



## Efeito do thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)

Fernanda Pereira<sup>1</sup>, Lírío Luiz Dal Vesco<sup>2</sup>, Paulo Cesar Poeta Fermino Junior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Discente de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, Curitibanos, Santa Catarina, Brasil. <sup>2</sup>Docente da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Naturais e Sociais, Curitibanos, Santa Catarina, Brasil.

\*[paulo.fermino@ufsc.br](mailto:paulo.fermino@ufsc.br)

Recebido em: 21/02/2020 Aceito em: 22/04/2020 Publicado em: 07/05/2020

### RESUMO

A goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) é uma espécie nativa da Mata Atlântica e Pampa, com elevado potencial de uso na fruticultura. A micropropagação é uma das alternativas viáveis para a produção de mudas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ) e diferentes meios de cultura nas respostas morfogênicas da goiabeira-serrana. No primeiro experimento, segmentos nodais contendo dois nós foram retirados das plântulas e introduzidos em meio MS, suplementado com TDZ (0; 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu$ M). No segundo experimento, três formulações salinas (MS, WPM, LPm) com as mesmas concentrações de TDZ foram avaliadas. Após 30 dias as respostas morfogênicas foram avaliadas. O uso de TDZ em diferentes concentrações não altera o número de brotos regenerados, porém o número de nós por broto regenerado diminui com o aumento da concentração de TDZ. Em meio de cultura LPm os microbrotos tiveram efeito inibitório na altura dos brotos com o aumento da concentração de TDZ. O uso de 2,0  $\mu$ M de TDZ em meio de cultura LPm promoveu menor número de brotos regenerados, menor número de nós por broto e menor altura.

**Palavras-chave:** Micropropagação. Meios de cultura. Citocinina.

## Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* propagation of goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)

### ABSTRACT

Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) is a species native to the Atlantic Forest and Pampa, with high potential for use in fruticulture. Micropropagation is one of the viable alternatives for the production of seedlings. The aim of this work was to evaluate the influence of different concentrations of Thidiazuron (TDZ) and different culture media on the morphogenic responses of goiabeira-serrana. In the first experiment, nodal segments containing two nodes were removed from the seedlings and introduced in MS medium, supplemented with TDZ (0; 0.5; 1.0 and 2.0  $\mu$ M). In the second experiment, three saline formulations (MS, WPM, LPm) with the same concentrations of TDZ were evaluated. After 30 days, morphogenic responses were evaluated. The use of TDZ in different concentrations does not change the number of regenerated shoots, however the number of nodes per regenerated bud decreases with increasing TDZ concentration. In LPm culture medium, the microshoots had an inhibitory effect on the height of the sprouts with the increase in the concentration of TDZ. The use of 2.0  $\mu$ M TDZ in LPm culture medium promoted a lower number of regenerated shoots, a smaller number of nodes per shoot and a lower height.

**Keywords:** Micropropagation. Culture media. Cytokinin.

## INTRODUÇÃO

A goiabeira-serrana *Acca sellowiana* também conhecida como feijão, goiabeira-do-campo ou goiabeira-do-mato, ocorre com maior frequência nas áreas de bosque e floresta de araucárias nos estados do Paraná e Santa Catarina, e no Rio Grande do Sul, ocorre nas margens da Floresta Estacional Decidual e em Campos sulinos, em altitudes menores (CIOTTA et al., 2018). Apresenta porte reduzido, raramente ultrapassando 5 metros de altura. É predominantemente alógama, de floração tardia (outubro-novembro) quando não há mais riscos de geada e com polinização feita, em grande parte, por pássaros frutívoros que comem as pétalas da goiabeira-serrana e ficam com pólen da espécie na cabeça (DUCROQUET; HICKEL, 1997). Segundo Amarante e Santos (2011), a goiaba-serrana vem sendo estudada desde 1986 em Santa Catarina, pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (Epagri), com o objetivo de selecionar genótipos superiores que se desenvolvam em um sistema de produção de escala comercial. O interesse no estudo desta espécie se deve ao potencial organoléptico dos frutos. A exploração comercial e cultivo da goiaba-serrana é capaz de permitir a oferta à população de uma nova opção de frutos, com propriedades nutracêuticas desejáveis (AMARANTE; SANTOS, 2011).

