

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA,
PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO – PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E MOLECULAR,
ANÁLISE DE IMAGENS RADIOGRÁFICAS EM
SEMENTES E TOXIDAZ DO ALUMÍNIO NO
CRESCIMENTO RADICULAR DE *Campomanesia*
(MYRTACEAE)**

Autor: Ma. Érica Virgínia Estêfane de Jesus Amaral
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana de Fátima Sales

RIO VERDE - GO
agosto – 2016

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA,
PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO – PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E MOLECULAR,
ANÁLISE DE IMAGENS RADIOGRÁFICAS EM
SEMENTES E TOXIDEZ DO ALUMÍNIO NO
CRESCIMENTO RADICULAR DE *Campomanesia*
(MYRTACEAE)**

Autor: Ma. Érica Virgínia Estêfane de Jesus Amaral
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana de Fátima Sales

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação – *Stricto sensu* em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde – Área de concentração “Produção Vegetal Sustentável no Cerrado”.

RIO VERDE - GO
agosto – 2016

Amaral, Érica Virgínia Estêfane de Jesus

Cutter: A485c Caracterização palinológica e molecular, análise de imagens radiográficas em sementes e toxidez do alumínio no crescimento radicular de *Campomanesia* (Myrtaceae) / Érica Virgínia Estêfane de Jesus Amaral. Rio Verde. – 2016.

81 f.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde,
2016.

Orientador: Dra. Juliana de Fátima Sales.

Bibliografia

1. Palinologia. 2. Raios X. 3. Alumínio. I. Título. II Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD: 635

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E MOLECULAR,
ANÁLISE DE IMAGENS RADIOGRÁFICAS EM
SEMENTES E FITOTOXIDEZ DO ALUMÍNIO NO
CRESCIMENTO RADICULAR DE *Campomanesia*
(Myrtaceae)**

Autora: Érica Virgínia Estêfane de Jesus Amaral
Orientadora: Prof^ª. Dra. Juliana de Fátima Sales

TITULAÇÃO: Doutor(a) em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 30 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis
Avaliador externo
UEG – Câmpus Jataí

Prof. Dr. Christiano Peres Coelho
Avaliador externo
UEG – Câmpus Jataí

Prof. Dr. Jacson Zuchi
Avaliador externo
IF Goiano – Câmpus Rio Verde

Prof. Dr. Aurélio Rúbio Neto
Avaliador externo
IF Goiano – Câmpus Rio Verde

Prof^ª. Dra. Juliana de Fátima Sales
Presidente da banca
IF Goiano – Câmpus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem para ir, sempre em busca dos objetivos e nunca olhar as dificuldades do caminho. Pela graça de conseguir pegar as pedras do caminho e construir a fortaleza que me envolve. Por sempre me motivar, e, saber que nada acontece na nossa vida por acaso, que em todas as dificuldades sempre existe algo que nos motiva a correr atrás do melhor.

A minha família que me motiva, me entende e me auxilia em todas as dificuldades encontradas. À minha filha que chegou para transformar essa batalha em algo encorajador e mais alegre, trouxe luz para todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí pela liberação e apoio a todas as atividades do doutorado. Ao Herbário Jataiense, nas pessoas dos professores Luzia Francisca de Souza, Christiano Peres Coelho e Frederico Augusto Guimarães Guilherme, pela compreensão e apoio em todos os momentos necessários.

À minha orientadora, professora Juliana de Fátima Sales, pela confiança em aceitar uma aluna de outra cidade, com trabalho e grávida e, por me apoiar e me defender, sempre disposta a ajudar.

Ao meu coorientador, professor Edésio Fialho dos Reis, pelo auxílio e disponibilidade com o material vegetal e mão de obra de seus funcionários. Agradeço também ao seu funcionário, Gilmar Amaral Emidio, meu pai, que sempre me ajuda em todas as etapas da minha vida, profissional e pessoal.

Ao técnico do Laboratório de Recursos Genéticos da UFG-REJ e amigo, Jefferson Fernando Naves Pinto, pela disponibilidade e auxílio em todas as análises requisitadas.

Aos doutores Jacson Zuchi, Gessimar Nunes Camelo e José Maria Gomes Neves pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos e na correção dos artigos.

Às amigas, sempre presentes e dando força, em especial à Karine Feliciano Barbosa e Lilia Cristina pela disponibilidade e ajuda sempre! Sem vocês tudo ficaria mais difícil.

À todos que de alguma forma acreditaram e contribuíram para que esse sonho virasse realidade, o meu muito obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Érica Virgínia Estêfane de Jesus Amaral, filha de Maria de Lourdes de Jesus Amaral e Gilmar Amaral Emidio, nasceu na cidade de Jussara, Goiás, em 09 de fevereiro de 1984. Em março de 2003 iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, graduando-se em março de 2007.

Nos anos de 2009 e 2010 fez pós-graduação *latu sensu* em Educação e Gestão Ambiental, e entre os anos de 2010 e 2011 cursou pós-graduação *stricto sensu*, nível Mestrado, em Agronomia ambos pela Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, onde é servidora do quadro efetivo, desde o ano de 2008, atuando como técnica do Laboratório de Botânica, Herbário.

Em 2013 ingressou no programa de pós-graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, em nível de Doutorado, passando pelo exame de qualificação em julho de 2015 e submetendo-se a defesa em agosto de 2016.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	xiv
ABSTRAT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Gabirobeiras.....	2
1.2. Ferramentas taxonômicas.....	4
1.3. Germinação de sementes.....	6
1.4. Fitotoxidez do alumínio.....	8
1.5. Referências bibliográficas.....	10
2. OBJETIVOS.....	17
3. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E USO DE MARCADOR ISSR EM <i>Campomanesia</i> (Myrtaceae).....	18
RESUMO.....	18
ABSTRAT.....	19
3.1. INTRODUÇÃO.....	20
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.1. Viabilidade polínica e receptividade estigmática.....	21
3.2.2. Caracterização morfológica dos grãos de pólen.....	22
3.2.3. Caracterização molecular.....	23
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.3.1. Viabilidade polínica e receptividade estigmática.....	24
3.3.2. Caracterização morfológica dos grãos de pólen.....	25

3.3.3. Caracterização molecular.....	30
3.4. CONCLUSÕES.....	33
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
4. CAPÍTULO II – ANÁLISE DE IMAGENS RADIOGRÁFICAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Campomanesia pubescens</i> (Mart. ex DC.) O.Berg (MYRTACEAE) COM DIFERENTES TEORES DE ÁGUA.....	37
RESUMO.....	37
ABSTRAT.....	38
4.1. INTRODUÇÃO.....	39
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.4. CONCLUSÕES.....	46
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
5. CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ESTRUTURA ANATÔMICA RADICULAR DE <i>Campomanesia pubescens</i> (Mart. ex DC.) O.Berg (MYRTACEAE) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO.....	49
RESUMO.....	49
ABSTRAT.....	50
5.1. INTRODUÇÃO.....	51
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.2.1. Avaliação do crescimento radicular em solução nutritiva simples e completa.....	52
5.2.2. Efeito do alumínio na anatomia dos ápices radiculares das plântulas de <i>Campomanesia pubescens</i> crescidas em solução nutritiva simples e completa.....	54
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.3.1. Avaliação do crescimento radicular em solução nutritiva simples e completa.....	55
5.3.2. Efeito do alumínio na anatomia dos ápices radiculares das plântulas de <i>Campomanesia pubescens</i> crescidas em solução nutritiva simples e completa.....	58
5.4. CONCLUSÕES.....	60
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
6. CONCLUSÃO GERAL.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. INTRODUÇÃO	
Tabela 1. Trabalhos publicados com a utilização do teste de raios X.....	8
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Descrição dos Primers ISSR, com seus respectivos números de Amplificações Polimoficas (AP), Amplificações Monomorficas (AM), Amplificações Totais (AT) e a porcentagem de Amplificações Porlimorficas (%AP) utilizados para análise molecular da espécie <i>Campomanesia adamantium</i> e para os morfotipos de <i>Campomanesia pubescens</i>	31
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Porcentagem de sementes (%S) e Porcentagem de germinação (%G) em sementes de <i>Campomanesia pubescens</i> (Myrtaceae) submetidas ao teste de raios X e classificadas dentro de classes nos diferentes teores de água das sementes. Sementes cheias (A); Sementes mal formadas (B); Sementes danificadas (C); e Sementes vazias (D).....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. INTRODUÇÃO	
Figura 1. <i>Campomanesia pubescens</i> . A. Arbusto; B. Flores.....	3
CAPÍTULO I	
Figura 1. Grãos de pólen de espécies de <i>Campomanesia</i> fotomicrografados em microscópio ótico, objetiva 100x. A. Vista polar; B. Vista equatorial.....	23
Figura 2. Morfologia dos grãos de pólen em microscopia eletrônica de varredura. A. <i>Campomanesia adamantium</i> ; B. <i>Campomanesia pubescens</i> morfotipo 1; C. <i>Campomanesia pubescens</i> morfotipo 2; D. <i>Campomanesia pubescens</i> morfotipo 3....	27
Figura 3. Comparação de médias da morfometria dos grãos de pólen de espécies de <i>Campomanesia</i> . A. Comprimento em vista Polar; B. Largura em vista Polar. C. Comprimento em vista Equatorial; D. Largura em vista Equatorial; Sendo: 1 = <i>Campomanesia adamantium</i> ; 2 = <i>Campomanesia pubescens</i> 1; 3 = <i>Campomanesia pubescens</i> 2; 4 = <i>Campomanesia pubescens</i> 3.....	28
Figura 4. Gráfico de dispersão com valores de morfometria dos grãos de pólen, em duas dimensões, da espécie <i>Campomanesia adamantium</i> com os morfotipos da espécie <i>Campomanesia pubescens</i>	29
Figura 5. Padrão de amplificação de três primers ISSR. Sendo: 1. <i>Campomanesia adamantium</i> ; 2. <i>Campomanesia pubescens</i> 1; 3. <i>Campomanesia pubescens</i> 2; 4. <i>Campomanesia pubescens</i> 3.....	31
Figura 6. Dendrograma obtido com base na matriz de dissimilaridade gerada a partir de 115 amplificações polimórficas para a espécie <i>Campomanesia adamantium</i> e os três morfotipos de <i>Campomanesia pubescens</i> . Linha pontilhada vertical: ponto de	32

corte no dendrograma.....	
CAPÍTULO II	
Figura 1. Classes de sementes de <i>Campomanesia pubescens</i> (Myrtaceae), obtidas por análise de imagens radiográficas. Sementes cheias (A); Sementes mal formadas (B); Sementes danificadas (C); e Sementes vazias (D).....	42
Figura 2. Análise de regressão da germinação de sementes de <i>Campomanesia pubescens</i> classificadas como cheias e mal formadas.....	45
CAPÍTULO III	
Figura 1. Germinação e instalação do sistema hidropônico para avaliação dos efeitos do alumínio em solução nutritiva nas raízes das plântulas de gabirobeira (<i>Campomanesia pubescens</i>). A. Crescimento das plântulas de gabirobeira; B. Vasos com as plântulas fixadas com algodão; C. Raízes das plântulas de gabirobeira; E. Sistema hidropônico instalado.....	53
Figura 2. Taxa de crescimento radicular de plântulas de gabirobeira (<i>Campomanesia pubescens</i>), crescidas em cultivo hidropônico, com diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva simples e completa.....	55
Figura 3. Elongação radicular relativa (ERR%) das raízes de plântulas de gabirobeira (<i>Campomanesia pubescens</i>), crescidas em cultivo hidropônico, com diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva simples e completa.....	57
Figura 4. Micrografias de fluorescência de cortes transversais de raízes de plântulas de gabirobeira (<i>Campomanesia pubescens</i>), tratadas com fluorocromo morin após terem sido mantidas em solução nutritiva com diferentes concentrações de alumínio. Fotos à esquerda são de plantas cultivadas em solução nutritiva simples e, fotos à direita são de plantas cultivadas em solução nutritiva completa. A fluorescência verde do morin-Al indica a presença de alumínio nos tecidos dos diferentes tratamentos, sendo: A e B – Sem Al; C e D – dose de 150 µM de Al; E e F – dose de 300 µM de Al; G e H – dose de 600 µM de Al; I e J – dose de 1200 µM de Al. En: endoderme; Fl: floema; Pa: parênquima. Setas: figuras C a F detalhe da área marcada com a fluorescência verde do morin-Al; figuras G a J detalhe da desorganização celular.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

REJ.....	Regional Jataí
UFG.....	Universidade Federal de Goiás
UFLA.....	Universidade Federal de Lavras
LAS EZ.....	Leica Application Suite
CD.....	Compact Disc
DVD.....	Digital Versatile Disc
°C.....	Graus Celsius
%.....	Porcentagem
±.....	Mais ou Menos
Nº.....	Número
MO.....	Microscópio óptico
P.....	Grãos de pólen em vista Polar
E.....	Grãos de pólen em vista Equatorial
P/E.....	Razão do maior eixo polar dividido pelo maior eixo equatorial
\bar{X}	Média aritmética
$s\bar{X}$	Desvio padrão da média
µm.....	Micrômetro
µL.....	Microlitro
µM.....	Micromolar
G.....	Gramma
Mg.....	Miligramma
ng.....	nanograma
mL.....	Mililitro
ppm.....	Partes por milhão
KV.....	Quilovolt
UV.....	Ultra Violeta
M.....	Molar
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
ISSR.....	Inter-Simple Sequence Repeat
dNTPS.....	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Mm.....	Nanomol
BSA.....	Soro Albumina Bovina
Tm.....	Temperatura de Melting
AP.....	Amplificações Polimoficas

AM.....	Amplificações Monomorfas
AT.....	Amplificações Totais
% AP.....	Porcentagem de Amplificações Porlimorfas
b.u.....	Base úmida
B.O.D.....	Biochemical Oxygen Demand
Pf.....	Massa final da amostra
Pi.....	Massa inicial da amostra
Tai.....	Teor de água inicial das sementes
TAf.....	Teor de água desejado nas sementes
TCR.....	Taxa de crescimento radicular
Cf.....	Comprimento radicular final
Ci.....	Comprimento radicular inicial
ERR.....	Elongação radicular relativa
CiAl _x	Comprimento radicular inicial medido antes da exposição ao Al
CfAl _x	Comprimento radicular final medido após a exposição ao Al
CiAl ₀	Comprimento radicular inicial antes da exposição à solução sem Al
CfAl ₀	Comprimento radicular final após a exposição à solução sem Al
P.....	Fósforo
K.....	Potássio
Ca.....	Cálcio
Mg.....	Magnésio
Mo.....	Molibdênio
Mn.....	Manganês
Zn.....	Zinco
Al.....	Alumínio
N.....	Nitrogênio
Cu.....	Cobre
Co.....	Cobalto
Fe.....	Ferro
N.....	Nitrogênio
S.....	Enxofre
H ₂ O.....	Água
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NH ₄ OH.....	Hidróxido de amônio
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	Cloreto de Cálcio Bihidratado
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O.....	Sulfato de alumínio Octadecahidratado
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amônia
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
K ₂ SO ₄	Sulfato de Potássio
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....	Fosfato de Sódio Monobásico Bihidratado
MnSO ₄ .H ₂ O.....	Sulfato de Manganês Monohidratado
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
MoO ₃	Trióxido de Molibdênio
CoSO ₄ .7H ₂ O.....	Sulfato de Cobalto Heptahidratado
HCl.....	Ácido clorídrico
NaOH.....	Hidróxido de Sódio
EDTA.....	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
pH.....	Potencial Hidrogênio

RESUMO

AMARAL, ERICA VIRGÍNIA ESTÊFANE DE JESUS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2016. **Caracterização palinológica e molecular, análise de imagens radiográficas em sementes e toxidez do alumínio no crescimento radicular de *Campomanesia* (Myrtaceae).** Orientadora: Juliana de Fátima Sales, Coorientadores: Edésio Fialho dos Reis, Michellia Pereira Soares.

O gênero *Campomanesia* tem espécies com potencial para cultivo comercial, porém são de difícil identificação, sendo muitas vezes confundidas com a existência de grupos com características morfológicas distintas dentro de uma mesma espécie. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos da espécie *Campomanesia pubescens* através de avaliações palinológicas e com o uso de marcador molecular, para auxiliar a descrição taxonômica da espécie; avaliar a morfologia interna de sementes de *Campomanesia pubescens*, com diferentes teores de água, por meio da análise de imagens de raios X, e sua germinação; e avaliar o crescimento e a estrutura anatômica radicular de *Campomanesia pubescens* sob diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva simples e completa. As avaliações palinológicas e moleculares foram feitas na Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, no Laboratório de Morfologia e Taxonomia Vegetal e no Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas, com material vegetal colhido no campo experimental da mesma instituição, e as análises de microscopia eletrônica de varredura dos grãos de pólen foram feitas na Universidade Federal de Lavras, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural. As análises de imagens radiográficas foram feitas na Universidade Federal de Lavras, no Laboratório de Análise de Sementes, e o teste de germinação foi feito no Laboratório de Sementes do Instituto

Federal Goiano, Campus Rio Verde. As avaliações da toxidez do alumínio no crescimento radicular de *Campomanesia* foram feitas na Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, no Laboratório de Melhoramento de Plantas. Foram encontradas informações importantes que reforçam a possibilidade de cruzamento entre *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, gerando morfotipos intermediários, indicando um possível processo de hibridação. As duas espécies são simpátricas, florescem e suas flores ficam viáveis simultaneamente, não existindo barreira temporal para cruzamento entre elas. As análises da morfologia dos grãos de pólen em microscopia eletrônica de varredura não apresentaram diferenças entre a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos de *Campomanesia pubescens*, e as análises da morfometria dos grãos de pólen indicaram que todos apresentam o mesmo padrão de tamanho, o que facilita o cruzamento. A utilização dos 13 primers ISSR foi uma ferramenta eficaz no auxílio da identificação destas espécies e indicam agrupamento entre elas. Concluiu-se que *Campomanesia adamantium* está mais distante do morfotipo 2 de *Campomanesia pubescens* e os morfotipos 1 e 3 são intermediários entre eles, podendo se tratar de híbridos. O teste de Raios X foi eficiente para identificação de sementes cheias, mal formadas, danificadas e vazias, auxiliando na escolha das sementes e melhorando a porcentagem de germinação. O alumínio afetou o crescimento radicular de *Campomanesia pubescens* cultivada em solução nutritiva simples e completa, observando-se queda na taxa de crescimento radicular e alongação radicular relativa e fitotoxidez a partir de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio na solução. A área marcada com morin em células do parênquima indicam essas áreas como alvo da toxidez do alumínio, limitando o crescimento das raízes. A presença de alumínio nas células do floema indica a possibilidade de translocação deste elemento, podendo este elemento afetar outras partes da planta. Neste sentido, o estabelecimento da espécie *Campomanesia pubescens* em solos com altas concentrações de alumínio pode ficar comprometido, devido à limitação do crescimento radicular.

PALAVRAS-CHAVES: gabirobeira, taxonomia, raios X, desorganização celular.

ABSTRAT

AMARAL, ERICA VIRGÍNIA ESTÊFANE DE JESUS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, August 2016. **Palynological and molecular characterization, analysis of radiographic images in seeds and phytotoxicity of aluminum on root growth *Campomanesia* (Myrtaceae)**. Advisor: Juliana de Fátima Sales, Co-advisors: Edésio Fialho dos Reis, Michellia Pereira Soares.

