

**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DE
IPÊ-BRANCO**

LETICIA CARAVITA ABBADE

2008

LETICIA CARAVITA ABBADE

**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DE
IPÊ-BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Abbade, Leticia Caravita.

Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco / Leticia Caravita Abbade. –
Lavras : UFLA, 2008.

113 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Bibliografia.

1. Germinação. 2. Cultura de tecidos. 3. Análises bioquímicas. 4.
Anatomia foliar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.54046

LETICIA CARAVITA ABBADE

**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DE
IPÊ-BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 07 de março de 2008.

Prof. Dr. Breno Regis Santos

UNIFAL

Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto

UEMG/Passos



Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

(Orientadora)

Lavras

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por guiar meu caminho;

OFEREÇO

Aos meus pais;

Aos meus avós;

Ao meu namorado, pelo apoio nos momentos difíceis;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus avós e familiares, por todo amor e encorajamento.

Ao meu namorado, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e, principalmente, por sempre incentivar minha carreira profissional.

À Prof. Cleuza Aparecida dos Santos Jesuino e ao Sr. Pedro Elisiário Jesuino (*in memoriam*) por sempre torcerem por mim e me dar forças para seguir meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

À minha orientadora, professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, por toda atenção, apoio, amizade, conselhos e incentivo.

Ao professor Renato Paiva, por toda a atenção, confiança e amizade durante os anos de convivência na minha iniciação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa durante o mestrado.

À Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, pela doação das sementes e mudas, possibilitando a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Breno Régis Santos Netto e Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Evaristo, Ana Cristina, Dartagnan e Cellen na Fisiologia Vegetal; Vantuil e Clarette na Agricultura, por todo o auxílio e pela simpatia sempre constante.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal, em especial a Agda, Camila, Humberto, Marcelo e Emanuelle, por me propiciarem dias de estudo mais felizes.

Às meninas do Núcleo de Estudo em Paisagismo e Floricultura (NEPAFLOR), em especial à Simone, Leandra e Daniella, pela ajuda e companheirismo durante todos os momentos.

À Lívia pela ajuda na cultura de tecidos; ao Marcelo pela ajuda nas análises bioquímicas; ao prof. Evaristo, Cínthia e Agda, pela valiosa ajuda na anatomia.

Às grandes amigas de São Pedro: Carla, Daniela e Fernanda, pela amizade que nos une em todos os momentos de nossas vidas.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meus profundos agradecimentos, com todo o carinho.

BIOGRAFIA

LETICIA CARAVITA ABBADE, filha de Nelson Pereira Abbade e Rosa Maria Caravita, nasceu em 21 de julho de 1982 em São Pedro-SP. Realizou seus estudos fundamentais na Escola Estadual Benedito Modesto de Paula e Escola Estadual José Abílio de Paula e o ensino médio no Colégio Anglo - São Pedro, concluindo-o em 1999. No início de 2001, mudou-se para Lavras e ingressou no curso de graduação em Engenharia Florestal na Universidade Federal de Lavras, finalizando-o em junho de 2006. Durante o período de realização do curso de graduação, a partir de 2003, desenvolveu projetos de pesquisa no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Biologia, no Setor de Fisiologia, sob orientação do Prof. Renato Paiva, como bolsista de iniciação científica (CNPq). Em agosto de 2006, iniciou o curso de mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na UFLA, sob orientação da Prof^ª. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva. No mesmo ano entrou para o núcleo de estudos em paisagismo e Floricultura (NEPAFLOR), ajudando a organizar cursos, eventos e simpósios. Em março de 2008, conclui seu mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT.....	iii

CAPÍTULO I: Introdução Geral.....	1
1 Introdução.....	2
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 Caracterização Geral da Família Bignoniaceae.....	3
2.2 Descrição da Espécie.....	3
2.3 Germinação.....	5
2.4 Cultura de Tecidos Vegetais.....	6
2.4.1 Micropropagação de Plantas Lenhosas.....	8
2.4.1.2 Calogênese	8
2.4.1.3 Curva de Crescimento de Calos.....	8
2.6 Aspectos Bioquímicos.....	9
2.7 Aspectos Anatômicos.....	11
3 Referências Bibliográficas.....	12

CAPÍTULO II: Germinação de Sementes de Ipê-branco	17
1 Resumo.....	18
2 Abstract.....	19
3 Introdução.....	20
4 Material e Métodos	22
4.1 Determinação do Teor de Água das Sementes.....	22
4.2. Análises Bioquímicas das Sementes.....	23
4.3 Germinação <i>ex vitro</i>	25
4.4. Germinação <i>in vitro</i>	26
4.4.1 Desinfestação de Sementes.....	26
4.4.2 Efeitos dos Meios de Cultura, Carvão Ativado e GA ₃ na Germinação de ipê-branco.....	26
5 Resultados e Discussão.....	27
5.1 Determinação do Teor de Água das Sementes.....	27
5.2. Análises Bioquímicas das Sementes.....	27
5.3 Germinação <i>ex vitro</i>	28
5.4 Germinação <i>in vitro</i>	30
5.4.1. Desinfestação de Sementes.....	30
5.4.2. Efeito do Meio de Cultura, Carvão Ativado e GA ₃ na Germinação <i>in vitro</i> de Ipê-branco.....	32
5.4.2.1 Efeito do Meio de Cultura MS e GA ₃	32
5.4.2.2 Efeito do Meio de Cultura WPM e GA ₃	34
6 Conclusões.....	37
7 Referências Bibliográficas.....	38

CAPÍTULO III: Indução de Calos em Explantes Foliares de Ipê-branco.	44
1 Resumo.....	45
2 Abstract.....	46
3 Introdução.....	47
4. Material e Métodos.....	49
4.1.1 Efeito do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e BAP (benzilaminopurina).....	50
4.1.2. Efeito do ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina).....	50
4.2. Efeito do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e CIN (cinetina).....	50
4.2.1 Efeito do ANA (ácido naftalenoacético) e CIN (cinetina).....	50
5. Resultados e Discussão.....	51
5.1.Efeito do 2,4-D e BAP.....	51
5.2 Efeito do ANA e BAP.....	51
5.3.Efeito do 2,4-D e Cinetina.....	53
5.4.Efeito do ANA e Cinetina.....	55
6 Conclusão.....	56
7 Referências Bibliográficas.....	56

CAPÍTULO IV: Curva de Crescimento e Análises Bioquímicas de Calos de Ipê-branco.	60
1 Resumo.....	61
2 Abstract.....	62
3 Introdução.....	63
4 Material e Métodos.....	66
4.1 Estabelecimento da Curva de Crescimento de Calos de Ipê-branco.....	66
4.2 Análises Bioquímicas de Calos de Ipê-branco.....	66
5 Resultados e Discussão.....	69
5.1 Estabelecimento da Curva Crescimento.....	69
5.2 Análises Bioquímicas.....	72
6 Conclusões.....	78
7 Referências Bibliográficas.....	78

CAPÍTULO V: Anatomia foliar comparada de plantas de Ipê-branco provenientes do cultivo <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i>.....	83
1 Resumo.....	84
2 Abstract.....	85
3 Introdução.....	86
4 Material e Métodos.....	87
5 Resultados e Discussão.....	89
5.1 Espessura do Limbo Foliar e Nervura Central.....	92
5.2 Espessura das Epidermes Abaxial e Adaxial e Parênquimas Paliçádico Esponjoso.....	94
5.3 Densidade Estomática.....	95
5.4 Diâmetro Polar e Equatorial dos Estômatos.....	96
6 Conclusões.....	98
7 Referências Bibliográficas.....	98
ANEXOS.....	104
Anexo A – Tabelas.....	105
Anexo B - Composição dos Meios de Cultura.....	112

RESUMO GERAL

ABBADE, Leticia Caravita. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco.** 2008. 113p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba*) é uma espécie arbórea, nativa, pertencente à família Bignoniaceae. Suas sementes apresentam baixa viabilidade e pequena porcentagem de germinação (40%). O presente estudo teve como objetivo propor metodologias para o cultivo *in vitro* do ipê-branco. Para tanto, foram estudadas a composição química das sementes, a germinação (*ex vitro*) em diferentes substratos, germinação *in vitro*, indução de calos em explantes foliares, determinação da curva de crescimento e análises bioquímicas. No processo de germinação *ex vitro*, o substrato mais adequado é constituído de areia + terra (subsolo) ou plantmax (50%), porém proporciona um IVG mais lento. Para a germinação *in vitro*, recomenda-se utilizar o meio MS com 3mgL^{-1} de GA_3 ou meio MS (100%) com 50% de concentração de sais acrescido de 1mgL^{-1} de GA_3 , resultando respectivamente em 88 e 80% de germinação. Maior indução de calos em explantes foliares de ipê-branco ocorreu no meio de cultura MS suplementado com $1,55\text{mgL}^{-1}$ de Cinetina com de 1mgL^{-1} de 2,4-D ou com a utilização de $1,62\text{mgL}^{-1}$ de ANA e 2mgL^{-1} de BAP. A curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de ipê-branco apresenta crescimento sigmóide, com cinco fases distintas. A repicagem dos calos para um novo meio de cultura deve ser realizada entre o 60° e 75° dia cultivo. Teores máximos de açúcares solúveis totais e açúcares redutores foram observados no 45° dia de cultivo. As proteínas solúveis totais apresentaram maiores teores no dia da inoculação, reduzindo em seguida enquanto que teores máximos de aminoácidos foram observados no 15° dia de cultivo. O estudo anatômico foi feito em de seções transversais e paradérmicas das folhas e analisado em microscópico. As estruturas foliares de plantas de ipê apresentam epiderme uniestratificada, e o mesofilo possui uma organização dorsiventral. São hipostomáticas e apresentam tricomas em todas as faces. Folhas de plantas cultivadas *ex vitro*, em comparação as culturas *in vitro*, apresentaram maior espessura do limbo foliar, nervura central, epiderme adaxial e abaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso. Em folhas oriundas do cultivo *ex vitro*, observou-se se cutícula e esclerênquima, estruturas ausentes nas folhas cultivadas *in vitro*. Folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor número de estômatos e maior número de tricomas quando comparadas com as

* Comitê Orientador: Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Orientadora), Renato Paiva (Co-orientador).

cultivadas em *in vitro*. Os estômatos dessas são maiores em comparação com o das folhas cultivadas *ex vitro*.

