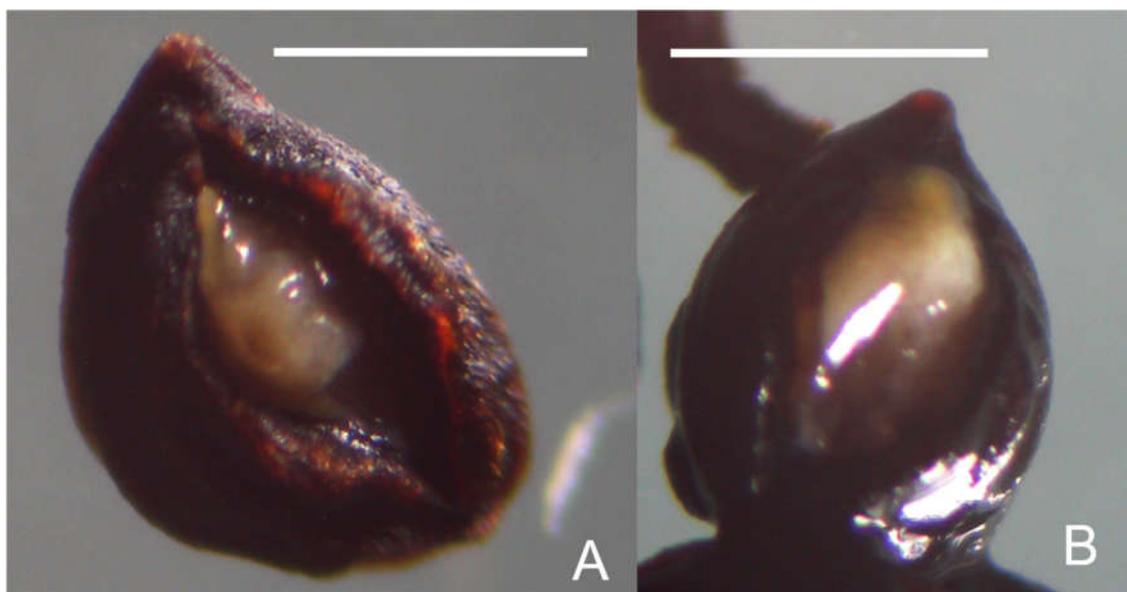
Wada & Reed (2011 b) relatam grande correlação entre o peso das sementes e a espessura do tegumento (82%), ou seja, sementes mais pesadas possuem endocarpos mais espessos. *R. sellowii* tem sementes mais leves que as da espécie *R. chamaemorus* e, conseqüentemente, endocarpo mais fino, levando à necessidade de exposição a tempos mais reduzidos ao ácido sulfúrico. Para *R. chamaemorus*, somente tempos acima de 4 horas provocaram danos ao embrião, enquanto que para *R. sellowii*, tempos acima de uma hora se mostraram prejudiciais devido ao seu endocarpo mais fino.



**Figura 8.** Sementes de *R. sellowii* (A) antes do processo de escarificação química. (B) Carbonização do endocarpo da semente de *R. sellowii* após ser submetida ao processo de escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por duas horas. Barras equivalentes a 1 mm.



**Figura 9.** Sementes de *R. sellowii* após serem submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por uma hora e posterior fricção em peneira, realizado conforme protocolo de Wada & Reed (2011 b). (A) Liberação de partes internas. (B) Semente desintegrada após fricção. (C) Detalhe da parte interna da semente de *R. sellowii*. Barras equivalentes a 1 mm.

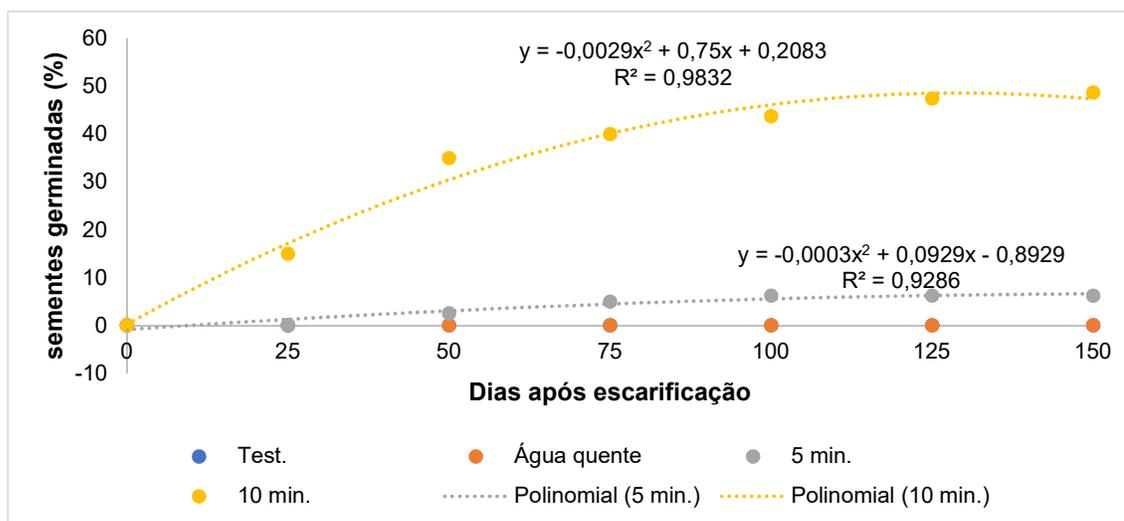


**Figura 10.** Sementes de *R. sellowii* apresentando abertura do hilo após serem submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por 3 (A) e 4 (B) horas. Barras equivalentes a 1 mm.

#### **4.6 Escarificação química de *R. sellowii* em tempos reduzidos de exposição das sementes ao ácido sulfúrico**

A finalidade desse experimento foi verificar se tempos reduzidos de escarificação química com ácido sulfúrico promoveriam a germinação sem causar danos às sementes, já que os primeiros experimentos demonstraram danos irreversíveis e que afetaram o processo de germinação das sementes de *R. sellowii*. Como hipotetizado, os resultados mostraram que tempos menores de exposição (5 e 10 min. de exposição) ao ácido sulfúrico resultaram em melhor resposta na porcentagem de germinação de sementes. Assim como nos experimentos anteriores,

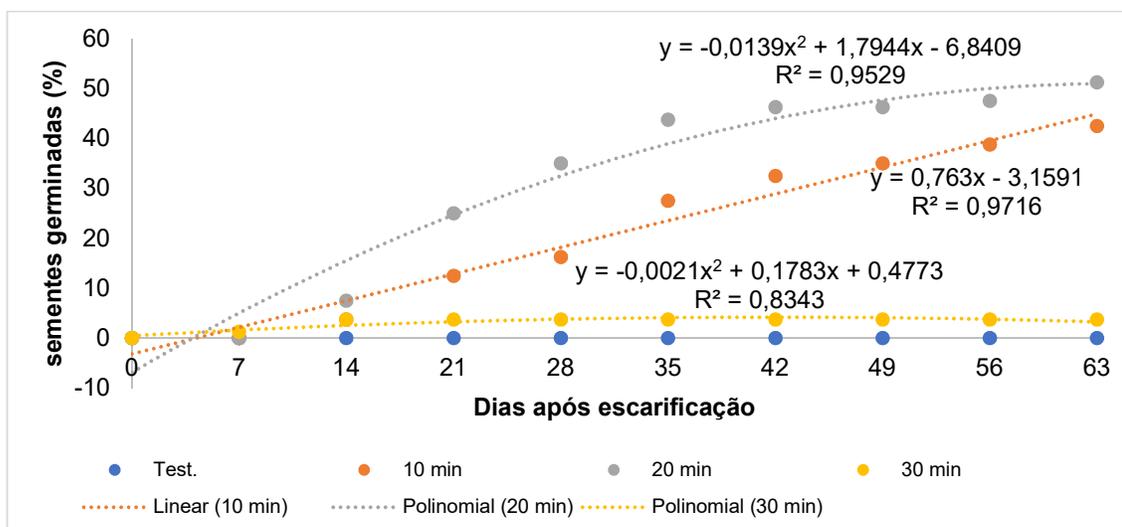
as sementes do tratamento testemunha, que não foram escarificadas, também não germinaram (Figura 11). A imersão das sementes por 10 minutos em água quente não foi suficiente para remoção ou escarificação do endocarpo rígido, não apresentando germinação. A escarificação química por cinco minutos não foi eficiente, apresentando apenas 6% de germinação 150 dias após a escarificação (Figura 11). Quando o tempo de exposição foi aumentado para 10 minutos houve um grande aumento da taxa de germinação, chegando a 49% aos 150 dias após escarificação.



**Figura 11.** Porcentagem de sementes de *R. sellowii* germinadas ao longo do tempo após o processo de escarificação com ácido sulfúrico a 98% por 5 e 10 min e com água a 98°C.

As sementes de *R. sellowii* também foram avaliadas quanto aos tempos de 10, 20 e 30 minutos de escarificação com ácido sulfúrico a 98%.

As sementes escarificadas pelo tempo de 10 minutos mostraram o mesmo comportamento e, até o período avaliado, em torno de 60 dias, a taxa de germinação estava ao redor de 38-40%. O tempo de escarificação por 30 minutos se mostrou excessivo, apresentando apenas 4% de sementes germinadas 60 dias após a imersão em ácido. Já as sementes escarificadas por 20 minutos apresentaram germinação mais rápida de todos os tratamentos avaliados, com 25% de germinação aos 21 dias e chegando a 51% aos 60 dias, valor 10% superior quando comparado com a escarificação por 10 minutos (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentagem de sementes de *R. sellowii* germinadas ao longo dos dias após o processo de escarificação química com ácido sulfúrico a 98% por 10, 20 e 30 minutos.

A porcentagem de germinação apresentada pelo tratamento de escarificação em ácido por 10 e 20 minutos se mostraram significativamente superior aos outros tratamentos. Esse fato pode indicar a tendência de os tratamentos com 10 e 20 min se equipararem na porcentagem de germinação ao longo do tempo, visto que a porcentagem máxima de germinação obtida neste trabalho para as sementes de *R. sellowii* foi de aproximadamente 50% em todos os demais testes realizados (Tabela 2; Figura 6; Figura 11; Figura 12). No entanto, a velocidade de germinação foi significativamente maior com o tratamento de 20 min de exposição (Tabela 3).

**Tabela 2.** Taxa de germinação de sementes de *R. sellowii* submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico 98% pelos tempos de 10, 20 e 30 minutos.

Trat.	Germinação (%)									
	Dias após escarificação									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
<b>Test.</b>	0 a*	0 a	0 b	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c	0 b	0 b
<b>10 min</b>	0 a	0 a	3,75 ab	12,5 b	16,25 b	27,5 b	32,5 b	35 b	38,75 a	42,5 a
<b>20 min</b>	0 a	0 a	7,5 a	25 a	35 a	43,75 a	46,25 a	46,25 a	47,5 a	51,25 a
<b>30 min</b>	0 a	1,25 a	3,5 ab	3,75 c	3,75 c	3,75 c	3,75 c	3,75 c	3,75 b	3,75 b
<b>CV (%)</b>	-	400	98	59	48	46	26	28	30	28

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Índice de velocidade de germinação de sementes de *R. sellowii* submetidas à escarificação e mantidas em BOD para germinação *in vitro*.

Tratamento	IVG
Testemunha	0 c*
10 min.	1,0116 b
20 min.	1,5825 a
30 min.	0,2316 c
CV (%)	39,51

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Peacock & Hummer (1996) relataram taxa de germinação de 26% com a espécie *R. chamaemorus* após meia hora de escarificação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, considerada baixa pelos autores. Wada & Reed (2011a) também necessitaram fazer alterações nos tempos de escarificação devido à ausência de germinação de *R. chamaemorus* escarificadas por uma hora. Esses autores sugerem que, para essa espécie e para *R. arcticus*, devem ser utilizados tempos de quatro a seis horas de escarificação com ácido sulfúrico devido ao rígido endocarpo das sementes dessas espécies.

Wada & Reed (2011b) observaram problema similar com a espécie *R. occidentalis*. As sementes dessa espécie escarificadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 0,5, 1 e 2 horas apresentaram taxas muito baixas de germinação, sendo 0; 12 e 20% respectivamente. Mas quando as sementes foram escarificadas por três horas, os autores obtiveram até 74% de sementes germinadas.

Para as espécies *R. ursinus* e *R. georgicus*, os autores relataram que, quando o tempo de escarificação em ácido sulfúrico foi aumentado de três para 3,5 horas, houve perda de 80% da viabilidade das sementes, e quando as sementes foram escarificadas por quatro horas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, houve perda de viabilidade de 100% das sementes, demonstrando que a exposição ao ácido sulfúrico pode representar danos a semente e ao embrião, bem como o tempo depende da espécie, em especial pela composição estrutural e espessura do endocarpo das sementes de *Rubus*.

Esse fato, conciliado aos resultados obtidos em nosso experimento, sustentam as observações de queda na taxa de germinação nas sementes escarificadas por 30 minutos, bem como nos tratamentos com uma a três horas de exposição ao ácido sulfúrico, quando comparadas com aquelas submetidas ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 10 e 20 minutos (Figura 12; Tabela 2).

## 5 CONCLUSÕES

Sementes de *R. sellowii* possuem endocarpo impermeável à absorção de água;

A semeadura em bandeja realizada no mês de março e mantida em casa de vegetação resultou em taxa de germinação de aproximadamente 50%, assim como em condições de BOD;

A utilização de NaClO não foi eficiente para escarificação química de sementes de *R. sellowii*;

Tempos acima de uma hora, utilizando-se de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% na escarificação química de sementes de *R. sellowii*, são excessivos e não promoveram a germinação;

A utilização de tempos de 10 e 20 minutos de escarificação química com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em sementes de *R. sellowii*, bem como a emergência em substrato com semeadura no final do verão, resultaram nas maiores taxas de germinação para a espécie, sendo de aproximadamente 50% de sementes germinadas;

## 6 LITERATURA CITADA

BEWLEY, J.D. BLACK, M. **Dormancy and the control of germination**. In: BEWLEY, J.D. BLACK, M. Eds. *Seeds: physiology of development and germination*. New York: Plenum Press, p.199-214. 1994.

BEWLEY, J.D. Seed germination and Dormancy. **The Plant Cell**. v. 9, p. 1055-1066. 1997.

BURGHARDT, L.T. EDWARDS, B.R. DONHUE, K. Multiple paths to similar germination behavior in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytol**. v. 209, p. 1301-1312. 2015.

CAMPBELL, P.L. ERASMUS, D.J. van STADEN, J. Enhancing seed germination of sand blackberry. **HortScience**. v. 23, p. 560–561. 1988.

CLARK, J.R. ERIC, J.S. HALL, H.K. FINN, C.E. **Blackberry breeding and genetics**. In: Janick, J. (Ed.). *Plant Breeding*. John Wiley and Sons Inc., NJ. p. 19–144. 2007.

DAUBNEY, H.A. **Brambles**. In: *Fruit Breeding II*. John Wiley and Sons, Inc., New York. 477 p. 1996.

DESAI, B.B. **Seeds handbook**. Biology, production, processing, and storage. Second edition. Marcel Dekker Inc., New York. 627 p. 2004.

