



Ácido naftalenoacético e cinetina na multiplicação in vitro de *Eugenia involucrata*

Charlene Moro Stefanel¹, Lia Rejane Silveira Reiniger¹, Caetano Miguel Lemos Serrote², Ana Cristina Fonseca Ziegler¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnica, Campus Universitário, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

²Universidade Lúrio, Faculdade de Ciências Agrárias, Avenida do Trabalho, Central, Lichinga, Moçambique

*Autor correspondente:
chastefanel@gmail.com

Termos para indexação:

Micropropagação
Fitorreguladores
Recurso genético

Index terms:

Micropropagation
Phytohormones
Genetic resource

Histórico do artigo:

Recebido em 29/12/2019
Aprovado em 12/11/2021
Publicado em 13/06/2022

Resumo - *Eugenia involucrata* é uma espécie florestal nativa do Brasil, com grande potencial para uso madeireiro, frutícola e medicinal. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de ácido naftalenoacético (ANA) e cinetina (CIN) na sua multiplicação in vitro. Foram testadas diferentes combinações de ANA e CIN. Após 90 dias de cultivo in vitro foi observada uma média geral de 1,19 gemas por explante, sendo que o maior número de brotos (1,33) e folhas (3,38) foram obtidos a 2 µM de ANA. Essa concentração de ANA é importante na multiplicação in vitro de *E. involucrata*, sendo dispensável sua associação com cinetina.

Naphthaleneacetic acid and kinetin in vitro multiplication of *Eugenia involucrata*

Abstract - *Eugenia involucrata* is a native Brazilian forest species with great potential for timber, fruit and medicinal use. The objective of this work was to evaluate the effect of naphthalenoacetic acid (NAA) and kinetin (KIN) on its in vitro multiplication. Different combinations of NAA and KIN were tested. After 90 days of in vitro culture, a general average of 1.19 buds per explant was observed, and the largest number of shoots (1.33) and leaves (3.38) was obtained at 2 µM NAA. This concentration of NAA is important in in vitro multiplication of *E. involucrata*, and its association with kinetin is not necessary.



Eugenia involucrata De Candolle é uma espécie florestal nativa conhecida popularmente como cerejeira-do-mato, cerejeira-do-rio-grande, dentre outros. É uma Myrtaceae de ocorrência natural em vários estados brasileiros, entre eles o Rio Grande do Sul (Carvalho, 2009). Apresenta madeira de excelente qualidade e durabilidade, sendo utilizada na construção civil, para confecção de cabos de machado, ripas, ferramentas agrícolas em geral e para lenha e carvão (Lorenzi, 2016). As folhas apresentam propriedades medicinais, sendo utilizadas na forma de chás com ação antialérgica, antioxidante e anti-inflamatória (Dametto,

2014) e os frutos são muito apreciados para consumo humano e animal (Lorenzi, 2016).

Seus frutos apresentam poucas sementes, normalmente uma ou duas (Silva et al., 2005), as quais são recalcitrantes, caracterizadas pela perda do potencial germinativo logo após duas semanas em condições de armazenamento (Carvalho, 2009, Lorenzi, 2016). Esse fato, aliado à baixa ocorrência de árvores adultas, baixa taxa de sincronia na floração e a reduzida frutificação dos indivíduos (Tonetto et al., 2013) dificultam a obtenção de sementes em grande quantidade para a produção

de mudas em larga escala (Silva et al., 2005) e se configuram nos principais obstáculos para a instalação de povoamentos de *E. involucrata*.

Diante dessa limitação de reprodução por via seminal, a propagação vegetativa torna-se uma alternativa para a multiplicação da espécie (Oliveira et al., 2013). A micropropagação, uma das técnicas de propagação vegetativa, é uma ferramenta de grande destaque para a área (Xavier et al., 2013), sendo de extrema relevância para a propagação das espécies florestais nativas.

Em geral, o sucesso da micropropagação está relacionado com a suplementação de fitorreguladores de maneira isolada ou combinada (Vidal et al., 2013) ao meio nutritivo, sendo que as respostas morfogênicas observadas são controladas, principalmente, pelo balanço hormonal que se estabelece entre auxinas e citocininas. As auxinas atuam na expansão e alongamento celular, auxiliando, também, na divisão celular. O ácido naftalenoacético (ANA) se destaca para tal finalidade (Taiz et al., 2017). As citocininas estão envolvidas nos processos associados com o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo a cinetina (CIN) um dos fitorreguladores mais utilizados na micropropagação (Asmar et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos fitorreguladores ANA e CIN na multiplicação in vitro de *E. involucrata*.

O ensaio foi realizado no laboratório do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnica, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS. Inicialmente, foi realizada a desinfestação superficial das sementes para a germinação in vitro e obtenção dos explantes. Na desinfestação superficial, realizada em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submersas durante 1 min em etanol a 70%, seguida de imersão por 15 min em hipoclorito de cálcio a 3%, e igual período em hipoclorito de sódio ativo a 3%. Por último, as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada.