Campomanesia genus has species with potential for commercial cultivation, but they are difficult to identify, being often confused with the existence of groups with distinct morphological characteristics within the same species. This study aimed to characterize the *Campomanesia adamantium* species and morphotypes of species *Campomanesia pubescens* through palynological reviews and with the use of molecular markers to assist the taxonomic description of the species; and to evaluate the internal morphology of *Campomanesia pubescens* seeds with different moisture contents by means of X-ray image analysis and germination; and evaluate the growth and root anatomical structure of *Campomanesiapubescens* under different concentrations of aluminum in simple and complete nutrient solution. The palynological and molecular evaluations were performed at the Federal University of Goiás, Regional Jataí in Morphology Laboratory and Taxonomy Plant and Laboratory of Genetics and Plant Breeding, with plant material collected in the experimental field of the same institution; and the analysis of electron microscopy scanning of pollen grains was held at the Federal University of Lavras, in the Laboratory of Electron Microscopy and Analysis Ultra-structural. The analysis of radiographic images were taken at the Federal University of Lavras, in the Seed Analysis Laboratory, and the germination test was carried out at the Federal Institute of Seed Laboratory Goiás, Rio Verde Campus. Evaluations of aluminum toxicity on root growth *Campomanesia* were held at the Federal University of Goiás,

Regional Jataí, in Plant Breeding Laboratory. Important information was found that reinforces the possibility of cross between *Campomanesia adamantium* and *Campomanesia pubescens*, generating morphotypes intermediaries, indicating a possible hybridisation process. Both two species are sympatric, they bloom and its flowers are viable at the same time, with no time barrier to cross between them. Analysis of the morphology of the pollen grains in scanning electron microscopy showed no differences between *Campomanesia adamantium* species and morphotypes of *Campomanesia pubescens*, and analysis of morphometry of pollen grains indicated that all have the same standard size, which facilitates the crossing. The use of 13 ISSR primers was an effective tool to aid in the identification of these species and indicate grouping between them. It was concluded that *Campomanesia adamantium* is farthest from the morphotype 2 of *Campomanesia pubescens*, and morphotypes 1 and 3 are intermediate between them, possibly being hybrids. The X-ray test was efficient for identification of full seeds, malformed, damaged and empty, assisting in the selection of seeds and improving the percentage of germination. Aluminum affected root development of *Campomanesia pubescens* grown in simple and complete nutrient solution, observing decrease in root growth rate and relative root elongation, and phytotoxicity from 150 micromol aluminum L-1 in solution. The area marked with morin in parenchymal cells indicates these areas as targets of aluminum toxicity, limiting the growth of the roots. The presence of aluminum in phloem cells indicates the possibility of translocation of this element, which may affect other parts of the plant. In this regard, the establishment of *Campomanesia pubescens* species in soils with high aluminum concentrations can be compromised due to limitation of root growth.

KEYWORDS: gabirobeira, taxonomy, X ray, cellular disorganization.

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado está classificado dentro dos padrões de vegetação do mundo como savana, destacando-se pela alta biodiversidade e ocorrência de espécies endêmicas, sendo considerado a mais rica savana do mundo e o segundo maior domínio brasileiro, ocupando 21% do território nacional, superado em área apenas pela Amazônia (KLINK; MACHADO, 2005).

Entre as espécies estudadas atualmente na região do cerrado que merecem destaque, estão as gabirobeiras, que têm frutos carnosos, apreciados pela fauna e pela população local (VALLILO et al., 2008). São espécies frutíferas com potencial para cultivo comercial, visando à diversificação da produção e ao consumo de frutas, que pode ser *in natura* ou transformadas em subprodutos pela indústria alimentícia e farmacêutica (DANNER et al., 2010), sendo necessários estudos conclusivos para conhecimento de algumas características essenciais da espécie em questão.

Do ponto de vista econômico, a reprodução é um dos principais pilares para se manter uma cultura economicamente viável, seja ela por meio da produção de frutos e de sementes ou pela propagação vegetativa (SILVA; PINHEIRO, 2007). Porém, apesar da importância dessas espécies, a coleta dos frutos ocorre de forma extrativista e diretamente de populações naturais. O conhecimento básico sobre as condições necessárias para o armazenamento, a germinação das sementes e o estabelecimento das plântulas para a utilização das sementes, produção de mudas e recomposição de vegetação são essenciais para o estabelecimento de cultivos comerciais (DRESCH et al., 2012).

O uso de técnicas inovadoras, como a análise de imagens pelo teste de raios X (MASETTO et al., 2007), facilita a seleção de sementes e homogeneização de lotes, aumentando a uniformidade de germinação. O efeito da secagem sobre as sementes das

espécies do gênero *Campomanesia* também é característica essencial, pois não existem estudos conclusivos sobre a qualidade fisiológica pós-secagem.

Outro ponto que merece destaque é a propagação das espécies, pois são típicas do Cerrado brasileiro, que tem solos ácidos, com grande concentração de alumínio (CANÇADO et al., 2001). Assim, estudos para compreender os mecanismos de toxidez do alumínio, a influência na estrutura anatômica e no crescimento radicular também são uma inovação, podendo auxiliar seu cultivo doméstico e em programas de melhoramento genético.

1.1. Gabirobeiras

As gabirobeiras pertencem à família Myrtaceae, gênero *Campomanesia*, compreendendo arbustos encontrados amplamente no Cerrado das regiões Sudeste e Centro-Oeste, bem como em outros países da América do Sul (DOUSSEAU et al., 2011).

A família Myrtaceae tem ampla distribuição no hemisfério Sul, sendo uma das principais famílias botânicas, contando com 140 gêneros e 5500 espécies (BIFFIN et al., 2010), cerca de 800 endêmicas do Brasil (Sobral et al., 2015). A família tem duas subfamílias, sendo que somente a subfamília Myrtoideae compreende espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central (ARAGÃO; CONCEIÇÃO, 2008). Todos os representantes brasileiros da família estão incluídos na tribo Myrtae, que tem três subtribos que se distinguem pela morfologia do embrião. Entre as subtribos, destaca-se a subtribo Mirtinae, que tem hipocótilo desenvolvido e cotilédones pequenos ou vestigiais (REGO et al., 2010), características de grande importância taxonômica no estudo da família (MORAIS; LOMBARDI, 2006).

A família Myrtaceae é considerada uma das famílias mais complexas do ponto de vista taxonômico, pela morfologia de folhas e flores, que são muito semelhantes entre as espécies, dificultando a identificação (ROCHA et al., 2008). Isto pode ser atribuído a possíveis eventos de hibridação associados à poliploidia, o que explica a existência de caracteres intermediários entre os grupos de espécies próximas, apesar de, no geral, a família Myrtaceae apresentar pouca variação no número de cromossomos, $n=11$ na maioria dos gêneros, sendo frequentes espécies poliploides (COSTA, 2004).

As espécies do gênero *Campomanesia* variam de árvores a arbustos, Figura 1A, com ritidoma esfoliante na maioria das espécies, tricomas sempre unicelulares e simples, venação geralmente broquidódromo, folhas que variam em textura e tamanho,

sendo persistentes em algumas espécies e em outras caducas, inflorescência uniflora, hermafroditas, coloração creme esbranquiçada, estames numerosos, Figura 1B, corola e cálice 5-mero e ovário ínfero (LANDRUM, 1986).

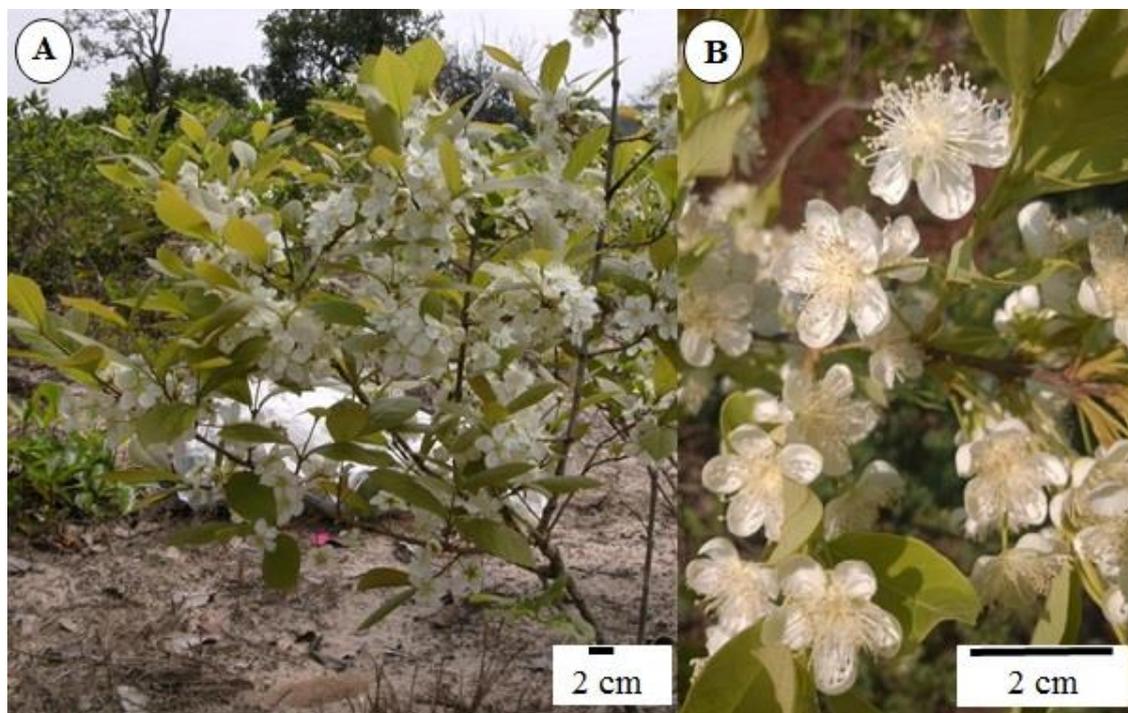


Figura 1. *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg. A. Arbusto; B. Flores.

O gênero *Campomanesia* é um dos mais claramente definidos da família (LANDRUM, 1986), distinguindo-se dos demais pelo desenvolvimento dos frutos e sementes, com a ocorrência de um aborto sistemático de todos, exceto um dos óvulos de cada lóculo (LANDRUM, 1982). Porém, dada a grande riqueza de espécies, ocorrência em diferentes ambientes e grande semelhança morfológica, apresenta inúmeros problemas taxonômicos (COSTA, 2004). Suas espécies são de difícil identificação, sendo muitas vezes confundidas, como no caso de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg, que são morfológicamente semelhantes, diferindo entre si basicamente pela presença de tricomas em folhas e sépalas desta última espécie (ARANTES; MONTEIRO, 2002). A espécie *C. pubescens* apresenta grande variabilidade entre as características morfológicas, podendo identificar a formação de grupos com características morfológicas distintas (AMARAL et al., 2016).

A última revisão completa para o gênero foi feita por Landrum (1986), que distinguiu as espécies do gênero em três grupos, sendo o complexo *Campomanesia xanthocarpa* composto pela maioria das espécies encontradas no Sudeste do Brasil, incluindo as espécies *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, o que é considerado por ele o complexo mais semelhante e de difícil identificação, sugerindo provável evento de hibridação entre estas espécies.

1.2. Ferramentas taxonômicas

As diferenças e semelhanças entre plantas são características taxonômicas passíveis de avaliação em larga escala pelos caracteres morfológicos (AMORIM et al., 2008). Ferramentas como o estudo dos grãos de pólen e desconstituição genética são usadas para diferenciar as espécies vegetais.

A palinologia é a ciência que estuda a morfologia dos grãos de pólen e esporos, apresentando diversas aplicações, entre elas estudos taxonômicos e de sistemática vegetal, que têm como base o fato de os grãos de pólen e os esporos terem diferenças típicas em cada espécie vegetal (BAUERMAN; NEVES, 2005), que se respalda nas evidências estruturais da morfologia do grão de pólen (STANSKI, 2014).

Grãos de pólen são estruturas microscópicas, produzidas em grande quantidade ao longo do ciclo reprodutivo da planta, que podem ser transportados de diversas formas até a parte feminina de outras plantas, possibilitando a polinização (LIMA-RIBEIRO; BARBERI, 2005). A variabilidade morfológica dos grãos de pólen é a característica que permite o uso da palinologia em vários campos da ciência, relacionando-se aos diferentes aspectos da biodiversidade vegetal brasileira (STANSKI, 2014).

Características morfológicas dos grãos de pólen podem ser úteis em estudos de taxonomia vegetal, pois são influenciadas pela seleção natural e envolvidas em vários processos reprodutivos, incluindo a polinização, dispersão, germinação e nas reconstruções evolutivas (OSWALD et al., 2011), o que auxilia na classificação taxonômica dos grupos vegetais (LIMA-RIBEIRO; BARBERI, 2005).

Para a maioria das espécies da família Myrtaceae, assim como para as espécies do gênero *Campomanesia*, o pólen é o recurso floral que atrai os polinizadores, sendo ricos em carboidratos, lipídios, proteínas e vitaminas, fonte alimentar para os visitantes florais (SILVA; PINHEIRO, 2007).

A polinização é um processo biológico importante em todos os ecossistemas, auxiliando na fertilização das plantas, formação de frutos e sementes e contribuindo para a manutenção das populações vegetais naturais, o fluxo gênico e a variabilidade genética (CORDEIRO, 2015). É uma relação mutualista pela qual a formação dos frutos é dependente, sendo uma das interações mais importantes do ciclo de vida das plantas vasculares, o que é essencial para a evolução (MUSICANTE; GALETTO, 2008).

No melhoramento genético, a análise da fertilidade do pólen é condição preliminar indispensável (DOMINGUES; TULMANN NETO; SOBRINHO, 2000), pois sua viabilidade assegura o sucesso nas hibridações controladas (EINHARDT; CORREA; RASEIRA, 2006). Existem diferentes métodos para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen, entre eles a germinação *in vitro* e o uso de corantes. Porém, o uso de corante, apesar de ser um método mais rápido, pode superestimar a viabilidade, por corar grãos de pólen inviáveis, mas que apresentam quantidades de enzimas, amidos e outras substâncias. Assim sendo, a germinação *in vitro* é o método mais eficiente para testar a viabilidade de grãos de pólen (FRANZON; RASEIRA, 2006).

Técnicas moleculares também vêm sendo amplamente utilizadas para auxiliar estudos taxonômicos, pois a variabilidade genética entre genótipos intra e inter-específicos pode ser analisada utilizando marcadores moleculares. Os marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (Simple Sequence Repeats) são os mais frequentemente utilizados para a caracterização na família Myrtaceae (KOERBER; A.; SEEKAMP, 2013; LÓPEZ-SEPÚLVEDA et al., 2013; MIRANDA et al., 2016; RAI; PHULWARIA; SHEKHAWAT, 2013; RANUCI et al., 2013; VILELA et al., 2012). Contudo, esses marcadores apresentam algumas limitações não evidenciadas no marcador ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), que vem sendo utilizado em estudos com a família Myrtaceae (BRANDÃO, 2008; CHEZHIAN; YASODHA; DASGUPTA, 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

O uso de marcadores ISSRs pode ser empregado para estudos de polimorfismos baseados em SSR, sendo uma poderosa ferramenta para análises moleculares, de diversidade genética e variabilidade genética, pois utiliza uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador (*Primer*) para amplificar um fragmento de DNA situado entre dois microssatélites invertidos, gerando um alto grau de polimorfismo (SILVA et al., 2011). Por ser uma técnica multiloco, que não necessita do conhecimento prévio da sequência de DNA alvo, o ISSR se torna um

marcador de baixo custo, de fácil uso e de grande reprodutibilidade (MATTHEWS et al., 1999).

1.3. Germinação de Sementes

Todas as espécies de Myrtaceae do Brasil apresentam frutos carnosos, com sementes envolvidas por poupa carnosa e rica em água, embriões facilmente observados, com pouco ou nenhum endosperma nas sementes maduras (LANDRUM; KAWASAKI, 1997), e com grande quantidade de água.

O teor de água das sementes é fundamental durante algumas fases, como nos processos de formação e maturação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Neste contexto, as sementes podem ser classificadas em sementes ortodoxas, que suportam a dessecação no final do seu amadurecimento e o armazenamento por longos períodos de tempo, e sementes recalcitrantes, que têm elevado teor de água na maturidade e são intolerantes à dessecação (DOUSSEAU et al., 2011).

A desidratação de sementes é uma característica importante, pois o processo de tolerância à dessecação permite a ampliação do período de seu uso para além da época em que elas são produzidas, contribuindo para a conservação e preservação da espécie (BARBEDO; BILIA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2002). Porém, alterações bioquímicas, decorrentes de processos como a secagem das sementes, podem afetar sua germinação.

A longevidade das sementes corresponde ao período em que elas se mantêm viáveis, sendo capazes de germinar quando em condições favoráveis, caso não haja dormência, e isso varia em poucos dias para as sementes recalcitrantes, o que restringe seu prazo de utilização (FONSECA; FREIRE, 2003). A preservação das sementes em temperaturas negativas é o processo mais utilizado, porém sementes recalcitrantes são susceptíveis a danos causados por estas temperaturas, pela formação de cristais de gelo nos tecidos, o que pode ocasionar a ruptura das membranas, provocando perda da viabilidade (WU et al., 2013).

Com isso, a conservação de sementes é a forma mais comum de preservação de uma espécie *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (SANTOS, 2001). Neste caso, a preservação da qualidade fisiológica das sementes é fundamental para a manutenção dos bancos de germoplasma e para o processo de repovoamento da vegetação em áreas degradadas, pois permite o uso de espécies vegetais em épocas e locais diferentes daqueles de sua origem (KOHAMA et al., 2006).

A divisão primária das sementes em duas classes - recalcitrantes e ortodoxas - considera basicamente a intolerância à dessecação, a curta longevidade e a intolerância a temperaturas negativas. Porém, atualmente, acrescentou-se a classe das sementes intermediárias, que também são intolerantes às temperaturas de congelamento e à secagem até 10% de teor de água (BONJOVANI; BARBEDO, 2008). Muitas espécies têm uso limitado pela inexistência de informações sobre o manejo de suas sementes (DELGADO; BARBEDO, 2007), confirmando a necessidade de estudos com sementes de diferentes espécies recalcitrantes para o conhecimento do grau de umidade crítico ou letal suportado.

Durante o processo de formação da semente, colheita, transporte e beneficiamento, podem ocorrer injúrias mecânicas, sendo necessárias técnicas que indiquem os locais e a extensão dos danos causados nas sementes (NUNES et al., 2014). Com isso, atualmente, são empregadas algumas técnicas para auxiliar a melhoria da qualidade do lote de sementes e uniformizar a germinação, entre elas, o teste de raios x, considerado um método rápido e não destrutivo da semente, permitindo a avaliação da morfologia do embrião e do endosperma da semente (BURG et al., 1994). Este método foi introduzido na Suécia por Simack e Gustafsson em 1953 para avaliar a qualidade de sementes de algumas coníferas (MASETTO; FARIA; QUEIROZ, 2008), possibilitando a obtenção de informações sobre a ocorrência de sementes mal formadas e vazias, podendo influenciar a germinação (AMARAL et al., 2011).

Recomendado pela ISTA (2004), o teste de raios X pode ser utilizado para várias espécies, pois é uma técnica rápida, simples e com aplicação direta na identificação de danos internos nas sementes (CARVALHO et al., 2009), sendo uma técnica promissora e precisa, em que a semente pode ser avaliada individualmente em imagens de áreas danificadas e sua extensão (FORTI; CICERO; PINTO, 2008).

Nessa técnica, as sementes são colocadas em um filme fotossensível, expostas a uma fonte de baixa energia de raios X, que atravessam a sementes, atingindo o filme, criando uma imagem latente (KOBORI; CICERO; MEDINA, 2012). Quando os raios x passam através da semente, a radiação é absorvida em vários graus, dependendo da espessura, densidade, composição da semente e do comprimento da onda da radiação, criando uma imagem permanente no filme radiográfico (LIMA et al., 2013). A eficiência do teste depende de procedimentos específicos para a espécie em estudo como a determinação do melhor tempo e intensidade de radiação a que as sementes ficam expostas durante a execução do teste (MASETTO et al., 2007).

A vantagem da utilização do teste de raios X em sementes, para determinar a qualidade física, são a rapidez e a conservação da viabilidade das sementes testadas, sendo possível submetê-las a outros testes fisiológicos depois das radiografias, relacionando aos resultados do teste de raios X (MUXFELDT et al., 2012).