DIEZ, C.A.D. ARIAS, M.L. VALENZUELA, J.R.C. CANO, C.I.M. Dormancy and Germination of Castilla Blackberry Seeds (*Rubus glaucus* Benth). **Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín**. v. 66, p. 6855-6864. 2013.

GALLETTA, G.J. BALLINGTON, J.R. DRAPER, A.D. Pregermination treatment of seeds of species and hybrids in *Rubus* with sodium hypochlorite. **Acta Hort**. v. 262, p. 289–296. 1989.

HE, H. VIDIGAL, D.S. SNOEK, L.B. SCHABEL, S. NIJVEEN, H. HILHORST, H. L. BENTSINK. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot**. v. 65, p. 6603-6615. 2014.

HUMMER, K. PEACOCK, D.N. Seed dimension and weight of selected *Rubus* species. **HortScience**, v. 29, p. 1034–1036. 1994.

HUMMER, K. *Rubus* diversity. **HortScience**, v. 31, p. 182–183. 1996.

JENNINGS, D.L. **Raspberries and blackberries**: their breeding diseases and growth. Academic Press, New York. USA. 20 p. 1988.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for emergence and vigor. **Crop Science**. v.2, p.176-177, 1962.

MIAN, M.A.R. SKIRVIN, R.M. NORTON, M.A. OTTERBACHER, A.G. Drying interferes with germination of blackberry (*Rubus* sp.) seeds *in vitro*. **HortScience**, v. 30, p. 124–126. 1995.

MOISE, J.A. HAN, S. GUDYNAITE-SAVITCH, L. JOHNSON, D.A. MIKI, B.L.A. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**. v. 41, p. 620–644. 2005.

NÉE, G. XIANG, Y. SOPPE, W.J.J. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 35, p. 8-14. 2017.

NYBOM, H. Germination in Swedish blackberries (*Rubus* L. subgen. *Rubus*). **Botaniska Notiser**. v. 133, p. 619–631. 1980.

OURECKY, D.K. **Brambles**. In: JANICK, J. and MOORE, J.N. (Eds.). Advances in fruit breeding. Purdue University Press. West Lafayette, Indiana. 640 p. 1975.

PEACOCK, D.N. HUMMER, K. Pregermination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. **HortScience**. v. 31, p. 238–239. 1996.

SILVA, F. A. S. AZEVEDO, C. A. V. A new version of the Assisat-Statistical Assistance Software. In: World congress on computers in agriculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. p. 393-396. 2006.

SILVA, S.M. OLIVEIRA, R.C. ALMEIDA, R.F. et al. Aryl removal methods and passion fruit seed positions: Germination and emergence. **J. Seed Sci**. v,37, p. 125-130. 2015.

- SIMONS, A.M. JOHNSTON, M.O. Environmental and genetics sources of diversification in the timing of seed germination: implications for the evolution of bet hedging. **Evolution**. v. 60, p. 2280-2292. 2006.
- SUZUKI, W. Germination of *Rubus palmatus* var. *coptophyllus* and *R. microphyllus* seeds buried in soil for 7.5 years. **Ecological Research**. v. 8, p. 107-110. 1993.
- TAYLOR, K. Biological flora of the British Isles: *Rubus vestitus* Weihe. **J. Ecol.**, v. 93, p. 1249–1262. 2005.
- THOMPSON, M.M. Chromosome numbers of *Rubus* species at the National Clonal Germplasm Repository. **HortScience**. v. 30, p. 1447–1452. 1995.
- VIDAL, M. C. STACCIARINI-SERAPHIN, E. CÂMARA, H.H.L.L. et al. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Lobeira) em casa de vegetação. **Acta bot. bras.** v. 13, p. 271-274. 1999.
- WADA, S. KENNEDY, J.A. REED, B.M. Seed coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. **Scientia Hort.** v. 130, p. 762–768. 2011.
- WADA, S. REED, B.M. Optimized scarification protocols improve germination of diverse *Rubus* germplasm. **Scientia Horticulturae**. v. 130, p. 660–664. 2011 a.
- WADA, S. REED, B.M. Standardizing germination protocols for diverse raspberry and blackberry species. **Scientia Horticulturae**. v. 132, p. 42–49. 2011 b.
- WARR, H.J. D.R. SAVORY AND A.K. BAL. Germination studies of bakeapple (cloudberry) seeds. **Canadian Journal of Plant Science**. v. 59, p. 69-74. 1979.
- WROBLOWNA, W. Observation on the vegetative propagation, germination, and zoochory of the raspberry. **Acta Societatis Botanicorum**. v. 20, p. 201–222. 1949.
- ZASADA, J.C. TAPPEINER III, J.C. **Rubus L.** In: The Woody Plant Seed Manual. Eds. BONNER, F.T. KARRFALT, R.P. U.S.D.A. Forest Service. Washington, D.C., USA. p. 984-996. 2008.

## **CAPÍTULO 2. MICROPROPAGAÇÃO SEM REGULADORES VEGETAIS DE AMORA PRETA E INFLUÊNCIA DA LUZ NATURAL NA CONDUÇÃO *in vitro* PARA ACLIMATIZAÇÃO**

### **1 RESUMO**

A técnica de micropropagação é muito utilizada no gênero *Morus*, adicionando-se reguladores vegetais ao meio de cultivo para indução de brotações laterais e para indução de raízes nos explantes. Objetivou-se neste estudo a micropropagação de *M. nigra* na ausência de reguladores vegetais seguido do enraizamento *in vitro* em dois ambientes de cultivo, sala de crescimento e casa de vegetação. Nos experimentos de multiplicação *in vitro*, a maior taxa de multiplicação foi observada nos tratamentos contendo Benziladenina. O tratamento sem adição de reguladores vegetais demonstrou viabilidade para produção de mudas micropropagadas dessa espécie, permitindo inclusive a realização das fases de multiplicação e enraizamento utilizando o mesmo meio de cultura. Nos experimentos de ambiente de cultivo para o enraizamento *in vitro*, a condução *in vitro* por 28 dias em sala de crescimento, em comparação à condição de casa de vegetação, se mostrou como melhor ambiente para o cultivo, com aproximadamente 90% de segmentos nodais com raízes, 100% de sobrevivência das plântulas e melhor desempenho das mudas na fase de aclimatização.

Palavras-chave: *Morus nigra*; propagação; fitorreguladores.

## 2 INTRODUÇÃO

A amoreira (*Morus* spp.), pertencente à família Moraceae, é uma frutífera exótica nativa da Ásia (LORENZI, 2006), possuindo mais de 68 espécies catalogadas (VIJAYAN et al., 2011) distribuídas pela Ásia, Europa, Américas e África (TIKADER & DANDIN, 2005). Sendo uma espécie utilizada na fruticultura, além do consumo *in natura*, podem ser preparados produtos como geleias, compotas, sucos, sorvetes e vinho (KOYUNCU, 2004). Os frutos também possuem compostos medicinais usados na medicina popular contra disenteria, constipação e diabetes (LEE et al., 2011), sendo, também, fonte de compostos fenólicos e flavonoides (ARFAN et al., 2012).

A propagação dessa espécie por sementes é limitada devido à alta heterozigose das linhagens e por apresentar longos períodos de juvenilidade (VIJAYAN, 2014), sendo, portanto, sua propagação comercial realizada por estaquia caular. Outro método de propagação utilizado é a micropropagação, utilizando-se o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com adição de BA (benziladenina), em concentrações que variam de 0,5 a 2,5 mg L<sup>-1</sup>. No desenvolvimento de raízes adventícias (fase de enraizamento), a adição de Ácido indol-butírico (IBA) ou ácido naftalano-acético (NAA) nas concentrações de 0,25 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> são utilizadas para diferentes espécies desse gênero (CHITRA & PADMAJA, 2005; KASHYAP & SHARMA, 2006; AHMAD et al., 2007; JI et al., 2008; CHATTOPADHYAY et al., 2011). É utilizado também o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) em algumas espécies do gênero, na etapa de alongamento de explantes, anterior à fase de enraizamento (GOGOI et al., 2017).

Embora os reguladores vegetais (PGRs) como BA, IBA e NAA promovam o controle do desenvolvimento *in vitro*, aumentando a eficiência da micropropagação, sua adição ao meio de cultivo pode ocasionar variações somaclonais, indesejáveis, com perda da qualidade final das mudas, como observado em *Coffea arabica* (BOBADILLA LANDEY et al., 2015).

Essas variações fenotípicas levam a necessidade de frequente reintrodução de novos materiais para produção de novos lotes na micropropagação comercial (JAIN, 1993; PLADER et al., 1998; BAIRU et al., 2011), o que também obriga a manutenção de plantas matrizes em condições de campo ou casa de vegetação, além da realização frequente de testes de indexação de doenças (SUN et al., 2013).

Além dos reguladores vegetais, o controle do ambiente de cultivo é outra realidade da micropropagação. Convencionalmente, o cultivo *in vitro* é realizado em salas de crescimento, com estrito controle de luminosidade e temperatura (GOGOI et al., 2017). Porém, a utilização da luz solar natural no cultivo *in vitro* pode promover os processos fotomorfogênicos, aumentar a capacidade fotossintética das mudas *in vitro* e reduzir parte dos custos de produção associado ao controle climático comum das salas de crescimento convencionais, além de reduzir os efeitos drásticos da aclimatização das plantas cultivadas *in vitro* (SILVA et al., 2011; CARDOSO et al., 2013; CHEN, 2016).

Portanto, esse experimento teve como objetivo avaliar a micropropagação de *M. nigra* sem adição de reguladores vegetais nas fases de multiplicação e enraizamento e avaliar o ambiente de cultivo e o tempo de condução *in vitro* de explantes para aclimatização de amora.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Introdução *in vitro* de *M. nigra***

Para a introdução *in vitro* foram utilizadas gemas apicais e axilares, provenientes de estacas caulinares de plantas adultas de amora-preta (*M. nigra*), com aproximadamente quatro anos de idade, cultivadas em condições de campo. Brotações jovens contendo de um a dois cm de comprimento foram colocadas em recipiente plástico contendo água destilada para transporte até o laboratório.

Os explantes foram inicialmente imersos por 30 segundos em álcool 70%, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 40% (2,5% cloro ativo) por 15 minutos e lavados três vezes em água destilada e esterilizada. Os ápices caulinares, com aproximadamente três mm, foram excisados e transferidos para frascos de vidro contendo 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com a metade da concentração de macronutrientes ( $MS\frac{1}{2}$ ), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA e 0,1 mg L<sup>-1</sup> NAA. O pH do meio foi aferido para  $5,8 \pm 0,05$  previamente à adição de 6,4 g L<sup>-1</sup> agar, e autoclavado a 120°C, 1kgf/cm<sup>2</sup>, por 20 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob luz branca fluorescente (2500 lux) em fotoperíodo 16/8h e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

As subseqüentes repicagens para aumento do material foram feitas utilizando-se apenas o meio MS $\frac{1}{2}$ , sem adição de reguladores vegetais e mantidas nas mesmas condições descritas acima.

### **3.2 Multiplicação *in vitro* de amora preta utilizando diferentes concentrações e tipos de reguladores vegetais**

Os explantes utilizados foram segmentos nodais (1,0 $\pm$ 0,2 cm) obtidos de plântulas de amora preta previamente cultivados por 30 dias em meio de cultura PGR-free, contendo uma gema axilar. Os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições descritas no item 3.1.

Foi utilizado o mesmo meio de cultura descrito na fase anterior (MS  $\frac{1}{2}$ ), porém com diferentes tratamentos de reguladores vegetais, como segue: sem a adição de reguladores vegetais (PGR-free); Benziladenina (BA) em 0,25; 0,50 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>; Thidiazuron (TDZ) a 0,10 mg L<sup>-1</sup> e Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) a 3,0 mg L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 5,8  $\pm$  0,05 e adicionado 6,4 g L<sup>-1</sup> de agar. O meio de cultura foi vertido em frascos de 250 mL com tampas de polipropileno e autoclavado a 120°C, 1kgf/cm<sup>2</sup>, por 20 minutos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto de cinco repetições (frascos) contendo quatro segmentos nodais cada. Após 30 dias de cultivo foram avaliados altura de planta (cm), número de folhas, diâmetro de folha (cm) e taxa de multiplicação (número de segmentos nodais obtidos por segmento inoculado) em cada um dos tratamentos.

### **3.3 Condições de cultivo e tempo de condução *in vitro* na aclimatização de plantas de amora negra**

Segmentos nodais, com 1,0 $\pm$ 0,2 cm contendo uma gema axilar, foram inoculados em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  sem adição de reguladores vegetais (PGR-free). Ao total, foram realizados oito tratamentos dispostos em esquema fatorial 4x2, sendo: tempo de cultivo *in vitro* prévio à aclimatização: 7, 14, 21 e 28 dias, em duas condições de cultivo: sala de crescimento, conforme descrito no item 3.1 ou casa de vegetação coberta com plástico difusor transparente 150 $\mu$ m, intensidade luminosa 65000  $\pm$  3000 luxes, e temperaturas médias externas de 28,1 e 29,5°C para setembro e outubro, respectivamente (Fonte: Estação Meteorológica Automática – CCA UFSCar).

Cada tratamento foi composto por quatro repetições (frascos) contendo cinco segmentos nodais cada. Foram realizadas avaliações de número de segmentos com início de brotações e número de segmentos com emissão de raízes seguido do transplântio das micro estacas ou plântulas para bandejas preenchidas com substrato comercial à base de turfa (Pindstrup® – Dinamarca) e colocadas em casa de vegetação nas condições acima descritas. 30 dias após o transplântio das mudas para as bandejas realizou-se outra avaliação sendo essas: altura de planta, número e largura de folhas.

### **3.4 Análise estatística**

Os experimentos dos itens 3.2 e 3.3 foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado e os dados obtidos foram analisados através de análise de variância ANOVA e as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. O software estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006) foi utilizado para realização das análises.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Introdução *in vitro* de *M. nigra***

Os ápices caulinares *in vitro* de amora preta iniciaram seu desenvolvimento com emissão de novas folhas a partir do 14º dia da inoculação, sem problemas de contaminação ou oxidação dos explantes (dados não apresentados). A primeira repicagem para a fase de multiplicação ocorreu após 30 dias de cultivo. As plantas foram micropropagadas até a obtenção de quantidade suficiente de plantas para a instalação do primeiro experimento com reguladores vegetais.

### **4.2 Multiplicação *in vitro* de amora preta utilizando diferentes concentrações e tipos de reguladores vegetais**

Os segmentos nodais cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$  sem adição de reguladores vegetais apresentaram melhor desenvolvimento para altura de planta (6 cm), número de folhas (4,4) e diâmetro de folha (1,8 cm), diferindo significativamente dos meios de cultura contendo os reguladores vegetais (Tabela 1).

A adição de BA ao meio de cultura promoveu maior taxa de multiplicação, independentemente da concentração (Tabela 1), variando de 4,72 (0,25 mg L<sup>-1</sup>) a 5,24 (1,0 mg L<sup>-1</sup>).