ABSTRACT

ABBADE, Leticia Caravita. **Aspects of the *in vitro* culture of *Tabebuia roseo-alba***. 2008. 113 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil*

The *Tabebuia roseo-alba* is an arboreal specie, which belongs to the Bignoniaceae family, and has a great potential for urban landscape. Their seeds present low viability and small germination percentage. The objective this work was to propose different methodologies for the *in vitro* cultivation of *Tabebuia roseo-alba*. The ideal substrate to *ex vitro* germination is the mix of the sand with land (subsoil) or plantmax (50%), however, but it provides a slower IVG. Higher *in vitro* germination was obtained using MS with 50% of salt's concentration supplemented with 1mg L^{-1} of GA_3 or MS (100%) with 3mg L^{-1} of GA_3 , promoting 88 and 80% of germination, respectively. Higher callus induction in leaves explants of *Tabebuia roseo-alba* were observed with MS supplemented with $1,55\text{mg L}^{-1}$ of KIN and 1mg L^{-1} of 2,4-D or $1,62\text{mg L}^{-1}$ NAA with 2mg L^{-1} of BA. The growth curve of the callus followed a shape sigmoid, with five different phases. The callus should be transfer to a new culture medium between 60° to 75° day. The maximum level of total soluble sugars and reducing sugars were obtained in 45° day of cultivation. The great level of total soluble protein was observed in the inoculation day. Higher levels of amino acids were observed in 15° day of cultivation. The anatomical study was did proceed utilizing microscope for transversal and paradermics sections from leaf blade. The leaves structures from plants *ex vitro* show uniseriate epidermis, and mesophly with dorsiventral organization. They are hipostomatic and present trichomes in all the faces. Leaves from plants cultivate *ex vitro*, in compared with culture *in vitro* were largest in limb, central nervure, adatial and abbatial epidermis and palisade and sponges parenchyma. In leaves of plants cultivated *ex vitro*, cuticle and sclerenchym were present, but these structures were not find in plants cultivate *in vitro*. Leaves from plants cultivated *ex vitro* presented minor number of stomate and greater number of trichomes when compared with plants *in vitro*. Stomate of these plants were biggest that leaves of *in vitro* cultivation.

* Guidance Committee: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, DAG - UFLA (Adviser), Renato Paiva, DBI – UFLA (Co-adviser.)

CAPITULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

As árvores do gênero *Tabebuia*, conhecidas como ipês, são admiradas pelo efeito ornamental que apresentam quando floridas, apresentam propriedades medicinais e podem ainda ser utilizadas para fins madeireiros e em programas de restauração florestal (Lorenzi, 2000; Carvalho, 1994).

Muitas das espécies do gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) são nativas do Brasil e vulgarmente denominadas ipê. Pertencem ao grupo ecológico das secundárias tardias (Ferretti et al., 1995) e o nome vulgar de cada espécie é complementado pela coloração das flores, que pode ser branca, amarela, rosa ou roxa. Dentre as espécies nativas do Brasil mais cultivadas, *T. roseo-alba* (Ridl.) Sand. é a única que produz flores brancas (Maeda & Matthes, 1984).

Apesar da importância do gênero *Tabebuia* no contexto nacional, o alto grau de desmatamento e destruição de áreas florestais, seja pela expansão das fronteiras agrícolas, construção de rodovias ou exploração indevida, tem levado à diminuição das populações e à destruição das árvores deste gênero, incluindo *T. serratifolia* (ipê-amarelo) e *T. roseo-alba* (ipê-branco) (Oliveira, 2004).

A propagação dessa espécie é feita principalmente por sementes (Rizzini, 1971), porém poucos estudos são realizados objetivando definir metodologias adequadas para avaliar a capacidade de germinação dessas sementes (Carvalho, 1994).

O ipê-branco, apesar da sua intensa florada, apresenta pequena quantidade de sementes produzidas e, ainda, muitas não são viáveis. Existem poucos estudos a respeito da germinação para a espécie e estes confirmam uma baixa porcentagem de germinação.

Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a germinação, induzir calos em segmentos foliares, analisá-los bioquimicamente e comparar anatomicamente plantas oriundas do cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização geral da Família Bignoniaceae

Esta família compreende 120 gêneros, de ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente freqüentes nos trópicos americanos (Joly, 1998). São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, e também trepadeiras; apresentam folhas compostas, raramente simples, de disposição oposta; flores grandes e vistosas, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, de simetria zigomorfa. Possui fruto capsular seco, loculicida ou septicida, sempre com sementes aladas, raramente indeiscentes com sementes não aladas (Joly, 1998).

2.2 Descrição da espécie

Tabebuia roseo-alba (Ridl.) Sand. pertence à família Bignoniaceae e é conhecida popularmente como ipê-branco, pau d'arco ou ipê-do-cerrado (Lorenzi, 2000).

O ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba*) é encontrado em altitudes de 20 a 1.600m, em regiões com precipitação média anual de 1.500mm, com verão chuvoso e período de três a cinco meses de déficit hídrico, como ocorre na região central de Minas Gerais. Tolerância temperaturas médias anuais de 14°C a 21°C, sendo a temperatura do mês mais frio de 10°C a 20°C e do mês mais quente de 18°C a 26°C, em diversos tipos climáticos. É uma espécie secundária, decídua, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e norte de São Paulo e, ainda, em alguns estados do nordeste; particularmente encontrada em terrenos pedregosos.

É uma espécie de hábito arbóreo, com porte entre 5 a 10 m, com copa alongada. Possui tronco ereto, de 40 a 50 cm de diâmetro (Pott & Pott, 1994). A espécie é extremamente ornamental, não somente pelo exuberante florescimento, mas também pela folhagem densa de cor verde azulada e forma piramidal da

copa; também é ótima para o paisagismo, sendo amplamente utilizada e indicada para arborização urbana, dado seu porte não muito grande; é útil para reflorestamentos em função de sua adaptação em terrenos secos e pedregosos (Lorenzi, 2000).

Floresce, principalmente, durante os meses de agosto a outubro com a planta totalmente despida de folhas. A frutificação é pequena em relação à florada (Pott & Pott, 1994). Os frutos amadurecem a partir de outubro (Lorenzi, 2000).

As sementes devem ser colhidas logo após iniciarem a abertura espontânea, são pequenas e 1Kg contém aproximadamente 71.000 sementes. A germinação das sementes recém colhidas em substrato organo-argiloso é em torno de 40% (Lorenzi, 2000).

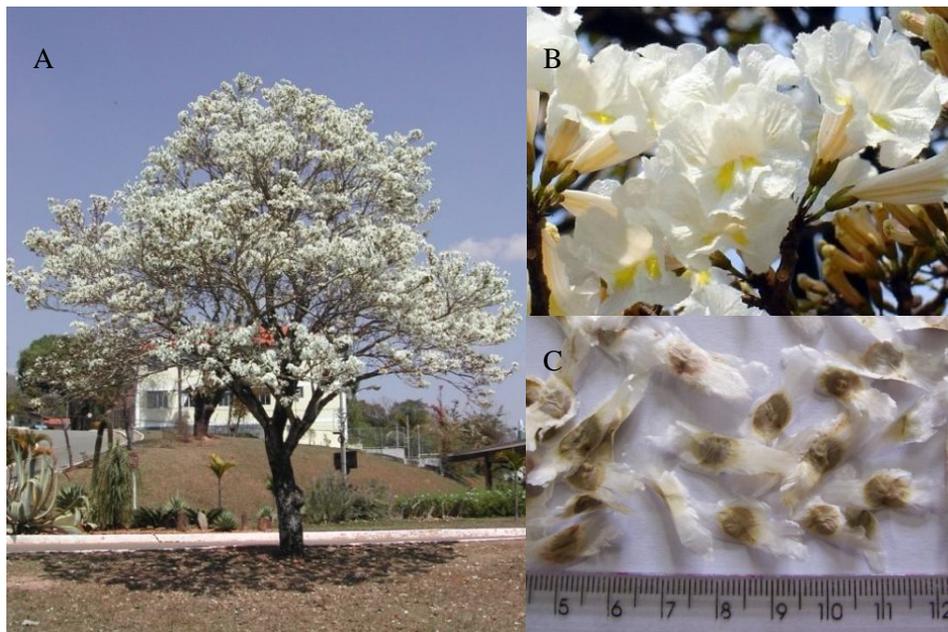


Figura 1. Aspecto visual de uma planta adulta (A), de um ramo com flores (B) e de sementes (C) de Ipê-branco. (Foto da árvore: Cristiano Martinotto)

2.3 Germinação

A germinação é considerada um dos estádios mais críticos do desenvolvimento vegetal, sendo caracterizada por processos fisio-metabólicos de natureza complexa que levam à retomada do crescimento do eixo embrionário da semente e à protrusão da radícula do tegumento. Inicia-se com a absorção de água pela semente (embebição) e finaliza-se com o início da elongação do eixo embrionário, usualmente a radícula (Bewly & Black, 1994).