O teste de raios X já foi empregado em diversas espécies cultivadas além de algumas espécies nativas, não havendo trabalhos com espécies nativas da família Myrtaceae.

Tabela 1. Trabalhos publicados com a utilização do teste de raios X.

<i>Glycine max</i> (soja)	PINTO; CICERO; FORTI, 2007
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	BURG et al., 1994
<i>Cucurbita moschata</i> (abóbora)	CARVALHO et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2002
<i>Zea mays</i> (milho)	CARVALHO et al., 1999; CICERO; BANZATTO JUNIOR, 2003
<i>Ricinus communis</i> (mamona)	CARVALHO; ALVES; OLIVEIRA, 2010; KOBORI; CICERO; MEDINA, 2012
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	FORTI; CICERO; PINTO, 2008
<i>Tabebuia heptaphylla</i>	AMARAL et al., 2011
<i>Eugenia pleurantha</i>	MASETTO et al., 2007
<i>Cedrella fissilis</i>	MASETTO; FARIA; QUEIROZ, 2008
<i>Bauhinia forficata</i>	MATTOS; MEDEIROS, 2000
<i>Ilex paraguariensis</i>	MATTOS; MEDEIROS, 2000
<i>Cryptocarya aschersoniana</i>	MUXFELDT et al., 2012
<i>Peltophorum dubium</i>	OLIVEIRA; CARVALHO; DAVIDE, 2003
<i>Cecropia pachystachya</i>	PUPIM et al., 2008

1.4. Fitotoxidez do Alumínio

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, ocupando cerca de 8% dela, mas é um dos principais contaminantes de metal do meio ambiente (ACHARY et al., 2008). Isto causa problemas de toxicidade em solos ácidos, limita o crescimento das plantas e a produção agrícola (MIGUEL et al., 2010).

A maior parte do alumínio em solos é incorporada na forma de aluminossilicatos e outros precipitados inofensivos para as plantas (BRUNNER; SPERISEN, 2013), porém, em solos ácidos, o alumínio é solubilizado na solução do solo na forma de cátion trivalente (Al^{3+}), que resulta em fitotoxicidade. O alumínio, em concentrações micromolares, pode inibir o alongamento da raiz em minutos ou horas, já que o ápice radicular é um local crítico de percepção da toxicidade do alumínio e expressão da resistência (CAI et al., 2011a).

Uma estratégia para diminuir os efeitos tóxicos do alumínio é a incorporação de calcário, porém a capacidade corretiva dessa técnica não ultrapassa as camadas superiores do solo, impossibilitando o crescimento normal do sistema radicular dos vegetais (MIGUEL et al., 2010).

A fitotoxidez por alumínio é considerada fator que limita a produção das culturas em solos ácidos, pois em solos com pH inferior a 5,0 o alumínio trivalente (Al^{3+}), considerado o mais tóxico, prevalece na solução do solo, inibindo o crescimento das raízes, o que limita a exploração das camadas mais profundas do solo, restringindo a absorção de água e nutrientes (ALVES et al., 2004).

A inibição do crescimento do sistema radicular é um índice amplamente utilizado para medir a toxicidade por alumínio (POSCHENRIEDER et al., 2008), além disso, outros sintomas são visíveis como a clorose nas folhas, o crescimento de plantas raquíticas, além de alterações na parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo (ACHARY et al., 2008).

Algumas plantas desenvolveram mecanismos de tolerância ao alumínio, entre eles um mecanismo interno, em que o alumínio é inativado por algumas enzimas ou isolado no interior do vacúolo (FREITAS et al., 2006); e um mecanismo externo, que tem como base a exclusão de alumínio pela liberação de ácidos orgânicos pelas pontas da raiz, geralmente citrato e malato, que se ligam ao alumínio, formando complexos estáveis, que impedem sua absorção pela planta, como uma forma de proteção contra seus efeitos tóxicos (CAI et al., 2011b). Também existem plantas com genótipos resistentes ao alumínio, geralmente, acumulam menos alumínio no ápice da raiz que plantas com genótipos sensíveis, pois os mecanismos de exclusão desempenham papel importante nos mecanismos de resistência (CAI et al., 2011a).

Plantas desenvolvidas em solos com altas concentrações de alumínio tóxico apresentam sintomas de deficiência nutricional de P, Ca, Mg, K e Mo, pois ele influencia nos processos de absorção, transporte e uso desses nutrientes, pela indução, provocada pelo alumínio, de deposição de calose nos canais plasmodesmáticos, inibindo fisicamente o transporte simplástico entre as células (CANÇADO et al., 2001), tornando-se indiretamente responsável pela insuficiência do transporte pela raiz e processos metabólicos na parte aérea (RIBEIRO et al., 2013). Além disso, a mudança de homeostase celular do Ca^{2+} e da competição por canais de Ca^{2+} é outro efeito prejudicial do alumínio, afetando em maior ou menor intensidade vários processos celulares (CANÇADO et al., 2001).

Para avaliação da absorção e acumulação de alumínio nos tecidos das raízes, são utilizados alguns métodos, entre eles o uso de corantes específicos, o Morin, que é um fluorocromo altamente sensível ao alumínio, podendo detectar concentrações muito baixas deste metal (ETICHA; STAS; HORST, 2005).

O uso de sistemas de hidroponia para avaliação da toxidez por alumínio é adequado para avaliação de plantas resistentes e tolerantes a alumínio, devido às condições controladas do ambiente, proporcionando vantagens como o pronto acesso ao sistema radicular e a possibilidade de controle do pH e as concentrações de alumínio e outros importantes na solução nutritiva (MIGUEL et al., 2010).

A técnica de hidroponia se refere ao cultivo em água, possibilitando o desenvolvimento rápido para o cultivo de diversas hortaliças, apresentando inúmeras vantagens sobre o cultivo tradicional (FURLANI et al., 2014a). A composição de uma solução nutritiva ideal para ser utilizada para esse tipo de cultivo depende não somente das concentrações dos nutrientes, mas também de outros fatores ligados ao cultivo, como o tipo de sistema hidropônico, fatores ambientais, época do ano, fenologia e espécies vegetal (FURLANI et al., 2014b).

1.5. Referências bibliográficas

- ACHARY, V. M. M. et al. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 300–310, 2008.
- ALVES, V. M. C. et al. Toxidez por alumínio e hidrogênio no crescimento de raízes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 2, p. 311–318, 2004.
- AMARAL, É. V. E. DE J. et al. Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia Ruiz & Pavon* (Myrtaceae). **Revista Agrotecnologia**, v. 7, n. 1, p. 42–52, 2016.
- AMARAL, J. B. DO et al. Teste de raios X para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 601–607, 2011.
- AMORIM, I. L. DE et al. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. *lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin & Barneby - Leguminosae Caesalpinioideae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 3, p. 507–516, 2008.
- ARAGÃO, J. G.; CONCEIÇÃO, G. M. DA. Myrtaceae: espécies das subtribos Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae registradas para o estado do Maranhão. **Revista Sinapse Ambiental**, p. 7–17, 2008.

- ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG, Brasil. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 111–127, 2002.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 431–439, 2002.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 145–164, 1998.
- BAUERMANN, S. G.; NEVES, P. C. P. DAS. Métodos de estudos em palinologia do quaternário e de plantas atuais. **Cadernos La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 99–107, 2005.
- BIFFIN, E. et al. Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. p. 79–93, 2010.
- BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 345–356, 2008.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema de corredor-fragmento semidecíduais no Sul de Minas**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2008.
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–12, 2013.
- BURG, W. J. VAN DER et al. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society of Horticultural Sciences**, v. 119, n. 2, p. 258–263, 1994.
- CAI, M. et al. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 7, p. 966–971, 2011a.
- CAI, M. et al. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. **Plant Science**, v. 180, n. 5, p. 702–708, 2011b.
- CANÇADO, G. M. A. et al. Novas perspectivas para a adaptação de culturas ao Cerrado. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 23, p. 56–61, 2001.
- CARVALHO, M. L. M. DE et al. Caracterização de danos de estresse em pré-colheita e seus efeitos na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 93–100, 1999.

- CARVALHO, M. L. M. DE et al. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 221–227, 2009.
- CARVALHO, M. L. M. DE; ALVES, R. A.; OLIVEIRA, L. M. DE. Radiographic analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 170–175, 2010.
- CHEZHIAN, P.; YASODHA, R.; DASGUPTA, G. M. Molecular Discrimination of Eucalypt Clones Using the ISSR Marker System. **Journal of sustainable forestry**, v. 31, n. 6, p. 537–548, 2012.
- CICERO, S. M.; BANZATTO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 29–36, 2003.
- CORDEIRO, G. D. “Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum 1984 - Myrtaceae)”. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- COSTA, I. R. DA. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- DANNER, M. A. et al. Fenologia da floração e frutificação de Mirtáceas nativas da Floresta com Araucária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 291–295, 2010.
- DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de Eugenia. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 265–272, 2007.
- DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; SOBRINHO, J. T. Viabilidade de pólen em clones de laranja pêra e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 85–89, 2000.
- DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1362–1368, 2011.
- DRESCH, D. M. et al. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 40, n. 94, p. 223–229, 2012.
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. DO C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5–7, 2006.
- ETICHA, D.; STAS, A.; HORST, W. J. Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? **Journal of Experimental Botany**,

v. 56, n. 415, p. 1351–1357, 2005.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: Problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297–303, 2003.

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos e causados por percevejos em semente de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 121–130, 2008.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. D. C. B. Germinação in vitro e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 18–20, 2006.

FREITAS, F. A. DE et al. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 72–79, 2006.

FURLANI, P. R. et al. Cultivo Hidropônico de Plantas, Parte 1 - Conjunto hidráulico. **Infobibos**, p. 1–14, 2014a.

FURLANI, P. R. et al. Cultivo Hidropônico de Plantas, Parte 2 - Solução nutritiva. **Infobibos**, p. 1–15, 2014b.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

KOBORI, N. N.; CICERO, S. M.; MEDINA, P. F. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 125–133, 2012.

KOERBER, G. R. A.; A., P.; SEEKAMP, J. V. Morphology, physiology and AFLP markers validate that green box is a hybrid of *Eucalyptus largiflorens* and *E. gracilis* (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 25, n. 2, p. 156–166, 2013.

KOHAMA, S. et al. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 72–78, 2006.

LANDRUM, L. R. The development of the fruits and Seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, v. 34, n. 2, p. 220–224, 1982.

LANDRUM, L. R. Flora Neotropica: *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). **The New York Botanical Garden Press**, v. 45, n. 4, p. 1–178, 1986.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The Genera of Myrtaceae in Brazil: An Illustrated Synoptic Treatment and Identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508–536, 1997.

- LIMA, L. K. S. et al. Utilização de técnicas na avaliação de sementes por imagem. **Acsa**, v. 9, n. 3, p. 1–6, 2013.
- LIMA-RIBEIRO, M. D. S.; BARBERI, M. Análise palinológica: fundamentos e perspectivas na pesquisa arqueológica. **Habitus**, v. 3, n. 2, p. 261–290, 2005.
- LÓPEZ-SEPÚLVEDA, P. et al. Genetic variation (Aflps and nuclear microsatellites) in two anagenetically derived endemic species of myrceugenia (Myrtaceae) on the Juan Fernandez Islands, Chile. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 4, p. 722–734, 2013.
- MASETTO, T. E. et al. Avaliação da qualidade de sementes de Eugenia pleurantha (Myrtaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 170–174, 2007.
- MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; QUEIROZ, S. E. E. Avaliação da qualidade de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* - Meliaceae) pelo teste de raios X. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1708–1712, 2008.
- MATTHEWS, D. et al. 5'-Anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 210–212, 1999.
- MATTOS, P. P.; MEDEIROS, A. C. D. S. Uso de raios X na avaliação de sementes de pata-de-vaca. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Embrapa**, n. 88, p. 2–3, 2000.
- MIGUEL, P. S. B. et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**, v. 24, p. 11–30, 2010.
- MIRANDA, E. A. G. C. et al. Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2016.
- MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 7, n. 1, p. 3–32, 2006.
- MUSICANTE, M. L.; GALETTO, L. Biologia reprodutiva de *Cologania broussonetii* (Fabaceae, Faboideae). **Darwiniana**, v. 46, n. 1, p. 7–16, 2008.
- MUXFELDT, R. E. et al. Utilização do teste de raios X na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de canela-batalha - *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, v. 18, n. 4, p. 657–666, 2012.
- NASCIMENTO, W. M. et al. Mudanças fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento de sementes híbridas de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2,

p. 1–4, 2002.

NUNES, R. T. C. et al. Análise de imagens na avaliação da qualidade fisiológica de sementes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5, p. 84–90, 2014.

OLIVEIRA, L. M. DE; CARVALHO, M. L. M. DE; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 116–120, 2003.

OLIVEIRA, N. N. S. DE et al. Análise de distância genética entre acessos do gênero *Psidium* via marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 917–923, 2014.

OSWALD, W. W. et al. Pollen Morphology and Its Relationship to Taxonomy of the Genus *Sarracenia* (Sarraceniaceae). **Rhodora**, v. 113, n. 955, p. 235–251, 2011.

PINTO, T. L. F.; CICERO, S. M.; FORTI, V. A. Avaliação de danos por umidade, em sementes de soja, utilizando a técnica da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 31–38, 2007.

POSCHENRIEDER, C. et al. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1–3, p. 356–368, 2008.

PUPIM, T. L. et al. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de Embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 28–32, 2008.

RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S. Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in guava (*Psidium guajava* L.) to four Myrtaceae species. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 8, p. 5067–5071, 2013.

RANUCI, L. E. C. et al. Levantamento da dispersão e variabilidade genética de *Tectococcus ovatus* (Heteroptera: Eriococcidae) nas regiões de ocorrência natural de *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). **Floresta**, v. 43, n. 2, p. 289–300, 2013.

REGO, S. S. et al. Caracterização morfológica do fruto, da semente e do desenvolvimento da plântula de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. e *Myrceugenia gertii* Landrum - Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 52–60, 2010.

RIBEIRO, M. A. Q. et al. Aluminium effects on growth, photosynthesis, and mineral nutrition of cacao genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36, p. 1161–1179, 2013.

ROCHA, L. D. et al. Estudo anatômico comparativo da casca do caule do araçá-amarelo

- e araçá-vermelho, *Psidium cattleianum* Sabine, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1114–1122, 2008.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 60–65, 2001.
- SILVA, A. L. G. DA; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 235–247, 2007.
- SILVA, K. V. P. DA et al. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1082–1088, 2011.
- STANSKI, C. **Catálogo polínico de espécies de Myrtaceae e Solanaceae da Região dos Campos Gerais - Paraná, Brasil**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.
- VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231–237, 2008.
- VILELA, R. C. F. et al. Sistema reprodutivo e diversidade genética de quatro espécies de *Myrciaria* (Myrtaceae, jabuticabeiras). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 727–734, 2012.
- WU, R. Y. et al. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. **Scientia Horticulturae**, v. 157, p. 108–112, 2013.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi fazer a caracterização palinológica e molecular da espécie *Campomanesia adamantium* e dos morfotipos da espécie *Campomanesia pubescens*; avaliar a morfologia interna de sementes de *C. pubescens*, com diferentes teores de água, por meio da análise de imagens de raios X, e sua germinação; e avaliar o crescimento e a estrutura anatômica radicular de *C. pubescens* sob diferentes concentrações de alumínio, em cultivo hidropônico, com solução nutritiva simples e completa.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Plant Biology)

CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E USO DE MARCADOR ISSR EM *Campomanesia* (Myrtaceae)

RESUMO

O gênero *Campomanesia* tem potencial para cultivo comercial, mas são de difícil identificação, com a existência de morfotipos para algumas espécies. Com isso, objetivou-se neste trabalho caracterizar a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos da espécie *Campomanesia pubescens*, através de avaliações palinológicas e com o uso de marcador molecular, para auxiliar a descrição taxonômica da espécie. O material vegetal foi coletado no campo experimental da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, na floração de 2014, e as análises feitas no Laboratório de Morfologia e Taxonomia Vegetal e no Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da mesma instituição. A análise de microscopia eletrônica de varredura foi feita na Universidade Federal de Lavras. Foram encontradas informações importantes que reforçam a possibilidade de cruzamento entre *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, gerando morfotipos intermediários, indicando um possível processo de hibridação. As duas espécies florescem e suas flores ficam viáveis simultaneamente. As análises da morfologia dos grãos de pólen em microscopia eletrônica de varredura não permitiram verificar diferenças entre a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos de *Campomanesia pubescens* estudados e, as análises da morfometria dos grãos de pólen indicaram que todos têm o mesmo padrão

de tamanho, o que facilita o cruzamento. A utilização dos 13 primers ISSR foi eficaz no auxílio da identificação destas espécies, indicando um agrupamento entre elas. Pode-se concluir que *Campomanesia adamantium* está mais distante do morfotipo 2 de *Campomanesia pubescens*, e os morfotipos 1 e 3 são intermediários entre eles, podendo se tratar de híbridos.

Palavras-chave: gabirola; grãos de pólen; hibridação; taxonomia.

CHARACTERIZATION PALYNOLOGICAL AND ISSR MARKER FOR USE IN *Campomanesia* (Myrtaceae)

ABSTRAT

The *Campomanesia* genus has potential for commercial cultivation, but these are difficult to identify, with the existence of morphotypes for some species. Thus, the aim of this study was to characterize the *Campomanesia adamantium* species and morphotypes of species *Campomanesia pubescens* through palynological reviews and with the use of molecular markers to assist the taxonomic description of the species. The plant material was collected in the experimental field of Jataí Regional Federal University of Goiás, in bloom of 2014, and analyzes were performed in the Morphology Laboratory of Plant Taxonomy and in the Laboratory of Genetics and Plant Breeding belonging to the same institution. Analysis of scanning electron microscopy was performed at the Federal University of Lavras. Important information was found that reinforce the possibility of cross between *Campomanesia adamantium* and *Campomanesia pubescens*, generating morphotypes intermediaries, indicating a possible hybridisation process. Both species flower and its flowers are viable simultaneously. Analysis of the morphology of the pollen grains in scanning electron microscopy not allowed to verify the differences between the *Campomanesia adamantium* and morphotypes of *Campomanesia pubescens* studied, and the analysis of morphometry of pollen grains indicated that all have the same standard size, facilitating the cross. The use of 13 ISSR primers was an effective tool to aid in the identification of these species and indicating a grouping between them. It can be concluded that *Campomanesia adamantium* is farthest from the morphotype 2 from *Campomanesia*

pubescens, and morphotypes 1 and 3 are intermediate between them, possibly being hybrids.

Keywords: gabirola; pollen grains; hybridization; taxonomy.

3.1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae é uma das principais famílias botânicas, com 140 gêneros e 5500 espécies (Biffin *et al.*, 2010), sendo cerca de 800 endêmicas do Brasil (Sobral *et al.*, 2015). Pode-se destacar o gênero *Campomanesia*, representado por 40 espécies distribuídas na América do Sul (Oliveira *et al.*, 2012), 32 endêmicas (Sobral *et al.*, 2015).

Conhecidas como gabirolas são espécies nativas do Brasil, têm distribuição ampla em todo centro-oeste e em alguns estados do Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do país (Sobral *et al.*, 2015). Suas espécies são de difícil identificação, sendo muitas vezes confundidas, como no caso de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg e de *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg, que são morfologicamente semelhantes, diferindo entre si basicamente pela presença de tricomas em folhas e sépalas desta última espécie (Arantes & Monteiro, 2002). Com base nas descrições originais e auxílio de trabalho de campo e material de herbários, Amaral *et al.* (2016) identificaram três morfotipos para a espécie *Campomanesia pubescens*, com caracteres intermediários de *Campomanesia adamantium*.