A propagação vegetativa por estaquia apresenta baixa eficiência (DUARTE et al., 1992) e baixa taxa de enraizamento (CIOTTA et al., 2018). A enxertia também apresenta baixos índices de pega com enxertia lenhosa ou semilenhosa, onde os índices não ultrapassam 20% a 30% (CIOTTA et al., 2018). Com essas limitações, a cultura de tecidos vegetais e seus procedimentos podem ser aplicados com sucesso para a micropropagação (OLTRAMARI et al., 2000). A micropropagação por indução de embriogênese somática foi obtida com sucesso em dois genótipos de *Acca sellowiana* (GUERRA et al., 1997). Estudos preliminares de micropropagação baseados na organogênese, foram desenvolvidos a partir de explantes de meristemas e folhas jovens (BHOJWANI et al., 1987), além de meristemas caulinares e microestacas (DAL VESCO; GUERRA, 1999). Os resultados obtidos por esses autores demonstraram baixas taxas de neoformação de gemas e altos índices de contaminação e oxidação, com ambas as fontes de explantes. O uso de plântulas germinadas *in vitro* para a obtenção de explantes em meio de cultura MS com o uso de BAP e caseína hidrolisada induziram a regeneração de brotações múltiplas a partir de segmentos nodais (BHOJWANI et al., 1987). Nos estudos de Bassi e Cossio (1993) foram testadas diferentes formulações

salinas para a micropropagação de *A. sellowiana* e constataram a superioridade nos resultados, quando foi utilizado meio básico WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), isento de fitorreguladores. Oltramari et al., (2000) desenvolveram um protocolo de micropropagação de *A. sellowiana* a partir da rota organogênica, com o uso da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP).

As citocininas são hormônios que auxiliam vários processos fisiológicos nas plantas, como divisão celular, morfogênese, maturação de cloroplastos, crescimento de brotos laterais e senescência (GEORGE et al., 2008). O thidiazuron (TDZ) é uma substância sintética com atividade citocínica e vem sendo empregada como regulador de crescimento bastante eficaz na cultura de tecidos para diferentes tipos de espécies, podendo ser utilizado desde gramíneas, herbáceas até espécies lenhosas (KURUP et al., 2018).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais caulinares de plântulas de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para iniciação e estabelecimento da cultura *in vitro*, foram utilizadas sementes extraídas de frutos fisiologicamente maduros coletados de plantas matrizes de duas cultivares de *Acca sellowiana*, Helena (Registro no MAPA SCS 412) e Alcântara (Registro no MAPA SCS 411), doados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), da cidade de São Joaquim – SC.

O experimento foi realizado no laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. Para o cultivo *in vitro* e multiplicação da goiabeira-serrana, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura. Todos os processos de manipulação foram realizados em câmara de fluxo laminar horizontal e posteriormente mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e lâmpadas fluorescentes brancas ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons), com fotoperíodo de 16 h.

Para o cultivo *in vitro*, as sementes de *Acca sellowiana* foram removidas manualmente dos frutos maduros, lavadas em água corrente com detergente para a remoção da mucilagem e armazenadas em geladeira ( $9^{\circ}\text{C}$ ) por 15 dias. Para a assepsia seguiu-se o protocolo de desinfecção com imersão em álcool 70% por 2 minutos,

seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e finalmente em água destilada esterilizada, por três vezes consecutivas para a remoção das substâncias de assepsia. Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar para a germinação.

Após 90 dias da germinação, segmentos nodais contendo 2 nós caulinares foram removidos das plântulas e transferidos para meio de multiplicação. O meio de multiplicação foi composto por sais de MS (Murashige; Skoog, 1962 – SIGMA - Aldrich®) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, e ainda, suplementado com as diferentes doses de Thidiazuron (TDZ): 0 µM; 0,5 µM; 1,0 µM e 2,0 µM. Em cada frasco foram inoculados cinco explantes de *Acca sellowiana*. Os frascos de vidro foram fechados com tampa plástica convencionais (sem troca gasosa) e vedados com PVC.

Após 30 dias, os novos brotos regenerados (multiplicados) *in vitro* foram removidos na base com auxílio de bisturi e subcultivados (2° subcultivo), mantendo as respectivas concentrações de TDZ das condições do 1° cultivo. Os parâmetros avaliados no subcultivo 1 e 2 foram: percentual de resposta morfogênica, número de brotos, número de nós por brotos, e altura de brotos (cm).