Santana (2003), define que a germinação é composta por 3 fases: embebição, indução do crescimento (quanto acontece a reativação do metabolismo) e protrusão da radícula.

Segundo Bewley & Black (1994), a embebição pode ser definida como o conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides. Suas dimensões variam com a permeabilidade do tegumento, a composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente.

Para a retomada do crescimento do embrião, a semente deve estar madura, bem constituída, com poder germinativo e ao mesmo tempo deve receber do meio exterior, água e oxigênio em quantidades suficientes para assegurar um intenso metabolismo (Borges & Rena, 1993).

Para ipê-branco, Lorenzi (2000), relata que as sementes germinam em baixa porcentagem, geralmente próximo a 40%. Degan et al. (2001), trabalhando com sementes de ipê-branco colhidas no estágio maduro, obtiveram germinação máxima de 56,7%. Mello & Eira (1995), também obtiveram germinação máxima variando de 50 a 60%, para a mesma espécie. Valores estes bastantes baixos para produção em larga escala.

2.4 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas, em um meio artificial. O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma nova planta (Torres et al., 1998).

Muitas técnicas podem ser utilizadas para o cultivo *in vitro*, podendo ser por morfogênese direta, pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente de um explante ou por morfogênese indireta, via cultura de calos. Esses calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem estimular o crescimento da massa de células de forma desorganizada ou o desenvolvimento de órgãos como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (Caldas, 1996).

Atualmente, a modalidade de maior interesse e aplicação na propagação de plantas é a micropropagação, que reúne características tais como multiplicação rápida de plantas selecionadas, obtenção de mudas livres de patógenos, conservação e transporte de germoplasma (Nascimento, 2006).

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivos básicos o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores ou a conservação genética por meio da criação de bancos de germoplasma, a qual tem sido realizada principalmente por cultivo de gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos (Nascimento, 2006).

Nos tecidos submetidos ao cultivo *in vitro*, o controle da organogênese é feito pela introdução exógena de fitoreguladores em substratos diversos. A retirada de um fragmento de tecido de um organismo íntegro e a sua colocação em um meio de cultura contendo nutrientes e fitoreguladores tem como

consequência a liberação de células do controle, as que estão submetidas neste organismo. Desta forma, submetem-se a uma nova condição, na qual a capacidade de divisão pode ser readquirida e o genoma expressar-se de novas formas, conduzindo-a a novos padrões de diferenciação (Handro, 1989). Estes eventos podem levar, de diversas maneiras, à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético que ocorre “de novo” (Lima, 2004).

As técnicas de micropropagação apresentam vantagens em relação aos métodos vegetativos convencionais de propagação. Segundo Kerbauy (1997), algumas dessas vantagens são: produção de mudas uniformes em um curto período de tempo, controle efetivo de doenças, facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e espaço físico de cultivo reduzido.

2.4.1 Micropropagação de plantas lenhosas

Atualmente, a micropropagação é praticada com êxito em espécies hortícolas, ornamentais e, mais recentemente, em espécies lenhosas. A atividade comercial de micropropagação hoje se concentra principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas. Em segundo plano, inserem-se as plantas lenhosas, com destaque para a propagação de porta enxertos de frutíferas de clima temperado e de árvores elite de essências florestais de rápido crescimento (Soares, 2003).

Na última década, apesar de não ser muito difundida a técnica de instalar laboratórios junto a viveiros, algumas empresas de reflorestamento têm realizado a propagação vegetativa *in vitro* de árvores selecionadas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Outra aplicação para a utilização de micropropagação de espécies lenhosas é para multiplicação de espécies raras como, por exemplo, a pera-do-cerrado (*Eugenia klotzchiana*) ou para espécies que produzem poucas sementes, como a sucupira-branca (*Pterodon pubescens*). Nesses casos, a produção de

mudas é insuficiente para atender à demanda e também à conservação de espécies ameaçadas de extinção em bancos de germoplasma. No entanto, alguns fatores dificultam a micropropagação de espécies lenhosas, como a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas e a maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro* (Coelho, 1999).

O ipê-branco é uma espécie nativa que apresenta um grande potencial para a arborização urbana e tem sua propagação dificultada pela baixa taxa de germinação das sementes, havendo assim a necessidade de se produzir protocolos para a sua propagação *in vitro*.

2.4.1.2 Calogênese

A calogênese é uma das metodologias mais aplicadas no cultivo *in vitro*. A cultura de calos consiste na indução e manutenção de células não diferenciadas do parênquima, constituindo uma massa de células com pequeno grau de organização, obtida pela inoculação de partes da planta para um meio de cultura adequado, freqüentemente contendo combinações apropriadas de fitorreguladores (Collin & Dix, 1990). Segundo Torres et al. (1998), os calos podem se diferenciar em tecidos e órgãos. É um método que possibilita a propagação em massa de uma espécie, sendo também utilizado para a produção de metabólitos secundários e pré-requisito para a transformação genética (Santos, 2004).

2.4.1.3 Curva de Crescimento de Calos

Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante. Entretanto, procura-se utilizar aqueles que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar totipotência. No entanto, explantes oriundos de tecidos jovens não

lignificados, são mais adequados para a indução de calogênese por possuírem alta capacidade de regeneração (Pierik, 1990).

A importância de se estabelecer a curva de crescimento, de calos de uma espécie está na identificação das fases distintas do crescimento. A partir deste estudo, pode-se prever o momento exato de repicagem dos calos para um novo meio de cultura, ou a possibilidade de sua utilização em suspensões celulares visando a produção de metabólitos secundários (Smith, 1992).

Segundo George (1996), o crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela sua curva de crescimento, que normalmente exibe 5 fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag se caracteriza como a de maior produção de energia, correspondendo ao período que as células se preparam para o início da divisão celular, visando sua expansão, onde ocorre o início da mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e compostos específicos, resultando em um pequeno crescimento de calos. A fase exponencial é biossintética, possuindo maior crescimento de calos, devido a alta taxa de divisão celular e ao aumento do número de células. A fase linear caracteriza-se por diminuição da divisão, mas aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, pois ocorre a redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar, consequência da redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (Smith, 1992).

2.4.1.4 Aspectos Bioquímicos

Durante o desenvolvimento e o crescimento dos calos, ocorrem mudanças bioquímicas nas suas células. O estudo dessas mudanças fornecem subsídios aos processos de estabelecimento *in vitro*, propiciando a otimização das condições de seu cultivo.

Proteínas, aminoácidos, açúcares estruturais e não estruturais, lipídeos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos e pigmentos estão presentes nos tecidos vegetais e essas substâncias podem ser classificadas em macro ou micromoléculas, de acordo com o seu peso molecular ou por união de moléculas simples ligadas por covalência (Lehninger et al., 1995).

As análises dos níveis de proteína e aminoácidos em tecidos vegetais são muito comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). As proteínas são macromoléculas, constituídas por cadeias de aminoácidos ligados por um tipo específico de ligação covalente. Essas moléculas podem apresentar funções estruturais, de transporte, controle do crescimento, diferenciação ou função enzimática (Lehninger et al., 1995).

A análise quantitativa de aminoácidos é importante para a determinação da estrutura de proteínas e de complexos peptídicos similares, os quais são elementares para a determinação química de amostras de moléculas orgânicas (Soares, 2003).

Outra classe de moléculas que se destaca em tecidos vegetais são os açúcares ou carboidratos, os quais atuam como forma de armazenamento de energia, como importantes constituintes e suporte de tecidos ou também como provedores de esqueletos de carbono para compostos orgânicos sintetizados pelas células (Serra et al., 2000). Podem ser classificados como açúcares redutores, como a glicose e a frutose, enquanto que a sacarose, um açúcar não-redutor, tem função de armazenamento e transporte. A determinação dos níveis de açúcares tem aplicação em vários estudos fisiológicos, já que revela as reservas prontamente disponíveis para o crescimento (Passos, 1996).

A determinação dos tipos e dos níveis de carboidratos é de importância fundamental em calos considerados de alta capacidade de regeneração, indicando potencialidades industriais de plantas clonadas. As alterações mais

acentuadas nos níveis de carboidratos estruturais ocorrem na fase de crescimento ativo exponencial, durante a formação da parede celular (McKee et al., 1995).

2.5 Aspectos Anatômicos

Para se obter conhecimento das estruturas internas dos vegetais, é necessário o entendimento das funções peculiares em cada órgão da planta, visto que diferentes condições ambientais influenciam diretamente nas suas estruturas anatômicas (Lima, 2004). A anatomia foliar em plantas micropropagadas é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (Martinotto, 2004).