No entanto, o uso de BA causou redução das características quantitativas (Tabela 1) e fenotípicas das plântulas obtidas, uma vez que mesmo na concentração mais baixa observou-se desenvolvimento de calos na base dos explantes e folhas amareladas (Fig. 1A-C) em contraste com os explantes cultivados sem reguladores (PGR-free) (Fig. 1F). Sintomas similares, porém, mais intensos, foram também observados com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ (Fig. 1D), outra citocinina utilizada na indução de múltiplas brotações.

Faisal et al. (2005) observaram que o TDZ em baixas concentrações (1,1x10<sup>-6</sup> mg L<sup>-1</sup>) foi efetivo para indução de altas taxas de múltiplas brotações (17-18/ explante) em *Rauvolfia traphylla*. Embora o TDZ na mesma concentração (1,1x10<sup>-6</sup> mg L<sup>-1</sup>) também promova altas taxas de multiplicação em *Vitex trifolia*, a exposição prolongada ao TDZ provocou sintomas de deformação, hiperidricidade e fasciação das brotações, exigindo um subcultivo em meio livre de TDZ (AHMED; ANIS, 2012).

A utilização do Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) não resultou em benefícios no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *M. nigra*, (Fig. 1E), comparado às plantas cultivadas em meio sem adição de reguladores. Litwińczuk et al. (2009) relatam que o uso de GA<sub>3</sub> em altas concentrações (5,0-10,0 mg L<sup>-1</sup>) promoveu o alongamento de plantas de morango (*Fragaria x ananassa*) cultivados *in vitro*, aumentando sua taxa de multiplicação. No presente trabalho com *M. nigra*, o uso de 3,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> resultou em menor taxa de multiplicação, devido ao alongamento dos entrenós e redução no número de folhas e conseqüente número de gemas axilares (Tabela 1; Fig. 1E).

A maioria dos protocolos de multiplicação de *Morus* sp. demonstram efeitos positivos da aplicação de citocininas no meio de cultura para quebra da dormência da gema axilar e indução de brotações, condição necessária para alcançar taxas de multiplicação satisfatórias e viabilizar a utilização comercial da micropropagação (CHATTOPADHYAY et al., 2011; LALITHA et al., 2013).

Interessantemente, não há relatos na literatura da utilização do meio de cultura sem adição de reguladores vegetais para a etapa de multiplicação de amoras do gênero *Morus*. YADAV et al. (1990), utilizando ápices e segmentos nodais de *M. nigra*, relatam que a alta taxa de multiplicação obtidas dos ápices (4,2) e segmentos nodais (11,3) só foram atingidas após a adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA ao meio de cultivo MS.

Observaram ainda que a kinetina (KIN), outra citocinina, só foi efetiva para multiplicação (6,3) quando se utilizava segmentos nodais como explante.

ANIS et al. (2003), em trabalho com *M. alba*, necessitaram da adição de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA além de aminoácidos asparagina e glutamina ao meio de cultura para obter taxa de rendimento entre 2,4 e 5,2 segmentos por explante, e uma sobrevivência *in vitro* de 70%. AKRAM E AFTAB (2012) relatam que não houve indução de múltiplas brotações quando cultivaram explantes de *M. macroura* em meio MS suplementado apenas com BA ou KIN. A maior taxa de rendimento (4,7) foi obtida apenas com a combinação de BA e AIB no meio de cultivo.

A indução de múltiplas brotações promovida pela adição de citocininas exógenas (BA) ocorre através da proliferação e diferenciação celular dos meristemas laterais presentes no câmbio vascular (DELLO LOIO et al., 2008). A regulação e limitação da citocinina nos tecidos vegetais são realizadas pela enzima citocinina oxidase. Ela promove a inativação irreversível da citocinina através da clivagem da cadeia lateral, porém, citocininas com cadeias laterais aromáticas como a BA são resistentes à clivagem (ASHIKARI et al., 2005). Essa resistência à clivagem pode explicar a alta atividade da BA em ensaios *in vitro* e também aos relatos de autores que observaram a maior eficácia de BA quando comparado com KIN em experimentos *in vitro*.

Neste trabalho, o desenvolvimento primário observado nos segmentos inoculados *in vitro* na ausência de reguladores foi possível devido à remoção do ápice caulinar. A diminuição dos níveis de auxina causada pela remoção do ápice permite que haja aumento nos níveis de expressão dos genes que codificam a isopenteniltransferase (IPT), uma enzima precursora de citocininas endógenas, e diminuição da enzima citocinina oxidase, proporcionando aumento na concentração de citocinina na área nodal do caule que é então transportada para a gema quebrando sua dormência (TANAKA et al., 2006).

Além da boa taxa de multiplicação obtida (4,2) em meio de cultura livre de citocininas, os segmentos nodais cultivados em meio de cultura MS<sup>1/2</sup> sem adição de reguladores vegetais apresentaram desenvolvimento de raízes sem necessidade de subcultivo em outro meio de cultura específico (dados não apresentados) (Figura 1 F), sendo que em outras espécies do gênero somente foi observado o desenvolvimento de raízes após adição exógena de ANA (ANIS et al., 2003) ou AIB + carvão ativado (AKRAM; AFTAB, 2012). Yadav et al. (1990) observaram que o uso da auxina AIB foi

mais eficaz para melhorar o enraizamento em *M. nigra* em comparação com AIA e ANA, aumentando o número de raízes de 1,2 (0,0 mg L<sup>-1</sup>) para 6,1 (0,025 mg L<sup>-1</sup>).

Embora a aplicação de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BA no meio de cultura tenha propiciado maior taxa de multiplicação (5,0) que o meio sem reguladores vegetais (4,0), as plantas obtidas, por serem menores e mais quebradiças, foram de difícil manuseio, resultando em processo mais trabalhoso e demorado. Além disso, subcultivos consecutivos em meio de cultura contendo BA podem levar a variações somaclonais em plantas cultivadas *in vitro* (SAHIJRAM et al., 2003; NASSER; MAHMOOD, 2014). Pela experiência nesse trabalho, o cultivo das plântulas de amora por segmentos nodais (microestaquia *in vitro*) possibilitou até o momento a manutenção de plântulas *in vitro*, com subcultivos mensais e durante 24 meses, sem sinais de variações morfológicas como sinais de nanismo, hiperidricidade ou mutações de clorofila, comuns a cultivos com uso do BA (ISRAELI et al., 1991; 1996; KUMAR et al., 1999).

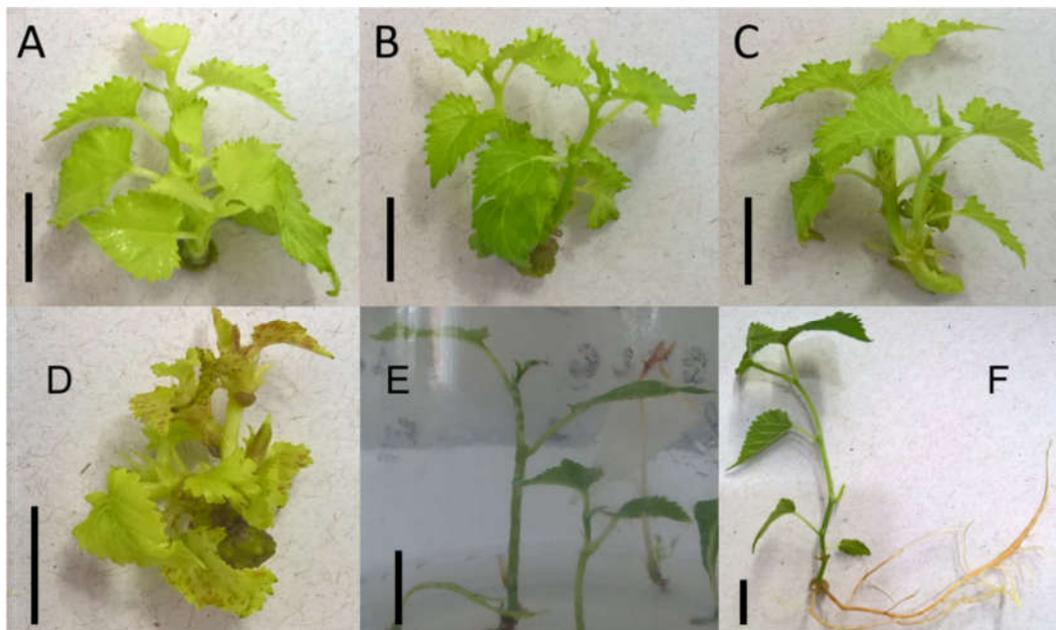
Dessa forma, a simples micropropagação de segmentos nodais de *Morus nigra* em meio de cultura MS ½ é possível de ser realizada tanto para a multiplicação quanto para o enraizamento de mudas, permitindo não somente agilizar e facilitar o processo de cultivo, como também facilitar a programação de produção de mudas.

**Tabela 1.** Reguladores vegetais no desenvolvimento e multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *M. nigra*.

Tratamento	Planta		Folhas	
	Altura (cm)	Taxa de multiplicação**	Número (Nº)	Diâmetro (mm)
PGR-free	6,4 A	4,1 BC	4,5 A	1,8 A
BA 0,25	3,5 B	4,7 AB	3,7 B	1,2 B
BA 0,50	3,5 B	5,0 A	3,7 B	1,1 B
BA 1,00	3,3 B	5,2 A	3,6 B	1,1 B
GA <sub>3</sub>	3,6 B	2,2 D	2,4 C	1,2 B
TDZ	2,3 C	3,6 C	3,4 B	1,1 B
CV (%)	38,30	26,35	30,77	26,60

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*\* Referente à média de segmentos nodais obtidos por segmento inoculado *in vitro*.



**Figura 1.** Explantes de *M. nigra* cultivados em diferentes reguladores vegetais e concentrações: (A) 0,25 mg L<sup>-1</sup> BA; (B) 0,50 mg L<sup>-1</sup> BA; (C) 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA; (D) 0,10 mg L<sup>-1</sup> TDZ; (E) 3,0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. (F) MS½ sem reguladores (PGR-free). Barra = 1 cm.

### 4.3 Condições de cultivo e tempo de condução *in vitro* na aclimatização de plantas provenientes de cultivo *in vitro*

As avaliações desse experimento ocorreram em dois momentos: pré-aclimatização, no momento do transplantio das plantas *in vitro* para bandeja contendo substrato comercial com 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação *in vitro* dos segmentos nodais; e pós aclimatização, 30 dias após o transplantio das mudas em bandejas contendo substrato e cultivo em casa de vegetação.

#### 4.3.1 Desenvolvimento *in vitro* ou pré-aclimatização

As principais diferenças observadas no desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de amora preta ocorreram após o 7º dia da inoculação (Figura 2), sendo a porcentagem máxima de brotações obtida em sala de crescimento (100%), em comparação aos 80% obtidos em casa de vegetação. Porém, a maior diferença entre os ambientes de cultivo ocorreu em relação ao desenvolvimento das raízes adventícias, no qual obteve-se somente 40% de segmentos nodais com raízes em condições de casa de vegetação e 90% para aqueles segmentos cultivados em sala de crescimento (Figura 2). Embora tenha obtido, em casa de vegetação, 80% de segmentos nodais com brotações aos 14 dias de cultivo, esse número foi reduzido para 70 e 40% aos 21 e 28 dias, respectivamente. Essa queda foi causada devido à

morte de plântulas após o 14º dia de cultivo nas condições de estufa, principalmente pela intensidade luminosa excessiva (acima de 65000 lux) e as altas temperaturas das condições naturais da estação, cujas temperaturas máximas variaram de 35,1 a 36,7°C durante o período de condução. Essas foram as principais diferenças das condições de sala de crescimento, onde se manteve temperaturas de  $25 \pm 2$  °C e intensidade luminosa de 2500 lux.

Altas temperaturas levam a um incorreto funcionamento dos processos celulares, como por exemplo a expressão de proteínas (KOINI et al., 2009; STAVANG et al., 2009) e a regulação hormonal do desenvolvimento, incluindo as citocininas (HARE et al., 1997; MACKOVÁ et al., 2013). A aquisição da termotolerância (aclimatização) requer a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) para evitar o estresse oxidativo e envolve a síntese de ácido abscísico (PENFIELD, 2008). O ABA é um hormônio conhecido na promoção da inibição do crescimento em plantas sob condições de estresse (SHARP, 2002), o que pôde resultar no menor desenvolvimento de raízes nos segmentos nodais de *M. nigra* sob condições de casa de vegetação.

Evidenciou-se que as citocininas estão diretamente relacionadas com a sinalização de resposta ao calor em plantas, modulando grande parte (mais de 70%) das proteínas de resposta a altas temperaturas (acima de 35°C), sendo, portanto, a resposta ao calor inibida na ausência desse hormônio. Porém, o efeito da citocinina diminui com o aumento da temperatura (CERNY et al., 2014). Da mesma forma a luz excessiva pode resultar em foto-oxidação das auxinas naturais. Fett-Neto et al. (2001), observaram que condições de luz ( $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na fase de formação da raiz reduziram as raízes adventícias em estacas de *Eucalyptus globulus*.

#### **4.3.2 Desenvolvimento *ex vitro* (aclimatização)**

Nessa fase plantas cultivadas *in vitro* com 7, 14, 21 ou 28 dias da inoculação dos segmentos nodais, em condições de sala de crescimento e em casa de vegetação, foram avaliadas quanto ao sucesso da aclimatização dessas mudas em bandejas contendo substrato comercial (Tabela 2).

Os efeitos anteriores observados nas condições *in vitro* também se refletiram no desenvolvimento de plântulas de *M. nigra* no estágio de aclimatização em casa de vegetação (Tabela 2). Os segmentos nodais mantidos *in vitro* em condições de casa de vegetação resultaram no pior desenvolvimento de plântulas no estágio de

aclimação. O número de dias de cultivo *in vitro* também afetou o desenvolvimento de plantas aclimatadas. As plantas mantidas por diferentes tempos sob condições *in vitro* em casa de vegetação apenas apresentaram aumentos no diâmetro das folhas (0,57 cm a 7 dias para 1,79 cm a 28 dias), sem ganhos em relação ao comprimento e ao número de folhas (Tabela 2; Figura 2). As plantas cultivadas *in vitro* por 28 dias em sala de crescimento apresentaram a melhor aclimatização com plantas mais altas (9,2 cm) e maior largura foliar (3,2 cm) comparadas com as mantidas *in vitro* em casa de vegetação (3,8 e 1,8 cm, respectivamente).