Landrum (1986) afirma que parte da variabilidade de *Campomanesia pubescens* se deve a hibridações naturais, que ocorre por polinização cruzada interespecífica. E um trabalho de Torezan-Silingardi & Del-Claro (1998) constatou que o sistema sexual de *Campomanesia pubescens* é autocompatível, embora a formação dos frutos ocorra principalmente por polinização cruzada, o que presume a existência de fluxo gênico. A ausência de barreiras de isolamento eficazes pode levar ao processo de hibridação (Wendt *et al.*, 2008). Outro fator que pode favorecer a hibridação é o número cromossômico, que, para a família Myrtaceae, apresenta pouca variação (Costa & Forni-Martins, 2006a), como observado por Costa & Forni-Martins, 2006b) em populações de *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, que têm estado diploide ($2n = 22$).

Com isso, é necessário o uso de desenvolvimento de trabalhos que auxiliem a correta identificação dessas espécies, como a palinologia, uma importante ferramenta para estudos taxonômicos e ambientais (Cancelli *et al.*, 2007). Neste sentido, é importante conhecer características que forneçam subsídios para constatar a ocorrência de possíveis cruzamentos entre as espécies, explicando a formação de caracteres morfológicos intermediários. Um dos trabalhos que podem auxiliar é o estudo da morfologia dos grãos de pólen, por se basear nas diferenças típicas apresentadas por cada espécie vegetal, principalmente no que diz respeito ao tamanho e forma (Bauermann & Neves, 2005).

Além disso, com a utilização de ferramentas moleculares, é possível quantificar a diversidade genética através de marcadores moleculares (Brandão, 2008), tendo acesso à informação diretamente do DNA, obtendo uma melhor caracterização das espécies deste gênero, mesmo tendo características morfológicas próximas, pois podem ter influência do ambiente. Na literatura, são encontrados alguns trabalhos utilizando ferramentas moleculares para avaliar a variabilidade genética contida em algumas espécies do gênero *Campomanesia*, incluindo *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens* (Assis *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2016), porém nenhum com enfoque de caracterização molecular para auxílio na taxonomia do gênero.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos da espécie *Campomanesia pubescens*, através de avaliações palinológicas e com o uso de marcador molecular.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi coletado do campo experimental da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás (REJ-UFG), onde existem acessos de *Campomanesia* coletados em 17 municípios do estado de Goiás, da região Sudoeste até o entorno do Distrito Federal. As coletas foram feitas na floração de 2014, entre os meses de agosto e outubro. Foi utilizada a classificação proposta por Amaral *et al.* (2016), aceitando a existência de três morfotipos para a espécie *Campomanesia pubescens*.

3.2.1. Viabilidade polínica e receptividade estigmática

As análises para viabilidade polínica foram feitas utilizando, aproximadamente, 10 flores em antese de *Campomanesia adamantium* e de cada um dos morfotipos de

Campomanesia pubescens estudados. Os grãos de pólen foram espalhados em lâminas e cobertos com solução aquosa de açúcar a 20% de grau brix, como substrato, deixados em temperatura de ± 25 °C e analisados após 24 horas (adaptado de Dafniet al., 2005). Foi contabilizada a porcentagem de grãos de pólen germinados, sob microscópio óptico binocular, tendo sido feita contagem, aleatória de 100 grãos de pólen e avaliada a porcentagem de grãos germinados. Considerou-se a germinação quando o tubo polínico ultrapassou o diâmetro do grão de pólen (Chia *et al.*, 2009).

A receptividade do estigma foi verificada em campo, observada com o auxílio de uma lupa de mão e uso de peróxido de hidrogênio, em flores em antese, colocado uma gota sobre o estigma e observando, com lupa de mão, presença de bolhas, que cessa quando a receptividade termina. Avaliou-se uma média de 10 flores de cada espécie durante 10 dias, sempre por volta das 8 horas da manhã.

3.2.2. Caracterização Morfológica dos grãos de pólen

Para a análise da morfologia dos grãos de pólen, foram utilizadas pelo menos cinco flores frescas em pré-antese de cada uma das espécies e os respectivos morfotipos analisados, sendo que para o morfotipo 3, foram utilizadas flores de exsicatas, reidratadas, pela indisponibilidade de material fresco. As anteras foram maceradas para retirada dos grãos de pólen e, em seguida, submetidas ao processo de acetólise (Erdtman, 1960, adaptado de Dafni *et al.*, 2005). O material polínico foi fixado em álcool 70% e transportado para a Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As análises foram feitas em microscópio eletrônico de varredura no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA, tendo as imagens sido capturadas utilizando câmera digital acoplada ao microscópio, com auxílio do software Leica Application Suite (LAS EZ), e transferidas para um DVD, retornando à REJ-UFG para descrição das características morfológicas.

As descrições dos grãos de pólen foram feitas com o uso das terminologias e critérios de classificação propostos por Barth (1965) e Barth & Barbosa (1972).

Para a análise da morfometria polínica em microscopia óptica (MO), foram utilizadas flores frescas para montagem das lâminas em glicerina. Os grãos de pólen foram fotomicrografados e medidos com auxílio de software específico do equipamento Leica Application Suite – LAS EZ, as medidas foram expressas em micrômetros (μm) e os tamanhos, de acordo com a classificação proposta por Barth (1965).

Foram analisados dez grãos de pólen, de cinco flores diferentes, totalizando 50 grãos de pólen. Para o morfotipo 3, devido à indisponibilidade de material, foram utilizados os grãos de pólen submetidos à acetólise, montados em gelatina glicerinada, com lâmina permanente.

Foram medidos o comprimento e a largura dos grãos de pólen em vista Polar (P), Figura 1A, e comprimento e largura em vista Equatorial (E), Figura 1B, calculando-se a média aritmética (\bar{X}), o desvio padrão ($s\bar{X}$) e a amplitude do tamanho dos grãos de pólen, descritos nessa ordem, com os valores de amplitude entre parênteses. A forma dos grãos de pólen é dada pela razão do maior eixo polar dividido pelo maior eixo equatorial (P/E).

As análises estatísticas foram feitas com auxílio dos softwares Systat e Genes (Cruz, 2013) e as médias, comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

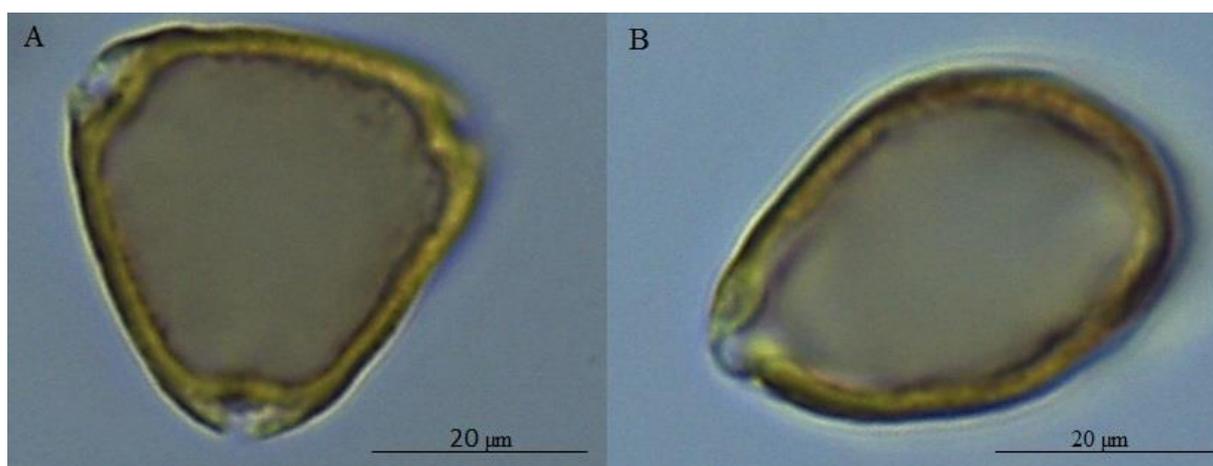


Figura 1. Grãos de pólen de espécies de *Campomanesia* fotomicrografados em microscópio ótico, objetiva 100x. A. Vista polar; B. Vista equatorial.

3.2.3. Caracterização Molecular

As análises moleculares foram feitas no Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás. Foram coletadas folhas em estado intermediário de maturação de 10 acessos da espécie *Campomanesia adamantium* e dos três morfotipos de *Campomanesia pubescens* para compor o “bulk” de DNA utilizado nas análises de PCR.

A extração do DNA foi feita utilizando o método CTAB, conforme Carvalho *et al.* (2012). Para as análises moleculares, foram utilizados 13 primers ISSRs (Tabela 1). As reações de amplificação dos ISSRs foram preparadas para um volume final de 13

μL , contendo 5 μL de Master Mix (*Taq* DNA Polimerase, tampão de PCR e dNTPs), que corresponde a 1X da solução, 3 Mm de MgCl_2 , 1 μL de BSA (a 0,25 mg/ μL), 0,4 μM primer e 20 ng de DNA.

As ampliações foram feitas em termocicladores Veriti (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 95 °C por 4 minutos (1 ciclo), 94 °C por 60 segundos, 42 – 46 °C por 45 segundos (dependendo do primer), 72 °C por 60 segundos (40 ciclos); e uma extensão final a 72 °C por 07 minutos (1 ciclo). A separação eletroforética foi feita em gel de agarose a 2,5%, durante três horas, a 70 volts.

Os marcadores ISSR gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre as espécies estudadas, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. A matriz de dissimilaridade genética foi utilizada para estimar as coordenadas principais para a espécie de *Campomanesia adamantium* e os três morfotipos de *Campomanesia pubescens*, e os escores foram projetados em um plano tridimensional. As análises das coordenadas principais foram pelo programa Genes (Cruz, 2013).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Viabilidade polínica e receptividade estigmática

Observou-se que todas as flores em antese, por volta das 8 horas da manhã, estavam com seus estigmas receptivos e os grãos de pólen com média com de viabilidade de 23% para *Campomanesia adamantium* e de 27% para os morfotipos de *Campomanesia pubescens*, o que levou à conclusão de que não ocorre diferenciação temporal na maturação dos órgãos reprodutivos das duas espécies analisadas.

Franzon *et al.* (2006) também encontraram valores semelhantes para a germinação *in vitro* de pólenes de *Campomanesia xanthocarpa*, coletados em botão floral, e valores próximos a 50% em flores em antese. Valores diferentes foram encontrados por Borém (2009), tendo a viabilidade dos grãos de pólen de *Campomanesia pubescens* alcançado 90% em teste feito com o uso de carmim acético para marcar os grãos de pólen viáveis, porém Baez *et al.* (2002) concluíram que o uso de corantes em teste de viabilidade de grãos de pólen superestima os dados quando comparados à germinação *in vitro*, pois o corante marca os grãos de pólen não abortados, que podem não estar viáveis.

Pode-se dizer que as duas espécies observadas estão com seus estigmas receptivos e seus grãos de pólen férteis ao mesmo tempo. Observou-se que as duas espécies abrem poucas flores por dia, durante muitos dias, como também observado por Proença & Gibbs (1994) em *Campomanesia pubescens*, aumentando a taxa de polinização cruzada, tanto intraespecífica como interespecífica, pois aumenta o período reprodutivo da planta, assim como a movimentação dos polinizadores em busca de recursos, favorecendo um possível fluxo interespecífico de pólen, já que existe similaridade entre as flores. Também reforça a não existência de barreira temporal para o cruzamento entre as duas espécies.

A polinização cruzada é um mecanismo da natureza que incrementa a variabilidade genética, reduz as chances de depressão por endogamia, além de auxiliar na melhor adaptação populacional às mudanças ambientais (Morran *et al.*, 2009). Também favorece a recombinação gênica e contribui para a variabilidade morfológica, pois possibilita o cruzamento de indivíduos com características diferentes.

A formação de frutos em *Campomanesia pubescens* é estatisticamente superior por polinização cruzada, como observado por Proença & Gibbs (1994), assim como em *Campomanesia phae*, não tendo ocorrido formação de frutos nos tratamentos de autopolinização manual (Cordeiro, 2015). Com isso, podemos dizer que essas plantas se reproduzem por polinização cruzada, sem controle de origem do pólen, com chance de ocorrência de cruzamentos entre as espécies *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*, já que não apresentam barreiras de isolamento para o cruzamento, o que pode gerar indivíduos com características intermediárias entre as duas espécies, formando indivíduos morfológicamente diferentes, como encontrado em campo para indivíduos de *Campomanesia pubescens*.

3.3.2. Caracterização morfológica dos grãos de pólen

- *Campomanesia adamantium*: apresenta grãos de pólen pequenos, isolados em mônades¹, com simetria radial², isopolar³, triangular, suboblato⁴, P/E = $0,79 \pm 0,13$ (0,57 – 1,22), aperturados⁵, tricolporado⁶, apocólpio convexo⁷ (Figura 2A). P = $15,37 \pm 2,09$ (11,59 – 21,60), E = $11,93 \pm 1,49$ (10,00 – 17,10).

- *Campomanesia pubescens* morfotipo 1: apresenta grãos de pólen pequenos, isolados em mônades, com simetria radial, isopolar, triangular, suboblato, P/E = $0,80 \pm 0,14$ (0,59 – 1,27), aperturados, tricolporado, apocólpio convexo (Figura 2B). P = $14,97 \pm 2,37$ (11,56 – 22,12), E = $11,89 \pm 2,30$ (09,10 – 19,01).

- *Campomanesia pubescens* morfotipo 2: apresenta grãos de pólen pequenos, isolados em mônades, com simetria radial, isopolar, triangular, suboblato, P/E = $0,82 \pm 0,14$ (0,53 – 1,17), aperturados, tricolporado, apocólpio convexo (Figura 2C). P = $17,96 \pm 1,88$ (12,88 – 24,42), E = $14,73 \pm 2,30$ (11,05 – 23,10).

- *Campomanesia pubescens* morfotipo 3: apresenta grãos de pólen pequenos, isolados em mônades, com simetria radial, isopolar, triangular, suboblato, P/E = $0,76 \pm 0,08$ (0,67 – 0,93), aperturados, tricolporado, apocólpio convexo (Figura 2D). P = $18,61 \pm 1,33$ (16,29 – 20,86), E = $13,98 \pm 1,75$ (11,54 – 17,10).

Nota-se que os grãos de pólen das espécies de *Campomanesia* analisadas não têm variação morfológica e, mesmo com as médias dos valores de eixo Polar e Equatorial variando entre os grupos, todos se enquadram na classificação de Barth (1965), como pequenos, ou seja, grãos de pólen que têm seu eixo mais longo, variando entre 10 e 25 μm .

Estes resultados confirmam a descrição de Stanski (2014) e de Silva *et al.* (2010) para espécies de *Campomanesia*, em que os grãos de pólen têm o mesmo padrão morfológico e tamanhos pequenos, indicando pouca variação na morfologia polínica dentro deste gênero. Porém, Stanski (2014) encontrou valores da relação P/E entre 1,01 a 1,13 μm , classificados como prolato-esferoidal, diferindo dos valores encontrados neste trabalho, mas mesmo assim de tamanhos pequenos.

¹**Mônade:** Grão de pólen que se dispersa como unidade individual.

²**Simetria radial:** grão de pólen que apresenta vários planos de simetria.

³**Isopolar:** grão de pólen que apresenta polos distal e proximal semelhantes.

⁴**Suboblato:** razão P/E variando entre 0,75 – 0,87 μm .

⁵**Aperturado:** grão de pólen provido de aberturas.

⁶**Tricolporado:** grão de pólen que apresenta três aberturas em forma de cólporo (abertura composta, formada por um colpo provido de uma ou mais endoaberturas).

⁷**Apocólpio convexo:** área nos polos, delimitada por linhas imaginárias que ligam os ápices dos cólporos em grãos de pólen zonoaperturados (poros localizados na região equatorial), que se apresenta em forma convexa.

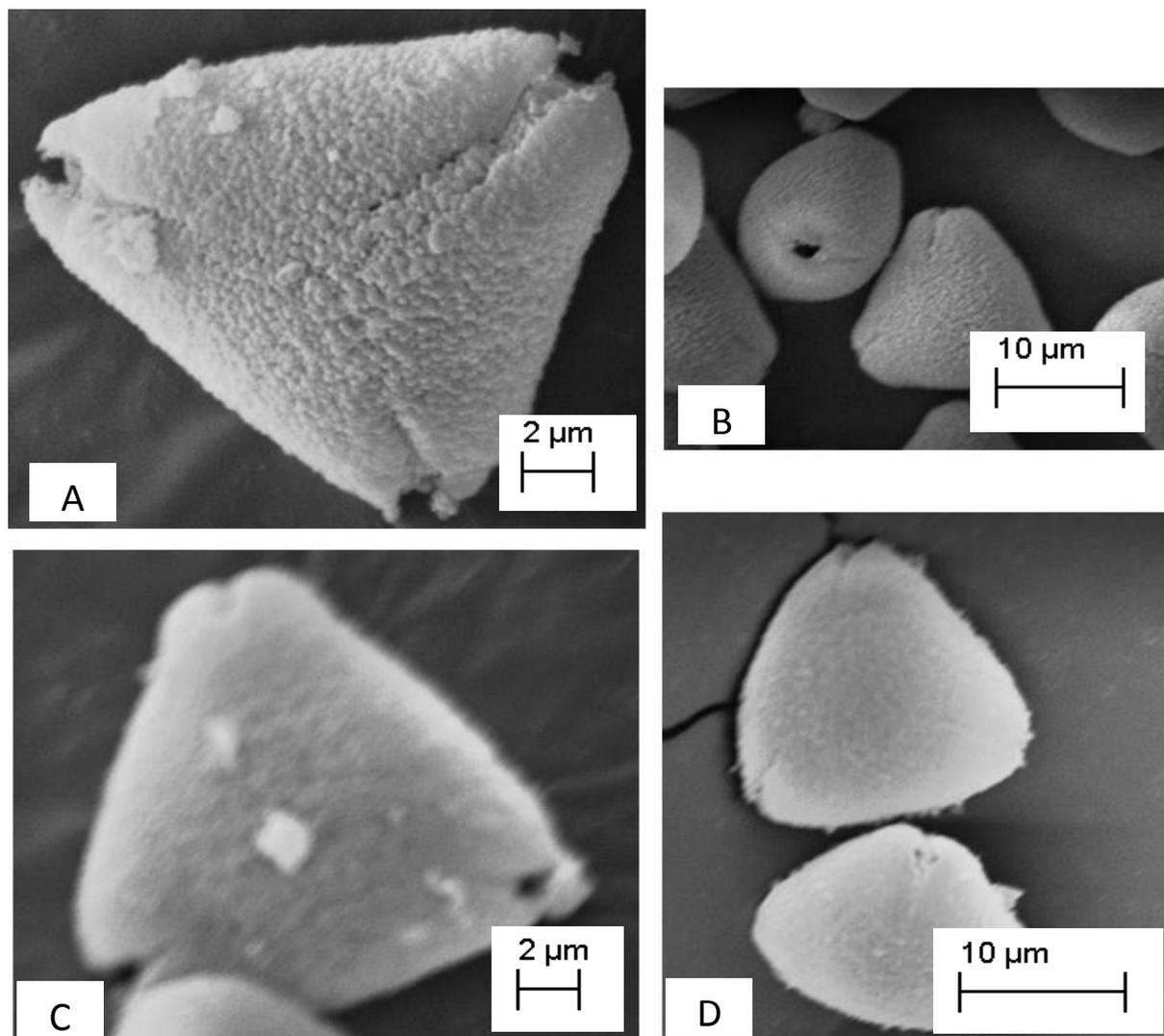


Figura 2. Morfologia dos grãos de pólen em microscopia eletrônica de varredura. A. *Campomanesia adamantium*; B. *Campomanesia pubescens* morfortipo 1; C. *Campomanesia pubescens* morfortipo 2; D. *Campomanesia pubescens* morfortipo 3.

Na análise da morfometria dos grãos de pólen, constatou-se diferença entre comprimento, Figura 3A, e largura, Figura 3B, dos grãos de pólen em vista Polar, e de comprimento, Figura 3C, e largura, Figura 3D, em vista Equatorial de *Campomanesia adamantium* com os três morfortipos de *Campomanesia pubescens*.