Larcher (2000) relata que as respostas de controle da abertura estomática diferem de acordo com as condições ambientais preponderantes durante o desenvolvimento da folha, como o comportamento anormal do aparato estomático sob condições de alta umidade durante o desenvolvimento foliar. De acordo com Preece & Compton (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando estas são submetidas a condições adversas, como o ambiente natural.

De acordo com Sutter & Langhans (1979), as folhas novas produzidas durante a aclimatização possuem anatomia de transição, que pode conferir maior habilidade fotossintética e maior capacidade de regulação hídrica às plantas.

O estudo anatômico de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* pode fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Publishing, 1994. 445 p.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coords.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 83-136.

CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo, RJ. **Anais...** Nova Friburgo: SBB, 1996. p. 22

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras. **Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa, 1994. 640 p.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.)Benth.)**. 1999. 119 p.
Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COLLIN, H. A.; DIX, P. J. Culture systems and selection procedures. In: Dix JP ed. **Plant cell line selection: Procedures and applications**. New York: VCH, 1990. p. 3-18.

DEGAN, P.; AGUIAR, I. B. DE; SADER, R.; PERECIN, D.; PINTO, L. R. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.

FERRETTI, A.R.; KAGEYAMA, P.Y.; ÁRBOCZ, G. de F.; SANTOS, J.D. dos; BARROS, M.I.A de; LORZA, R.F.; e OLIVEIRA, C. de. Classificação das Espécies Arbóreas em Grupos Ecológicos para Revegetação com Nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 3, n. 7- mar./jun. 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa – CNPH, 1990. p.203-212.

JOLY, A. B. **Botânica** : introdução a taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1988. 777 p.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. I, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA. 2000. 531p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 331-351p.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (Croton urucurana Baill)**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 367 p.

MAEDA, J. A.; MATTHES, L. A. F. Conservação de sementes de ipê. **Bragantia**, Campinas, v.43, n.1, p.51-61, 1984.

MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfológicos de cagaiteira (Eugenia dysenterica DC.)** 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MELLO, C. M. C. de; EIRA, M. T. S. de. Conservação de sementes de ipês (*Tabebuia* spp.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 19, n. 4, p. 427-432, out./dez. 1995.

MCKEE, T.B., N.J. DOESKEN, J. KLEIST. Drought monitoring with multiple time scales. In Proceedings of the 9th Conference on Applied Climatology, **American Meteorological Society**, Dallas, p. 233-236, Jan. 1995.

NASCIMENTO, A. C. **Micropropagação de uvaieira**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. De Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente**. 2004. 160 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 233p.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. 3. ed.. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 320p.

PREECE, F.F.; COMPTON, M.E.I. Problems with explants exudation in micropropagation. In: BAJAM Y.P.S. **Hight-tech and micropropagation**. Berlin: Springer Verlag, 1991, p.168-189. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17).

RIZZINI, C.T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do Cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3., 1971, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. p. 61-64.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae.** 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, B. R. **Micropropagação de pequi (Caryocar brasiliense Camb.).** 2004. 239 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SMITH, R.. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** San Diego: Academic Press, 1992. 171 p.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.)** 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras.

SUTTER, E.G.; LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Greensboro v.104, n.4, p. 493-496, 1979.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. 1998. v.1, p.133 – 145.

CAPÍTULO II

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE IPÊ-BRANCO

1 RESUMO

ABBADE, Leticia Caravita. Germinação de sementes de ipê-branco. In: _____. **Aspectos do cultivo *in vitro* de Ipê-branco**. 2008, Cap. 2, p.17-43. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O potencial ornamental e as dificuldades encontradas no processo de propagação do ipê-branco por meio de sementes, conseqüência principalmente da baixa taxa de germinação (40%), valorizam estudos visando melhorar a taxa de germinação para melhor produção de mudas desta espécie, de maneira rápida e eficiente. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da composição química das sementes, germinação e o índice de velocidade (IVG) das sementes de ipê-branco em condições *in vitro* e *ex vitro*. No processo de germinação *ex vitro*, foram testados os substratos: areia, areia +terra, terra e plantmax. Para a realização da germinação *in vitro* as sementes foram dispostas em meios MS e WPM, com concentração de 100 e 50% de sais, com ou sem carvão ativado, e com diferentes concentrações de GA₃. As sementes de ipê-branco têm caráter lipídico (68,44%). O substrato mais adequado foi a areia + terra (subsolo) ou plantmax[®] hortaliças, que proporcionaram 50% de germinação, porém nesses tratamentos, o IVG foi mais lento quando comparado com o IVG das sementes dispostas na terra. Para a germinação *in vitro*, recomenda-se utilizar o meio MS com 3mg L⁻¹ de GA₃ ou de 1mg L⁻¹ de GA₃ no meio MS (100%) com 50% de concentração de sais que proporcionam, respectivamente, 88 e 80% de germinação. Os resultados de porcentagem de germinação e IVG obtidos para sementes mantidas em meio MS foram superiores quando comparados com sementes mantidas em meio WPM.

* Comitê Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Orientadora), Renato Paiva (Co-orientador).

2 ABSTRACT

ABBADE, Leticia Caravita. Germination of seeds of *Tabebuia roseo-alba*. In: _____. **Aspectos do cultivo *in vitro* de Ipê-branco**. 2008, cap.2, p.17-43. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The ornamental potential and the difficulties for propagation process of *Tabebuia roseo-alba* due to reduced seed germination (40%), stimulate research with the objective of improving seedlings production of this species, fast and efficient. The objective of this work was to study chemistry composition, germination and germination speed index (GSI) in seeds of *Tabebuia roseo-alba*, in conditions *in vitro* and *ex vitro*. For *ex vitro* germination was tested the substrates: land, mix of land and sand, sand and plantmax. For *in vitro* germination seeds were inoculated in MS and WPM culture medium, with 100 and 50% of salt's concentration with charcoal active and supplemented with different concentration of GA₃. The *Tabebuia roseo-alba* seeds were lipidics (68,44%). The ideal substrate to *ex vitro* germination is the mix of the sand with land (subsoil) or plantmax[®] (50%), however they provides a slower IVG though compared with IVG of the land. Higher *in vitro* germination was obtained using MS with 50% of concentration supplemented with 1mg. L⁻¹ of GA₃ or MS (100%) with 3mg. L⁻¹ of GA₃, 80 e 88%, respectively. The germination and IVG was highest in MS culture medium when compared with the seeds on WPM culture medium.

* Comitê Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Orientadora), Renato Paiva (Co-orientador).

3 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os países que mais devastam o meio ambiente e os recursos naturais. Situa-se também entre os países com maior diversidade biológica do mundo e, ao mesmo tempo, uma das menos estudadas. Assim, estudos para o conhecimento e preservação da sua flora e fauna são de fundamental importância. No caso particular da germinação das sementes, algumas informações fragmentadas existem para espécies dos ecossistemas brasileiros, mas, muito pouco, ao se considerar o potencial biológico que existe para ser conhecido (Borghetti, 2000).

Os estudos sobre germinação das espécies nativas do cerrado ainda são incipientes quando comparados aos de espécies de outros biomas brasileiros. O crescente interesse por parte dos pesquisadores neste tipo de vegetação está revelando, aos poucos, seu potencial (Coelho, 1999).

Para que o processo de germinação ocorra, é necessário que as sementes estejam viáveis, as condições ambientais sejam favoráveis e que as sementes não estejam dormentes. A germinação fisiológica começa com a embebição de água pela semente e se completa com o início da elongação do eixo embrionário; este processo é caracterizado, normalmente, pela emissão da radícula (Bewley & Black, 1994). Sob o ponto de vista tecnológico, a germinação só se completa quando há o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade para dar origem a uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis (Nassif et al., 1998).

A baixa longevidade natural das sementes de ipê está ligada à pequena quantidade de substâncias de reserva armazenadas na semente (Kageyama et al.,

1992) e ao elevado teor de óleo em sua composição química (Freitas et al., 1979). Segundo Oliveira et al. (2004), sementes de ipê não toleram o armazenamento por dois anos, apresentando, após esse período, 86% de sementes mortas. A germinação das sementes recém colhidas de ipê-branco em substrato organo-argiloso é em torno de 40% (Lorenzi, 2000).

A taxa de germinação de sementes de algumas espécies pode ser aumentada quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente, quando as sementes apresentam dormência, endosperma reduzido ou grande infestação por microrganismos (Fay, 1992). Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 1996).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies (Tabela 1B, Anexo B). Para espécies lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos, e composições mais diluídas em macronutrientes apresentam melhor desempenho (Grattapaglia & Machado 1998). O meio nutritivo WPM (Lloyd & McCown, 1980), por exemplo, apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de maior concentração de potássio e de íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (Pasqual, 2001), (Tabela 2B, Anexo B).

A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é também importante na regulação da germinação *in vitro*. Sabe-se, hoje, que as giberelinas têm um papel-chave neste processo, estando diretamente envolvidas e desenvolvendo um importante papel tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento

(Nascimento, 2006; Taiz & Zeiger, 2004).