Na sequência, as sementes foram inoculadas com o auxílio de pinças em meio ágar-água, autoclavado previamente a 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 min. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com condições controladas de temperatura (25 °C ± 2), fotoperíodo (16 h) e intensidade luminosa (20 µmol m⁻² s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias, tipo luz do dia), onde permaneceram por

80 dias. Obtida a germinação in vitro, isolaram-se os segmentos apicais caulinares, os quais foram utilizados como explantes no experimento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (3 x 4), em que os níveis do fator A referem-se às concentrações de ANA (ausência, 2 µM ou 4 µM), e os níveis do fator B referem-se às diferentes concentrações de CIN (ausência, 4 µM, 8 µM ou 16 µM), totalizando 12 tratamentos com 10 repetições. Cada repetição foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962), cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS) e três explantes por frasco.

Após 90 dias de cultivo in vitro, foram avaliadas as variáveis número de gemas, número de brotos e número de folhas. Após testar a normalidade dos erros, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as médias foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Quando significativas, as médias dos tratamentos qualitativos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $\frac{CV}{\sqrt{N}}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (Pimentel-Gomes, 2009). Foi utilizado o pacote estatístico Sistema para Análise de Variância (Sisvar) para Windows® versão 5.6 (Ferreira, 2014).

Para o número de gemas (Tabelas 1 e 2), não houve efeito significativo de qualquer dos fatores principais, tampouco da interação entre eles. Foi observado efeito significativo para as variáveis número de brotos (p = 0,0065) e número de folhas (p = 0,0488) somente do fator principal ANA (Tabela 2), não sendo observado efeito significativo de CIN (Tabela 1), tampouco de sua interação.

Apesar das diferentes combinações de fitorreguladores avaliadas no presente trabalho não tenham influenciado significativamente o número de gemas (Figura 1A), foi observada uma média que pode ser considerada alta (1,19) (Tabelas 1 e 2) comparativamente ao que foi registrado para a espécie em trabalho anterior de multiplicação in vitro (0,67) (Golle et al., 2017). O resultado obtido pode ser explicado pelo nível endógeno de citocinina nos explantes, o que aparentemente foi suficiente para induzir a proliferação de gemas axilares, como pode ser observado no tratamento controle

(Tabelas 1 e 2). Esse resultado é positivo, uma vez que a utilização de fitorreguladores no meio nutritivo aumenta o custo da técnica da micropropagação.

A maior média de número de brotos (1,33) foi obtida com o emprego de 2 μM de ANA, a qual diferiu significativamente dos demais tratamentos (Tabela 2 e Figura 1B). Isso pode ser explicado pelo balanço hormonal favorável à indução de brotações que se estabeleceu com a suplementação da concentração intermediária da auxina. Na concentração mais elevada de ANA (4 μM), assim como na ausência de fitorreguladores no meio nutritivo,

o balanço entre auxina e citocinina não foi adequado para a emissão de um maior número de brotações. Em outro estudo realizado com *E. involucrata*, foram obtidos 2 brotos por explante quando foram combinados a 0,5 μM da auxina ANA e uma concentração elevada (32 μM) da citocinina thidiazuron (TDZ) (Golfe et al., 2017). De maneira semelhante, no cultivo in vitro de *Tectona grandis*, foi observado uma das maiores médias no número de brotos (2,42) com uma concentração mais baixa (17,7 μM) de citocinina (CIN) associado a 0,53 μM de ANA (Fermino Júnior et al., 2014).

Tabela 1. Número médio de gemas, brotos e folhas aos 90 dias de multiplicação in vitro de *Eugenia involucrata*, em meio nutritivo MS, com concentração de sais reduzida à metade ($\frac{1}{2}\text{MS}$) em função de cinetina (CIN), independente da concentração de ácido naftaleno acético (ANA). Santa Maria, RS, 2019.

Table 1. Average number of buds, shoots and leaves at 90 days from vitro multiplication of *Eugenia involucrata* in MS nutrient medium, with salt concentration halved ($\frac{1}{2}\text{MS}$) as a function of kinetin (KIN) regardless of naphthalene acetic acid (NAA) concentration. Santa Maria, Rio Grande do Sul State, 2019.

Concentração de cinetina (μM)	Número de gemas	Número de brotos	Número de folhas
0	1,17 a*	1,11 a	2,89 a
4	0,83 a	0,83 a	1,72 a
8	1,50 a	0,78 a	3,11 a
16	1,28 a	0,61 a	1,50 a
Média	1,19	0,83	2,31
IV	13,31	11,67	18,64

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). IV = índice de variação.



Fotos: Charlene Moro Stefanel

Figura 1. Aspectos da indução de gemas, brotações e folhas em *Eugenia involucrata* após 90 dias de cultivo in vitro na presença de 2 μM de ácido naftalenoacético (ANA) no meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}\text{MS}$). Destaque com setas para o aspecto da formação de gemas (A), emissão de brotações (B) e emissão de diversas folhas no explante (C). Barra = 1 cm.