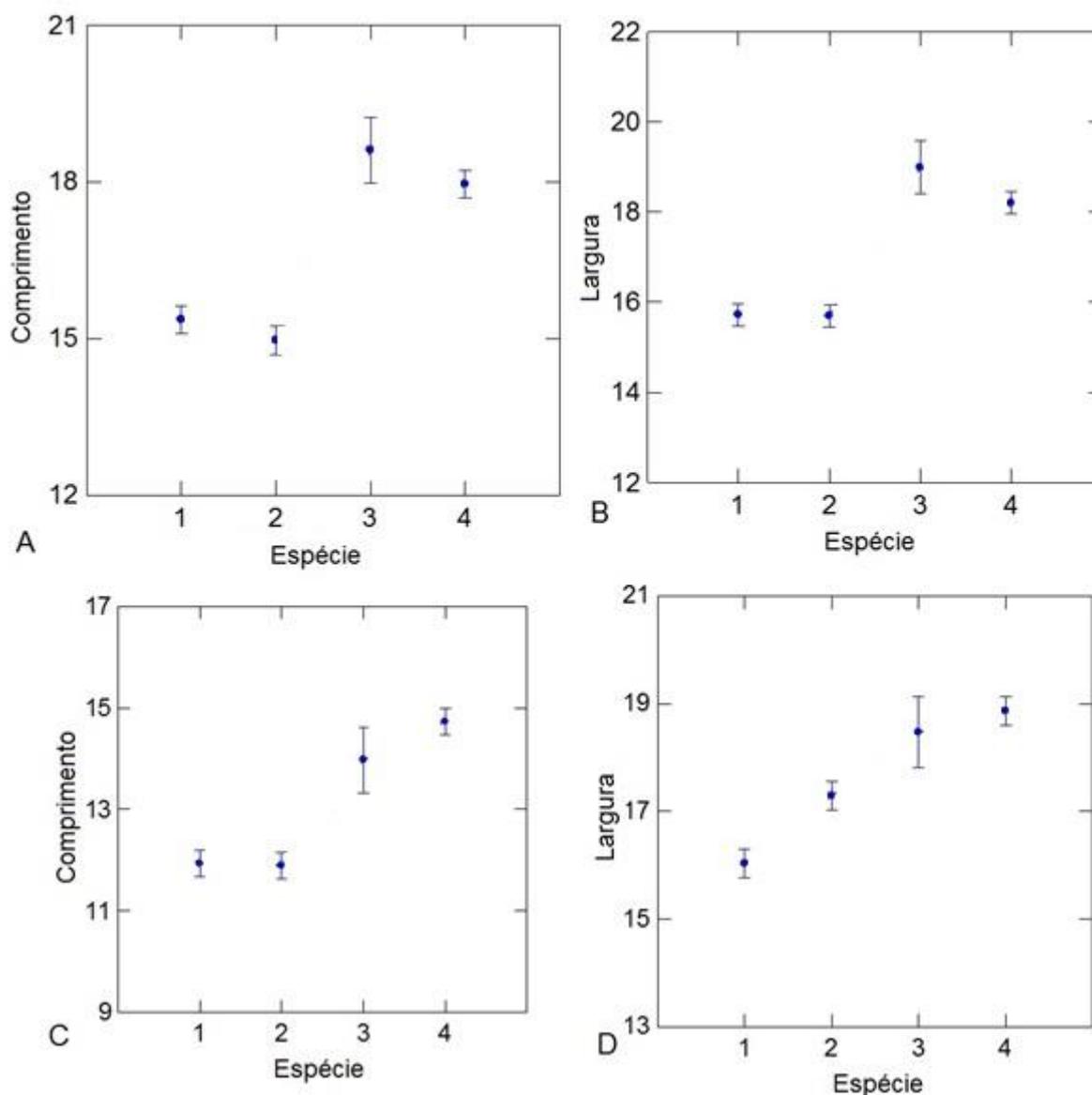


Figura 3. Comparação de médias da morfometria dos grãos de pólen de espécies de *Campomanesia*. A. Comprimento em vista Polar; B. Largura em vista Polar. C. Comprimento em vista Equatorial; D. Largura em vista Equatorial; Sendo: 1 = *Campomanesia adamantium*; 2 = *Campomanesia pubescens* 1; 3 = *Campomanesia pubescens* 2; 4 = *Campomanesia pubescens* 3.

As análises dos grãos de pólen revelaram formação de dois agrupamentos, sendo um formado por *Campomanesia adamantium* e pelo morfotipo1 de *Campomanesia pubescens* e o outro formado pelos morfotipos 2 e 3 de *Campomanesia pubescens*, indicando similaridade entre eles.

A espécie *Campomanesia adamantium* está mais próxima do morfotipo 1 de *Campomanesia pubescens*, não sendo observada diferença para a largura dos grãos de pólen em vista Polar. Morfologicamente, essas plantas também são semelhantes,

apresentando sépalas arredondadas, presença de duas bractéolas na base dos botões, menores que ele, e brácteas escamiformes na base dos pedúnculos, diferindo somente na presença de tricomas, ausentes em *Campomanesia adamantium* e diminutos no morfotipo 1 de *Campomanesia pubescens* (Amaral *et al.*, 2016). Assim como as plantas dos morfotipos 2 e 3 de *Campomanesia pubescens* que também são muito semelhantes, com sépalas triangulares, bractéolas na base dos botões, maiores que ele, e brácteas foliformes na base dos pedúnculos, com diferença na presença de uma glândula no ápice da antera, encontrada somente no morfotipo 3 (Amaral *et al.*, 2016), sugerindo a possibilidade de cruzamento entre esses morfotipos com *Campomanesia adamantium*, contribuindo para o surgimento de caracteres intermediários, através da formação de híbridos, assim como observado em espécies simpátricas de palmeiras do gênero *Euterpe* (Wendt *et al.*, 2011).

Barth & Barbosa (1972) concluíram que as plantas da família Myrtaceae representam um grupo estenopalino, em que as diferenças na morfologia polínica são limitadas a caracteres secundários, como a dimensão dos grãos, de pequeno a médio. Como todos os grãos de pólen dos grupos analisados neste estudo têm tamanho pequeno, isto pode facilitar a polinização cruzada, intra e interespecífica.

Houve proximidade entre a espécie *Campomanesia adamantium* e o morfotipo 1 de *Campomanesia pubescens*, assim como dos morfotipos 2 e 3 de *Campomanesia pubescens* (Figura 4).

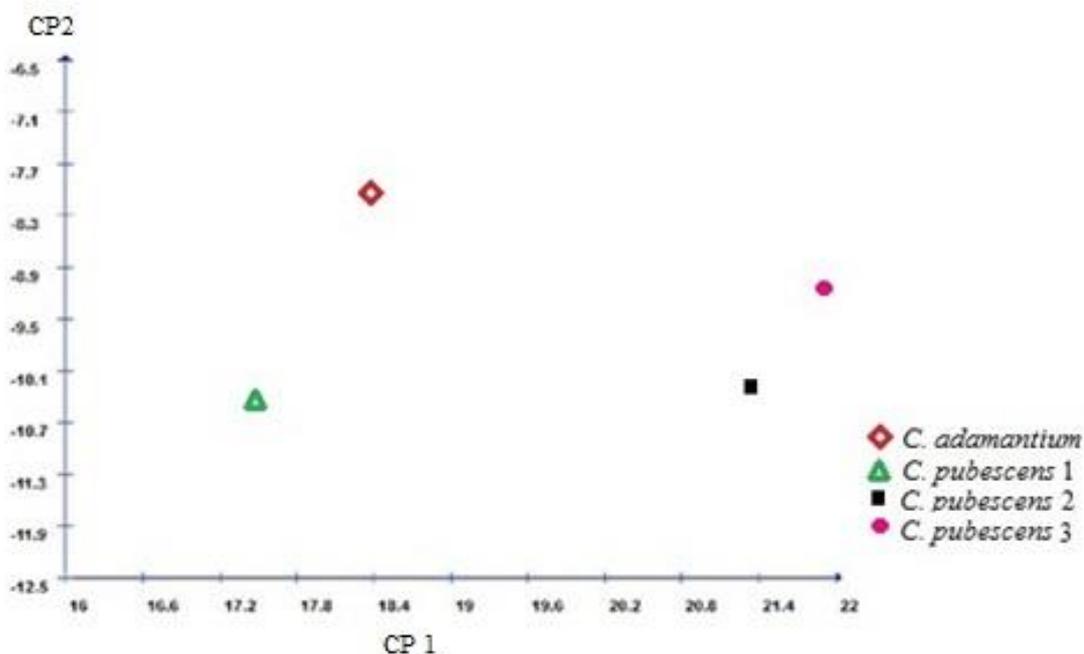


Figura 4. Análise multivariada de dispersão dos valores de morfometria dos grãos de pólen, em duas dimensões, da espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos da espécie *Campomanesia pubescens*.

Tendo por base a morfologia dos grãos de pólen, pode-se inferir que a espécie *Campomanesia adamantium* e o morfotipo 3 da espécie *Campomanesia pubescens* são as espécies mais distantes e que os morfotipos 1 e 2 de *Campomanesia pubescens* podem ser híbridos entre elas. Esses dados confirmam os resultados encontrados por Amaral *et al.* (2016) para caracteres morfológicos da planta, em que características como ausência de tricomas em *Campomanesia adamantium* e presença de uma glândula no ápice da antera no morfotipo 3 de *Campomanesia pubescens* fazem com que sejam mais distantes dos demais morfotipos que apresentam características morfológicas intermediárias.

O processo de hibridação ocorre naturalmente em algumas espécies, como em duas espécies de palmeiras, *Euterpe spiritosantensis* e *Euterpe edulis* (Wendt *et al.*, 2011), tendo sido constatados eventos de hibridação entre as duas espécies, com especificidades morfológicas e reprodutivas importantes, similares ao observado em *Campomanesia*. Os autores também reconheceram as dificuldades na identificação de espécies de palmeiras com base somente em caracteres morfológicos, indicando necessidade de estudos complementares para auxiliar a correta diferenciação das espécies.

Atualmente, a maioria das espécies é definida com base em caracteres morfológicos, devido à falta de informações filogenéticas e de comportamento reprodutivo, com isso, descontinuidades morfológicas se refletem em limites para a espécie (Wendt *et al.*, 2011), sendo necessários estudos complementares para definir onde termina a plasticidade fenotípica e se inicia a diferenciação entre as espécies.

3.3.3. Caracterização molecular

A reação de PCR apresentou padrões de amplificação de excelente qualidade (Figura 5).

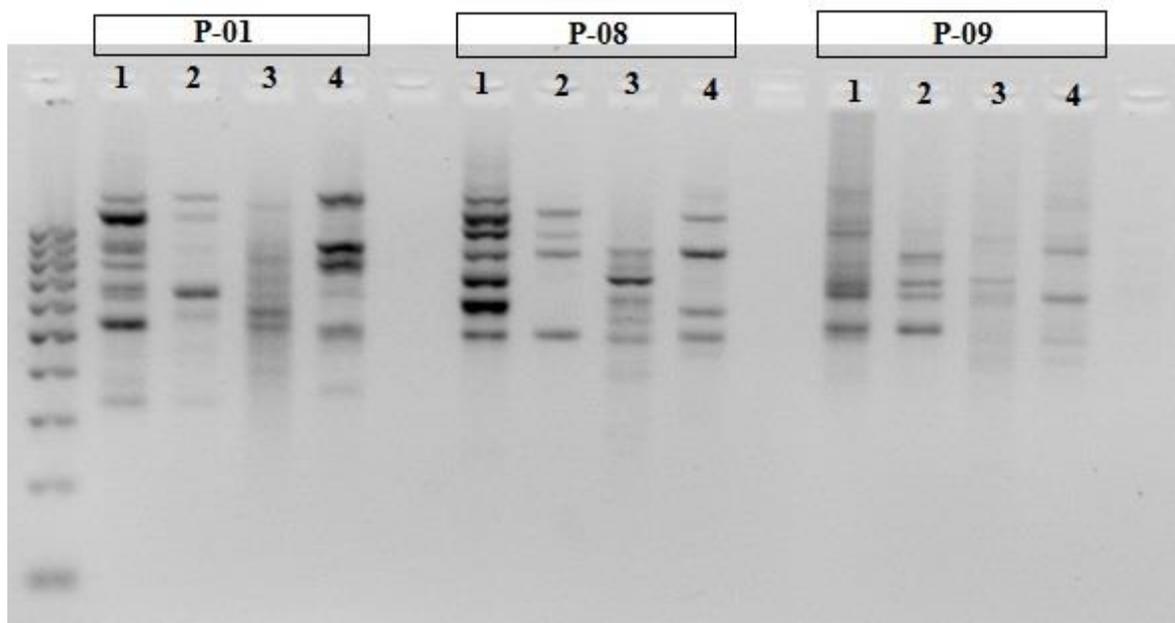


Figura 5. Padrão de amplificação de três primers ISSR. Sendo: 1. *C. adamantium*; 2. *C. pubescens* 1; 3. *C. pubescens* 2; 4. *C. pubescens* 3.

Os treze primers ISSR utilizados produziram um total de 149 amplificações entre as espécies estudadas, tendo uma média de 11,46 bandas por ISSR, e nível de polimorfismo correspondente a 77,18% (Tabela 1), semelhante ao encontrado por Assis *et al.* (2013), utilizando marcador RADP, obteve taxa de polimorfismo superior a 60% em populações de *Campomanesia* spp.

Tabela 1. Descrição dos Primers ISSR, com seus respectivos números de Amplificações Polimórficas (AP), Amplificações Monomórficas (AM), Amplificações Totais (AT) e a porcentagem de Amplificações Polimórficas (%AP) utilizados para análise molecular da espécie *Campomanesia adamantium* e para os morfotipos de *Campomanesia pubescens*.

Nº	Primer	Tm	AP	AM	AT	% AP
1	(AC) ₉ T	46 °C	12	1	13	92,31
2	(AG) ₈ YC ⁽¹⁾	46 °C	06	5	11	54,55
3	(AG) ₈ YT	42 °C	11	1	12	91,67
4	(CA) ₇ YC	42 °C	11	3	14	78,57
5	(CA) ₇ YG	42 °C	05	2	07	71,43
6	(CA) ₈ G	46 °C	12	1	13	92,31
7	(CA) ₈ T	46 °C	12	1	13	92,31
8	(CT) ₈ GC	46 °C	07	4	11	63,64
9	(CTCT) ₄ RC	42 °C	11	1	12	91,67
10	(GA) ₈ YC	42 °C	06	4	10	60,00
11	(TC) ₈ G	42 °C	08	3	11	72,73
12	GAC(CAA) ₅	42 °C	09	2	11	81,82

13	TA(CAG) ₄	42 °C	05	6	11	45,45
			115	34	149	77,18

⁽¹⁾D, R, V e Y: Oligossacarídeos degenerados: D = G, A, T; R = A, G; V = G, C, A; Y = C, T.

Observou-se que a dissimilaridade entre a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos de *Campomanesia pubescens*, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard, variou de 0,51 a 0,60, com média de 0,55. Esta variação, apesar de pequena, revela diferenças moleculares entre as espécies.

Um ponto que merece destaque foi a maior similaridade entre a espécie *Campomanesia adamantium* com o morfotipo 1 de *Campomanesia pubescens* e a maior dissimilaridade destes com os morfotipos 2 e 3 de *Campomanesia pubescens*, com base nas coordenadas principal, Figura 6, confirmando os resultados encontrados na morfometria dos grãos de pólen.

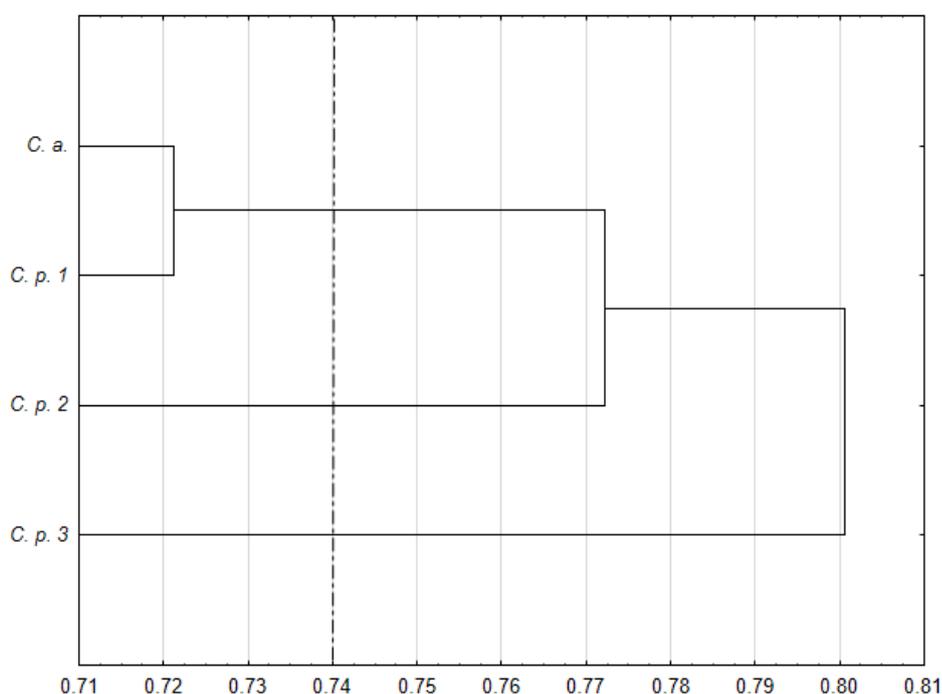


Figura 6. Dendrograma obtido com base na matriz de dissimilaridade gerada a partir de 115 ampliações polimórficas para a espécie *Campomanesia adamantium* e os três morfotipos de *Campomanesia pubescens*. Linha pontilhada vertical: ponto de corte no dendrograma.

Essa divergência genética confirma os resultados de Amaral *et al.* (2016), confirmando a maior proximidade de *Campomanesia adamantium* com o morfotipo 1

de *Campomanesia pubescens* e seu maior distanciamento para com os morfotipos 2 e 3 de *Campomanesia pubescens*.

As descrições existentes para a espécie *Campomanesia pubescens* (Landrum, 1986; Landrum & Kawasaki, 1997) são mais compatíveis com o morfotipo 2, porém a existência de uma glândula no ápice da antera, observada no morfotipo 3, faz com que ela se distancie mais das outras. Com isso, é aceitável supor que a espécie *Campomanesia adamantium* e o morfotipo 2 de *Campomanesia pubescens* sejam “espécies” e que as demais sejam híbridos entre elas.

A ausência de barreiras de isolamento eficazes pode levar à formação de híbridos na natureza, como observado em diferentes espécies de bromélias (Wendt *et al.*, 2008). No caso das espécies de *Campomanesia* analisadas, não foi observado nenhum tipo de barreira de isolamento reprodutivo que pudesse impedir essa hibridação, já que são simpátricas, florescem simultaneamente e suas flores ficam viáveis ao mesmo tempo, não existindo barreira temporal para cruzamento entre elas, sugerindo cruzamento entre as espécies e a formação de híbridos, levando a um possível processo de especiação, que merece ser mais bem estudado.

3.4. CONCLUSÕES

As análises da morfologia dos grãos de pólen, em microscopia eletrônica de varredura, não mostram diferenças entre a espécie *Campomanesia adamantium* e os morfotipos de *Campomanesia pubescens* estudados. As análises da morfometria dos grãos de pólen indicaram que todos apresentam o mesmo padrão de tamanho, com agrupamento entre *Campomanesia adamantium* e o morfotipo 1 de *Campomanesia pubescens* entre os morfotipos 2 e 3 de *Campomanesia pubescens*.