Isso pode provocar o amolecimento das camadas externas da semente, aumentando o suprimento de água e liberando os açúcares das paredes celulares (Franco & Ferreira, 2002). As giberelinas atuam na expressão gênica, ativando a síntese de várias enzimas, incluindo aquelas que hidrolisam e mobilizam reservas dos tecidos (Jeller & Perez, 2001).

Segundo Dodd & Donovan (1999), a presença de uma concentração maior ou menor de sais, ou outros compostos osmoticamente ativos, no meio de germinação, de acordo com a espécie e com o potencial osmótico de suas sementes, poderá ser o fator responsável pela adequada hidratação das mesmas. Conseqüentemente, poderá viabilizar ou inviabilizar a ocorrência do processo germinativo, a partir de uma embebição adequada ou não.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a composição química das sementes, avaliar a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de ipê-branco dispostas em diferentes substratos (*ex vitro*) e compará-las com a germinação e IVG *in vitro* realizada em meios MS e WPM, na presença ou ausência de carvão ativado e suplementados com diferentes concentrações de giberelinas (GA₃).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação do teor de água das sementes

O teor de água nas sementes foi determinado utilizando-se o método de estufa a 105°C + 2°C por 24 horas com quatro repetições de 1 g. O resultado foi expresso em porcentagem, com base no peso úmido, calculado pela fórmula de Brasil (1992):

$$U(\%) = \frac{P_u - P_i}{P_u} * 100, \text{ onde:}$$

U é a umidade das sementes;

Pu é o peso da semente úmida;

Ps é o peso da semente seca.

4.2 Análises bioquímicas das sementes

Para a realização das análises bioquímicas foram utilizadas sementes de ipê-branco provenientes do mesmo lote dos experimentos de germinação.

As sementes foram moídas e pesadas para compor o extrato. Para o extrato da quantificação de açúcares redutores, 1g de sementes foi diluída em 10mL de água. Para o extrato da quantificação de açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos, 1g de sementes foi diluída em 20 mL. Para o extrato da quantificação de amido, 0,5 g de sementes foi diluída em 1,5 mL de água com 2,5 mL de ácido perclórico (52%) e procedeu-se a quantificação pelos açúcares solúveis totais. Os extratos foram centrifugados a 6500g, durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado do "pellet", e colocado em eppendorf de 1,5 mL, e utilizado na quantificação.

O teor de açúcares solúveis totais foi determinado segundo a metodologia descrita por Yemm & Willis (1954). Em alíquotas de 20 μ L do extrato bruto foram adicionadas 998 μ L de água destilada e 2,0 mL do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5 mL de água destilada e 10 mL de H₂SO₄ concentrado). Após agitação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. Estas foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 620 nm. Os valores foram expressos em miligramas de glicose por grama de matéria fresca (mg glicose g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

A determinação dos açúcares redutores foi realizada por meio da metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em alíquota de 10 μ L do extrato bruto foram adicionados 1,65mL de água destilada e 1,0 mL do reagente DNS. A mistura

formada foi homogeneizada em agitador e levada ao banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente e completada com água destilada até um volume de 5 mL. As amostras foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores foram expressos em miligramas de glicose por grama de matéria fresca (mg glicose g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

Para a determinação dos teores de aminoácidos utilizou-se o método descrito por Stein & Moore (1948). Em alíquotas de 10 µL do extrato bruto foram adicionados 998µL de água destilada. Foi adicionado, também, 1,7 mL dos reagentes: tampão citrato de sódio 0,2M, pH 5,0; reagente de ninhidrina 5% em metilcelosolve e KCN 2% em metilcelosolve. As misturas foram agitadas e levadas ao banho-maria, 100°C, durante 20 minutos. Para leitura a 570 nm em espectrofotômetro foi adicionado 1,3 mL de etanol 60% (v/v). Os valores foram expressos em miligramas de aminoácidos por grama de massa fresca (mg aminoácidos g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicina.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), que se baseia no princípio da associação entre proteína e corante. Em alíquotas de 10µL do extrato bruto foram adicionados água destilada e 5,0 mL do reagente Commassie Blue (constituído de 0,01% de Commassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol). Após isto, as amostras foram homogeneizadas em agitador e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 595nm. Os valores foram expressos em miligramas de proteína por grama de massa fresca (mg proteína g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA).

O teor de lipídeos foi feito por método gravimétrico no laboratório de Bioquímica no Departamento de Química da UFLA. Foi utilizado o procedimento padrão do laboratório, em que sementes foram moídas e colocadas

em cartuchos de papel filtro, pesadas e transferidas para o conjunto “Soxhlet”, por um período de quatro horas. Foi feita a extração contínua com refluxo em presença de éter etílico. Após completa evaporação, e recuperação do solvente, as amostras foram pesadas e o teor de lipídeos determinado.

4.3 Germinação *ex vitro*

Sementes de ipê-branco foram colocadas a 1,0 cm de profundidade, em bandejas plásticas contendo cada uma os diferentes tipos de substratos: plantmax[®] para hortaliças, areia, terra de subsolo e areia + terra de subsolo na proporção de 1:1 (v/v). Foram mantidas por um período de 30 dias em casa de vegetação, sob temperatura de 25±2°C, irradiância de 67 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após este período, avaliou-se a percentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG).

O IVG foi determinado registrando-se o número de sementes germinadas por dia até o final do experimento, calculado pela fórmula de Maguire (1962):

$$IVG = \sum \frac{S}{\Delta t}, \text{ onde:}$$

S é a quantidade de cada semente germinada por dia; e

Δt é o tempo, em dias, em que as sementes levaram para germinar após a semeadura.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo cada repetição composta por 6 sementes. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

4.4 Germinação *in vitro*

4.4.1 Desinfestação de sementes

Sementes de ipê-branco foram lavadas em água corrente por 30 minutos e submetidas a quatro testes de desinfestação, em câmara de fluxo laminar: sementes imersas em álcool 70%, por 30 ou 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 1% de cloro ativo, por 10 ou 20 minutos.

Ao final desses tratamentos, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS, suplementado com 30gL^{-1} de sacarose, e solidificados com 6gL^{-1} de ágar. O pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos e 1 atm de pressão. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $36\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos em fatorial 2 (álcool) x 2 (hipoclorito), com 15 repetições cada, sendo cada parcela composta por 1 semente. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. A avaliação foi realizada aos 15 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes sadias em cada tratamento.

4.4.2 Efeitos de meio de cultura, carvão ativado e GA_3 na germinação *in vitro* de ipê-branco

Sementes de ipê-branco foram lavadas em água corrente por 30 minutos e levadas à câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70%, por 30 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo

por 20 minutos. Ao final deste tempo, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Desinfestadas, as sementes foram inoculadas em tubos contendo os meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (Lloyd & McCown, 1980), MS com redução de 50% de concentração salina ou WPM com redução de 50% de concentração salina. Todos os meios foram suplementados com GA₃ nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mg L⁻¹, em ausência ou presença de carvão ativado (0,2%), O pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento na temperatura de 25±2°C, sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 2 tubos de ensaio contendo uma semente cada, totalizando 10 explantes por parcela.

A avaliação foi realizada após 30 dias de incubação, sendo observada a percentagem de sementes germinadas e o IVG em cada tratamento. Considerou-se como germinada, a semente que apresentava a protusão da radícula. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio da análise de variância e de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi de 7,32%. Isto se deve pelo período de armazenamento de um ano. Estes resultados estão de acordo com Oliveira et al. (2005), que encontraram umidades semelhantes para sementes de ipê-amarelo (7%) armazenadas por dois anos. Para o ipê-roxo, estes mesmos autores encontraram 8% em sementes armazenadas por 2 anos e 8,3% para sementes recém colhidas.

5.2 Análises bioquímicas das sementes

A composição química das sementes, com base em seu peso seco, está relacionada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química, em porcentagem, das sementes de ipê-branco, com base em seu peso seco.

Composto	Porcentagem (%)
Lipídeos	68,44
Amido	9,01
Açúcares solúveis totais	4,99
Açúcares redutores	2,97
Aminoácidos	10,12
Proteínas	3,41
Outros	1,06
Total	100

Geralmente, quanto menor a semente e quanto menor a quantidade de substâncias de reserva da mesma, menor seu período de viabilidade (Kageyama & Marquez, 1981). O elevado teor de lipídeos das sementes, mais instável do que os hidratos de carbono, é responsável por uma deterioração mais rápida das sementes (Harrington, 1972).

A curta longevidade natural das sementes de ipê está ligada à pequena quantidade de substâncias de reserva armazenadas na semente e ao elevado teor de óleo em sua composição química (Degan et al, 2001). O ipê-branco possui esta característica, contendo 68,44% de lipídeos em sua composição química.

5.3 Germinação *ex vitro*

Observou-se diferenças significativas entre as porcentagens e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de ipê-branco germinadas em função dos diferentes substratos testados (Tabela 1A, Anexo A).

A Tabela 1 apresenta as porcentagem de germinação e IVG. A porcentagem de germinação de sementes de ipê branco foi melhor quando estas foram mantidas em terra + areia ou plantmax® (50%). Apesar desse valor ainda baixo, é semelhante ao previsto para a espécie conforme Lorenzi (2000), indicando que as sementes de ipê-branco germinam em porcentagem próxima a 40%.

