

Controle da oxidação *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia uniflora* L**Marília Poton Arcobeli Cola¹, Geovana Poton Arcobeli Cola², Elisângela Knoblauch V. de Andrade¹, Nina Cláudia Barbosa da Silva¹**

¹-Centro de Ciências Agrárias- UFES/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário s/n Cx Postal 16, Guararema, Alegre-ES, 29500-000, e-mail: marilia_agronomia@yahoo.com.br

²- Pos-graduanda em agroecologia- IFES- Campus Alegre, Fazenda Caixa D'Água s/n - Distrito Rive, Alegre, ES. CEP 29520-000, e-mail: geovanacola@hotmail.com

Resumo- *Eugenia uniflora* L. é uma espécie nativa do Brasil pertencente à família Myrtaceae, que devido a propagação por sementes gera pomares desuniformes, logo a micropropagação é uma técnica viável de propagação assegurando a uniformidade e sanidade dos pomares, e acelerando os métodos de propagação convencional. O objetivo deste trabalho foi o controle de oxidação *in vitro* de explantes com uso de diferentes antioxidantes (ácido ascórbico e carvão ativado). Segmentos nodais foram submetidos a tratamentos com MS sem antioxidantes, MS + 10mg/L ácido ascórbico, MS + 100mg/L ácido ascórbico, MS + 1,5g/L carvão ativado e MS + 3g/L carvão ativado. O material foi mantido no escuro e após 7 dias transferido para luz. O material foi avaliado após sete dias no escuro, um, três, sete, 14, 22 e 50 dias na luz quanto ao grau de oxidação. Após 7 dias no escuro o meio MS sem antioxidantes resultou em 73,9% de explantes sem nenhuma oxidação, porém a oxidação foi aumentando em ambos os tratamentos e ao final de 50 dias os tratamentos MS e MS+ácido ascórbico 100 mg/L apresentaram o menor grau de oxidação em relação aos demais tratamentos (2,4,5) resultando em 16% de explantes pouco oxidados.

Palavras-chave: : *Eugenia uniflora* L.; Myrtaceae; oxidação; micropropagação.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias**Introdução**

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma espécie nativa do Brasil, cujo nome provém do tupi pĩtãg, que significa vermelho. É uma árvore que mede entre 6 e 12 m de altura dotada de copa mais ou menos piramidal. Seus frutos são utilizados não só no preparo de polpa e suco, mas na fabricação de sorvetes, refrescos, geléias, licores e vinhos (LEDERMAN et al., 1992; BEZERRA et al., 2000). Na medicina popular é utilizada como anti-hipertensiva, antirreumática, antipirética, contra diarreia, no tratamento de bronquite e gripes tendo comprovada atividade antimicrobiana (FIÚZA et al., 2009).

A micropropagação é uma técnica viável de propagação assegurando a uniformidade dos pomares, possibilitando a produção de mudas com alta sanidade e acelerando os métodos de propagação convencional, através do rejuvenescimento *in vitro*. Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas, podendo ser alcançado na fase de multiplicação *in vitro* (ERIG et al., 2002). Segundo Fachinello et al. (1995), na maioria dos trabalhos envolvendo micropropagação de frutíferas, os explantes escolhidos são obtidos de gemas apicais ou axilares. Fatores como meio de cultura, tipo e

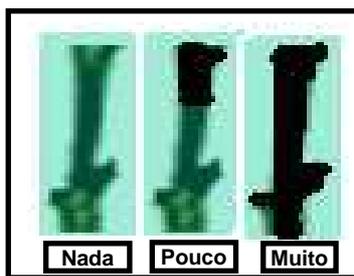
concentração de reguladores de crescimento são importantes de serem observados (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A micropropagação de pitangueira é ainda incipiente. No entanto, alguns trabalhos iniciais apresentam suporte para otimização de protocolos de multiplicação desta espécie. Para micropropagar uma espécie, o primeiro passo é o estabelecimento de plantas *in vitro*, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados (ERIG & SCHUCH, 2003). A utilização de explantes de 1,5cm de comprimento e a utilização de ágar como solidificante no meio de cultura proporcionou um maior estabelecimento *in vitro* desta espécie. (SOUZA et al., 2007)

A pitangueira é uma planta prioritária para estudos segundo a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renuis) por precisar de estudos para confirmar a possibilidade de cultivo e produção (MS, 2009). Levantamento etnobotânicos realizados previamente apontam a pitanga como espécie amplamente utilizada na medicina popular de diversas comunidades (VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006; ALVES et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi o controle de oxidação *in vitro* de explantes de pitangueira com uso de diferentes antioxidantes e concentrações (ácido ascórbico e carvão ativado).