A utilização dos 13 primers ISSR reforçou o agrupamento existente entre elas, sendo a espécie *Campomanesia adamantium* e o morfotipo 3 de *Campomanesia pubescens* os mais distantes, com os morfotipos 1 e 2 apresentando-se entre eles, com caracteres intermediários, podendo se tratar de híbridos.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral É.V.E. de J., Reis E.F. dos, Ressel K., Pinto J.F.N. (2016) Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia* Ruiz & Pavon (Myrtaceae). Revista Agrotecnologia 7:42–52.

- Arantes A.A., Monteiro R. (2002) A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG, Brasil. *Lundiana* **3**:111–127.
- Assis E.S. de, Reis E.F. dos, Pinto J.F.N., Contim L.A.S., Dias L.A.S. (2013) Genetic diversity of gabirola based on random amplified polymorphic DNA markers and morphological characteristics. *Genetics and molecular research: GMR* **12**:3500–3509.
- Baez P., Riveros M., Lehnebach C. (2002) Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. *New Zealand Journal of Botany* **40**:671–678.
- Barth O.M. (1965) Catálogo Palinológico. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **63**:133–162.
- Barth O.M., Barbosa A.F. (1972) Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional, XV - Myrtaceae. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **70**:467–496.
- Bauermann S.G., Neves P.C.P. das (2005) Métodos de estudos em palinologia do quaternário e de plantas atuais. *Cadernos La Salle XI* **2**:99–107.
- Biffin E., Lucas E.J., Craven L.A., Ribeiro I., Harrington M.G., Crisp M.D. (2010) Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. :79–93.
- Borém R.A.T. (2009) Biologia reprodutiva de *Campomanesia pubescens* Mart. (Myrtaceae) uma espécie arbustiva dos Cerrados do Brasil e sua ocorrência no Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito. *Anais III Congresso Latino Americano de Ecologia*:1–4.
- Brandão M.M. (2008) *Diversidade genética de Myrcia splendens (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema de corredor-fragmento semidecíduais no Sul de Minas*. Universidade Federal de Lavras
- Cancelli R.R., Evaldt A.C.P., Bauermann S.G. (2007) Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul - Parte I. *Pesquisas, Botânica* **58**:347–374.
- Carvalho R. dos S., Pinto J.F.N., Reis E.F., Santos S.C., Dias L.A. dos S. (2012) Variabilidade genética de Cajuzinho-do-Cerrado (*Anacardium humile* ST. HILL.) por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* **34**:227–233.
- Chia G.S., Lopes R., Cunha R.N.V. da, Rocha R.N.C. da (2009) Germinação in vitro de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. *Ciência Rural* **39**:1569–1571.

- Cordeiro G.D. (2015) “*Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do cambuci (Campomanesia phaea (O. Berg) Landrum 1984 - Myrtaceae)*”. Universidade de São Paulo
- Costa I.R. Da, Forni-Martins E.R. (2006a) Chromosome studies in species of Eugenia, Myrciaria and Plinia (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. *Australian Journal of Botany* **54**:409–415.
- Costa I.R. da, Forni-Martins E.R. (2006b) Chromosome studies in Brazilian species of Campomanesia Ruiz & Pávon and Psidium L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia* **59**:7–13.
- Cruz C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy* **35**:271–276. [online] URL: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/21251>
- Dafni P.G.K., Husband B.C. (2005) *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ltd., Cambridge, Ontario, Canada.
- Franzon R.C., Raseira M. do C.B., Júnior A.W. (2006) Germinação in vitro de pólen de gabirobeira (Campomanesia xanthocarpa Berg). *Ceres* **53**:129–134.
- Landrum L.R. (1986) Flora Neotropica: Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae). The New York Botanical Garden Press **45**:1–178.
- Landrum L.R., Kawasaki M.L. (1997) The Genera of Myrtaceae in Brazil: An Illustrated Synoptic Treatment and Identification Keys. *Brittonia* **49**:508–536.
- Miranda E.A.G.C., Boaventura-Novaes C.R.D., Braga R.S., Reis E.F. dos, Pinto J.F.N., Telles M.P. de C. (2016) Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic Campomanesia (Myrtaceae) species. *Genetics and molecular research: GMR* **15**:1–6.
- Morran L.T., Parmenter M.D., Phillips P.C. (2009) Mutation load and rapid adaptation favour outcrossing over self-fertilization. *Nature* **462**:350–352. [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08496> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847164>
- Oliveira M.I.U. de, Funch L.S., Landrum L.R. (2012) Flora da Bahia: Campomanesia (Myrtaceae). *SITIENTIBUS Série Ciências Biológicas* **12**:91–107. [online] URL: <http://pkp.uefs.br/ojs/index.php/sitentibusBiologia/article/view/115>
- Proença C.E.B., Gibbs P.E. (1994) Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist* **126**:343–354.

- Silva C.I., Ballesteros P.L.O., Palmero M.A., Bauermann S.G., Evaldt A.C.P., Oliveira P.E. (2010) *Catálogo Polínico: Palinologia aplicada em estudos de conservação de abelhas do gênero Xylocopa no Triângulo Mineiro*. EDUFU, Uberlândia.
- Sobral M., Proença C., Souza M., Mazine F., Lucas E. (2015) Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro [online] URL: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10307>
- Stanski C. (2014) *Catálogo polínico de espécies de Myrtaceae e Solanaceae da Região dos Campos Gerais - Paraná, Brasil*. Universidade Federal do Paraná
- Torezan-Silingardi H.M., Del-Claro K. (1998) Behavior of visitors and reproductive biology of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) in cerrado vegetation. *Journal of the Brazilian Association for the advancement of Science* **50**:281–284.
- Wendt T., Coser T.S., Matallana G., Guilherme F.A.G. (2008) An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **275**:31–41. [online] URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00606-008-0054-7> (accessed 20 August 2013).
- Wendt T., da Cruz D.D., Demuner V.G., Guilherme F.A.G., Boudet-Fernandes H. (2011) An evaluation of the species boundaries of two putative taxonomic entities of *Euterpe* (Arecaceae) based on reproductive and morphological features. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **206**:144–150. [online] URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036725301000112X> (accessed 20 August 2013).

4. CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a revista Journal of Seed Science)

ANÁLISE DE IMAGENS RADIOGRÁFICAS E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg (MYRTACEAE) COM DIFERENTES TEORES DE ÁGUA

RESUMO

As gabirobeiras têm sementes recalcitrantes, por isso, seu cultivo comercial é difícil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfologia interna das sementes de *Campomanesia pubescens*, com diferentes teores de água, por meio da análise de imagens de raios X, para verificar a influência na morfologia interna das sementes e da secagem na germinação e no desenvolvimento de plântulas no potencial fisiológico das sementes. Os frutos foram coletados na zona rural de Jataí, Goiás, e levados ao Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, para processamento. Para fixação dos teores de água, as sementes com teor de água inicial foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C até atingirem os teores de água pre-estabelecidos. Depois de secas, foram colocadas em suportes de acrílico para análise do teste de raios X, e em seguida, submetidas ao teste de qualidade. O teste de raios X foi eficiente na identificação e classificação de sementes de *Campomanesia pubescens*, segundo seu grau de enchimento ou formação interna, podendo ser uma ferramenta de auxílio da identificação de sementes vigorosas. A secagem pode afetar a estrutura interna e reduzir a germinação das sementes de *Campomanesia pubescens*.

Termos para indexação: gabirola, teste de raios X, qualidade fisiológica.

RADIOGRAPHIC ANALYSIS IMAGES AND GERMINATION OF SEEDS *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg (MYRTACEAE) WITH WATER LEVELS DIFFERENT

ABSTRACT

The gabirolas (*Campomanesia pubescens*) has recalcitrant seeds, that's why its commercial cultivation is difficult. The objective of this study was to evaluate the internal morphology of seed of *Campomanesia pubescens* with different water contents through the X-ray image analysis to check the influence on the internal morphology of the seeds and drying on germination and seedling development the physiological potential of seeds. The fruits were collected in rural Jataí, Goiás, and taken to the Federal Institute of Seed Laboratory Goiás, Rio Verde Campus, for processing. For fixing the water content, the seeds with an initial water content of 43% were kept in an oven with forced air circulation at 40 ° C to achieve the predetermined water content. Then dried, they were placed in plexiglass holders for analysis of X-ray test, then they returned to the seeds IF Goiano, Campus Rio Verde, to achieve the quality seed testing. The X-ray test was efficient in identifying and classifying seeds of *Campomanesia pubescens*, according to their degree of filling or internal training, and it can be a tool to aid the identification of vigorous seeds. Drying can affect the internal structure and reduce seed germination of *Campomanesia pubescens*.

Index terms: gabirola, X-ray test, physiological quality.

4.1. INTRODUÇÃO

No Brasil a família Myrtaceae apresenta 23 gêneros e 1034 espécies, sendo cerca de 800 endêmicas. Todas as espécies de Myrtaceae do Brasil apresentam frutos carnosos, com sementes envolvidas por polpa carnosa e rica em água, os embriões são facilmente observados, pois pouco ou nenhum endosperma está presente nas sementes maduras (LANDRUM; KAWASAKI, 1997), apresentando grande quantidade de água nas sementes maduras.

O gênero *Campomanesia* compreende 40 espécies, distribuídas em quase todo o território nacional, sendo 32 endêmicas (SOBRAL et al., 2015), como a espécie *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg, morfotipo 1 (AMARAL et al., 2016), que é endêmica do Brasil e encontrada em todo o centro-oeste e em alguns estados do Norte, Nordeste, Sudeste e Sul (SOBRAL et al., 2015) com grande potencial para cultivo.

Muitos autores classificaram as sementes de espécies de *Campomanesia* como recalcitrantes (DOUSSEAU et al., 2011; DRESCH et al., 2012; MELCHIOR et al., 2006; SANTOS; FERREIRA; ÁQUILA, 2004; SCALON et al., 2009), não tolerando a dessecação e o armazenamento a baixas temperaturas, pela formação de cristais de gelo no interior das células e perda da viabilidade.

A desidratação de sementes é uma característica importante para a ampliação do seu período de uso além da época de produção, contribuindo para a conservação da espécie (BARBEDO; BILIA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2002). A longevidade da semente é o período em que ela se mantém viva, capaz de germinar quando colocada em condições favoráveis, se não apresentar dormência, e isso varia em poucos dias para as sementes recalcitrantes, o que restringe seu prazo de utilização (FONSECA; FREIRE, 2003).

A avaliação da morfologia interna das sementes pode aumentar a identificação de problemas associados ao seu potencial fisiológico, servindo tanto como apoio aos programas de controle de qualidade, como para elucidação de dúvidas sobre a anormalidade de plântulas ou a presença de sementes não germinadas (LIMA et al., 2013).

O teste de raios X em sementes é um método rápido e não destrutivo indicado desde os anos 80 pela International Seed Testing Association (AMARAL et al., 2011). É de grande valia para um grande número de espécies por ser um teste não destrutivo, com

aplicação direta na identificação de danos internos das sementes e na seleção de lotes de melhor qualidade (CARVALHO et al., 2009).

Nessa técnica, as sementes são colocadas em um filme fotossensível, expostas a uma fonte de baixa energia de raios x, que atravessa a sementes, atingindo o filme e criando uma imagem latente (KOBORI; CICERO; MEDINA, 2012). Quando os raios x passam através da semente, a radiação é absorvida em vários graus, dependendo da espessura, densidade, composição da semente e do comprimento de onda da radiação, criando uma imagem permanente no filme radiográfico (LIMA et al., 2013). A eficiência do teste depende de procedimentos específicos para a espécie em estudo, como a determinação do melhor tempo e intensidade de radiação a que as sementes ficam expostas durante a execução do teste (MASETTO et al., 2007).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a morfologia interna e a germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*, com diferentes teores de água, por meio da análise de imagens de raios X.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, e no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras, MG.

Os frutos de *Campomanesia pubescens* foram coletados, de cerca de 50 plantas, no início do mês de novembro de 2014, em uma propriedade rural localizada no município de Jataí, Goiás (18° 12' 10'' S e 51° 44' 51'' W). Após, foram levados ao Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, onde foram processados manualmente e as sementes extraídas. As sementes foram imersas em solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) a 25%, na proporção de 1mL do composto para cada 100 mL de sementes, durante 48 horas (CARMONA; REZENDE; PARENTE, 1994) e lavadas em água corrente para retirada da mucilagem.

Para obtenção dos teores de água de 37%, 34%, 31% e 28% b.u., as sementes com teor de água inicial de 43% foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar a temperatura a 40 °C, até atingir os teores de água estabelecidos. A redução do teor de água das sementes foi acompanhada pela perda de massa de água. A pesagem das sementes foi feita periodicamente em balança analítica com resolução (0,001) e os cálculos foram feitos segundo metodologia adaptada de BRASIL (2009).

Em seguida, as sementes foram colocadas em suportes de acrílico, com fita dupla face, e enviadas ao Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, onde foram expostas a diversas intensidades de radiação (10, 25, 35, 45, 50 e 60 KV), em aparelho de raios X, Faxitron MX20. O padrão de raios X específico foi aquele que permitiu a visualização nítida da morfologia das sementes. As imagens foram salvas em CD para posterior análise.

O teste de raios X foi feito com 200 sementes por tratamento (teores de água), que foram avaliadas para a obtenção de imagens das estruturas internas e mensuração de possíveis danos. A disposição das sementes nos suportes de acrílico foi feita de forma a permitir melhor visualização do embrião e dos espaços internos vazios das sementes.

Após a exposição à radiação, as sementes foram enviadas ao Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, onde foi instalado o teste de germinação, ocorrendo quinze dias após a extração das sementes. A semeadura foi feita em caixas de plástico, tipo *gerbox*, sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada (BRASIL, 2009), contendo células individualizadas e numeradas, mantendo a sequência numérica, permitindo a identificação da semente e sua respectiva imagem, e colocadas para germinar em câmara de germinação do tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.), com 40% de umidade relativa média e fotoperíodo de 12 horas.

O efeito dos diferentes teores de água e das classes de morfologia interna foi avaliado pelo teste de germinação, sendo a avaliação feita no 14º dia, quando houve a estabilização no número de sementes com protrusão radicular, sendo este o critério utilizado para considerá-las germinadas. Os dados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas (BRASIL, 2009).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 4, sendo cinco teores de água e quatro classes de sementes, com quatro repetições de 50 sementes. A análise estatística foi feita por análise de variância e a comparação de médias, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), com o uso do programa Genes (CRUZ, 2013).

As sementes foram classificadas dentro de quatro classes de preenchimento predefinidas: sementes cheias, com a cavidade embrionária totalmente preenchida e com o embrião e os cotilédones bem formados; sementes mal formadas, com a cavidade embrionária não totalmente preenchida e com embrião e/ou cotilédones mal formados;

sementes danificadas, com algum dano na sua estrutura; e sementes vazias, com a cavidade embrionária sem preenchimento (MELO et al., 2009).

4.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das imagens de raios X permitiu observar a morfologia interna das sementes de *Campomanesia pubescens* e identificar sementes cheias (A), mal formadas (B), danificadas (C) e vazias (D) (Figura 1).

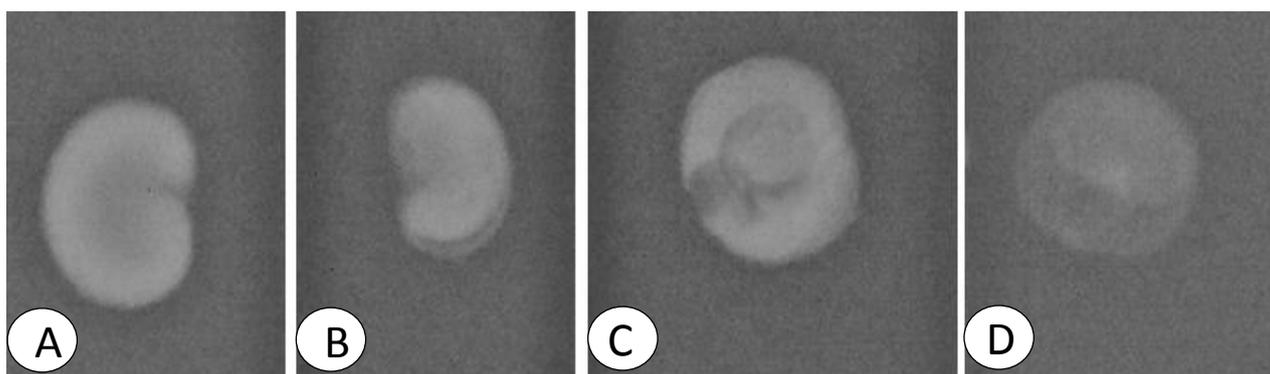


Figura 1. Classes de sementes de *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae), obtidas por análise de imagens radiográficas. Sementes cheias (A); Sementes mal formadas (B); Sementes danificadas (C); e Sementes vazias (D).

A intensidade de radiação que melhor proporcionou a visualização de imagens nítidas das sementes de *C. pubescens* foi de 18 KV e o tempo de exposição mais adequado foi em torno de 10 segundos de exposição. Para sementes de pitanga-do-mato (*Eugenia pleurantha*), a melhor combinação encontrada foi de 50 KV por 60 segundo em aparelho similar (MASETTO et al., 2007).

Pelas análises radiográficas, observou-se que mais de 50 % das sementes era da classe de sementes cheias, com embrião bem formado, seguida pela classe das sementes mal formadas e por uma pequena quantidade de sementes danificadas e vazias, independentemente do teor de água (Tabela 1). Somente no teor de água de 28%, a proporção de sementes mal formadas foi maior que a de sementes cheias, indicando efeito do teor de água sobre esta proporção, pois a redução do teor de água pode causar diminuição do tamanho do embrião, aumentando os espaços vazios internos nas sementes. Sementes mal formadas têm estruturas internas não íntegras, aumentando as chances de má formação de plântulas ou ausência de germinação (NUNES et al., 2014).

A identificação de sementes cheias, vazias ou mal formadas em *Lychnophora pinaster* Mart. (arnica), pelo uso de imagens, também foi eficiente para classificar as sementes viáveis (MELO et al., 2009).

Em um estudo com canela-batalha (*Cryptocarya aschersonima*), também foi encontrada maior porcentagem de sementes com espaços vazios internos ou mal formadas nas sementes dessecadas, sem implicar redução da germinação (MUXFELDT et al., 2012), assim como observado neste estudo. Isto pode ser explicado pelo efeito deletério que a secagem pode ter promovido na morfologia interna das sementes, o que também pode ser percebido nas diferenças de porcentagem de sementes cheias entre os diferentes teores de água (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de sementes (%S) e Porcentagem de germinação (%G) em sementes de *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) submetidas ao teste de raios X e classificadas dentro de classes nos diferentes teores de água das sementes. Sementes cheias (A); Sementes mal formadas (B); Sementes danificadas (C); e Sementes vazias (D).

	Classes	Teores de água				
		28%	31%	34%	37%	43%
%S	A	43,96 Db	72,22 Ba	74,00 Aa	64,50 Ca	74,26 Aa
	B	53,30 Aa	20,71 Db	21,50 Db	32,50 Bb	24,26 Cb
	C	2,20 Cc	5,05 Ac	4,00 ABc	2,50 BCc	0,99 Cc
	D	0,55 Ac	2,02 Ad	0,50 Ad	0,50 Ad	0,50 Ac
%G	A	29,00 Eb	64,50 Ba	54,50 Ca	35,50 Da	71,00 Aa
	B	32,50 Aa	13,50 Bb	10,00 CDb	10,50 CDb	12,00 BCb
	C	1,50 Ac	1,00 Ac	0,50 Ac	1,00 Ac	0,00 Ac
	D	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que as sementes cheias apresentaram taxa de germinação acima de 50%, exceto nos teores de 37 e 28%, nos quais a germinação foi inferior. A ocorrência de sementes cheias que não germinam pode ter sido causada pela presença de características invisíveis ao teste de raios X, como infecção por microrganismos ou deterioração completa (BURG et al., 1994).