Figure 1. Aspects of bud, shoots and leaves induction in *Eugenia involucrata* after 90 days of in vitro cultivation in the presence of 2 μM naphthalenoacetic acid (NAA) in the nutritive medium MS, with salt concentration halved ($\frac{1}{2}\text{MS}$). Highlighted by arrows: the bud formation aspect (A), the emission of shoots (B) and the emission of several leaves in the explant (C). Bar = 1 cm.

Tabela 2. Número médio de gemas, brotos e folhas aos 90 dias de multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*, em meio nutritivo MS, com concentração de sais reduzida à metade (½MS) em função de ácido naftaleno acético (ANA) independente da concentração de cinetina (CIN). Santa Maria, RS, 2019.

Table 2. Average number of buds, shoots and leaves at 90 days from *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* in MS nutrient medium, with salt concentration halved (½MS) as a function of naphthalene acetic acid (NAA) regardless of kinetin (KIN) concentration. Santa Maria, Rio Grande do Sul State, 2019.

Concentração de ANA (µM)	Número de gemas	Número de brotos	Número de folhas
0	1,00 a*	0,67 b	2,38 ab
2	1,04 a	1,33 a	3,38 a
4	1,54 a	0,50 b	1,17 b
Média	1,19	0,83	2,31
IV	13,31	4,35	6,95

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). IV = índice de variação.

Por sua vez, em *Hancornia speciosa* a ausência dos fitorregulares 6-benzylaminopurina (BAP) e ANA no meio nutritivo MS aumentou significativamente o número de brotações (Oliveira et al., 2016). Da mesma maneira, em estudos com *Caesalpinia pyramidalis* foi obtido um aumento no número de brotações na ausência de fitorreguladores no meio nutritivo (Silva et al., 2014), o que sugere que nessas espécies não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina ou auxina para estimular as brotações, diferente do que foi observado em *Eugenia involucrata* no presente estudo.

Para a variável número de folhas, a média obtida com 2 µM de ANA (3,38) foi superior àquela observada com o emprego da maior concentração da auxina (1,17), porém nenhuma das duas diferiu do tratamento controle (Tabela 2 e Figura 1C). O resultado observado provavelmente é decorrente do desbalanço hormonal relativo à formação de folhas, promovido pela suplementação com auxina. Na etapa de multiplicação *in vitro*, um maior número de folhas por explante é bastante favorável, visto que na inserção entre o caule e a folha pode existir a produção de gemas, que irão originar um novo broto e, consequentemente, uma nova muda (Costa et al., 2010). Em estudo realizado com *E. involucrata*, Golle et al. (2017) observaram as maiores médias de formação de folhas na ausência (2,22) do fitorregulador TDZ e na presença de 16 ou 32 µM (2,08) de TDZ, médias inferiores ao obtido no presente experimento. Porém, em *Campomanesia adamantium*, a adição de ANA (a 1 µM) combinado a TDZ (5 µM) no meio nutritivo MS reduziu o número de folhas nos explantes (Goelzer et al., 2019). Contrariamente, em *Peltophorum dubium*, o número de folhas foi aumentando de acordo com o incremento na

concentração de citocininas (BAP, CIN, 2IP ou TDZ), até a concentração de 20,2 µM, a partir da qual houve redução (Curti, 2011).

Conclusões

A utilização de 2 µM de ácido naftalenoacético (ANA) aumenta o número de brotações e folhas, sendo importante para na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*. É dispensável o emprego de cinetina (CIN).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo financiamento e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de estudo.

Referências

- Asmar, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, nesp., p. 533-538, 2011.
- Carvalho, P. E. **Cerejeira: *Eugenia involucrata***. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 8 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico). <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/578655>.
- Costa, G. M. et al. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000084>.
- Curti, A. R. **Contribuições para a micropropagação de *Peltophorum dubium* (sprengel) taubert**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

- Dametto, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara.
- Fermino Júnior, P. C. P. et al. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul Ocidental. **Evidência**, v. 14, n. 1, p. 7-20, 2014.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- Goelzer, A. et al. Reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.
- Golle, D. P. et al. Combination of NAA and TDZ for in vitro multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Revista Árvore**, v. 41, n. 5, e410509, 2017. <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000500009>.
- Lorenzi, H. (ed). **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2016. 384 p.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Oliveira, K. S. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação in vitro de *Hancornia speciosa*. **Revista Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335-342, 2016. <https://doi.org/10.5380/rf.v46i3.43993>.
- Oliveira, L. S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>.
- Pimentel-Gomes, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451 p.
- Silva, C. V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 86-92, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222005000100011>.
- Silva, T. dos S. et al. Multiplicação in vitro de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.13102/scb320>.
- Taiz, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artemed, 2017. 888 p.
- Tonetto, T. S. et al. Dinâmica populacional e produção de sementes de *Eugenia involucrata* na Floresta Estacional Subtropical. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 1, p. 62-69, 2013. <https://doi.org/10.4322/floram.2012.072>.
- Vidal, F. R. et al. Multiplicação in vitro de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 64-70, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100010>.
- Xavier, A. et al. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013. 279 p.