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 (quatro concentrações de TDZ e 2 subcultivos sucessivos) com 3 repetições, sendo utilizados 5 explantes por parcela.

Para os experimentos do efeito dos meios de cultura, sementes de *A. sellowiana* cv. Alcântara foram retiradas manualmente dos frutos maduros e posteriormente passaram por assepsia conforme descrito no item 3.3. Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar para a germinação. Após 98 dias, foram extraídas as raízes das plântulas e os brotos foram inseridos novamente em meio MS (Murashige; Skoog, 1962 – SIGMA - Aldrich®). Passados 53 dias, segmentos nodais contendo de 2 nós caulinares foram removidos das plântulas e transferidos para meio de multiplicação. O meio de multiplicação foi composto por sais de MS (Murashige; Skoog, 1962), sais de WPM (Lloyd; McCown, 1980) e LPm (Von Arnold; Erikson, 1981), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar, 5 ml L<sup>-1</sup> de vitaminas de Morel (Morel; Wetmore, 1951) e as diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ): 0 µM; 0,5 µM;

1,0  $\mu\text{M}$  e 2,0  $\mu\text{M}$ . Os frascos de vidro foram fechados com tampa plástica convencional (sem troca gasosa) e ainda foram vedados com PVC. Após 30 dias, os novos brotos regenerados foram avaliados quanto a: percentual de resposta morfogênica, número de brotos, número de nós por broto, e altura de brotos (cm).

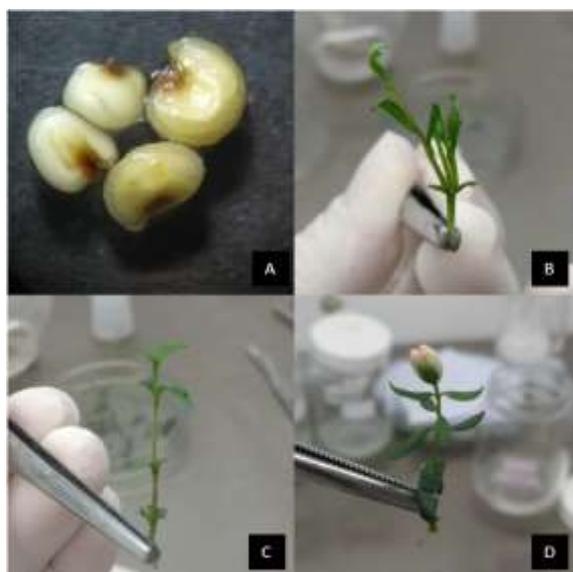
O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 3 (quatro concentrações de TDZ e 3 formulações salinas de meio de cultivo) com 3 repetições, sendo utilizados 5 explantes por parcela.

Os dados obtidos em cada parâmetro foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para os fatores qualitativos foi utilizado o teste SNK ao nível de 5% de probabilidade, e para os fatores quantitativos foi empregada a análise de regressão. A análise estatística foi realizada através do software estatístico R Core Team (2017).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de brotos adventícios ocorreu em todas as concentrações utilizadas de TDZ (Figura 1), inclusive na sua ausência. O percentual de respostas morfogênicas, o número de brotos regenerados, e a altura dos brotos não foram significativos para o efeito das concentrações de TDZ (Figura 2A, B, D) e para a interação dos fatores concentrações e subcultivos. O número de nós por broto regenerado foi significativo para o efeito das concentrações de TDZ (Figura 2C). Em todos os parâmetros, o efeito dos subcultivos foram estatisticamente significativos.