Tabela 1. Porcentagem de germinação e IVG de sementes de ipê-branco em função dos diferentes substratos

Substratos	% Germinação	T ₅₀	IVG
Plantmax®	50 a		0,890 b*
Terra	35 b		0,950 a
Terra + Areia (1:1)	50 a		0,810 c
Areia	40 b		0,882 b

*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância

Degan et al. (2001), trabalhando com sementes de ipê-branco colhidas no estágio maduro, germinadas em papel de filtro, com fotoperíodo de 8h. e temperatura de 25°C, obtiveram germinação máxima de 56,7%. Mello & Eira (1995), também obtiveram germinação máxima variando de 50 a 60%, para a mesma espécie.

Verifica-se, aos 30 dias, que nesses tratamentos o índice de velocidade de germinação (IVG) foi inferior em relação ao IVG das sementes em terra, indicando que a germinação foi mais efetiva, porém mais lenta. O aspecto visual das sementes de ipê-branco germinadas *ex vitro* pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Aspecto visual da germinação de ipê-branco aos 10 dias (A) e aos 20 dias (B), em diferentes substratos.

Dias	Substratos			
	Areia	Terra+Areia	Terra	Plantmax [®]
10				
20				

5.4 Germinação *in vitro*

5.4.1 Desinfestação de sementes

A análise de variância demonstrou que os diferentes tempos de álcool (70%) e hipoclorito (1%) foram significantes na desinfestação de sementes de ipê-branco para o cultivo em meio de cultura (Tabela 2A, Anexo A). As sementes que foram imersas em álcool (70%) por 60 segundos e hipoclorito 1% por 10 minutos apresentaram a melhor porcentagem de sementes normais (sem contaminação), não ocorrendo oxidação, sendo este então o melhor tratamento (Figura 1).

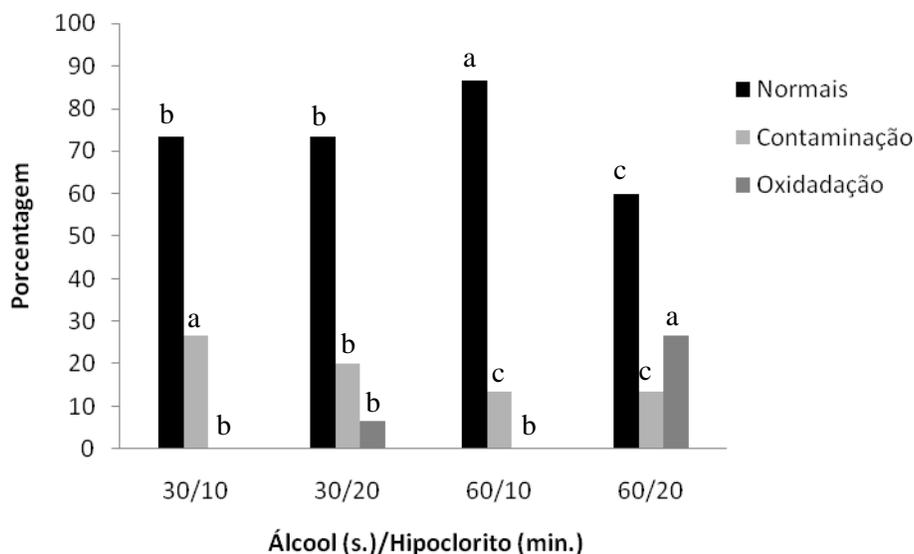


Figura 1. Porcentagem de sementes de ipê-branco normais, com contaminação e com oxidação em função dos tratamentos de álcool e hipoclorito (1% de cloro ativo). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si para cada coluna, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O resultado deste estudo concorda com os resultados observados por Andrade et al. (2000), que desinfestaram sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) em álcool 70% por 60 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, e as lavaram três vezes com água destilada, e estas não apresentaram nenhum tipo de contaminante.

Quando o tempo de imersão em hipoclorito é aumentado, as sementes passaram a apresentar sinais de oxidação, pois o meio de cultura apresentou-se escurecido com o passar do tempo. Preece & Compton (1991), verificaram que as substâncias responsáveis pela oxidação de espécies lenhosas cultivadas *in vitro* eram fenóis, flavonóides e taninos.

5.4.2 Efeito de meio de cultura, carvão ativado e GA₃ na germinação *in vitro* de ipê-branco

5.4.2.1 Efeito do meio de cultura MS e GA₃

Foram observadas diferenças estatísticas significativas na porcentagem de germinação e IVG em todos os meios testados (Tabelas 3A e 4A, Anexo A). Quando as sementes foram dispostas no meio MS, a germinação foi favorecida, com o incremento das concentrações de GA₃ aplicadas, conforme observa-se na Figura 2. Melhor germinação (67%) ocorreu das sementes mantidas em meio MS suplementado com 2,82mg L⁻¹ de GA₃.

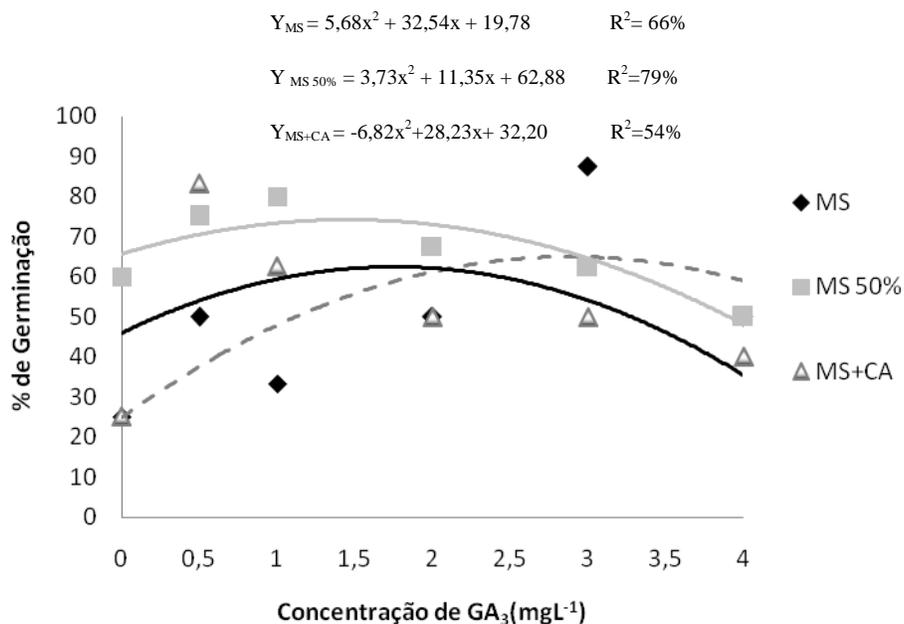


Figura 2. Porcentagem de germinação de sementes de ipê-branco em função de diferentes concentrações de GA₃ cultivadas em meio MS com ou sem carvão ativado e MS com 50% de concentração de sais.

Para o meio MS com 50% de concentração de sais, a concentração de GA₃ ideal foi de 1,52mg L⁻¹ com 72% de germinação esperada. Neste meio, menores doses de giberelinas são necessárias e atingem a maior taxa de germinação.

Para o meio MS com carvão ativado, a dose ideal de GA₃ foi 2,06 mg L⁻¹ com a porcentagem de germinação de 62%. Assim, como no meio MS com a redução de 50% de concentração de sais, a suplementação com pequenas doses de GA₃ favoreceram a germinação, porém este meio apresentou níveis mais baixos de germinação.

O maior índice de velocidade de germinação ocorreu em sementes dispostas no meio MS com 1mg L⁻¹ de GA₃ (1,253). Observa-se na Figura 3 que no meio MS o aumento das concentrações de GA₃, além de favorecer a porcentagem de germinação, promoveu também o aumento do índice de velocidade de germinação (IVG). Este índice foi reduzido com o aumento das concentrações de GA₃.

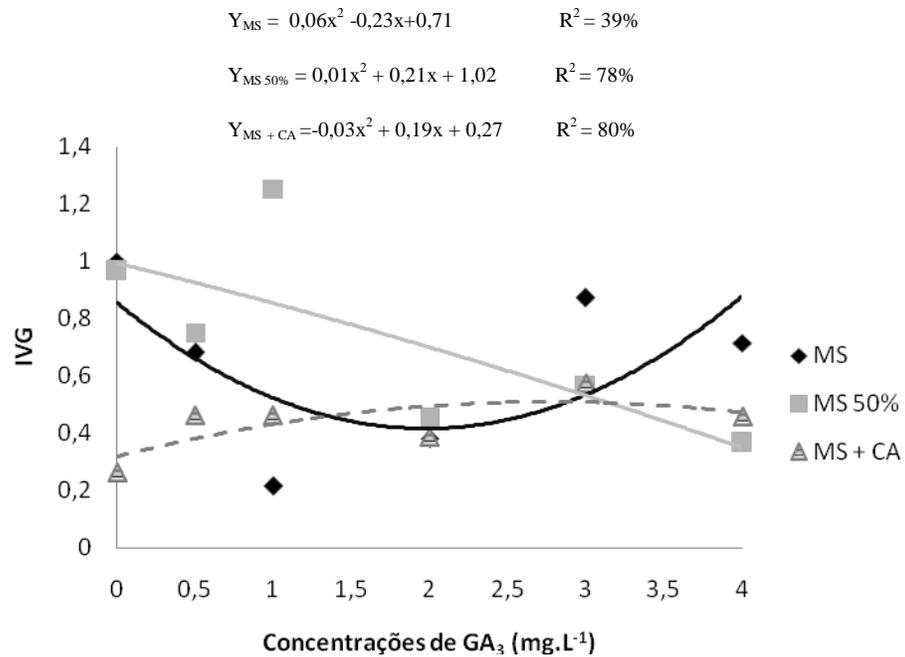


Figura 3. Índice de velocidade de germinação de sementes de ipê-branco em função de diferentes concentrações de GA₃ suplementadas ao meio MS com ou sem carvão ativado e MS com 50% de concentração de sais.