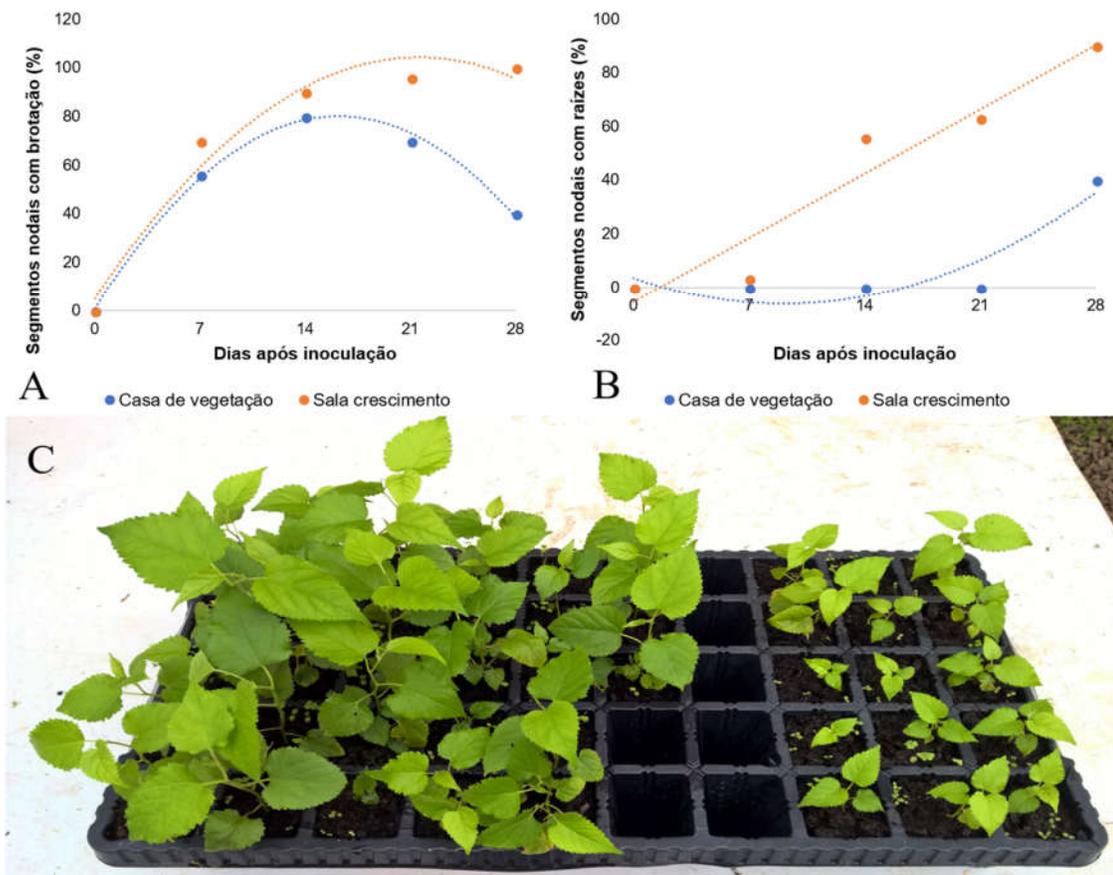
O cultivo *in vitro* de plântulas micropropagadas, durante o estágio de enraizamento e alongamento, chamado pré-aclimatização, foi relatado com sucesso em gérbera (*Gerbera jamesonii*), aumentando o desenvolvimento das plantas durante a aclimatização e com redução nos custos de produção (CARDOSO et al., 2013). As principais diferenças observadas entre o experimento com gérbera e o aqui relatado, foi o controle parcial dos fatores ambientais, que para gérbera foi mantida temperatura de  $25 \pm 5$  °C, PPFD =  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 h. No presente experimento com *M. nigra*, a ocorrência de alta intensidade de luz (900 a  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e temperaturas acima de 30 °C causaram lesões nas plantas no desenvolvimento *in vitro* em condições de casa de vegetação.

As condições de temperatura controlada e baixa intensidade luminosa da sala de crescimento foram essenciais para produzir mudas de *M. nigra* de qualidade e com sistema radicular desenvolvido, permitindo a sua aclimatização com 100% das plântulas vivas 30 dias após o seu transplante (dados não apresentados) para as bandejas.

**Tabela 2.** Influência do tempo de cultivo *in vitro* em dois ambientes, sala de crescimento e casa de vegetação, na aclimatização de plantas de *M. nigra*.

Ambiente de cultivo	Tempo de cultivo <i>in vitro</i> (dias)			
	7	14	21	28
	<b>Sobrevivência (%)</b>			
Sala de crescimento	96	86	73	86
Casa de vegetação	73	83	53	50
	<b>Comprimento de planta (cm)</b>			
Sala de crescimento	2,8 bA <sup>1</sup>	4,6 bA	4,3 bA	9,2 aA
Casa de vegetação	2,2 aA	1,9 aB	2,1 aB	3,8 aB
	<b>Número de folhas</b>			
Sala de crescimento	3,6 A	4,5 A	4,5 A	4,8 A
Casa de vegetação	3,3 A	2,7 B	3,7 B	3,5 B
	<b>Largura de folha (cm)</b>			
Sala de crescimento	0,78 cA	1,20 bcA	1,42 bA	3,23 aA
Casa de vegetação	0,57 bA	0,75 bA	0,97 bA	1,79 aB
	CP	NF	LF	
Ambiente	**	*	**	
Tempo	**	**	**	
Ambiente x Tempo	**	ns	**	
CV%	30,7	16,9	27,0	

<sup>1</sup>Letras iguais – maiúsculas entre ambientes de cultivo; minúsculas entre tempo de cultivo – não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Significante a 1 (\*\*) e 5% (\*) de probabilidade. ns – não significativo. CV – coeficiente de variação.



**Figura 2.** Desenvolvimento *in vitro* de segmentos nodais de *M. nigra* em diferentes ambientes de cultivo (sala de crescimento e casa de vegetação). Número de segmentos nodais com brotações (A) e com raízes (B) ao longo dos dias de condução *in vitro*. Brotações em casa de vegetação:  $y = -0,3003x^2 + 9,751x + 0,9714$   $R^2 = 0,9954$ . Brotações em sala de crescimento:  $y = -0,2128x^2 + 9,1878x + 5,1429$   $R^2 = 0,9653$ . Raízes em casa de vegetação:  $y = 0,1166x^2 - 2,1224x + 3,4286$   $R^2 = 0,8571$ . Raízes em sala de crescimento:  $y = 3,4243x - 5,48$   $R^2 = 0,9265$ . (C) Plantas de amora cultivadas por 30 dias após aclimatação em casa de vegetação, provenientes de cultivo *in vitro* por 28 dias em: Sala de crescimento (Esquerda) e Casa de vegetação (Direita).

## 5 CONCLUSÕES

O uso de um único meio de cultura sem adição de reguladores vegetais para o estágio de multiplicação e enraizamento foi eficiente para a produção de plantas micropropagadas de *M. nigra*. Os explantes micropropagados em meio sem reguladores foram mantidos durante dois anos de cultivo *in vitro* sem qualquer sinal morfológico de variação somaclonal. O enraizamento *in vitro* nas condições da sala de crescimento durante 28 dias apresentou melhor desenvolvimento de plântulas no estágio de aclimatação, com produção de mudas de alta qualidade. Embora a pré-aclimatação de estufa não tenha resultado em melhor condição para aclimatação, novos testes com condições ambientais mais controladas (temperatura e intensidade luminosa) devem ser realizados para viabilizar a técnica para *Morus*.

## 6 LITERATURA CITADA

AHMAD, P. SHARMA, S. SRIVASTAVA, P.S. *In vitro* selection of NaHCO<sub>3</sub>-tolerant cultivars of *Morus alba* (Local and Sujanpuri) in response to morphological and biochemical parameters. **Horticultural Science**. n. 34, p.114-122, 2007.

AHMED, M.R. ANIS, M. Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L. - an Important Medicinal Plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 168, p.957-966. 2012.

AKRAM, M. AFTAB, F. Efficient micropropagation and rooting of King White mulberry (*Morus macroura*) var. Laevigata from nodal explants of mature tree. **Pak. J. Bot.** v. 44, p. 285-289. 2012.

ANIS, M. et al. Micropropagation of mulberry (*Morus alba*) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants. **Plant Tiss. Cult.** v. 13, p. 47-51. 2003.

ARFAN, M. KHAN, R. RYBARCZYK, A. et al. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. **Int. J. Mol. Sci.** n. 13, p. 2472–2480, 2012.

ASHIKARI, M. SAKAKIBARA, H. LIN, S. et al. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. **Science**. v. 309, p.741-745. 2005.

AWASTHI, A.K. NAGARAJA, G.M. NAIK, G.V. et al. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. **BMC Genetics**. v. 5, p. 1-8. 2004.

BAIRU, M. W. AREMU, A.O. van STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regul.** v. 63, p. 147-173. 2011.

BOBADILLA LANDEY, R.B. CENCI, A. GUYOT, R. et al. Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**. v. 122, p. 517-531. 2015.

CARDOSO, J. C. ROSSI, M.L. ROSALEN, I.B. et al. Pre-acclimatization in the greenhouse: An alternative to optimizing the micropropagation of gerbera. **Scientia Horticulturae**. v. 164, p. 616-624. 2013.

- CERNÝ, M. JEDELSKÝ, P. L. NOVÁK, J. et al. Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in *Arabidopsis*. **Plant, Cell & Environment**. v. 37, p. 1641-1655. 2014.
- CHATTOPADHYAY, S. DOSS, S.G. HALDER, S. et al. Comparative micropropagation efficiency of diploid and triploid mulberry (*Morus alba* cv. S1) from axillary bud explants. **Afr. J. Biotech**. v. 10, p. 18153-18159. 2011.
- CHEN, C. Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**. v. 126, p. 167-175. 2016.
- CHITRA D.S.V. PADMAJA, G. Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae**. n.106, p. 593-602, 2005.
- DANDIA, S.D. DHAR, A. SENGUPTA, K. Meiosis in natural decosaploid (22x) *Morus nigra* L. **Cytologia**, Tokyo. v. 55, p. 505-509. 1990.
- DELLO LOIO, R. NAKAMURA, K. MOUBAYIDIN, L. et al. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. **Science**. v. 322, p. 1380-1384. 2008.
- FAISAL, M. AHMAD, N. ANIS, M. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 80, p. 187-190. 2005.
- FRANKLIN, K.A. Light and temperature signal crosstalk in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**.v.12, p. 63–68. 2009.
- GOGOI, G. BORUA, P.K. AL-KHAYRI, J.M. Improved micropropagation and in vitro fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 15, p. 249-256. 2017.
- HARE, P. CRESS, W.A. van STADEN, J. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. **Plant Growth Regulation**. v. 23, p. 79–103. 1997.
- HEGGIE, L. HALLIDAY, K.J. The highs and lows of plant life: temperature and light interactions in development. **The International Journal of Developmental Biology**. v. 49, p. 675–687. 2005.

ISRAELI, Y. BEN-BASSAT, D. REUVENI, O. Selection of stable banana clones which do not produce dwarf somaclonal variants during *in vitro* culture. **Sci. Hort.** v. 67, p. 197–205. 1996.

ISRAELI, Y. REUVENI, O. LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. **Sci. Hort.** v. 48, p. 71–88. 1991.

JAIN, S.M. Somaclonal variation in *Begonia elatior* and *Saintpaulia ionantha* L. **Scientia Horticulturae**. v. 54, p. 221-231. 1993.

JI, T. SHUANG, F. AIZHEN, Y. et al. The primary study of mulberry rapid propagation by culture of side bud tissue. **Chin. Agric. Sci. Bulletin**. Article No. 47. 2008.

KASHYAP, S. SHARMA, S. *In vitro* selection of salt tolerant *Morus alba* and its field performance with bioinoculants. **Hort. Sci.** v. 33, p. 77-86. 2006.

KOINI, M.A. ALVEY, L. ALLEN, T. et al. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. **Current Biology: CB**. v. 19, p. 408–413. 2009.

KOYUNCU, F. Organic acid composition of black mulberry. **Chem. Nat. Comp.** n. 40, p.368-369, 2004.

KUMAR, M. BARKER, R.E. REED, B.M. Morphological and molecular analysis of genetic stability in micropropagated *Fragaria* × *Ananassa* cv. pocahontas. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 35, p. 254-258. 1999.

LALITHA, N. KIHO, S. BANERJEE, R. et al. High frequency multiple shoot induction and *in vitro* regeneration of mulberry (*Morus indica* L. cv. S-1635). **Int. J. Adv. Res.** v. 1, p. 22-26. 2013.

LEE, Y. LEE, D. LEE, H. et al. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** n. 105, p.9-19, 2011.

LITWIŃCZUK, W. OKOŁOTKIEWICZ, E. MATYASZEK, I. Development of *in vitro* shoot cultures of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) ‘SengaSengana’ and

'Elsanta' under the influence of high doses of gibberellic acid. **Folia Horticulturae**. v. 21, p.43-52. 2009.

LORENZI, H. BACHER, L. LACERDA, M.et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: (de consumo *in natura*). São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2006.

MACKOVÁ, H. HRONKOVÁ, M. DOBRÁ, J.et al. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, p. 2805–2815. 2013.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. v. 15, p. 473-497. 1962.

NASEER, S. MAHMOOD, T. Tissue culture and genetic analysis of somaclonal variations of *Solanum melongena* L. cv. Nirrala. **Cent. Eur. J. Bio**. v. 9, n. 12. 2014.

PENFIELD, S. Temperature perception and signal transduction in plants. **The New Phytologist**. v. 179, p. 615–628.2008.

PLADER, W. MALEPSZY, S. BURZA, W. et al. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Euphytica**. v. 103, p. 9-15. 1998.

QURASHI, A. KOICHE, V. MISHRA, S.K. *In vitro* micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. v. 45, p. 87-91. 1996.

SAJEEVAN, R.S. SINGH, S.J. NATARAJA, K.N.et al. An efficient *in vitro* protocol for multiple shot induction in mulberry, *Morus alba* L. variety V1. **Intl. Res. J. Plant. Sci**. v. 2, p. 254-261. 2011.

SHRIN, F. RANA, P.K. MANDAL, A.K. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis*. **J. For. Res**. v. 10, p. 465-469. 2005.

SILVA, A. L. L. OLIVEIRA, Y. COSTA, J. GUERRA, E.P. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus*

*saligna* Sm. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**. v. 9, p. 179-184.2011.

SILVA, S. TASSARA, H. **Frutas Brasil frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 2005. 321p.

STAVANG, J.A. GALLEGU-BARTOLOMÉ, J. GÓMEZ, M.D. et al. Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. v. 60, p. 589–601.2009.

SUKUMAR, P. MALONEY, G.S. MUDAY, G.K. Localized Induction of the ATP-Binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. v. 162, p. 1392-1405. 2013.

FETT-NETO, A.G. FETT, J.P. GOULART, L.W.V. et al. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiol**. v. 21, p. 457-464. 2001.

SUN, S. ZHONG, J. LI, S. et al. Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.). **Botanical Studies**. v. 54. 2013.

TANAKA, M. TAKEI, K. KOJIMA, M. et al. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. **The Plant Journal**. v. 45, n. 6, p. 1028-1036. 2006.

TIKADER, A. DANDIN, S. B. Biodiversity, geographical distribution, utilization and conservation of wild mulberry *Morus serrata* Roxb. **Caspian J. Env. Sci**. v. 3, p. 179-186. 2005.

van ZANTEN, M. VOESENEK, A.C.J.L. PEETERS, A.J.M. et al. Hormone and light-mediated regulation of heat-induced differential petiole growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. v. 151, p. 1446–1458.2009.

VIJAYAN, K. Biotechnology of mulberry (*Morus L.*) - A review. **Emir. J. Food Agric**. v.26, n.6, p.472-496. 2014.

VIJAYAN, K. SRIVASTAVA, P.P. JAYARAMARAJU, P. et al. Breeding for higher productivity in mulberry. **Czech J. Genet. Plant Breed.** v. 48, p.147-156. 2012.