Sementes de ipê-roxo, submetidas ao teste de raios X, com cavidade embrionária totalmente preenchida, ou com mais de 50% de preenchimento, originaram plântulas normais (AMARAL et al., 2011), assim como observado neste estudo. O tamanho do embrião e seu estágio de desenvolvimento podem ser características relacionadas ao desempenho das sementes, podendo ser definido com relação ao espaço

disponível na cavidade interna das sementes (SILVA et al., 2013). Tendo esse fato como referência, podemos afirmar que sementes cheias de *Campomanesia pubescens*, ou seja, sem espaços vazios internos, têm elevada qualidade fisiológica.

Segundo Dousseau et al. (2011), sementes de *Campomanesia pubescens* apresentam comportamento recalcitrante e são intolerantes à secagem, podendo ser essa uma das explicações para ocorrência de maiores médias de germinação das sementes com teores de água superiores a 31%. O teor de água elevado por ocasião da queda dos frutos e rápida germinação das sementes recalcitrantes também estão relacionados com a estratégia de rápido estabelecimento das plântulas (DRESCH et al., 2012; FINCH-SAVAGE; BLAKE, 1994).

A germinação das sementes mal formadas variou de 10 a 32,5%, sendo que as maiores médias de germinação se deram no teor de água de 28%, sendo estatisticamente superior aos demais. Este fato ocorre porque a má formação é menos restritiva, não comprometendo a viabilidade das sementes. Sementes de mamona (*Ricinus communis*), parcialmente completas, também germinaram após análise de imagens de raios x (CARVALHO; ALVES; OLIVEIRA, 2010), porém, sementes de capitão-do-campo (*Terminalia argentea*), mal formadas, tiveram germinação zero (GOMES et al., 2014), indicando que essa característica é específica e deve ser testada para as diferentes espécies de plantas.

No teor de água de 28%, a germinação das sementes mal formadas esteve próxima de 50% do total de sementes classificadas nessa categoria, novamente reforçando a ação deste teor de água sobre a categoria de sementes mal formadas. Um trabalho com canela-batalha (*Cryptocaria aschersoniana*) (MUXFELDT et al., 2012) também relaciona a existência de espaços vazios internos nas sementes com a redução do teor de água.

Com isso, notamos que espaços vazios pequenos no interior das sementes podem não comprometer seu desempenho fisiológico. O tamanho do embrião e seu estágio de desenvolvimento podem ser características relacionadas ao desempenho das sementes, podendo ser definidos com relação ao espaço disponível na cavidade interna das sementes (SILVA et al., 2013).

Cerca de um por cento das sementes com algum tipo de dano na sua estrutura foi capaz de germinar, sendo estatisticamente inferior às demais classes. Em duas variedades de sementes de feijão, a percentagem de germinação ficou entre 42,5% e

13% em sementes com deformação no embrião(CARVALHO; ALVES; OLIVEIRA, 2010), mostrando que é uma característica específica.

As sementes vazias não germinaram, como já era esperado, pois não tinham embrião e nem endosperma no seu interior, devendo ser descartadas, assim como as sementes com má formação e danos severos, que comprometem o desempenho e uniformidade dos lotes de sementes. A eliminação de sementes mal formadas, danificadas e/ou vazias também foi recomendada pela avaliação da morfologia interna de sementes de *Terminalia argentea* pelo teste de raios X em programas de produção de mudas nativas visando a assegurar um bom desempenho germinativo (GOMES et al., 2014).

Como as classes de sementes cheias e mal formadas foram mais representativas, Tabela 1, constatou-se que no teor de água de 28% houve maior germinação nas sementes mal formadas, mas para os demais teores de água, a porcentagem de germinação foi maior nas sementes cheias (Figura 2).

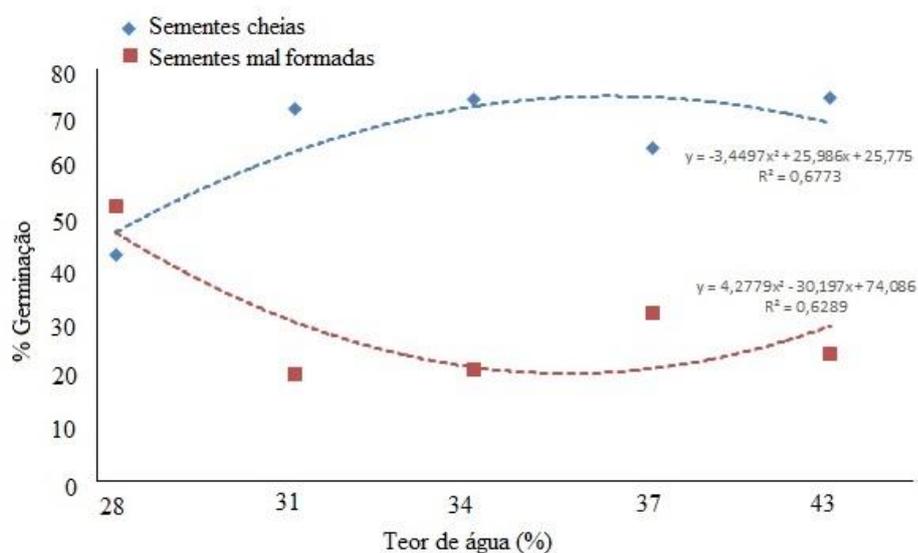


Figura 2. Análise de regressão da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens* classificadas como cheias e mal formadas com diferentes teores de água.

Apesar de ocorrer germinação em sementes mal formadas, esse percentual foi baixo, ficando menor que 50%, assim como observado em outras espécies como *Cedrela fissilis* (MASETTO; FARIA; QUEIROZ, 2008), *Lychnophora pinaster* (MELO et al., 2009) e *Ricinus communis* (CARVALHO; ALVES; OLIVEIRA, 2010), podendo-se dizer que o uso da técnica de análise de imagens por raios X é promissora,

colaborando com a seleção de sementes de alta qualidade e, conseqüentemente, no processo de formação de mudas (LIMA et al., 2013; PINTO et al., 2012).

4.4. CONCLUSÕES

O teste de raios X foi eficiente na identificação e classificação de sementes de *Campomanesia pubescens*, segundo seu grau de enchimento ou formação interna, podendo ser uma ferramenta de auxílio da identificação de sementes vigorosas.

A secagem pode afetar a estrutura interna e reduzir a germinação das sementes de *Campomanesia pubescens*.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, É. V. E. DE J. et al. Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia* Ruiz & Pavon (Myrtaceae). **Revista Agrotecnologia**, v. 7, n. 1, p. 42–52, 2016.
- AMARAL, J. B. DO et al. Teste de raios X para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 601–607, 2011.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 431–439, 2002.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério ed. Brasília: [s.n.].
- BURG, W. J. VAN DER et al. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society of Horticultural Sciences**, v. 119, n. 2, p. 258–263, 1994.
- CARMONA, R.; REZENDE, L. D. P.; PARENTE, T. V. Extração química de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* CAMB.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, p. 31–33, 1994.
- CARVALHO, M. L. M. DE et al. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 221–227, 2009.
- CARVALHO, M. L. M. DE; ALVES, R. A.; OLIVEIRA, L. M. DE. Radiographic analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 170–175, 2010.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and

- quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271–276, 2013.
- DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1362–1368, 2011.
- DRESCH, D. M. et al. Germinação de sementes de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg em diferentes temperaturas e umidades do substrato. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 40, n. 94, p. 223–229, 2012.
- FINCH-SAVAGE, W. E.; BLAKE, P. S. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. **Seed Science Research**, v. 4, n. 2, p. 127–133, 1994.
- FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: Problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297–303, 2003.
- GOMES, K. B. P. et al. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Terminalia argentea* (Combretaceae) pelo teste de raios X. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 45, n. 4, p. 752–759, 2014.
- KOBORI, N. N.; CICERO, S. M.; MEDINA, P. F. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 125–133, 2012.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The Genera of Myrtaceae in Brazil: An Illustrated Synoptic Treatment and Identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508–536, 1997.
- LIMA, L. K. S. et al. Utilização de técnicas na avaliação de sementes por imagem. **Acsa**, v. 9, n. 3, p. 1–6, 2013.
- MASETTO, T. E. et al. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 170–174, 2007.
- MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; QUEIROZ, S. E. E. Avaliação da qualidade de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* - Meliaceae) pelo teste de raios X. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1708–1712, 2008.
- MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. - Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 141–150, 2006.
- MELO, P. R. B. DE et al. Aplicação do teste de raios X no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 146–154, 2009.

- MUXFELDT, R. E. et al. Utilização do teste de raios X na avaliação dos efeitos da dessecação e infestação em diásporos de canela-batalha - *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Cerne**, v. 18, n. 4, p. 657–666, 2012.
- NUNES, R. T. C. et al. Análise de imagens na avaliação da qualidade fisiológica de sementes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5, p. 84–90, 2014.
- PINTO, T. L. F. et al. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 42, n. 3, p. 310–316, 2012.
- SANTOS, C. M. R. DOS; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 13–20, 2004.
- SCALON, S. D. P. Q. et al. Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb.: efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 96–103, 2009.
- SILVA, V. N. et al. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca selowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1158–1169, 2013.

5. CAPÍTULO III

(Normas de acordo com a revista Journal of Plant Interactions)

Avaliação do crescimento e estrutura anatômica radicular de *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg (Myrtaceae) sob diferentes concentrações de alumínio

Resumo

A acidez do solo é um dos principais fatores que limitam a produção agrícola, devido à elevada saturação de alumínio no solo. Com isso, objetivou-se avaliar o crescimento radicular e a estrutura anatômica das raízes de *Campomanesia pubescens*, submetidas a diferentes concentrações de alumínio, crescidas em solução nutritiva simples e completa. O experimento foi conduzido em sistema hidropônico, utilizando solução simples e completa como meio de cultivo. Observou-se que, tanto em solução nutritiva simples como em completa, os resultados de alongação radicular relativa e a taxa de crescimento radicular foram decrescentes com o aumento da dose de alumínio. O aumento da área marcada com morin em células do parênquima indica essas áreas como alvo da toxidez do alumínio. Conclui-se que a espécie mostrou sensibilidade ao alumínio nas dosagens avaliadas, indicando que o estabelecimento dessas plantas pode ser comprometido em solos ácidos, com concentrações tóxicas de alumínio.

Palavras-chave: crescimento radicular, fitotoxicidade, gabirola.

Evaluation of growth and root anatomical structure of *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O.Berg (Myrtaceae) under different concentrations of aluminum

Abstrat

Soil acidity is one of the main factors limiting agricultural production due to high aluminum saturation in the soil. This paper aimed to evaluate root growth and anatomical structure of *Campomanesia pubescens* root, subjected to different concentrations of aluminum, grown in simple and complete nutrient solution. The experiment were grown hydroponically using simple and complete solution as the culture medium. It was observed that both in simple nutrient solution as complete results on root elongation and root growth rate was decreasing with increasing dose of aluminum. The increase in the area marked with morin in parenchymal cells indicates those areas as targets of aluminum toxicity. It was concluded that the species has shown sensitivity to aluminum in the evaluated doses, indicating that the establishment of these plants can be compromised in acidic soils with toxic concentrations of aluminum.

Keywords: root growth, phytotoxicity, gabirola.

5.1. Introdução

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre e sua toxicidade é um dos principais fatores que limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois afeta o crescimento radicular (Achary et al., 2008). Além disso, plantas associadas a solos ácidos apresentam déficit nutricional de P, K, Ca, Mg e Mo, pois ele interfere no processo de absorção, translocação e transporte de nutrientes (Freitas et al., 2006; Miguel et al., 2010).

Um local crítico de percepção da toxicidade do alumínio e expressão da resistência é o ápice radicular, em que genótipos resistentes ao alumínio, geralmente, acumulam menos alumínio no ápice da raiz do que os genótipos sensíveis (Cai *et al.*, 2011a). A toxidez do alumínio também pode causar alterações citológicas (Miguel et al., 2010), afetar a divisão e expansão celular, causar desorganização da membrana plasmática e inibir a absorção de íons (Rodrigues, 2015). Com isso, as plantas desenvolveram dois mecanismos de tolerância ao alumínio, no primeiro, mecanismo externo, não é permitida a entrada do alumínio na raiz; no segundo, mecanismo interno, o alumínio é imobilizado na parede celular (Cai *et al.*, 2011b). Plantas classificadas como hiperacumuladoras de alumínio apresentam mais de 1000 ppm desse metal em suas folhas (Jansen et al., 2002).

Nos trópicos, a acidez do solo é um dos principais fatores que limitam a produção agrícola, devido à elevada saturação de alumínio no solo (Cançado et al. 2001). Como exemplo de família com potencial para cultivo, temos a família Myrtaceae, com grande representatividade em todas as formações vegetais brasileiras, incluindo locais com presença de solos ácidos. É considerada acumuladora moderada de alumínio (Jansen et al., 2002). Nesta família, destaca-se a espécie *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg, morfotipo 1, que vem ganhando espaço para o cultivo comercial pelas características dos frutos, que são bastante apreciados pela população da região do Cerrado, que a consome ao natural ou na forma de sucos, doces, sorvetes e licores (Bardivieso et al., 2011).

Muitas plantas cultivadas têm seu desenvolvimento prejudicado pelos solos ácidos, sendo importante conhecer melhor os problemas causados pela toxidez do alumínio, e uma forma eficiente para avaliar esses efeitos nas raízes das plantas é o cultivo hidropônico, por permitir a visualização do desenvolvimento radicular sem prejudicar a planta. Cultivo hidropônico consiste no cultivo em solução aquosa, que

contém todos os macro e micronutrientes, em que as raízes estão em contato permanente com os nutrientes necessários ao desenvolvimento de uma planta (Peche, 2012).

Com isso, objetivou-se neste trabalho avaliar o crescimento e a estrutura anatômica radicular de *Campomanesia pubescens* sob diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva simples e completa.

5.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Melhoramento de Plantas da Regional Jataí (REJ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Os frutos foram coletados no campo experimental da REJ-UFG, onde existem acessos de *Campomanesia* coletados em 17 municípios do estado de Goiás, da região Sudoeste até o entorno do Distrito Federal. Destes acessos, foram selecionados e coletados apenas frutos de *C. pubescens*, que foram levados a um laboratório localizado no viveiro, onde foram despoldados e as sementes, semeadas em bandejas de polietileno de 128 células, contendo substrato Bioplant®, mantidas em casa de vegetação com irrigação programada.

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial (2 x 5), sendo duas soluções nutritivas (simples e completa) e cinco concentrações de alumínio (0, 150, 300, 600 e 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 3 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso com 3 plantas. Todos os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa Genes(Cruz 2013) e à análise de regressão.

5.2.1. Avaliação do crescimento radicular em solução nutritiva simples e completa

Após estabelecimento das plântulas, com cerca de 30 dias elas foram fixadas com algodão em tampas plásticas e colocadas em vasos contendo 1 litro de solução nutritiva preparada de acordo com metodologia proposta por Jacob Neto (1993) (Figura 1).

O tratamento com solução nutritiva simples foi conduzido utilizando 0,1 mM de Ca ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e cinco concentrações de Al (0, 150, 300, 600 e 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na forma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$. O tratamento com solução nutritiva completa de baixa força iônica foi conduzido utilizando 0,5 mM de N (NH_4NO_3); 0,2 mM de Ca ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$);

0,2 mM de Mg ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0,5 mM de K (K_2SO_4); 0,1 mM de P ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (FeNa) EDTA; $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Mn ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); $0,16 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (ZnSO_4); $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu (CuSO_4); $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Mo (MoO_3); e $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Co ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

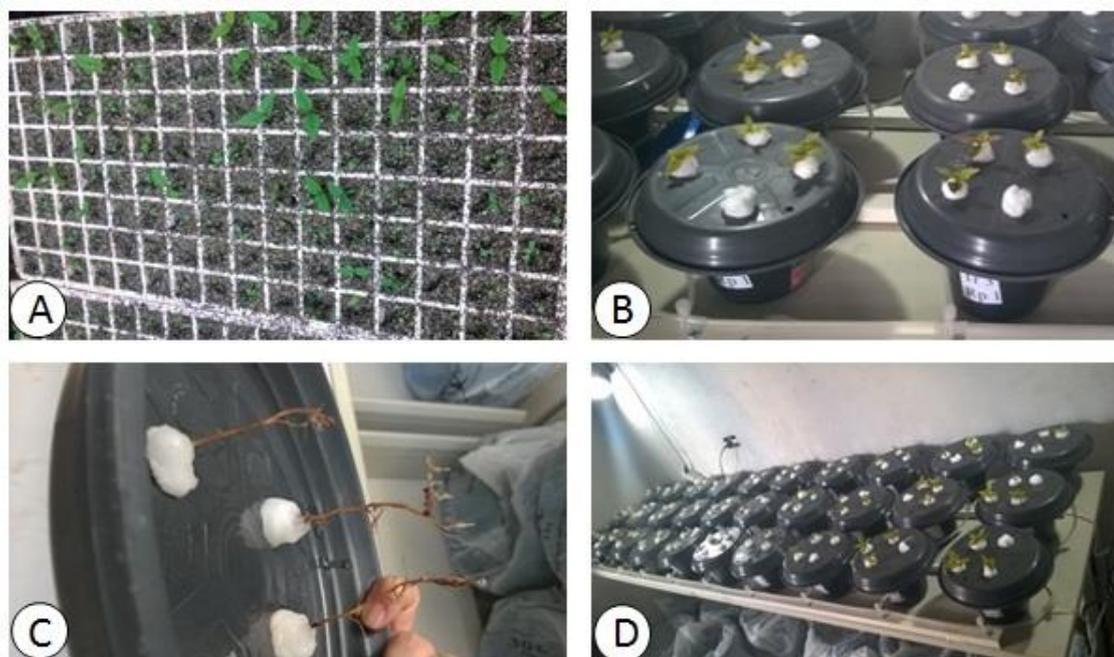


Figura 1. Germinação e instalação do sistema hidropônico para avaliação dos efeitos do alumínio em solução nutritiva nas raízes das plântulas de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*). A. Crescimento das plântulas de gabirobeira; B. Vasos com as plântulas fixadas com algodão; C. Raízes das plântulas de gabirobeira; E. Sistema hidropônico instalado.

Antes da imersão das raízes em solução, foi avaliado o comprimento da raiz principal. Após a transferência para a solução nutritiva, foram seguidas as mesmas avaliações para cálculo da taxa de crescimento radicular e alongação radicular relativa (ERR%), calculada de acordo com a equação proposta por Vasconcelos et al. (2002).

Parâmetros Avaliados:

- Taxa de crescimento radicular (TCR), pela equação $\text{TCR} = ((\text{Cf}/\text{Ci}) * 100) - 100$.

Em que:

Cf: comprimento radicular final;

Ci: comprimento radicular inicial;

- Alongação radicular relativa: (ERR).

$$\text{ERR} = \frac{(\text{CfAl}_x - \text{CiAl}_x)}{(\text{CfAl}_0 - \text{CiAl}_0)} \times 100$$

$$(\text{CfAl}_0 - \text{CiAl}_0)$$

Em que:

$CiAl_x$: comprimento radicular inicial medido antes da exposição à solução nutritiva no nível de “x” de Al;

$CfAl_x$: comprimento radicular final medido após n dias de exposição à solução nutritiva no nível “x” de Al;

$CiAl_0$: Comprimento radicular inicial antes da exposição à solução sem Al; e

$CfAl_0$: Comprimento radicular final medido após n dias de exposição à solução nutritiva sem Al.

A alongação radicular relativa avalia o comportamento do crescimento radicular das plântulas crescidas em contato com a solução de alumínio, em relação às plântulas crescidas em solução sem contato com alumínio, portanto, uma avaliação percentual do efeito do tratamento, retirando o crescimento natural das raízes (Silva, 2009). As raízes das plântulas foram mantidas em solução nutritiva (simples e completa), medidas a cada 02 dias, durante 60 dias.