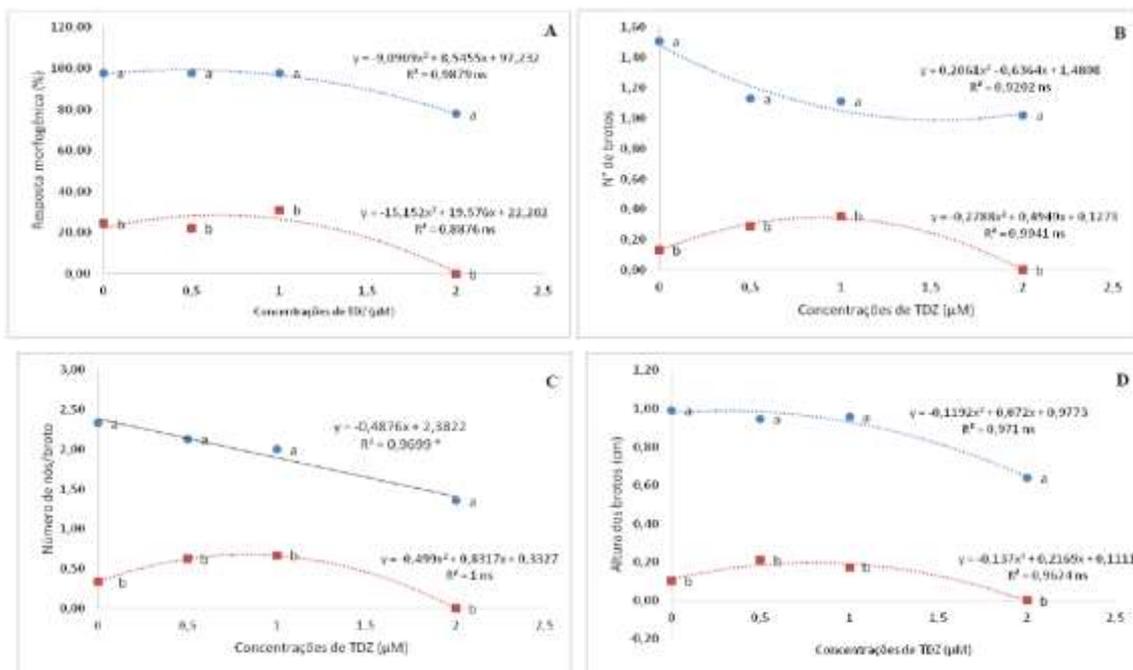
**Figura 1** - Multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret a partir de segmentos nodais. (A) Sementes desinfestadas utilizadas na germinação *in vitro*; (B) broto formado no 1º cultivo; (C) broto formado no 2º subcultivo; e (D) flor formada anteriormente ao cultivo suplementado com TDZ (aparente apenas em cv. Alcântara).



As diferentes concentrações de TDZ não promoveram diferenças significativas no percentual de respostas morfogênicas, no número de brotos regenerados e na altura dos brotos. Com relação ao número de nós por broto o aumento das concentrações de TDZ promoveu efeito inibitório no primeiro subcultivo (Figura 2C), expresso por equação de regressão linear com coeficiente de determinação  $r^2$  de 0,96.

Na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata* (GOLLE *et al.*, 2017), o maior número médio de brotações ocorreu na ausência de TDZ. O maior número de brotações por explante e o número médio de gemas adventícias é observado com o uso combinado de 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA e 32  $\mu\text{M}$  de TDZ. O TDZ também não causou hiperhidricidade nas plântulas.

**Figura 2** - Respostas morfofisiológicas na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret sob efeito de diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). **A.** Percentual de respostas morfogênicas; **B.** Número de brotos regenerados; **C.** Número de nós/broto regenerado; **D.** Altura dos brotos regenerados (cm). Legendas: ns = não significativo a 5% de probabilidade; subcultivo 1; subcultivo 2. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas a 5% de probabilidade na comparação entre subcultivo 1 e 2 para cada concentração de TDZ



Ainda sobre as concentrações de TDZ, Oliveira (2016) quando utilizou TDZ nas mesmas concentrações de BAP (0,25; 0,5; 0,75 e 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) para micropropagação de *Eremanthus incanus* (Less.) Less., em dois subcultivos, os explantes apresentaram menores números de brotações, indicando que o TDZ ao contrário de estimular pode ter inibido a produção de brotações. Supõe-se que a diminuição das brotações do primeiro

para o segundo subcultivo está relacionada ao fato das citocininas possuírem grande efeito residual, assim como, a grande produção de calos principalmente para o TDZ podendo indicar toxidez, além de que a autora conclui que a citocinina mais indicada para multiplicação seria o BAP. Na micropropagação de crisântemo o TDZ não estimulou significativamente a produção de brotos a partir dos explantes *in vitro* (SALGADO et al., 2001).