Metodologia

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Departamento de Produção Vegetal, no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre/ES.

A campo foram colhidos ramos de brotações novas com aproximadamente 20 cm e levados imediatamente para o laboratório onde foi feito toailete em água corrente segmentando-os e eliminando-se as folhas na altura do pecíolo permanecendo 50 min. em água corrente. Em seguida lavados com água e sabão de côco por 10 min. e lavado novamente para retirar o sabão. Em câmara de fluxo o material foi colocado em álcool 70% por 30 seg., seguido de imersão em NaOCl 2,5% mais duas gotas de tween 20 por 10 min. e após lavados por três vezes em água destilada autoclavada por um min. cada lavagem. Segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm contendo uma gema (lateral ou apical) foram inoculados isoladamente em tubos de ensaio contendo meio sólido (ágar 7%) nas seguintes composições: MS sem reguladores (T1), MS + 10mg/L ácido ascórbico (T2), MS + 100mg/L ácido ascórbico (T3), MS + 1,5g/L carvão ativado (T4) e MS + 3g/L carvão ativado (T5). As culturas foram mantidas em sala de cultivo com temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16h permanecendo uma semana no escuro. O experimento foi inteiramente casualizado com fatorial 5 X1 (cinco meios de cultura X 1 tipo de explante), com cinco repetições e unidade experimental constituída de 5 tubos/ 1 explante (n=25). Avaliou-se os explantes após sete dias no escuro, um, três, sete, 14, 22, 29 e 50 dias no claro quanto ao grau de oxidação como demonstra o esquema abaixo:



Resultados

Após 7 dias no escuro (Figura 1) o melhor resultado foi observado no meio MS sem antioxidantes (T1) onde 73,9% de explantes apresentavam nenhuma oxidação (Figura 2). Os tratamentos com ácido ascórbico (T2 e T3) proporcionaram o menor controle da oxidação com apenas 50% dos explantes com nenhuma oxidação. (Figura 2).

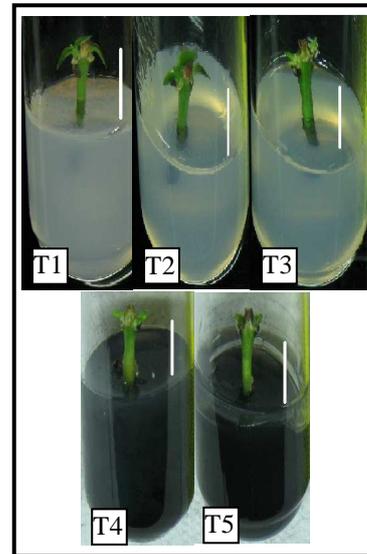


Figura 1: Explantes de pitangueira após 7 dias no escuro nos diferentes tratamentos com antioxidantes.

A oxidação foi aumentando no decorrer do tratamento e, após 7 dias no claro, o meio MS sem antioxidantes apresentou 44% dos explantes sem nenhuma oxidação seguido do meio MS+carvão ativado 1,5g/L (36%). O meio MS+10mg/L ácido ascórbico o que apresentou o maior número de explantes muito oxidados (16%). Ao final de 50 dias os tratamentos MS e MS+ácido ascórbico 100 mg/L apresentaram o menor grau de oxidação em relação aos demais tratamentos (2,4,5) resultando em 16% de explantes pouco oxidados. (Figura 2)

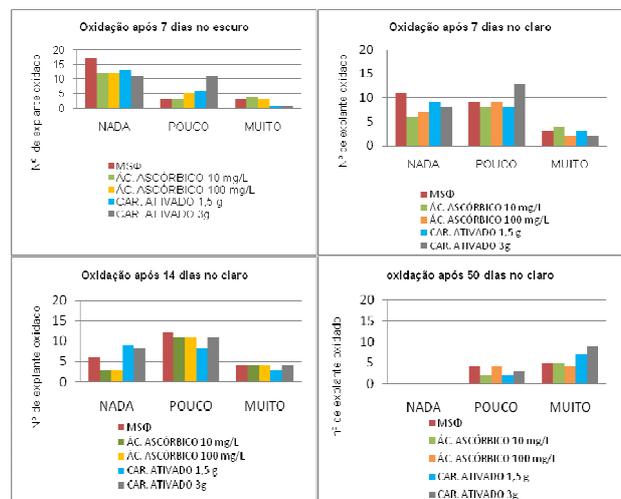


Figura 2: Grau de oxidação 7 dias no escuro, 7, 14 e 50 dias no claro nos diferentes tratamentos.