Para o estudo da tolerância ao alumínio, foram utilizadas as concentrações de 0,150, 300, 600 e 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio, adicionadas na forma de $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O})$. Para maximizar a atividade do Al_3^+ , as soluções foram mantidas a pH 4,0, com ajustes diários, com uso de solução de 0,1 M de HCl e 0,1 M de NaOH. As plantas foram mantidas sob arejamento intermitente, e as soluções nutritivas, trocadas semanalmente.

5.2.2. Efeito do alumínio na anatomia dos ápices radiculares das plântulas de *Campomanesia pubescens* crescidas em solução nutritiva simples e completa

Para avaliar o efeito do alumínio na estrutura anatômica das raízes de *C. pubescens* crescidas em solução nutritiva simples e completa, amostras dos ápices radiculares das plântulas foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas e posteriormente conservadas em álcool 70%. As amostras foram seccionadas transversalmente com auxílio de micrótomo LPC para anatomia vegetal, e os cortes, submetidos à solução de 10 μM de morin, por 30 minutos (Eticha et al., 2005). Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada, montados entre lâmina e lamínula com água destilada e observados em microscópio de fluorescência da marca Olympus, modelo BX61 com câmera DP-72., do Laboratório de Anatomia

Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde. Para análise de fluorescência, utilizou-se cubo de excitação UV 330-385.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Avaliação do crescimento radicular em solução nutritiva simples e completa

Nas diferentes doses de alumínio, a comparação das taxas de crescimento radicular foi mais adequada com o modelo de equação de regressão potencial, tanto em solução nutritiva simples como em solução completa, indicando decréscimo no crescimento das raízes nas diferentes doses de alumínio testadas, Figura 2, sendo que a maior dose de alumínio testada (1200 μM) sempre apresentou maior sensibilidade, com taxa de crescimento radicular próxima a 0%.

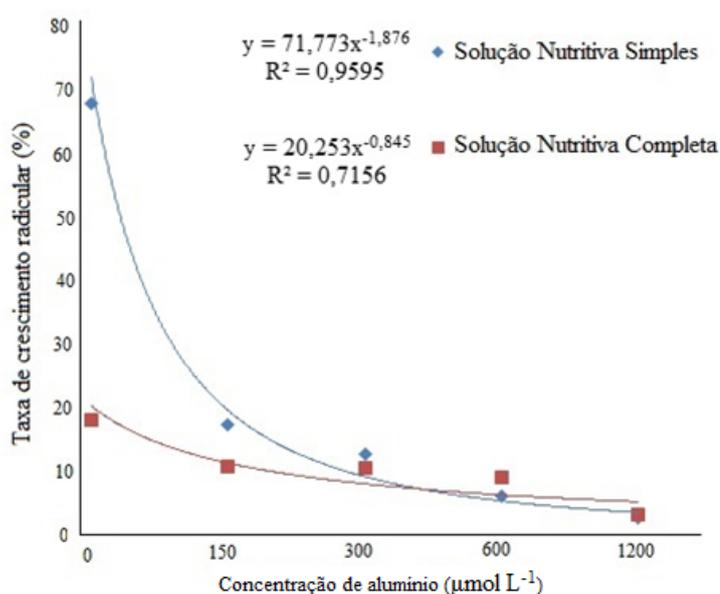


Figura 2. Taxa de crescimento radicular de plântulas de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), crescidas em cultivo hidropônico, com diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva simples e completa.

Em solução nutritiva simples, o tratamento controle, sem alumínio, apresentou taxa de crescimento radicular próximo a 70%, com decréscimo acentuado deste valor a partir da primeira dose de alumínio. Este fato indica sensibilidade da espécie a todas as doses de alumínio testadas. Em solução nutritiva completa, o tratamento controle também apresentou maior taxa de crescimento radicular, porém com valores menores de crescimento, com máxima próxima a 20% no tratamento controle.

Danos causados pela toxidez do alumínio são mais bem observados em plantas cultivadas em solução nutritiva simples, pois em solução nutritiva completa, há outros elementos que complexam o alumínio, diminuindo seus efeitos. A solubilidade do alumínio é dependente da concentração de P na solução, devendo esta concentração ser suficientemente reduzida para minimizar os complexos com Al (Pavan & Bingham, 1982).

Em *Eugenia dysenterica* cultivada em solução nutritiva simples, a taxa de crescimento radicular cresceu até a dose de 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio (Rodrigues, 2015), mostrando maior tolerância dessa espécie em relação à *C. pubescens*.

O comprimento total de raízes de soja diminuiu drasticamente com o aumento da concentração de alumínio em plantas cultivadas em solução nutritiva simples (Yu et al. 2011), assim como observado neste trabalho. Isto se deve ao fato de que o ápice radicular é o sítio de toxicidade do alumínio, afetando diretamente o crescimento da raiz (Vasconcelos Filho, 2014) induzindo uma rápida resposta da planta, que pode inibir o alongamento da raiz (Cai *et al.*, 2011).

Para a alongação radicular relativa (ERR%) o modelo de equação de regressão potência foi o mais adequado (Figura 3). No tratamento com solução nutritiva simples, os valores de ERR para os tratamentos com alumínio ficaram muito baixos, variando de 20 a 0%. Porém, na solução nutritiva completa, o decréscimo não foi tão acentuado, ficando com os valores próximos a 60% nas doses com até 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio e, novamente, a menor média de porcentagem foi apresentada na maior dose de alumínio testada, com a alongação radicular relativa ficando próxima de 20%.

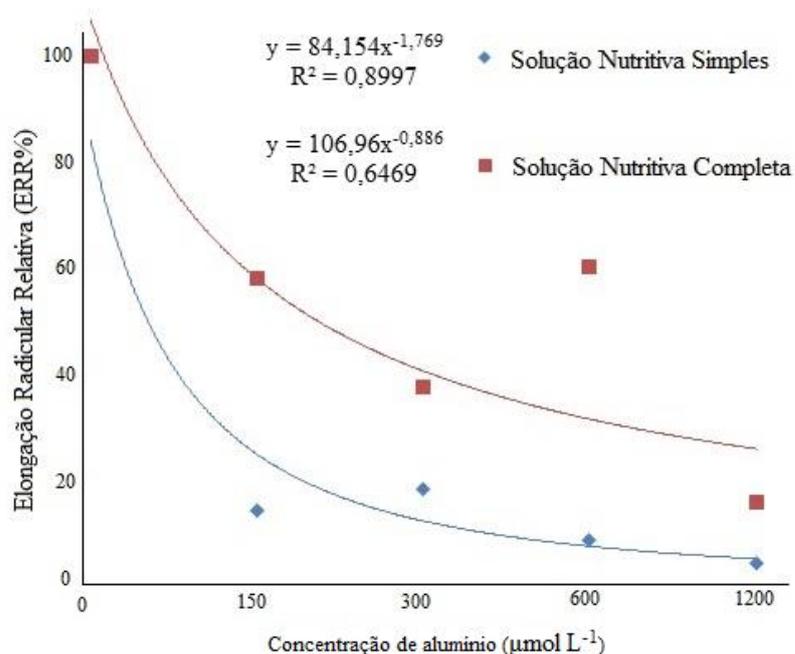


Figura 3. Elongação radicular relativa (ERR%) das raízes de plântulas de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), crescidas em cultivo hidropônico, com diferentes concentrações de alumínio, em solução nutritiva simples e completa.

A elongação radicular relativa de trigo diminuiu com o aumento da concentração de alumínio, chegando próximo a zero, quando a concentração de alumínio estava em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução nutritiva simples (Zheng et al. 2005), mas isto depende da cultivar. A elongação radicular relativa também decresceu com a adição de alumínio em solução simples de arroz (Vasconcelos et al., 2002), mostrando a sensibilidade das raízes destas espécies ao alumínio, assim como observado para *C. pubescens*.

O tratamento controle, sem adição de alumínio, sempre proporcionou maiores taxas de crescimento quando comparado aos tratamentos da maior dose de alumínio ($1200 \mu\text{mol L}^{-1}$). No tratamento de $1200 \mu\text{mol L}^{-1}$, houve maior sensibilidade, com taxas de desenvolvimento muito baixas e fitotoxicidade gradativa, mostrando a toxicidade do alumínio a *C. pubescens*. Isto indica que, mesmo em doses baixas de alumínio ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$), há menor desenvolvimento das raízes de *C. pubescens*.

A diminuição dos valores elongação radicular relativa nos tratamentos com alumínio prova a influência desse elemento no crescimento radicular de *C. pubescens*, podendo afetar a absorção de água, nutrientes, prejudicando o desenvolvimento da planta (Vasconcelos Filho 2014).

A composição da solução nutritiva interfere na atividade fitotóxica dos íons de alumínio, devido à interação com os radicais aniônicos e à formação de complexos solúveis (Vasconcelos Filho, 2014). Em solução nutritiva completa, o alumínio pode ter

formas insolúveis e com precipitados, o que atenua seu efeito tóxico na solução (Silva, 2009).

5.3.2. Efeito do alumínio na anatomia dos ápices radiculares das plântulas de *Campomanesia pubescens* crescidas em solução nutritiva simples e completa

A fluorescência verde do morin indicou presença de alumínio em algumas células parenquimáticas e no floema das raízes das plântulas cultivadas em solução nutritiva simples e completa (Figura 4). O morin é um fluorocromo que determina a localização do alumínio nos tecidos das raízes das plântulas, formando um complexo fluorescente com o alumínio.

Na ausência do alumínio, Figuras 4 A e B, constata-se ausência de fluorescência verde. Já na primeira dose de alumínio testada, $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, Figuras 4 de C e D, observa-se surgimento de fluorescência verde nos tecidos vasculares, principalmente no floema e em algumas células parenquimáticas. Na dose de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, a fluorescência é mais acentuada, Figuras 4 E e F, já na dose de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$, além da fluorescência, podemos observar desorganização celular e rompimento da epiderme, Figuras 4 G e H, assim como no tratamento com $1200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio (Figuras 4 I e J).

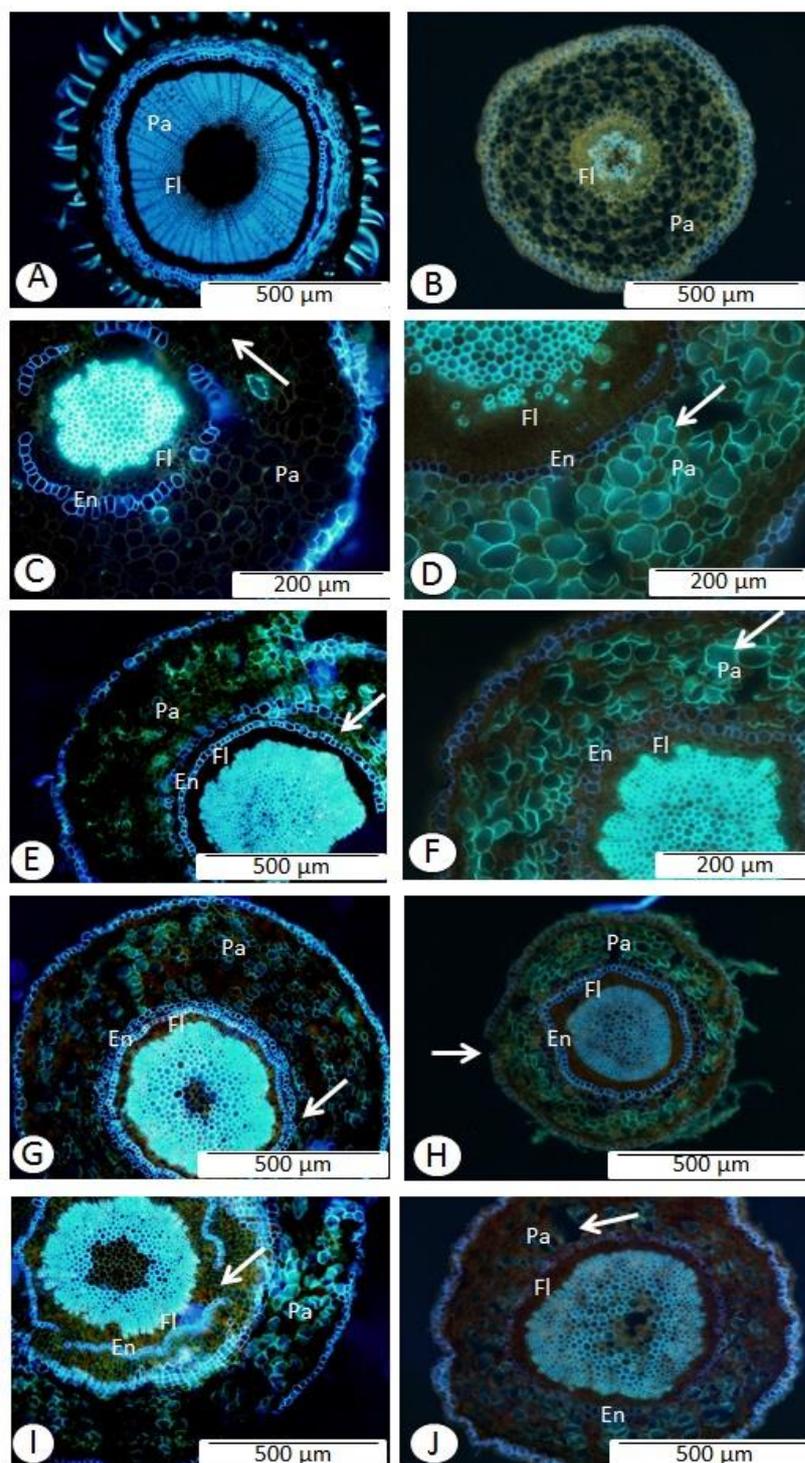


Figura 4. Micrografias de fluorescência de cortes transversais de raízes de plântulas de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*), tratadas com fluorocromo morin após terem sido mantidas em solução nutritiva com diferentes concentrações de alumínio. Fotos à esquerda são de plantas cultivadas em solução nutritiva simples e, fotos a direita são de plantas cultivadas em solução nutritiva completa. A fluorescência verde do morin-Al indica a presença de alumínio nos tecidos dos diferentes tratamentos, sendo: A e B – Sem Al; C e D – dose de 150 μM de Al; E e F – dose de 300 μM de Al; G e H – dose de 600 μM de Al; I e J – dose de 1200 μM de Al. En: endoderme; Fl: floema; Pa: parênquima. Setas: figuras C a F detalhe da área marcada com a fluorescência verde do morin-Al; figuras G a J detalhe da desorganização celular.

Podemos observar que, com o aumento da concentração de alumínio, ocorreu aumento da desorganização celular, assim como observado em trabalhos com soja (Yu et al., 2011). Existem especulações de que a toxicidade do alumínio em plantas sensíveis pode ser resultado de interações com vários sítios celulares diferentes, como parede celular, membrana plasmática e protoplasma (Silva, 2012). A exposição da raiz ao alumínio pode afetar a integridade da membrana, por sua interação com proteínas e lipídios, alterando sua permeabilidade (Britez, 2001). A desorganização celular, observada de forma acentuada nas maiores doses de alumínio, pode indicar morte da planta, pois as estruturas não conseguem desenvolver suas funções básicas para garantir o metabolismo da planta.

A presença do alumínio no interior das células vasculares pode indicar algum mecanismo de transporte para outras partes da planta. Contudo, esse mecanismo é desconhecido, e as informações existentes estão relacionadas às espécies acumuladoras de alumínio (Britez, 2001). Nestas espécies, a permeabilidade da membrana plasmática tem sido postulada como o local seletivo de toxicidade, porém não se compreende totalmente como o alumínio pode atravessar a membrana (Jansen et al., 2002), sendo necessários estudos que auxiliem o melhor entendimento.

5.4. Conclusões

O alumínio afetou o crescimento radicular de *Campomanesia pubescens*, reduzindo a taxa de crescimento radicular e a alongação radicular relativa, promovendo fitotoxicidade a partir de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio na solução.

A presença do morin em células do parênquima indica essas áreas como alvo da toxidez do alumínio, limitando o crescimento das raízes. A presença de alumínio nas células do floema indica a possibilidade de translocação deste elemento, podendo afetar outras partes da planta.

5.5. Referências bibliográficas

Achary VMM, Jena S, Panda KK, Panda BB. 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicol Environ Saf.* 70:300–310.

Amaral ÉVE de J, Reis EF dos, Ressel K, Pinto JFN. 2016. Descrição morfológica de duas espécies de *Campomanesia* Ruiz & Pavon (Myrtaceae). *Rev Agrotecnologia.*

7:42–52.

Bardivieso DM, Maruyama WI, Reis LL dos, Modesto JH, Rezende WE. 2011.

Diferentes substratos e recipientes na produção de mudas de guabiroba (*Campomanesia pubescens* O. Berg). *Rev Científica Eletrônica Agron.* 18:52–59.

Britez RM de. 2001. Efeito do alumínio em duas espécies arbóreas da planície litorânea da Ilha do Mel, PR. [place unknown]: Universidade Federal do Paraná.

Cai M, Wang F, Li R, Zhang S, Wang N, Xu G. 2011. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. *J Inorg Biochem* [Internet]. 105:966–971. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.04.004>

Cai M, Zhang S, Xing C, Wang F, Wang N, Zhu L. 2011. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. *Plant Sci* [Internet]. 180:702–708. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.017>

Cançado GMA, Carneiro NP, Carneiro AA, Purcino AÁC, Alves VMC, Parentoni SN, Souza IRP De, Paiva E. 2001. Novas perspectivas para a adaptação de culturas ao Cerrado. *Biotechnol Ciência e Desenvolv.:*56–61.

Cruz CD. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci Agron* [Internet]. 35:271–276. Available from: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/21251>

Eticha D, Staß A, Horst WJ. 2005. Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Jounal Exp Bot.* 56:1351–1357.

Freitas FA de, Kopp MM, Sousa RO de, Zimmer PD, Carvalho FIF de, Oliveira AC de. 2006. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciência Rural.* 36:72–79.

Jacob Neto J. 1993. The interations of H⁺/ OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutricion and aluminium effects. [place unknown].

Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E. 2002. Aluminum Hyperaccumulation in Angiosperms: A Review of Its Phylogenetic Significance. *New York Bot Gard.* 68:235–269.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27:137–138.

Miguel PSB, Gomes FT, Rocha, Wadson Sebastião Duarte da Martins CE, Carvalho CA De, Oliveira AV De. 2010. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES Rev.* 24:11–30.

- Pavan MA, Bingham FT. 1982. Toxidez de alumínio em cafeeiros cultivados em solução nutritiva. *Pesqui Agropecu Bras.* 17:1293–1302.
- Peche PM. 2012. Produção de mudas de goiabeira em sistema hidropônico e convencional. [place unknown]: Universidade Federal de Lavras.
- Rodrigues AA. 2015. Toxidez do alumínio em *Eugenia dysenterica* DC . e *Hancornia speciosa* Gomes. [place unknown]: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.
- Silva AC. 2009. Avaliação da tolerância ao alumínio em plântulas de maracujazeiro e mamoeiro. [place unknown]: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Silva S. 2012. Aluminium Toxicity Targets in Plants. *Jounal Bot.*:1–9.
- Vasconcelos SS, Rossiello ROP, Jacob-Neto J. 2002. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. *Pesqui Agropecu Bras.* 37:357–363.
- Vasconcelos Filho SC. 2014. Toxidez do alumínio em caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.). [place unknown]: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Yu HN, Liu P, Wang ZY, Chen WR, Xu GD. 2011. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. *Crop Prot* [Internet]. 30:323–328. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.024>
- Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF, Matsumoto H. 2005. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol.* 138:297–303.

6. CONCLUSÃO GERAL

Constatou-se que não existe barreira de isolamento eficaz para impedir o cruzamento entre as espécies, portanto a variabilidade existente nas características morfológicas dos grupos pode estar relacionada à hibridação existente entre essas espécies.

O teste de raios X foi eficiente para identificação da morfologia das sementes, auxiliando na seleção de sementes intactas e no aprimoramento da qualidade dos lotes.

A espécie *C. pubescens* mostrou sensibilidade ao alumínio, o que pode limitar seu crescimento radicular em solos ácidos.