Na propagação *in vitro* de *Campomanesia rufa* (SANT'ANA et al., 2018), forma testados diferentes tipos e concentrações de citocininas para indução das brotações, sendo usados o BAP, BA ou TDZ nas concentrações 0; 2,25; 4,5 e 9,0  $\mu\text{M}$ . O uso de BAP proporcionou maiores taxas de brotações, com maior formação na concentração 4,5  $\mu\text{M}$  sem se diferir estatisticamente da concentração 9,0  $\mu\text{M}$ . Também foram avaliados os explantes ao longo do tempo (30, 60 e 90 dias), mostrando que BAP foi o único que demonstrou diferença ao longo dos dias, tendo a maior taxa de brotações aos 90 dias. Para as outras fontes de citocininas, a diminuição do comprimento das brotações e no número de gemas, demonstram que pode haver uma possível fitotoxicidade das fontes de BA e TDZ.

Em todas as concentrações de TDZ utilizadas em *A. sellowiana* para todos os parâmetros avaliados a comparação entre o subcultivo 1 e o subcultivo 2 tiveram diferenças significativas, sendo os resultados no subcultivo 2 inferiores ao subcultivo 1 (Figura 2). Semelhante a isso, em frutíferas contemporâneas, em todos os genótipos estudados foram observados que ao início do estudo a taxa de multiplicação estava no máximo e após o segundo subcultivo declinou, mostrando que o potencial morfológico dos tecidos diminuiu gradualmente conforme foram subcultivados (VUJOVIĆ; RUŽIĆ; CERVIĆ, 2012).

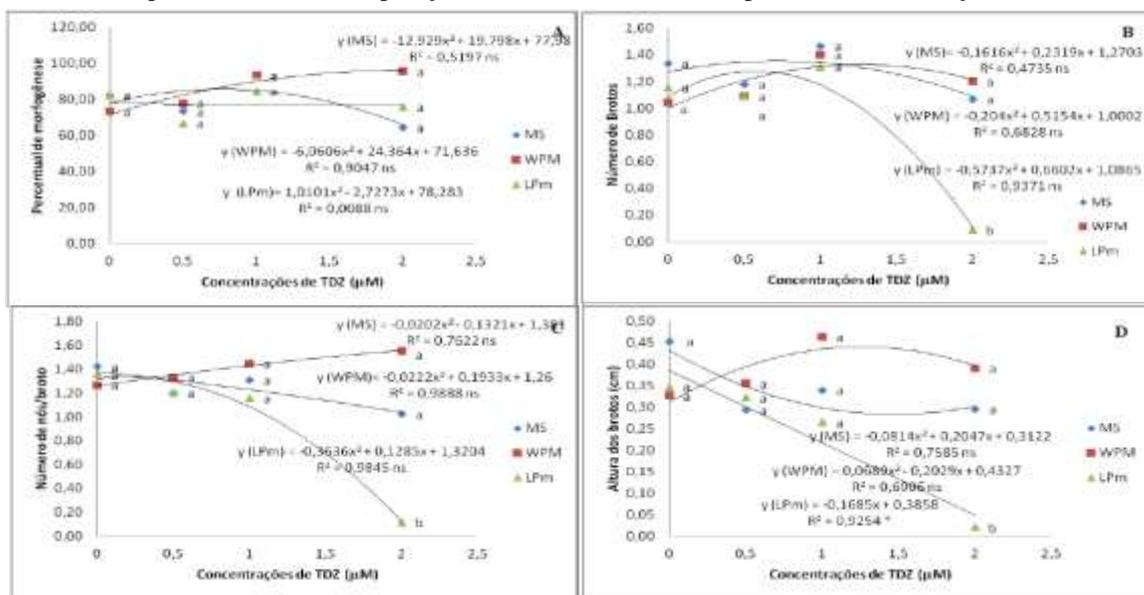
Uma das hipóteses para o declínio das brotações pode ser devido ao efeito residual do hormônio utilizado. Segundo Hussain et al. (2007), a redução na formação das brotações de *Sterculia urens* Roxb. pode melhorar com a redução da concentração da citocinina TDZ, favorecendo a produção contínua de brotações. Em ensaios com amoreira-preta (VILLA et al., 2006), os autores citam que apesar da utilização de citocinina ser essencial para multiplicação dos brotos, o excesso pode ser tóxico e algumas características observadas são: falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós.