VIJAYAN, K. et al. **Mulberry**. In: KOLE, C. (Ed.). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 75-95, 2011.

WERNER, T. MOTYKA, V. LAUCOU, V. et al. Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **Plant Cell.** v. 15, p. 2532-2550. 2003.

XIAO, Y. KOZAI, T. Commercial Application of a Photoautotrophic Micropropagation System Using Large Vessels with Forced Ventilation: Plantlet Growth and Production Cost. **HortScience.** v. 39, p.1387-1391. 2004.

YADAV, U. et al. Micropropagation of *Morus nigra* from shot tip and nodal explants of mature trees. **Scientia Hortic.** v. 44, p. 61-67. 1990.

### **CAPÍTULO 3 - POTENCIAL DE INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *M. nigra***

#### **1 RESUMO**

Dentre as técnicas de multiplicação *in vitro*, a embriogênese somática consiste na geração de embriões a partir de células somáticas, sem que ocorra fusão de gametas. Contudo, essa técnica ainda não foi utilizada com sucesso no gênero *Morus*, e não há relatos de tentativas do seu uso na espécie *M. nigra*. Esse trabalho teve como objetivo induzir a embriogênese somática na referida espécie. Para isso, foram obtidos calos de explantes nodais de *M. nigra* com o uso de ANA ou BA em condições de luz ou escuro. A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA em condições de luz apresentaram maior número de calos por segmento nodal inoculado, diferindo dos demais tratamentos. Para os experimentos visando a indução dos calos obtidos em calos embriogênicos foram utilizados 12 diferentes meios de cultura. Obteve-se calos embriogênicos em meios contendo 2,4-D (0,875 mg L<sup>-1</sup>) e água de coco (50 ml L<sup>-1</sup>). Esses calos embriogênicos foram cultivados em meio líquido visando a maturação dos embriões, no qual apresentaram desenvolvimento de estruturas globulares de coloração creme. Essas estruturas globulares se multiplicaram e adquiriram pigmentação verde quando cultivados em meio contendo sacarose ou glicose como fonte de carbono. Porém, não houve desenvolvimento posterior dos embriões globulares, portanto, sem germinação e obtenção de plântulas provenientes da embriogênese somática.

## 2 INTRODUÇÃO

Das técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas na multiplicação de plantas, se destaca a embriogênese somática. A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual as células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos, ou seja, estruturas bipolares sem conexão vascular com o tecido parental, através de uma série ordenada de estádios embriogênicos caracteristicamente descritos como: globular, coração, torpedo e cotiledonar (ROHELA et al., 2016). A embriogênese somática (ES) difere da embriogênese zigótica, pois nessa última existe a fusão de gametas masculino e feminino para produção de um zigoto, seguido da embriogênese.

A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta ou indireta: formando embriões diretamente, sem fase de calo (MAHENDRAN; NARMATHA BAI, 2016); ou indiretamente, onde há uma fase prévia, a formação de calo, formado pela dediferenciação de células provenientes de tecidos como integumentos de sementes imaturas, cotilédones, hipocótilos e segmentos foliares (LARDET et al., 2009; VENKATAIAH et al., 2016). Na forma direta, os embriões somáticos podem surgir a partir de células únicas isoladas em cultura (KIYOSUE et al., 1993; HÖXTERMANN, 1997). Porém, quando há uma fase de calo, existe o desenvolvimento de massas proembriogênicas (PEMs), que consiste em células de tamanho reduzido e com citoplasma denso (ROSE; SONG, 2016).

Os embriões somáticos são estruturas bipolares, sendo que cada polo contém seu próprio meristema, um polo apical (futuro meristema apical) e um polo basal (futuro meristema radicular) e um sistema provascular independente do explante de origem. Esta bipolaridade distingue embriões somáticos de outros órgãos adventícios, como brotações e raízes, que são estruturas unipolares com conexão vascular ao explante adjacente (BHATIA; BERA, 2015).

As células somáticas diferenciadas podem ser induzidas a se tornarem embriogênicas por procedimentos que normalmente incluem exposição a reguladores vegetais, frequentemente o ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2-4D), uma auxina sintética (KIM et al., 2017). Embora a auxina seja um fator chave na sua indução, os eventos iniciais também podem exigir a presença de uma citocinina no meio de cultivo (ASTHANA et al., 2017). Além da exposição a reguladores vegetais, a mudança na fonte de carbono e sua concentração no meio de cultura podem direcionar a transição

de células somáticas para células capazes de formar estruturas embriogênicas (JIMÉNEZ; GUEVARA, 1996; RAMÍREZ et al., 2018).

Contudo, um dos principais empecilhos enfrentados pela utilização da ES *in vitro* como ferramenta na propagação de plantas é a baixa capacidade de resposta de muitas espécies e genótipos. Esta recalcitrância afeta não apenas a indução de embriões, mas também as etapas subsequentes no processo de regeneração, incluindo a diferenciação e germinação do embrião (HORTSMAN et al., 2017). Encontrar condições adequadas para induzir a embriogênese somática em diferentes espécies e cultivares ainda é, em grande parte, analisando o efeito de diferentes meios de cultura e realizando alterações no tipo e concentrações de reguladores vegetais (HENRY et al., 1994; ROSE; SONG, 2016).

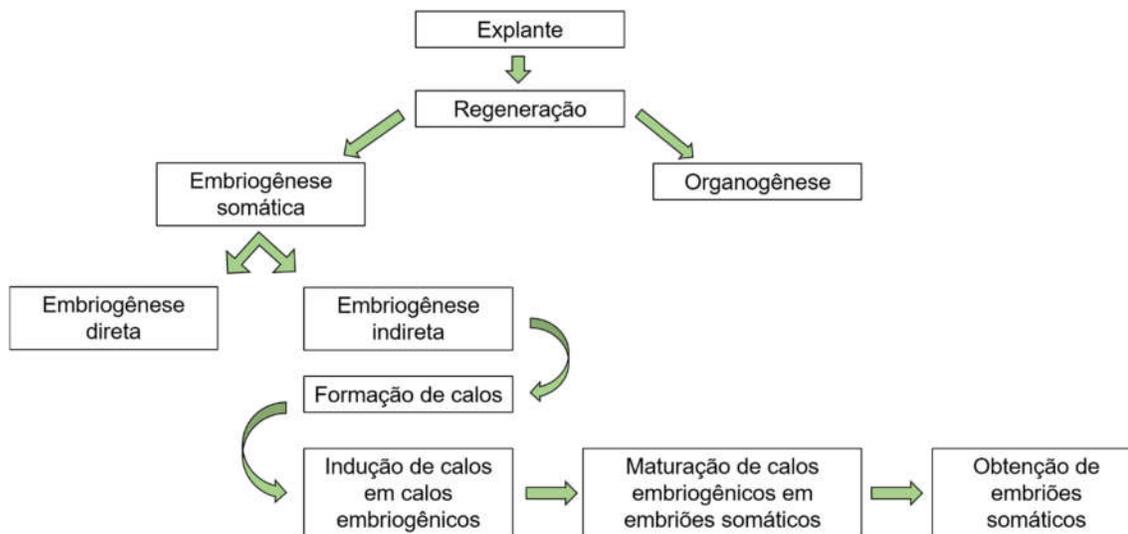
Há apenas dois trabalhos na literatura quem relatam a tentativa de indução de ES em *Morus*, sendo ambos realizados com a espécie *M. alba*. Shajahan et al. (1995) obtiveram embriões em forma de coração de segmentos de hipocótilo de *M. alba* cultivados em meio MS suplementado com 2,4 D (0,45-4,52  $\mu\text{M}$ ) e BAP (2,2  $\mu\text{M}$ ), porém, não obtiveram sucesso na conversão dos embriões em plântulas. Agarwal et al. (2004) obtiveram embriões em estágio cotiledonar cultivando calos obtidos a partir de hipocótilos de embriões zigóticos em meio MS contendo 0,05 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg L<sup>-1</sup> BAP e 60 g L<sup>-1</sup> sacarose.

Diante da escassez de trabalhos de ES com o gênero *Morus* na literatura e da ausência de relatos de tentativas de uso da técnica para a espécie *M. nigra*, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de indução da embriogênese somática na espécie *M. nigra*, uma frutífera exótica.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de tecidos do Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal(CCA/UFSCar), Araras – SP.

O seguinte fluxograma resume as etapas para a indução de embriogênese somática.



**Figura 1.** Fluxograma das etapas de indução de embriogênese somática.

### 3.1 Cultivo *in vitro* de segmentos nodais de amora preta em diferentes concentrações e reguladores vegetais visando a indução de calos

Todas as plantas obtidas para os experimentos a seguir foram provenientes dos mesmos procedimentos realizados no capítulo 2 (Item 3.3), ou seja, de ápices caulinares cultivados *in vitro* e micropropagados em meio MS sem a adição de reguladores vegetais. Para a indução de calos em segmentos nodais de *M. nigra*, foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com a metade da concentração de macronutrientes ( $MS\frac{1}{2}$ ), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1g L<sup>-1</sup> de inositol, pH ajustado para  $5,8 \pm 0,05$  e autoclavado a 120°C e 1 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos.

Os tratamentos consistiram da adição de tipos e concentrações de reguladores vegetais ao meio de cultura sendo: benziladenina (BA) nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> ou ácido naftaleno-acético (ANA) nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. O tratamento controle consistiu no cultivo dos segmentos nodais em meio de cultura sem a adição de reguladores vegetais. Após a inoculação dos segmentos nodais, os frascos foram transferidos para sala de crescimento sob luz fluorescente branca em fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 2.500 lux, ou mantidos no escuro, ambos em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Cada tratamento foi composto por cinco repetições (frascos) contendo, cada um, quatro segmentos nodais. Foram realizadas avaliações de porcentagem de segmentos vivos, diâmetro de calo (cm) além da porcentagem de segmentos com calos.

### **3.2 Indução de calos embriogênicos em meios de cultura contendo reguladores vegetais e com adição de água de coco**

Calos provenientes da porção basal dos segmentos nodais inoculados *in vitro* obtidos a partir item 3.1 (obtidos a partir do tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA) foram utilizados nesta etapa. Para tanto, foi utilizado o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,4 g L<sup>-1</sup> de Agar, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol e pH aferido para 5,8 ± 0,05, autoclavado a 120°C, 1kgf cm<sup>-2</sup> por 20 minutos.

O experimento foi delineado em esquema fatorial 2x2x3, sendo duas concentrações de Ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético (2,4-D): 0 e 0,875 mg L<sup>-1</sup>; duas doses de água de coco: 0 e 50 ml L<sup>-1</sup>; e três concentrações de BA: 0; 2,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup>, totalizando 12 tratamentos, com cinco repetições cada, sendo cada repetição equivalente a um frasco contendo dois segmentos de calos com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob luz fluorescente branca com fotoperíodo 16h, intensidade luminosa de 2.500 lux e temperatura de 25 ± 2°C.

O conjunto experimental foi repetido por duas vezes consecutivas.

Após 90 dias foram caracterizados o desenvolvimento de diferentes tipos de calos a partir daqueles inoculados e avaliados a porcentagem de calos induzidos para a formação de calos embriogênicos.

### **3.3 Cultivo *in vitro* de calos embriogênicos visando a obtenção e maturação dos embriões somáticos**

A metodologia adotada foi a utilizada por AGARWAL et al. (2004) para a espécie *Morus alba*, com modificações. Após a obtenção de calos embriogênicos na etapa anterior, para a primeira duplicata, esses foram cultivados em meio para obtenção e maturação de embriões somáticos, em meio de cultura MS, com pH de 5,8 ± 0,05, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 6,4 g L<sup>-1</sup> de Agar, com ou sem adição de 50 ml L<sup>-1</sup> água de coco e autoclavado por 20 minutos a 120°C, 1 kgf cm<sup>-2</sup>. Ao meio também foi adicionado 0,05 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram utilizados 30 frascos como repetições contendo porções de calos embriogênicos, sendo adicionados aproximadamente 200 mg por frasco. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16h e temperatura de 25 ± 2°C. Após quatro semanas de cultivo foram avaliadas a porcentagem de calos que se multiplicaram, porém mantiveram a condição de calos embriogênicos, além da

porcentagem de calos com produção de embriões nos estágios globular, torpedão, coração e cotiledonar.

Na segunda duplicata, os calos obtidos foram transferidos para tubos contendo meio líquido de maturação (Meio MS + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de inositol, pH de 5,8 ± 0,05, adicionado 0,05 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose e adição de 50 ml L<sup>-1</sup> água de coco), ao invés de meio sólido. Cada tubo recebeu uma porção de calo e foram vedados com filme plástico do tipo PVC. Os tubos foram mantidos em agitador orbital 12/12 (agitação/sem agitação) horas em condições de fotoperíodo de 16 horas e temperatura 25 ± 2°C.

As estruturas obtidas na etapa anterior foram transferidas para frascos contendo quatro diferentes fontes de carbono, sacarose, glicose, lactose e sorbitol, utilizando para o cálculo da concentração o potencial osmótico de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (-0,237 MPa) e resultando nas seguintes concentrações: glicose 17,0 g L<sup>-1</sup>; lactose 34,3 g L<sup>-1</sup>; sorbitol 17,3 g L<sup>-1</sup>, além de duas condições de 2,4-D: 2,0 ou 0,5 mg L<sup>-1</sup> em esquema fatorial 4x2. Cada tratamento foi composto de cinco repetições (frascos) e, em cada frasco, foram colocadas porções das estruturas Tipo 4 obtidos na etapa anterior, utilizando meio MS adicionado de 6,4 g L<sup>-1</sup> de Agar.

### **3.4 Análise estatística**

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. O software estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006) foi utilizado para realização das análises. Dados em porcentagem foram transformados pela equação  $\arcsen\sqrt{x+1}$  antes de serem submetidos à análise.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultivo *in vitro* de segmentos nodais de amora preta em diferentes concentrações e reguladores vegetais visando a indução de calos

Independentemente do tipo e concentração utilizada dos reguladores vegetais, todos os segmentos nodais inoculados apresentaram porcentagens de sobrevivência acima de 85%, sem diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

Para diâmetro de calo, a concentração e tipo de reguladores mostraram ser significativos assim como as condições de cultivo, porém, não houve interação entre esses fatores para essa variável.

**Tabela 1.** Porcentagem de segmentos nodais de *M. nigra* vivos, com desenvolvimento de calos e diâmetro médio de calos em diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais, na luz ou escuro.

Condições de luz	Tratamentos						
	Controle	BA 1,0	BA 2,0	BA 4,0	ANA 0,5	ANA 1,0	ANA 2,0
<b>Explantos vivos (%)</b>							
Luz	90	100	100	95	100	100	85
Escuro	90	100	100	90	85	90	90
<b>Segmento nodal com calo (%)</b>							
Luz	0 aC	95 aA	60 aB	70 aB	95 aA	65 aB	90 aA
Escuro	0 aC	85 aA	70 aAB	45 bAB	40 bB	70 aAB	75 aAB
<b>Diâmetro de calo (mm)</b>							
Luz	0	6,1	6,5	5,8	4,7	4,5	5,9
Escuro	0	4,8	4,6	4,4	2,2	3,8	4,6
	Explantos vivos		Segm. nodal c/ calo (%)			Diâmetro de calo	
Luz (F1)	ns		**			**	
Tratamento (F2)	ns		**			**	
Luz x Tratamento	ns		*			Ns	
CV%	15,1		28,6			28,7	

Médias seguidas pela mesma letra – maiúsculas na linha (reguladores vegetais) e minúsculas na coluna (luz/escuro) – não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Significativo a 1 (\*\*) e 5% (\*) de probabilidade. ns – não significativo. BA: benziladenina; ANA: ácido naftalenoacético.