A partir do 14^o dia começaram a surgir contaminações endógenas que ao final de 50 dias chegaram a 92% no tratamento 4, 64% T3, 52% T1 e 48% no T2 e T5.

Discussão

O controle da oxidação em explantes cultivados *in vitro* é de fundamental importância para o sucesso da cultura, Modgil et al (1999) relatam que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, e segundo Grattapaglia & Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. A partir do 14^o dia a oxidação foi aumentando no decorrer das avaliações. MODGIL et al. (1999) também verificaram elevada oxidação (34,25%) no estabelecimento *in vitro* de macieira cv. Tydemans' Early Worcester utilizando ápices caulinares e segmentos nodais como explantes. Estudos revelam que a oxidação fenólica foi limitante no estabelecimento da cultura de embriões imaturos de manga (*Mangifera indica*), recomendando-se a troca constante de meio de cultura e o uso de antioxidantes (Rodríguez, 1989). Outros estudos indicam que a manutenção das culturas no escuro por 7 a 15 dias reduz a oxidação fenólica de embriões e endosperma de andiroba (*Carapa guianensis*) (Amaral et al., 1997).

Ao final de 50 dias a contaminação endógena atingiu 92% dos explantes do tratamento 4, 64% T3, 52% T1 e 48% no T2 e T5. Segundo Erig & Schuch (2003) a contaminação fúngica foi praticamente nula, não oferecendo problemas ao estabelecimento *in vitro* de macieira, com uma média de 1,4% de contaminação até os 21 dias de cultivo. A contaminação bacteriana também não foi intensa, com exceção para a cv. Galaxy quando se utilizou como explante a gema (56% de contaminação). Estes resultados, possivelmente se devem, à manutenção das plantas-matrizes em um ambiente protegido (casa de vegetação), e as suas pulverizações semanais com fungicida e antibiótico, e reforçam a afirmativa de Montarroyos (2000) de que a condição fitossanitária da planta-matriz determina o grau de facilidade do processo de eliminação de microrganismos contaminantes existentes no explante, durante a sua introdução *in vitro*. No estabelecimento *in vitro* de cultivares de pereira (*Pyrus* spp.), (ERIG & FORTES, 2002), obtiveram contaminação por bactérias em 45,7% das gemas provenientes de plantas mantidas no campo.

Conclusão

Aos 14 dias os resultados apontam o meio MSO como o mais indicado no controle de oxidação em explantes de pitangueira, pois além da pouca oxidação apresentou maior número de brotos. Devido ao aumento da oxidação no decorrer das avaliações, talvez seja necessário a troca do meio de cultura com maior frequência. Sugere-se a manutenção da planta matriz em casa de vegetação para diminuir a contaminação endógena.

Referências

- ALVES, E.O. MOTA, J.H.; SOARES, T.S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C.B. Etnobotanical survey and medicinal plants characterization in forest fragments in Dourados-MS. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 32, n. 2, p. 651-658, mar./abr., 2008;
- Amaral, S. A.; Silva, A. T. A.; Mota, M. G. C.; Vieira, I. M. S. 1997. Uso de tratamentos como antioxidantes de explantes (embrião, endosperma) de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). In: *Seminário de Iniciação Científica da FCAP, 7.; Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 1. Resumos*. Belém: FCAP. p. 122-124.
- BEZERRA, J.E.F.; SILVA JÚNIOR, J.F. da; LEDERMAN, I.E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. (Série Frutas Nativas, 1). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 30p. ACCIOLY, F. Publicações eletrônicas [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por mfmendes@uff.br em 24 abr. 2000.
- ERIG, A.C. et al. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 9, n. 3, p.221-227, jul-set, 2003;
- FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p.
- FIÚZA, T.S.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; PIMENTA, F.C.. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves **Rev.**

Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 29, n.3, p. 245-250, 2009.

- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

- LEDERMAN, I.E.; BEZERRA, J.E.F; CALADO, G. **A pitangueira em Pernambuco**. (IPA. Documentos, 19) Recife, PE: IPA, 1992. 20 p..

- MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemans Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

- MS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Disponível em <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf >. Acesso 23 de março de 2009.

- Rodriguez, A. P. M. 1989. *Viabilidade do uso de diferentes explantes e variedades de manga (Mangifera indica L.) em cultura de tecido*. Piracicaba: ESALQ. 100pp. (Dissertação de mestrado)

- SOUZA, J.A. et al. Solificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação in vitro de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

- VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta bot. Brás.**, 20(2): 367-382.2006.

-