De acordo com Mankessi et al. (2009), as plantas ao ficarem expostas excessivamente aos regimes de subcultivos de longo prazo, com componentes inadequados dos meios, podem resultar na elevação das concentrações ideais de certas substâncias no interior dos tecidos vegetais, refletindo no desempenho da cultura como na obtenção de baixas taxas de multiplicação.

Segundo Huetteman e Preece (1993), as concentrações de TDZ eficazes são de 10 a 1000 vezes menores do que outros reguladores de crescimento de plantas. Os autores também descobriram que, em alguns casos, o cultivo em duas etapas, que consiste em um meio primário contendo TDZ para induzir a proliferação de brotações seguida por um meio secundário com concentrações menores de TDZ ou outros fitorreguladores para promover o desenvolvimento das brotações, pode ser muito eficaz. No geral, concentrações mais baixas de TDZ (inferiores a 1  $\mu\text{M}$ ) têm a capacidade de induzir maiores taxas de brotações, e em concentrações mais altas, pode levar a formação de calos.

O percentual de resposta morfogênica, o número de brotos regenerados e o número de nós por broto não foram significativos para o efeito das concentrações de TDZ, para os tipos de meio de cultura (Figura 3A, B, C) e para a interação entre os fatores. A altura dos brotações foi significativa para o efeito dos tipos de meio de cultura (Figura 3D).

**Figura 3** - Respostas morfofisiológicas na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em diferentes meios de cultura sob efeito de diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). **A.** Percentual de respostas morfogênicas; **B.** Número de brotos regenerados; **C.** Número de nós/broto regenerado; **D.** Altura dos brotos regenerados (cm). Legenda: ns= não significativo a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas a 5% de probabilidade na comparação entre os meios de cultura para cada concentração de TDZ.



O uso do meio de cultura LPm com concentrações crescentes de TDZ promoveu redução na altura dos brotos regenerados (Figura 3D), expresso por ajuste de equação de regressão linear com coeficiente de determinação  $r^2$  de 0,92. Segundo Goelzer et al. (2019), na micropropagação de guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) foram testadas concentrações de TDZ (5  $\mu\text{M}$ ), ANA (1  $\mu\text{M}$ ) e a combinação dos dois fitorreguladores em meio MS, encontrando que o meio suplementado com TDZ apresentou brotações de maiores alturas, e ainda, promoveu aumento no número de folhas e da taxa de multiplicação.

Similar a isto, na micropropagação de *Cedrela fissilis* (AMARAL, 2006), foram utilizados duas formulações salinas (WPM e MS) combinadas com as citocininas BAP e CIN concentradas a 5  $\mu\text{M L}^{-1}$ , sendo BAP (5  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) a citocinina que apresentou melhor média para número de brotos em relação a CIN na mesma concentração ou na ausência destas. Para os meios de cultura não houve diferença significativa nem mesmo interação entre os meios e efeito das citocininas.

Amaral (2006) ainda explica a inter-relação entre os sais inorgânicos presentes no meio de cultura e os fitorreguladores adicionados, que em parte, podem explicar as diferenças na capacidade de multiplicação de brotações na goiabeira-serrana. A maioria das formulações salinas incorporam ambos sais de nitrato e amônio como fonte de nitrogênio para o crescimento, onde a forma e a concentração de nitrogênio influenciam significativamente na síntese de citocininas endógenas.

Para Fracaro e Echeverrigaray (2011), o meio MS é superior aos outros por apresentar maiores concentrações de nitrogênio em sua formulação. Dal Vesco e Guerra (1999) citam que o meio WPM pode ser superior pelo fato de ser uma solução salina específica para plantas lenhosas assim como a goiabeira-serrana.

O percentual de morfogênese não apresentou diferenças significativas entre os tipos de meio de cultura em todas as concentrações avaliadas (Figura 3A). O número de brotos regenerados, o número de nós por broto e a altura dos brotos não apresentaram diferenças significativas com a utilização das concentrações 0; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  comparando se os meios MS, WPM e LPm. Na concentração de 2,0  $\mu\text{M}$  o meio LPm apresentou o menor número de brotos regenerados (Figura 3B), o menor número de nós por broto (Figura 3C) e a menor altura dos brotos (Figura 3D).