5.4.2.2 Efeito do meio de cultura WPM e GA₃

De acordo com a análise de variância (Tabelas 5A e 6A, Anexo A), houve diferenças estatísticas significativas para a germinação e IVG em todos os meios testados. Com o uso do meio WPM, a suplementação com GA₃ não foi eficiente para a germinação do ipê-branco, ocorrendo maiores porcentagens na ausência deste regulador.

O meio WPM com 50% de concentração de sais apresentou uma curva semelhante ao WPM, porém com germinação muito reduzida. O uso de GA₃ para este meio não se faz necessário. Quando o meio WPM foi suplementado

com carvão ativado, a presença de GA₃ favoreceu a porcentagem de germinação, atingindo 70% na concentração de 2mg L⁻¹.

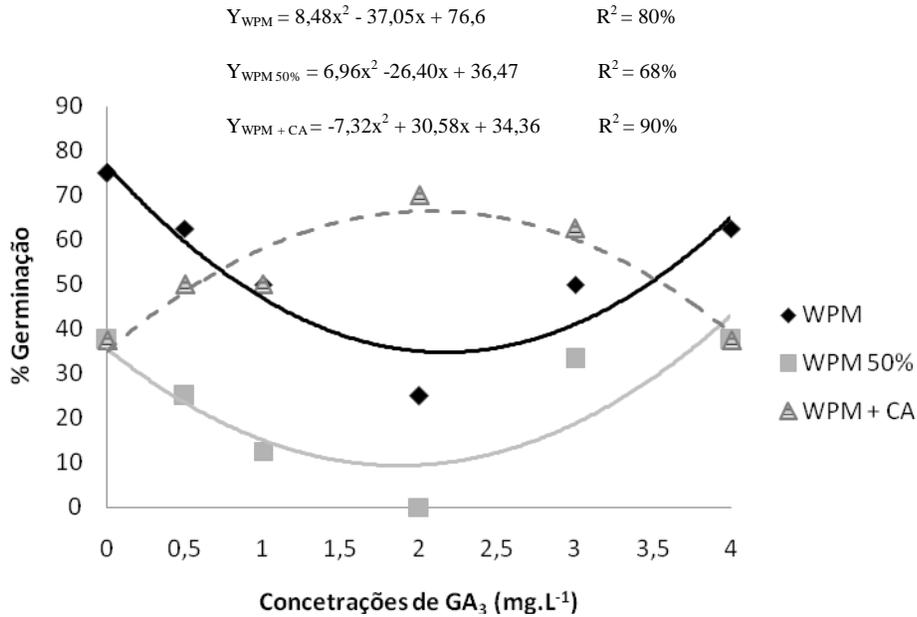


Figura 4. Porcentagem de germinação de sementes de ipê-branco em função de diferentes concentrações de GA₃ cultivadas em meio WPM com ou sem carvão ativado e WPM com 50% de concentração de sais

O índice de velocidade de germinação mais rápido foi observado em sementes mantidas no meio WPM, sem adição de GA₃ (0,786), sendo inferior ao observado no meio MS. O meio WPM e WPM com redução de 50% de sais apresentou queda no IVG até a concentração de 2mg L⁻¹ de GA₃. Após essa concentração, doses maiores de GA₃ passaram a aumentar o IVG. Já no meio WPM com carvão ativado, esta análise inverteu-se, sendo o IVG favorecido até a 2mg L⁻¹. Após esta concentração, doses maiores de GA₃ passaram a prejudicar o IVG.

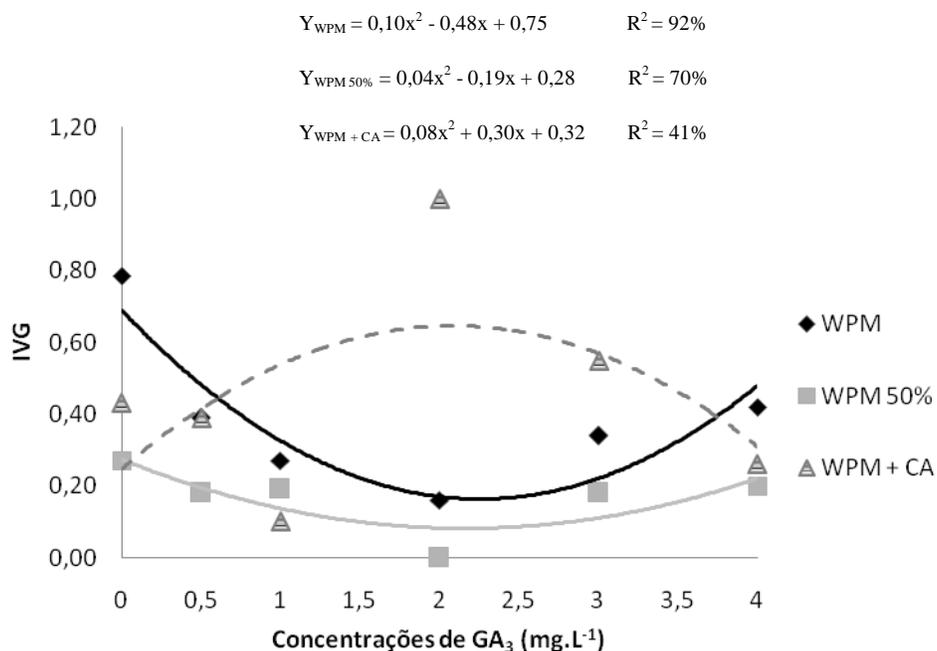


Figura 5. Índice de velocidade de germinação de sementes de ipê-branco em função de diferentes concentrações de GA₃ cultivadas em meio WPM com ou sem carvão ativado e WPM com 50% de concentração de sais.

Analisando os resultados obtidos, ocorreu maior porcentagem de germinação para sementes mantidas no meio MS suplementado com 3mg L⁻¹ de GA₃, seguida do meio MS com 50% de concentração de sais suplementado com 1mg L⁻¹ de GA₃. A maior velocidade de germinação foi observada em sementes mantidas no meio MS com 50% de concentração de sais suplementado com 1mg L⁻¹ de GA₃. Estes resultados estão de acordo com os observados por Soares (2005), que obteve uma maior porcentagem de germinação de sementes de mangabeira em meio nutritivo MS com 50% de concentração de sais.

Apesar de plantas lenhosas geralmente desenvolverem-se melhor em meio WPM para a germinação, para o ipê-branco este fato não foi verificado. O

meio WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980), apresenta composições mais diluídas em macronutrientes como, por exemplo, os íons nitrato e amônia do meio estão em concentrações inferiores e também pela menor quantidade de aminoácidos e vitaminas em relação à composição do meio MS. Estes fatores prejudicaram a germinação das sementes de ipê-branco no meio WPM, uma vez que, na composição da semente, os aminoácidos, proteínas e açúcares redutores, que estão prontamente disponíveis para a semente, são baixos. Com a utilização de WPM com 50% de concentração de sais, as menores porcentagens de germinação e os IVG's mais baixos foram observados.

Foi verificado também que a taxa de germinação *in vitro* foi bastante superior à observada quando as sementes foram dispostas em substratos. Estudos sobre germinação *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* (Viana et al., 1999) e de *Norantea brasiliensis* (Campos, 2003), também mostraram maior germinação quando comparadas às cultivadas *ex vitro*. Bhattacharya & Khuspe (2001), encontraram melhores resultados na germinação de diferentes cultivares de mamoeiro (*Carica papaya*) na condição *in vitro*, tanto para o IVG quanto para a porcentagem, do que na condição *ex vitro*. Santos (2004), obteve maior porcentagem de germinação e IVG em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense*), quando cultivados *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

- A semente possui umidade de 7,32% e é uma semente lipídica (68,44%).

- No processo de germinação *ex vitro*, o substrato mais adequado é a associação de areia e terra de subsolo ou o uso de plantmax[®] para hortaliças (50%). Estes substratos, no entanto, proporcionam um IVG mais lento em comparação com sementes dispostas em terra.

- Para a germinação *in vitro*, recomenda-se utilizar o meio MS com 3mg L⁻¹ de GA₃, ou de 1mg L⁻¹ de GA₃ no meio MS com 50% de concentração de sais, proporcionando 88 e 80% de germinação, respectivamente.

- A porcentagem de germinação e IVG obtidos para sementes mantidas em meio MS são superiores quando comparados com a utilização do meio WPM, devido à baixa quantidade de aminoácidos e proteínas encontradas nas sementes de ipê-branco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.W. ; LUZ, J. M. Q. ; LACERDA, A. S. ; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S.S. *In vitro* and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.91, p.39-49, 2001.