Para segmentos nodais com calo, as maiores porcentagens foram obtidas sob cultivo em condições de luz com ANA a 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> e de BA a 1,0 mg L<sup>-1</sup> com a obtenção de 90-95% dos segmentos nodais com calos. Zang et al. (2016) avaliaram a indução de calos *in vitro* em brotações de *Dendrocalamus hamiltonii* em meios suplementados com reguladores vegetais auxinas e citocininas. Os autores relatam que auxinas foram mais eficientes para indução de calos do que as citocininas. Porém, a adição de BA junto com 2,4-D resultou na produção de calos mais granulares (de melhor qualidade) quando comparado somente com o meio adicionado 2,4-D.

A adição de diferentes tipos de auxinas mostrou influência sobre a indução de calos em brotações jovens de *Chlorophytum borivillianum*, sendo que somente o 2,4-D resultou na formação de calos, apresentando 66% de calos na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>. As outras auxinas avaliadas (AIA e ANA) apenas induziram desenvolvimento de raízes nos explantes (NAKASHA et al., 2011). A eficiência de indução de calos da auxina 2,4-D também é relatada em outras espécies como *Cardiospermum halicacabum* (THOMAS; MASEENA 2006), *Vanilla planifolia* (JANARTHANAM; SESHADRI 2008), *Eremochloa ophiuroides* (YUAN et al., 2009), *Aloe vera* (RATHORE et al., 2011), *Chlorophytum borivillianum* (SUMAN et al., 2011).

Farhadi et al. (2017) relatam que a adição de ANA foi capaz de induzir a formação de calos em *Allium hirtifolium*, porém, sua eficiência se mostrou menor que a do 2,4-D na indução de calos. Contudo, a combinação ANA ou 2,4-D com BA resultou em incremento significativo na porcentagem de indução de calos.

No presente trabalho com *M. nigra*, a adição de ANA ao meio de cultivo também apresentou desenvolvimento de calos, assim como a adição de BA isoladamente ao meio de cultivo, contudo, esses reguladores não foram avaliados quanto à sua adição em conjunto ao meio de cultura e resposta na indução de calos.

Em explantes internodais de *Plectranthus bourneae*, Thaniarasu et al. (2016) relatam que a adição de ANA em associação com BA se mostrou mais responsiva para indução de calos do que outras auxinas avaliadas, 2,4-D; AIA; AIB e picloran, induzindo calos em 89% dos explantes. Ameri et al. (2018) também relatam que, em pera (*Pyrus communis*), o ANA, uma auxina fraca, em associação com BA foi mais eficiente para indução de calos do que a utilização de uma auxina forte, o 2,4-D. Outros autores também relatam a utilização da associação ANA + BA na indução de calos em outras espécies como *Astragalus nezaketae* (ERISEN et al., 2010), *Celosia argentea* (BAKAR et al., 2014), *Adhatoda vasica* (MANDAL; LAXMINARAYANA, 2014), *Plectranthus barbatus* (THANGAVEL et al., 2014), *Lantana camara* (VERAPLAKORN, 2016) e *Armeria maritima* (GOURGUILLON et al., 2018).

Além da adição de reguladores vegetais, a condição de luz se mostrou significativa na indução de calos (Tabela 1), sendo os explantes cultivados na luz os que apresentaram maior porcentagem de segmentos nodais com calos.

Em outras espécies a indução de calos em condições de luz também se mostrou mais significativa. A indução e crescimento dos calos em *Lemna gibba* mostrou melhor resposta em condições de luz. O cultivo no escuro produziu calos com

massa 75% menor, além de não se desenvolverem e oxidarem após quatro semanas (MOON; STOMP, 1997). Em explantes foliares de *Nicotiana tabacum*, a maior porcentagem de indução de calos foi obtida em conduções de luz (97%) quando comparado com condições de escuro (72%). Os autores ainda relatam que os calos obtidos de condições de escuro não tinham potencial para uso na embriogênese somática (SIDDIQUE; ISLAM, 2015). Porém, Kintzios et al. (2008), relatam que a indução de calos em explantes foliares de *Lavandula vera* foi significativamente maior em condições de escuro.

Nos trabalhos, tanto o cultivo em condições de luz (NAKASHA et al., 2011) como condições de escuro (ZANG et al., 2016; GOURGUILLON et al., 2018) podem ser utilizados para indução de calos em diferentes espécies, *Chlorophytum borivillianum*, *Dendrocalamus hamiltonii* e *Armeria maritima*, respectivamente. Isso indica a possibilidade de obtenção de calos nas duas condições de cultivo, como observado no presente trabalho. Contudo, quando realizada a avaliação comparativa, o cultivo em condições de luz se mostra significativamente melhor.

Diante de respostas variadas, a concentração e o tipo de regulador vegetal utilizados para indução de calos mostram ser bastante relativas à espécie estudada (DHAR; JOSHI, 2005; THOMAS; MASEENA, 2006). Para a espécie *M. nigra*, utilizada em nossos experimentos, a indução de calos em segmentos nodais foi obtida com a utilização isolada de auxina ANA ou citocinina BA (Tabela 1).

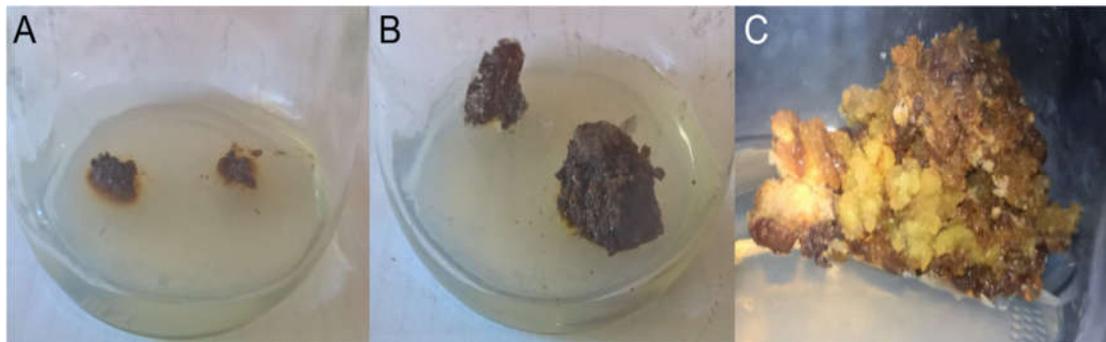
#### **4.2 Indução de calos embriogênicos em meios de cultura contendo reguladores vegetais e com adição de água de coco**

Os experimentos de indução de calos embriogênicos foram realizados por duas vezes consecutivas, com o objetivo de avaliar as respostas as diferentes classes de reguladores vegetais. Devido a algumas diferenças específicas observadas na resposta de obtenção de calos embriogênicos, os dois conjuntos de tratamentos foram apresentados separadamente, sendo a conclusão final realizada a partir das duplicatas realizadas.

##### **Duplicata 1**

Calos provenientes do Item 3.1, obtidos a partir do tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA, foram utilizados para este experimento.

Os calos obtidos neste ensaio foram classificados em três tipos, sendo: Tipo 1: calo sem crescimento e de coloração marrom-escuro; Tipo 2: calo com crescimento e coloração marrom-escuro; Tipo 3: calo em crescimento (divisão e expansão celular), coloração creme e com aspecto friável, característico de calos embriogênicos (Figura 2).



**Figura 2.** Tipos de calos obtidos após cultivo de calos provenientes de explantes de *M. nigra* em diferentes meios de cultura. (A) Calo Tipo 1: calo sem crescimento e de coloração marrom-escuro; Tipo 2: calo com crescimento e coloração marrom-escuro; Tipo 3: calo em crescimento, coloração creme e com aspecto friável, característico de calos embriogênicos.

Na primeira duplicata, somente os tratamentos 5, 6 e 9 (Tabela 2) (com adição de água de coco e 2,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BA apresentaram de 40 a 50% de desenvolvimento de calos Tipo 3. Além dos calos Tipo 3, os tratamentos 6 e 9 (Tabela 2) (com adição de 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BA + água de coco) desenvolveram 40 e 20% de calos Tipo 2, respectivamente (Tabela 2). Os tratamentos sem adição de água de coco (1; 2; 3 e 10) não apresentaram desenvolvimento nos calos inoculados (calo Tipo 1). Os calos tipos 1 e 2 não foram considerados como potenciais para uso na embriogênese somática, devido a sua consistência rígida e coloração escura. Os calos do Tipo 3 se mostraram friáveis, característica de calos embriogênicos obtidos em outras espécies de plantas em condições *in vitro* (KUMAR et al., 2017).

A adição individual ao meio de cultura, seja de 2,4-D ou BA, não promoveu crescimento dos calos, que pode ser observado nos tratamentos 2; 3 e 10 (Tabela 2). A adição de BA (2,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup>) ao meio de cultura suplementado com água de coco foi o que apresentou maior desenvolvimento dos calos, sendo esses valores de 50 e 40% de calos do Tipo 3 nos tratamentos 5 e 6, respectivamente (Tabela 2). No entanto, o cultivo com a adição de 2,4-D (0,875 mg L<sup>-1</sup>) e BA a 2,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup>, em conjunto, sem suplementação de água de coco, promoveu desenvolvimento apenas de calos do Tipo 2 (tratamentos 11 e 12) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeitos de reguladores vegetais e água de coco na indução de calos embriogênicos em *M. nigra* e na porcentagem de formação de calos do Tipo 2 e 3 em cada um dos tratamentos avaliados, referentes à cada duplicata do experimento.

Tratamento	Calos (%)			
	Duplicata 1		Duplicata 2	
	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 2	Tipo 3
01 – MS	0	0	0	0
02 – MS + 2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	0	0	30	0
03 – MS + 4,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	0	0	10	10
04 – MS + 50 mg L <sup>-1</sup> água de coco	30	0	0	0
05 – MS + 50 ml L <sup>-1</sup> água de coco + 2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	0	50	0	30
06 – MS + 50 ml L <sup>-1</sup> água de coco + 4,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	40	40	10	20
07 – MS + 0,875 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 50 ml L <sup>-1</sup> água de coco	20	0	20	60
08 – MS + 0,875 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 50 ml L <sup>-1</sup> água de coco + 2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	30	0	40	30
09 – MS + 0,875 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 50 ml L <sup>-1</sup> água de coco + 4,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	40	20	50	50
10 – MS + 0,875 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	0	0	0	0
11 – MS + 0,875 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 2,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	40	0	20	10
12 – MS + 0,875 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D + 4,0 mg L <sup>-1</sup> BAP	40	0	50	10
<b>CV</b>	109,88	111,11	86,22	123,72
<b>Água de coco (F1)</b>	ns	**	ns	ns
<b>2,4 – D (F2)</b>	ns	ns	*	*
<b>BA (F3)</b>	ns	*	ns	ns
<b>Int. F1xF2</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Int. F1xF3</b>	ns	*	ns	ns
<b>Int. F2xF3</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Int. F1xF2xF3</b>	ns	ns	ns	ns

Significativo a 5(\*) e (\*\*)1% de probabilidade. ns – não significativo.

Na primeira duplicata os fatores água de coco e BA se mostraram significativos para produção de calos Tipo 3. Embora a maioria dos relatos de embriogênese somática estejam relacionados ao uso do 2,4-D, os eventos iniciais da indução da embriogênese também podem exigir a presença de uma citocinina no meio de cultivo (ASTHANA et al., 2017).

A presença de citocininas no meio de cultivo se mostra necessária para que ocorra a indução da embriogênese somática em algumas espécies como *Saintpaulia ionantha* e *Bambusa edulis* (MITHILA et al., 2003; LIN et al., 2004). Em *Rubus sanctus* e *R. hirtus*, Sabooni & Shekafandeh (2017), obtiveram calos embriogênicos em meio

MS ½ sem adição de auxinas, contendo apenas citocininas 9,76 µM KIN (kinetina) + 7,99 µM BA.

Outro fator que se mostrou significativo foi a água de coco adicionada ao meio de cultivo. A água de coco, sendo um endosperma líquido, é um composto complexo que contém aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, vitaminas, carboidratos, minerais e hormônios vegetais (GE et al., 2005; YONG et al., 2009). A adição de substâncias complexas nos meios de cultura, como a água de coco mostra influência na indução do processo embriogênico (KHURANA; SINGLA 2009). É relatado que esse aditivo serve como fonte de nitrogênio reduzido (amônio), se mostrando importante para o desenvolvimento de calos embriogênicos friáveis (POULTON et al., 2012).

Neste trabalho, a adição de água de coco foi responsável por induzir maiores porcentagens de calos que se desenvolveram em calos friáveis (Tipo 3) em comparação aos tratamentos sem sua adição (Tabela 2).

## **Duplicata 2**

Na segunda duplicata desse experimento foi observada a formação de calos embriogênicos (Tipo 3) em tratamentos no qual anteriormente não haviam sido observados. Os tratamentos contendo somente BA a 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> (2 e 3), e sem a adição da água de coco, apresentaram calos em pleno crescimento, sendo 30% de calos do Tipo 2 no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> BA (2) e 10% de calos Tipo 2 e Tipo 3 no Tratamento 3 (Tabela 2).

O tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BA e adição de água de coco a 5% (v/v), resultou em 30% de calos Tipo 3. Contudo, o aumento da concentração de BA no meio contendo água de coco não resultou em incrementos na produção de calos embriogênicos (Tabela 2).

Levando-se em consideração a média de desenvolvimento de calos embriogênicos (Tipo 3) dentre as duas duplicatas do experimento realizadas, os meios 5 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BA + 50 ml L<sup>-1</sup> água de coco) e 9 (0,875 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D + 4,0 mgL<sup>-1</sup> BA + 50 ml L<sup>-1</sup> água de coco) foram os que apresentaram maior porcentagem de indução de calos embriogênicos (35 e 40%, respectivamente).

O potencial de produção de calos embriogênicos também foi comprovado pelo subcultivo dos calos não embriogênicos transferidos para os meios 5 (2,0 mg L<sup>-1</sup> BA + 50ml L<sup>-1</sup> água de coco) e 9 (0,875 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 4,0 mg L<sup>-1</sup> BA + 50 ml L<sup>-1</sup> água de

coco) que resultaram na obtenção de calos de coloração creme e de aspecto friável (Tipo 3) (dados não apresentados).

Na segunda duplicata, apenas a adição de 2,4-D se mostrou significativa para produção de calos, seja do Tipo 2 ou Tipo 3. É relatado que as auxinas desempenham papel crucial no desenvolvimento da embriogênese somática sendo relatado o 2,4-D como o mais utilizado (COOKE et al., 1993; REYES-DÍAZ et al., 2017). Mujib et al. (2014) relatam a obtenção de calos embriogênicos friáveis em meio MS contendo apenas 2,4-D (4.52  $\mu\text{M}$ ).