De acordo com Jesus et al. (2002), no cultivo *in vitro* de café arábica, em meio de cultura MS sem suplemento de BAP e posteriormente subcultivados em meio MS

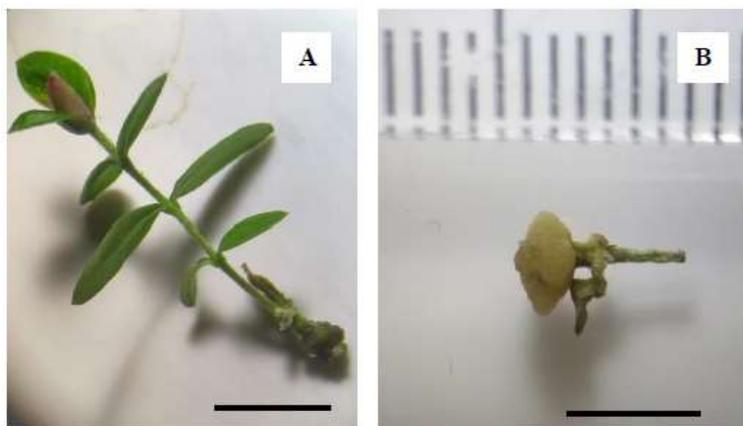
suplementado com TDZ, não houve incremento em nenhuma das variáveis avaliadas, sem diferença entre os tratamentos. Os autores ainda citam que o TDZ vem apresentando resultados superiores em relação a outras citocininas, na indução e multiplicação de diversas espécies. Contudo, algumas anormalidades vêm ocorrendo associadas ao seu uso na cultura de tecidos, como brotos menores e menos vigorosos.

Para George et al. (2008) não há formulação salina padrão para a utilização *in vitro*, contudo o meio MS, com suas modificações e diluições, vem sendo utilizado com sucesso para diversas culturas. Também ressalta que o sucesso do processo de micropropagação da planta é altamente influenciado pela natureza da formulação salina utilizada.

Dal Vesco e Guerra (1999) concluíram que o meio MS suplementado com TDZ em concentração de 4,5  $\mu\text{M}$  estimulou a proliferação de gemas múltiplas em *Acca sellowiana* (acesso 159), mas as taxas mais elevadas de multiplicação e o maior vigor das brotações (acesso 53B-7) foram obtidos com o meio WPM na ausência de fitorreguladores, na cultura de segmentos nodais. Ainda demonstraram que as respostas morfológicas são dependentes dos genótipos.

No presente estudo com *A. sellowiana* cv. Alcântara foi observado a formação de flores, mesmo após o subcultivo e manifestou-se em todos os meios de cultura e nas diferentes concentrações de TDZ (Figura 4A).

**Figura 4** - Microbrotos de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro*. A. Florescimento da cultivar Alcântara apresentada em todos os meios de cultura (MS, WPM, LPm) e em diferentes concentrações de TDZ. B. Formação de calo na base dos segmentos nodais. Barras= 0,5 cm.



A formação de calos na base dos segmentos nodais foi verificada em explantes no meio de cultura LPm suplementado com TDZ a uma concentração de 2,0  $\mu$ M em todas as repetições, sem desenvolvimento de parte aérea (Figura 4B). Cangahuala-Inocente *et al.* (2007), utilizando explantes com tecidos florais de *Acca sellowiana* em meio LPm com 2,4-D e Dicamba obtiveram culturas embriogénicas e não embriogénicas com formação de calo. Para Pimenta-de-macaco (PORFIRIO *et al.*, 2019) a porcentagem de calos foi superior nos tratamentos que continham o meio MS, não comprometendo a formação de brotos. Concentrações mais altas de citocinina podem promover a formação de calos, não sendo o objetivo na fase de multiplicação, pois interferem completamente no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização das plântulas.

Para Cordeiro *et al.* (2014), as citocininas são indispensáveis para quebrar a dominância apical e induzir a proliferação de gemas axilares, bem como a sua combinação com as auxinas são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*, sendo também afetada de maneira diferenciada pelos meios de cultura.