Autores sugerem que o 2,4-D possua dupla função na indução da embriogênese somática, como auxina e como fator estressante (FEHÉR et al., 2003; RAGHAVAN et al., 2006), onde os estágios iniciais de indução da embriogênese são caracterizados pela ação do 2,4-D na ativação de muitos genes relacionados ao estresse (DAVLETOVA et al., 2001). A exposição das células a reguladores vegetais e condições de estresse induzem à desdiferenciação de algumas células somáticas competentes presentes em tecidos de diferentes partes da planta (BEGUN et al., 2007; LINCY et al., 2009).

Outra etapa importante na embriogênese somática, também induzida pelas auxinas, envolve gradientes de auxina ligados a genes de transporte PIN no embrião somático em desenvolvimento. Esse tipo de regulamento controla a repressão de genes envolvidos na indução da embriogênese somática e alterações genômicas associadas. Outro gene, PICKLE, está associado à remodelação da cromatina e precisa ter sua expressão suprimida para ativar a via da embriogênese. Após a indução das células competentes, a remoção da auxina é necessária para dar prosseguimento aos estágios seguintes da embriogênese somática (ROSE; SONG, 2016).

Encina et al. (2014) utilizaram meio de cultura B5 (Gamborg et al., 1968) adicionado de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de picloram, uma auxina forte, para indução de ES em embriões zigóticos de *Persea americana*. Para indução de ES em integumentos de sementes de *Hevea brasiliensis*, Lardet et al. (2009) utilizaram meio MH (Carron et al., 1989) suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 4,44  $\mu\text{M}$  kinetina além da adição de 30  $\mu\text{M}$  AgNO<sub>3</sub>. Porém, em *Pyrus communis*, a indução de calos embriogênicos foi obtida em meio MS sem presença de 2,4-D, com adição de 8,05  $\mu\text{M}$  ANA e 13,32  $\mu\text{M}$  BA (AMERI et al., 2018).

Em *M. alba*, Agarwal et al. (2004) e Shajahan et al. (1995) relatam a presença de 2,4-D como fator necessário para indução da embriogênese somática nessa espécie. Shajahan et al. (1995) relatam a produção de embriões globulares e cordiformes a partir de calos obtidos de hipocótilos de *M. alba* cultivados em meio contendo 2,4-D. Porém, o posterior cultivo desses embriões nesse mesmo meio não resultou em desenvolvimento ou conversão em plântulas. Já Agarwal et al. (2004) relata que só foi possível obter embriões cotiledonares em meio contendo 2,4-D e BA, suplementado com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Neste experimento, mesmo utilizando-se calos provenientes das mesmas condições (indução em meio MS contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA), as respostas entre as duplicatas foram diferentes. Inicialmente, a adição de BA se mostrou efetiva para indução de calos embriogênicos, assim como a água de coco. Como já citado, algumas espécies necessitam da utilização de BA adicionado ao meio para indução de ES (SABOONI; SHEKAFANDEH, 2017; AMERI et al., 2018).

#### **4.3 Cultivo *in vitro* de calos embriogênicos visando a obtenção de embriões somáticos**

Os calos embriogênicos Tipo 3 obtidos na primeira duplicata foram transferidos para frascos contendo meio de maturação MS com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de inositol, pH aferido para 5,8 ± 0,05, adicionado 0,05 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA e 60 gL<sup>-1</sup> de sacarose, com adição de 50 mL<sup>-1</sup> água de coco além de 6,4 g L<sup>-1</sup> de Agar.

Porém, após 60 dias de cultivo nesse meio de cultura todos os calos transferidos oxidaram, não ocorrendo desenvolvimento posterior ou maturação para embriões e germinação de plântulas.

Os calos Tipo 3 obtidos da Duplicata 2, ao contrário do cultivo em meio sólido dos calos Tipo 3 nos quais não foi observado desenvolvimento significativo resultando em escurecimento dos tecidos, o cultivo em meio líquido apresentou, 70 dias após a introdução dos calos, desenvolvimento de estruturas globulares, classificadas como Tipo 4, no qual os calos obtidos desenvolveram estruturas globulares na sua região superficial, como demonstrado na Figura 3.

O desenvolvimento desse novo tipo de estrutura pode ter ocorrido devido ao uso do meio de cultura líquido, propiciando aumento da superfície de contato com o meio de cultivo, redução da resistência da absorção de água e nutrientes e diminuição do contato com locais do meio onde os nutrientes já foram consumidos (ESCALONA

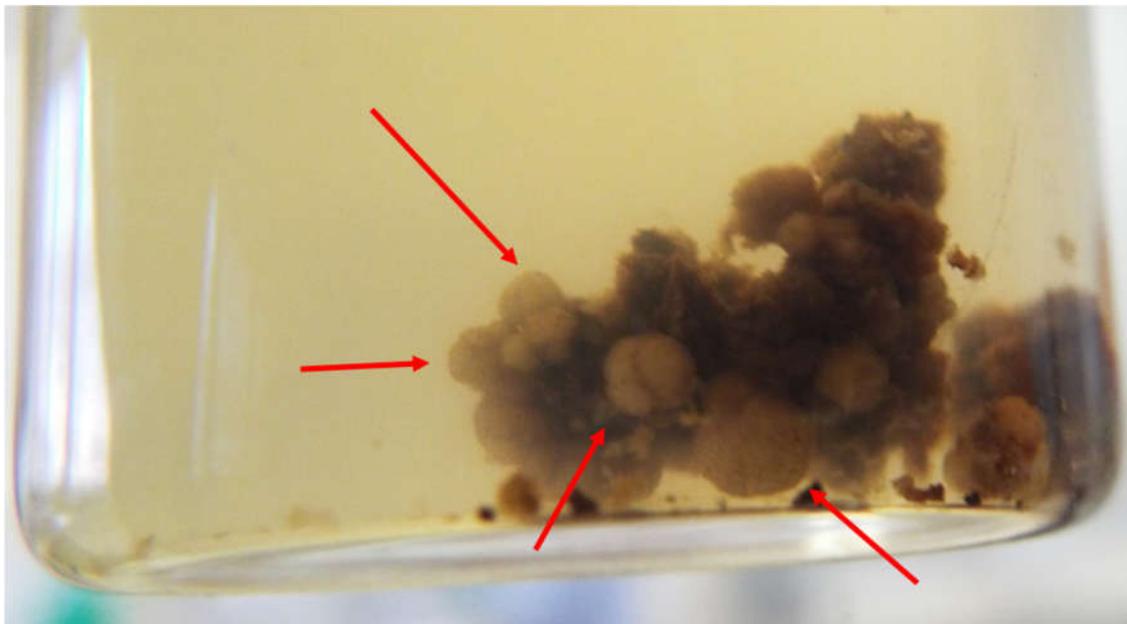
et al., 2003; MARBUM et al., 2015). O consumo dos nutrientes nos locais de inoculação dos calos em meio sólido da primeira duplicata pode ter impedido seu desenvolvimento, necessitando de repicagens mais frequentes para manter sua viabilidade.

Nos trabalhos de indução de ES com a espécie *M. alba*, foi utilizado também o meio líquido sem aeração, assim como utilizado no presente trabalho com a espécie *M. nigra*. Shajahan et al. (1995) utilizaram meio de cultura líquido suplementado com 2,4-D para cultivo de calos obtidos a partir de embriões zigóticos de *M. alba*. Os autores relatam a obtenção de embriões em estágio globular e cordiforme, porém, o posterior cultivo desses embriões não resultou em subsequente desenvolvimento. Agarwal et al. (2004), também utilizando meio de cultura líquido para cultivo de calos obtidos a partir de embriões zigóticos de *M. alba*, relataram a obtenção de embriões em estágio cotiledonar.

A utilização do meio de cultura líquido também é relatada na ES em outras espécies. Em *Elaeis guineensis*, Gomes et al. (2016) avaliaram a utilização do meio semi-sólido e meio líquido com imersão temporária na germinação dos embriões em plântulas. O meio semi-sólido apresentou número inferior de plântulas regeneradas (8 plântulas/g de calo) em comparação com a utilização do sistema de imersão temporária (15 plântulas/g de calo). Em *Bactris gasipaes*, foi observado que o cultivo de calos em meio líquido com imersão temporária apresentou incremento na produção de calos embriogênicos quando comparado com o cultivo em meio sólido. Além disso, as plântulas obtidas a partir do sistema de imersão temporária apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento *ex vitro* (STEINMACHER et al., 2011).

Porém, em *Catharanthus roseus*, os autores relatam que o uso de meio líquido foi menos eficiente na produção de embriões, resultando em 83 embriões/50 mg de calo, enquanto que o cultivo de calos em meio sólido resultou em 99 embriões/50 mg de calo (MUJIB et al., 2014).

No presente trabalho, o cultivo de calos embriogênicos em meio líquido promoveu o desenvolvimento de um novo tipo de estrutura, diferente do cultivo em meio sólido realizado na duplicata 1, indicando a melhor viabilidade na utilização desse meio para indução da embriogênese somática em *M. nigra*.



**Figura 3.** Visualização do desenvolvimento de estruturas globulares esbranquiçadas por toda a periferia do calo Tipo 4 em um calo mantido em desenvolvimento em tubo contendo meio de maturação líquido com água de coco em agitação orbital, fotoperíodo 16h de luz e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

No desenvolvimento de estruturas Tipo 4, bem como a maturação e germinação dos embriões obtidos em meio líquido, foi observado que as estruturas similares a embriões somáticos globulares adquiriram coloração verde (clorofilada) em cada tratamento, sendo a primeira vez que as estruturas obtidas se mostraram com essa coloração (Figura 4).

A fonte de carbono se mostrou como fator significativo para produção dessas estruturas clorofiladas (Tabela 3), sendo relatado sua influência também em outros trabalhos. Das fontes de carbono glicerol, sorbitol, manitol, glicose, lactose e galactose avaliadas por Kayim & Koc (2006), em diferentes variedades de citros, a suplementação do meio de cultivo com 4-5% de glicerol apresentou os melhores resultados para formação de embriões somáticos. Já em pera (*Pyrus communis*), a utilização de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose como fonte de carbono se mostrou mais efetiva, sendo a única a produzir embriões somáticos dentre as fontes avaliadas, sacarose, maltose e sorbitol (AMERI et al., 2018).



**Figura4.** Estruturas globulares clorofiladas, obtidas após cultivo de calos Tipo 4 em meio contendo glicose como fonte de carbono e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D.

**Tabela 3.** Tipo de calo desenvolvido e número de embriões obtidos a partir de cada fonte de carbono e concentração de 2,4-D adicionado ao meio de cultivo.

Tratamento	Tipo de calo	Nº médio de embriões
T1 – Sacarose + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	5	15 B*
T2 – Sacarose + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	5	20 B
T3 – Glicose + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	5	31 A
T4 – Glicose + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	5	21 B
T5 – Lactose + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	2	0 C
T6 – Lactose + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	2	0 C
T7 – Sorbitol + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	1	0 C
T8 – Sorbitol + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D	1	0 C
<b>CV (%)</b>		77,9
<b>Fonte de carbono (F1)</b>		*
<b>Concentração 2,4-D (F2)</b>		ns
<b>F1xF2</b>		ns

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Significativo a 5% de probabilidade. ns – não significativo.

As estruturas clorofiladas obtidas foram transferidas para meio MS  $\frac{1}{2}$  +  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $0,10 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $6,4 \text{ g L}^{-1}$  de agar para observar sua posterior conversão em plântulas. Porém, após 80 dias de cultivo, não

foi observada nenhuma progressão no desenvolvimento dessas estruturas, sendo que as mesmas voltaram a produzir calos e com escurecimento dos tecidos (Figura 5).



**Figura 5.** Calos Tipo 5 oxidados após cultivo em meio MS  $\frac{1}{2}$  + 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Segundo Carra et al. (2016) os principais fatores determinantes do sucesso da embriogênese somática são genótipo, composição do meio (adição de reguladores vegetais e suplementação com aditivos) e tipo de explante. O balanço específico entre regulador vegetal e sua concentração no meio se mostra como específico para cada cultivar/espécie, o que parece tornar a embriogênese somática um processo baseado em erros e acertos (SANTANA-BUZZY et al., 2007; ROSE; SONG, 2016).

Porém, no presente trabalho, só foi possível obter embriões globulares a cordiformes, sem o posterior desenvolvimento desses embriões para estádios mais avançados, como torpedos e cotiledonares, o que não possibilitou a sua germinação e obtenção de plântulas. Shajahan et al. (1995) reportaram desenvolvimento de embriões somáticos de *M. alba*, obtidos a partir de hipocótilos de embriões zigóticos, apenas até o estágio cordiforme. Esses autores propõem que esse não desenvolvimento seja devido à manutenção do 2,4-D no meio de cultivo, e que sua remoção possa resultar em continuidade do desenvolvimento das estruturas. Entretanto, Agarwal et al. (2004), também utilizando embriões somáticos de *M. alba* obtidos a partir de hipocótilos de embriões zigóticos, relata que foi possível obter embriões somáticos em estágio cotiledonar apenas em meio contendo 2,4-D e BA. Essa diferença no desenvolvimento de embriões somáticos da mesma espécie pode ter relação com a recalcitrância dos genótipos para a ES. Segundo Hortsman et al.

(2017), a recalcitrância não afeta apenas a fase de indução de embriões, mas também as etapas subsequentes do processo de regeneração, incluindo a diferenciação e germinação dos embriões.

O motivo da recalcitrância na indução da embriogênese somática está relacionada à competência dos explantes, influenciada pelo genótipo, tipo de explante e nível de hormônios endógenos (MERKLE et al., 1995; JIMÉNEZ, 2001). Assim como em *Pyrus communis* (AMERI et al., 2018), relatada como espécie genótipo-dependente para a embriogênese somática, e *Coffea arabica*, no qual a idade e o estado fisiológico do explante afetam significativamente o sucesso de indução da embriogênese (MOLINA et al., 2002; CAMPOS et al., 2017), o genótipo de *M. nigra* avaliado no presente trabalho, apesar de se ter obtido embriões em estágio globular, se mostrou recalcitrante para a maturação, continuidade do desenvolvimento e germinação, tornando necessária a continuidade dos trabalhos para avaliar outros fatores como genótipos, tipo e idade dos explantes.

## 5 CONCLUSÕES

Pela própria característica da embriogênese somática e de sua divisão em diferentes estádios de desenvolvimento para obtenção dos ES, foi possível observar que, desde a indução de calos e formação de calos embriogênicos, maturação dos embriões e desenvolvimento a estádios que possibilitem sua germinação e conversão em plântulas, são determinados por múltiplos fatores estádios-dependente.

Observou-se que para indução de calos embriogênicos necessita-se da presença de reguladores auxina e citocinina, além de água de coco no meio de cultivo. Para que seu desenvolvimento avançasse, foi necessário o cultivo desses calos em meio líquido, pois sua manutenção em meio sólido inviabilizou sua conversão em embriões. Por fim, a conversão em estruturas globulares foi dependente da utilização do meio líquido e a biossíntese de clorofila nesses embriões ocorreu na presença dos açúcares sacarose ou glicose.