## CONCLUSÃO

O uso do Thidiazuron (TDZ) não altera o número de brotos regenerados, porém o número de nós por broto regenerado diminui com o aumento da concentração de TDZ.

O segundo subcultivo sucessivo promoveu menor percentual de resposta morfogênica do explante, número de brotos regenerados, número de nós por broto e altura dos brotos em todas as concentrações de TDZ avaliadas.

Em meio de cultura LPm os microbrotos regenerados tiveram efeito inibitório na altura dos brotos com o aumento da concentração de TDZ.

O uso de 2,0  $\mu$ M de TDZ em meio de cultura LPm promoveu menor número de brotos regenerados, menor número de nós por broto e menor altura dos brotos do que em meio MS e WPM.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 44 f. Dissertação (Mestrado EM Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

AMARANTE, C. V. T.; SANTOS, K. L. Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 34-46, 2011.

BASSI, G., COSSIO, F. Risultati di ricerche sulla micropropagazione della feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). **L'informatore Agrario**, v. 569, n. 3, p. 79-80, 1993.

BHOJWANI, S.S., MULLINS, K., COHEN D. Micropropagation of *Feijoa sellowiana* Berg. **Acta Horticulturae**, v. 212, n. 3, p. 69-76, 1987.

CIOTTA, M. N.; ARIOLI, C. J.; PINTO, F. A. M. F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. 216 p.

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

DAL VESCO, L. L., GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 1, p. 60-64, 1999.

DUARTE, O. R.; FACHINELLO, J. C.; SANTOS FILHO, B.G. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 513-516, 1992.

DUCROQUET, J.P.H.J., HICKEL, E.R. Birds as pollinators of feijoa (*Acca sellowiana* Berg). **Acta Horticulturae**, v. 452, n. 1, p. 37-40, 1997.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galoides*, a popular medicinal plant of South Brazil. **Plant Cell Research**, v. 64, n. 1, p. 1-4, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Springer, 2008. 501 p.

GOLZER, A.; DÉO, T. G.; LOPES, G. B.; DAMIANI, C. R. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Braz. Ap. Sci. Rev.**, Curitiba, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.

GUERRA, M.P., PESCADOR R., DAL VESCO, L. L., *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. **Acta Horticulturae**, v. 452, n. 1, p. 27-35, 1997.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.

HUSSAIN, T. M.; CHANDRASEKHAR, T.; GOPAL, G. R. High frequency shoot regeneration on *Sterculia urens* Roxb. An endangered tree species through cotyledonary node cultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 1643-1649. 2007.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M.; DUTRA, L. F. Micropropagação do cafeeiro com concentrações de BAP em meio de pré-cultivo e de BAP e TDZ em meio de subcultivo. **Revista Ceres**, v. 49, n. 283, p. 253-263, 2002.

KURUP, S.S; PURAYIL, F.T.; ALKHAILI, M.M.S.; TAWFIK, N.H.; CHERUTH, A.J.; KABSHAWI, M.; SUBRAMANIAM, S. Thidiazuron (TDZ) induced organogenesis and clonal fidelity studies in *Haloxylon persicum* (Bunge ex Boiss & Buhse): an endangered desert tree species. **Physiological and Molecular Biology of Plants**, v.24, n. 3, p. 683-692. 2018.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-327, 1980.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. In vitro rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, v. 23, n. 5, p. 931-940, 2009.

MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, n. 38, p. 141-143, 1951.

OLIVEIRA, R. N. **Propagação *in vitro* e controle de hiperidricidade em candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**. 2016. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

OLTRAMARI, A. C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTI, E. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 61-68, 2000.

PORFIRIO, K. P.; TITON, M.; CASTRO, A. C. M.; PEREIRA, I. M.; KNEGT, R. A. P. Multiplicação *in vitro* de *Xylopiá aromática* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2019.

SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, p. 274-280, 2001.

SANT'ANA, C. R. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; SILVA, D. P. C.; SILVA, L. C. In vitro propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 372-380, 2018.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'cherokee': Efeito de meios de cultura, cinetina e GA3. **Ceres**, v. 36, n. 3, p. 357-362, 2006.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 870-874, 1981.

VUJOVIĆ, T.; RUŽIĆ, Dj.; CEROVIĆ, R. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. **Horticulturae Science**, v. 39, n. 3, p. 101-107, 2012.

..