Porém, não foi possível a obtenção de embriões maduros ou a germinação destes.

## 6 LITERATURA CITADA

AGARWAL, S. KANWAR, K. SHARMA, D.R. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. **Scientia Horticulturae**. v. 102, p. 359–368. 2004.

AMERI, A. DAVARYNEJAD, G.H. MOSHTAGHI, N. et al. Polyethylene glycol and chilling overcome Somatic embryogenesis obstacle in *Pyrus communis*. **Scientia Horticulturae**. v. 227, p. 57-64. 2018.

ASTHANA, P. RAI, M.K. JAISWAL, U. Somatic embryogenesis from sepal explants in *Sapindus trifoliatus*, a plant valuable in herbal soap industry. **Industrial Crops and Products**. v. 100, p. 228-235. 2017.

BAKAR, AD. AHMED, BA. TAHA, R.M. *In vitro* callus induction and plant regeneration of *Celosia argentea* - an important medicinal plant. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 57, p. 860–866. 2014.

BEGUN, Y. ROY, S. BANDYOPADHYAY, S. et al. Radiation induced alterations in *Vigna radiata* during in vitro somatic embryogenesis. **International Journal of Radiation Biology**. vol. 84, p. 165-175. 2007.

BHATIA, S. BERA, T. **Somatic Embryogenesis and Organogenesis**. In: Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. Eds. BHATIA, S. SHARMA, K. DAHIYA, R. BERA, T. Academic Press. United Kingdom. 439p. 2015.

CAMPOS, N.A. PANIS, B. CARPENTIER, S.C. Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. **Front. Plant Sci.** v. 8, p. 1460. 2017.

CARRA, A. SAJEVA, M. ABBATE, L. et al. Factors affecting somatic embryogenesis in eight Italian grapevine cultivars and the genetic stability of embryo-derived regenerants as assessed by molecular markers. **Sci. Hortic.** v., 204, p. 123-127. 2016.

CARRON M.P. ENJALRIC F. LARDET L. DESCHAMPS A. BAJAJ Y.P.S. **Rubber** (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 5, Trees II, Berlin Springer-Verlag. p. 222-245. 1989.

COOKE, T.J. RACUSEN, R.H. COHEN, J.D. The role of auxin in plant embryogenesis. **The Plant Cell**. v. 5, p. 1494-1495. 1993.

DAVLETOVA, S. MÉSZÁROS, T. MISKOLCZI, P. et al. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. **Journal of Experimental Botany**. vol. 52, p. 215-221. 2001.

DHAR, U. JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC) Edgew. (Asteraceae) effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Rep**. v. 24, p. 195–200. 2005.

ENCINA, C.L. PARISI, A. O'BRIEN, C. et al. Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. **Scientia Horticulturae**. v. 165, p. 44-50. 2014.

ERISEN, S. YORGANCILAR, M. ATALAY, E. et al. Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketiae* in Turkey. **Electron. J. Biotechn.** v. 13, p. 1–7. 2010

ESCALONA, M. SAMSON, G. BORROTO, C. DESJARDINS, Y. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**. v. 39, p. 651–656. 2003.

FARHADI, N. PANAHANDAH, J. AZAR, A.M. et al. Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). **Scientia Horticulturae**. v. 218, p. 80-86. 2017.

FEHÉR, A. PASTERNAK, T. P. DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. vol. 74, p. 201-228. 2003.

GAMBORG, O.L. MILLER, R.A. OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res**. v. 50, p. 151–158. 1968.

GE, L. YONG, J.W.H. GOH, N.K. et al. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid

chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**. v. 829, p. 26-34. 2005.

GOMES, H.T. BARTOS, P.M.C. BALZON, T.A. et al. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**. v. 82, p. 244-249. 2016.

GOURGUILLON, L. RUSTENHOLZ, C. LOBSTEIN, A. et al. Callus induction and establishment of cell suspension cultures of the halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. **Scientia Horticulturae**. v. 233, p. 407-411. 2018.

HENRY, Y. VAIN, P. DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**. v. 79, p. 45-58. 1994.

HORTSMAN, A. BEMER, M. BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**. v. 4, p. 201-216. 2017.

HÖXTERMANN, E. Cellular 'elementary organisms' *in vitro*. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization. **Physiologia Plantarum**. v. 100, p. 716-728. 1997.

JANARTHANAM, B. SESHADRI, S. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. **In Vitro Cell Dev Biol. Plant**. v. 44, p. 84–89. 2008.

JIMÉNEZ, V.M. GUEVARA, E. Regeneración *in vitro* mediante embryogenesis somática de variedades de cítricos. II. Efecto del 'plateo' de suspensiones celulares en medio de cultivo con diferentes carbohidratos sobre la inducción de embriones. **Agronomía Costarricense**. v. 20, p. 9-16. 1996.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **R. Bras. Fisiol. Veg.** v. 13, p. 196-223. 2001.

KAYIM, M. KOC, N.K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Sci. Hortic.** v., 109, p. 29-34. 2006.

KHURANA, P. SINGLA, B. **Unravelling the molecular basis of somatic embryogenesis**. In: Kumar, A. Shekhawat, N.S. Eds. Plant Tissue Culture and Molecular Markers: Their Role in Improving Crop Productivity. Kluwer Publishers, New Delhi. p. 141-154. 2009.

KIM, J.Y. ADHIKARI, P. B. AHN, C.H. et al. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. **Journal of Ginseng Research**. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.08.002>

KINTZIOS, S. PAPANASTASIOU, I. TOURGELIS, P. et al. The Effects of Light on Callus Growth and Somatic Embryogenesis from *Lavandula vera* and *Teucrium chamaedrys*: A Preliminary Study. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. v. 9, p. 223-227. 2008.

KIYOSUE, T. SATOH, S. KAMADA, H. HARADA H. Somatic embryogenesis in higher plants. **Journal of Plant Research**. v. 3, p. 75-82. 1993.

KUMAR, V. et al. Somatic embryogenesis in *Hypoxis hemerocallidea*: An important African medicinal plant. *South African Journal of Botany*. v. 108, p. 331-335. 2017.

LARDET, L. DESSAILLY, F. CARRON, M. et al. Influences of aging and cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype. **Tree Physiology**. v. 29, p. 291-298. 2009.

LIN, C.S. LIN, C.C. CHANG, W.C. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. **Plant Cell Tiss Org Cult**. v. 76, p. 75–82. 2004.

LINCY, A.K. REMASHREE, A. B. SASIKUMAR, B. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale*Rosc.). **Acta Botanica Croatica**. vol. 68, p. 93-103. 2009.

MAHENDRAN, G. NARMATHA BAI, V. Direct somatic embryogenesis of *Malaxis densiflora* (A. Rich.) Kuntze. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 14, p. 77-81. 2016.

MANDAL, J. LAXMINARAYANA, U. Indirect shoot organogenesis from leaf explants of *Adhatoda vasica* Nees. **SpringerPlus**. v. 3, p. 648. 2014.

MERKLE, S.A. PARROTT, W.A. FLINN, B.S. **Morphogenic aspects of somatic embryogenesis**. In: THORPE, T.A. Ed. *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 155-203. 1995.

MITHILA, J. HALL, J. VICTOR, J.M.R. SAXENA, P. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wend l.). **Plant Cell Rep.** v. 21, p. 408–414. 2003.

MOLINA, D.M. APONTE, M.E. CORTINA, H. MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** v. 71, p. 117-123. 2002.

MOON, H.K. STOMP, A.M. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.** v. 33, p. 20-25. 1997.

MUHAMMAD, K. GUL, Z. JAMAL, Z. et al. Effect of coconut water from different fruit maturity stages, as natural substitute for synthetic PGR in in vitro potato micropropagation. **International Journal of Biosciences.** v. 6, p. 84-92. 2015.

MUJIB, A. ALI, M. ISAH, T. et al. Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) – A comparative study. **Saudi Journal of Biological Sciences.** v. 21, p. 442-449. 2014.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** v. 15, p. 473-497. 1962.

NAKASHA, J.J. SINNIHAH, U.R. KEMAT, N. MALLAPA, K.S. Induction, subculture cycle, and regeneration of callus in Safed musli (*Chlorophytum borivilianum*) using different types of phytohormones. **Pharmacognosy Mag.** v. 12, p. 460-464. 2016.

PADUA, M.S. PAIVA, L.V. da SILVA, L.C. et al. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural.** v. 4, p. 660-665. 2014.

PASTERNAK, T. P. FEHÉR, A. DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** v. 74, p. 201-228. 2003.

PASTERNAK, T. P. PRINSEN, E. AYAYDIN, F. et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**. v. 129, n. 4, p. 1807-1819. 2002

POULTON, J.E. ROMEO, J.T. CONN, E.E. **Plant Nitrogen Metabolism**, vol. 23. Springer Science & Business Media. 2012.

RAGHAVAN, C. ONG, E. K. DALLING, Michael J. et al. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Arabidopsis. **Functional and Integrative Genomics**. vol. 6, p. 60-70. 2006.

RAMÍREZ, A.M.H. VASQUEZ, T. H. OSORIO, T.M.O. et al. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**. v. 229, p. 148-156. 2018.

RATHORE, M.S. CHIKARA, J. SHEKHAWAT, N.S. Plantlet regeneration from callus cultures of selected genotype of *Aloe vera* L. - an ancient plant for modern herbal industries. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.163, p.7860-7868. 2011

REYES-DÍAZ, J.I. ARZATE-FERNÁNDEZ, A. PIÑA-ESCUZIA, J.L. et al. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. **Industrial Crops and Products**. v. 108, p. 81-85. 2017.

ROHELA, G.K. DAMERA, S. BYLLA, P. et al. Somatic embryogenesis and indirect regeneration in *Mirabilis jalapa* Linn. **Materials Today: Proceedings**. v. 3, p. 3882-3891. 2016.

ROSE, R.J. SONG, Y. **Somatic Embryogenesis**. In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. 2nd Edition. Eds. Brian Thomas Denis J Murphy Brian G Murray. Academic Press. United Kingdom. 2016. 1706p.

SABOONI, N. SHEKAFANDEH, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration of blackberry using the thin cell layer technique. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** p. 1-9. (in press). 2017.

SANTANA-BUZZY, N. ROJAS-HERRERA, R. GALAZ-ÁVALOS, R. M. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.** v. 43, p. 507–520. 2007.

SHAJAHAN, A. KATHIRAVAN, K. GANAPATHI, A. Induction of Embryo-like structures by liquid culture in mulberry (*Morus alba* L.). **Breeding Science.** v. 45, p. 413-417. 1995.

SHARMA, S. K. BRYAN, G. J. WINFIELD, M. O. MILLAM, S. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. **Planta.** vol. 226, p. 1449-1458. 2007.

SIDDIQUE, A.B. ISLAM, S.M.S. effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Bangladesh J. Bot.** v. 44, p.643-651. 2015.

SILVA, F. A. S. AZEVEDO, C. A. V. A new version of the Assistat – Statistical Assistance Software. In: World congress on computers in agriculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2006. p. 393-396.

STEINMACHER, D.A. GUERRA, M.P. SAARE-SURMINSKI, K. LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Ann. Bot.** v. 108, p. 1463–1475. 2011.

SUMAN, K. ANURADHA, P. SHAIKALI, G. et al. Isolation and characterization of secondary metabolites "Saponins" from explants of Indian medicinal plant *Chlorophytum borivilianum*. **Int. J. Pharm. Front.** v. 1, p. 214-222. 2011.

THANGAVEL, P. BRITTO, S.J. PRABHU, S. et al. *In vitro* callus induction and plantlets regeneration from leaf explants of *Plectranthus barbatus* Andrews - a valuable medicinal plant. **Int. J. Adv. Sci. Eng.** v.2, p. 51–57. 2014.

THANIARASU, T. KUMAR, T.S. RAO, M.V. Mass propagation of *Plectranthus bourneae* Gamble through indirect organogenesis from leaf and internode explants. **Physiol. Mol. Biol. Plants.** v. 22, p. 143-151. 2016.

THOMAS, C. JIMÉNEZ, V. M. **Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects.** In: MUJIB, A. and SAMAJ, J. eds. Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs. Berlin; Springer Verlag. vol. 2, p. 157-175. 2005.

THOMAS, T.D. MASEENA, E.A. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. **Sci Hort.** v. 108, p. 332–336. 2006.

VENKATAIAH, P. BHANUPRAKASH, P. KALYAN, S.S. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.** v. 14, p. 55-60. 2016.

VERAPLAKORN, V. Micropropagation and callus induction of *Lantana camara* L. – A medicinal plant. **Agriculture and Natural Resources.** v, 50, p. 338-344. 2016.

YONG, J.W.H. GE, L. NG, Y.F. et al. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. **Molecules.** v. 14, p. 5144-5164. 2009.

YUAN, X. WANG, Z. LIU, J. SHE, J. Development of a plant regeneration system from seed-derived calluses of centipedegrass [*Eremochloa ophiuroides* (Munro.) Hack]. **Sci Hort.** v. 120, p. 96–100. 2009.

ZANG, Q. ZHOU, L. ZHUGE, F. et al. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. **SpringerPlus.** v. 5, p. 1799. 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das diferentes técnicas utilizadas neste trabalho, todas visaram o mesmo objetivo: propagação das plantas. Como ferramenta de propagação, as sementes são muito eficientes: possuem toda a informação necessária para o desenvolvimento de um novo indivíduo. Porém, as sementes de *R. sellowii* possuem dormências que as impedem de germinar mesmo em condições favoráveis. Os resultados aqui obtidos agora permitem a possibilidade de utilização das sementes dessa espécie como recurso propagativo, seja para situações de reflorestamento, por ser uma espécie nativa, seja para inserção de características de interesse no melhoramento genético.

Em questão de propagação por sementes, a espécie *M. nigra* não compartilha do mesmo empecilho da espécie *R. sellowii*. O entrave em sua propagação seminífera é devido à alta heterozigose apresentada em relação aos genitores e ao longo período de juvenilidade. Para contornar esses problemas, as técnicas de micropropagação são essenciais, pois permitem a obtenção e propagação de muitos indivíduos sem os problemas apresentados pela propagação por sementes e em reduzido tempo e espaço. A possibilidade de manutenção, multiplicação e enraizamento no mesmo meio de cultivo elimina a necessidade de cultivo em meio específico para cada fase além de otimizar tempo e mão de obra.

Como ferramenta propagativa, a embriogênese somática se apresenta como uma técnica mais eficiente que a micropropagação em termos de rendimento, não sendo ainda descrito na literatura sua utilização na espécie *M. nigra*. No presente trabalho, foi possível obter embriões globulares, um estágio inicial de desenvolvimento da embriogênese somática, porém, sem posterior desenvolvimento e conversão em

plântulas. Diante dos resultados obtidos, torna-se necessário o prosseguimento das investigações acerca da possibilidade de indução de embriogênese somática na espécie *M. nigra*. Apesar do grande potencial da técnica e da grande utilidade que teria para todo o gênero em questão, são escassos os trabalhos avaliando seu uso e, dos poucos existentes, nenhum obteve êxito nesse objetivo.