BORGHETTI, F. Ecofisiologia da germinação das sementes. **Universia**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 149-179, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para Análises de Sementes**: divisão de sementes e mudas. Brasília: Ministério da Agricultura, 1992. 365 p.

CAMPOS, D. B. **Métodos de propagação *ex vitro* e *in vitro* de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae)**. 2003. 90 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de *sucupira branca* (*Pterodon pubescens* (Benth.))** 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DEGAN, P.; AGUIAR, I. B. de; SADER, R.; PERECIN, D.; PINTO; L. R. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001

DODD, G. L.; DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 8, p. 1146-1153, Aug. 1999.

FAY, P. A. **The growth and physiological responses of *Silphium integrifolium* to gall insect attack**. 1992. Dissertation (Master in Ecology) - Kansas State University, Manhattan.

FRANCO, E. T. H.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 1-10, jun. 2002.

FREITAS, S. C.; CÂNDIDO, J. F.; CONDÉ, A. R.; HARA, T. Determinação de equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols) armazenadas em diferentes umidades relativas.

Revista Árvore, Viçosa, MG, v. 3, n. 2, p. 135-144, 1979.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1- the technology**. Edington: Exergetics, 1996. 574 p.

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

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 3, p.145-245,

JELLER, H.; PEREZ, S. C. J. G. de A. Efeitos dos estresses hídrico e salino e da ação de giberelina em sementes de *Senna spectabili*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 93-104, jun. 2001.

KAGEYAMA, P.Y. & MARQUEZ, F.C.M. Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero *Tabebuia*. **Reunión sobre Problemas in Semillas Forestales Tropicales**, San Felipe, v.1., n.1, 1980.

KAGEYAMA, P.Y.; SANCHEZ, S.P.A.; FERRAZ, E.M.; SOUZA, L.M.C. Armazenamento de sementes de três espécies nativas (*Tabebuia heptaphylla*, *Erythrina verna* e *Chorisia speciosa*). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p.435-439, 1992.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (Croton urucurana Baill)**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v.30, p.421-427, 1986.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, 367 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madson, v. 2, n.02, p.176 -177, 1962.

MELLO, C. M. C. de; EIRA, M. T. S. de. Conservação de sementes de ipês (*Tabebuia* spp.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 19, n. 4, p. 427-432, out./dez. 1995.

MILLER, G. L. use o dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Bioquimetry**, New York, v. 31, p. 426-428. 1959.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A. C. **Micropropagação de uvaieira**. 2006. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. Germinação de sementes: fatores externos (ambientais) que influenciam a germinação. **Informativo Sementes**. 1998. Disponível em: < <http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp> >. Acesso em: 29 jan. 2008.

OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl. Nich. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. De Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente**. 2004. 160 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALAHO, M.L.M.; SILVA, T.T.A.; BORGES, D.I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T.serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.642-648, 2005.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 127 p.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotecnology in agriculture and**

forestry: 17- High-Tech and micropropagation I. Berlin: Springer Verlag, 1991.
p. 168-189.

SANTOS, B. R. **Micropropagação de pequi (Caryocar brasiliense Camb.)**. 2004. 239 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, F. P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.176, p. 367-372, 1948

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720 p.

VIANA, V. R. C.; FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N. Germinação *in vitro* de plantas medicinais I. *Pothomorphe umbellata* L. Miq. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1/2, p. 22-24, 1999.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. the estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemistry Journal**, London, p. 508-514, 1954.

CAPÍTULO III

INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE IPÊ-BRANCO

1 RESUMO

ABBADE, Leticia Caravita. Indução de calos em explantes foliares de ipê-branco. In: _____. **Aspectos do cultivo *in vitro* de Ipê-branco.** 2008. Cap. 3, p.44-59. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O ipê-branco é uma árvore ornamental e apesar de produzir grande quantidade de sementes, estas possuem baixa porcentagem de germinação (40%). No cultivo *in vitro*, um dos métodos que possibilita a propagação em massa de determinada espécie é o cultivo de calos, também utilizado para a produção de metabólitos secundários e desenvolvimento de um sistema de transformação genética. Este trabalho teve como objetivo estudar a indução de calos em segmentos de folhas jovens de ipê-branco. As folhas foram desinfestadas e inoculadas em meio MS suplementado com sacarose (30g L^{-1}), ágar (6mg L^{-1}) e diferentes reguladores de crescimento. Estudou-se o efeito de combinações 2,4 - associado BAP; ANA em combinação com BAP; 2,4-D associado a CIN; ANA em combinação com CIN na indução de calogênese em explantes foliares de ipê-branco. A maior indução de calos em explantes de ipê-branco ocorreu em meio de cultura MS suplementado com $1,55\text{mg L}^{-1}$ de Cinetina com de 1mg L^{-1} de 2,4-D ou com a utilização de $1,62\text{mg L}^{-1}$ de ANA e 2mg L^{-1} de BAP . O uso de 2,4-D associado ao BAP ou ANA associado à cinetina, não foi eficiente para a indução de calos em ipê-branco.

* Comitê Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Orientadora), Renato Paiva (Co-orientador).

2 ABSTRACT

ABBADE, Leticia Caravita. Callus induction in leaf explants of *Tabebuia roseo-alba*. In: _____. **Aspects of the *in vitro* culture of *Tabebuia roseo-alba***. 2008. Cap. 3, p.44-59. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

Tabebuia roseo-alba is an ornamental tree and although the production of seeds is large, the germination is reduced (40%). In *in vitro* cultivation, one of the methods that allows the mass propagations in determinate species is the callus cultivation, also is used for the production of secondary metabolites and development of genetic transformation. The objective of this work was examines the callus induction in young leaves segments of *Tabebuia roseo-alba*. The leaves were disinfected and inoculated in MS medium supplemented with sucrose (30g L^{-1}), agar (6mg L^{-1}) and different growth regulators. The effect of combinations of 2,4-D associated to BA; NAA in combination with BA; 2,4-D associated with KIN; NAA in combination KIN in induction of callus in leaves explants of *Tabebuia roseo-alba*. Most of callus induction in explants of *Tabebuia roseo-alba* occurred in the MS culture medium supplemented with 1.55 mg L^{-1} of KIN with 1mg L^{-1} of 2,4-D or with the used of 1.62 mg L^{-1} of ANA and 2 mg L^{-1} of BAP. The use of 2,4-D with BAP or ANA associated with KIN, was not effective for the inductionf of callus in *Tabebuia roseo-alba*.

* Guidance Committee: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, DAG - UFLA (Adviser), Renato Paiva, DBI – UFLA (Co-adviser.)

3 INTRODUÇÃO

Quando um segmento de tecido vegetal devidamente desinfestado ou assepticamente cultivado é transferido para um meio de cultura apropriado e mantido sob condições adequadas, algumas células se dividem. Após intensa proliferação, dão origem a uma massa não diferenciada de células (Arasu & Paranjothy, 1975). Esta massa é denominada de calo e tem sido a técnica mais utilizada em cultura de tecidos de plantas, sendo capaz de crescer sem limite, se subcultivado em novos e apropriados meios de cultura.

Ainda, como aplicações, o calo tem sido utilizado para estudar o crescimento e o desenvolvimento de plantas, para a exploração de produtos do metabolismo secundário para a propagação *in vitro* em si, dentre outras técnicas (Constabel, 1984).

O calo é um tecido produzido em resposta a uma injúria física ou química. Nem todas as células em um explante contribuem para a formação de calos. No entanto, o mais importante é que existem certos tipos de células de calos que são competentes para regenerar estruturas organizadas, enquanto outros tipos de células não parecem ser competentes para expressar a totipotencialidade. Isto significa que qualquer célula vegetal viva possui informação genética suficiente para produzir uma planta idêntica à planta mãe (Pinto & Lameira, 2001).

A indução de calos tem apresentado sucesso na micropropagação de várias espécies, inclusive as florestais. Os tipos de cultivo *in vitro* utilizados para propagação de plantas lenhosas não diferem muito dos tipos utilizados para outras espécies de plantas. A principal diferença, na maioria dos casos, é que somente tecidos jovens têm sido utilizados ou têm dado resultados satisfatórios, sendo sucesso com tecidos maduros. Dunstan et al. (1995), afirmaram que até que os aspectos bioquímicos e fisiológicos da juvenilidade e maturidade sejam

esclarecidos, não será possível elucidar alguns padrões morfogenéticos que são observados na cultura de tecidos em espécies florestais. Procurando elucidar a indução de calos em várias plantas lenhosas, diversos autores como Azevedo (2003), Lima (2004), Santos et al. (2005), Nicioli (2006), Nascimento (2006) e Nogueira et al. (2007), já pesquisaram a influência dos reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, Picloran, BAP, Cinetina, TDZ.

Segundo Rey et. al. (1980), auxinas e citocininas são exigidas para o crescimento de calos. As primeiras propiciam a formação de calo mais friável, enquanto as outras, calos mais firmes. A concentração dos reguladores de crescimento influencia o desenvolvimento da cultura de calos *in vitro* e, geralmente, concentrações semelhantes de auxinas e citocininas no meio de cultura promovem a formação de calos. Tisserat & Noga (2002), verificou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina; entretanto, quando foi adicionada citocinina, a proliferação dos mesmos aumentou.

Um fator importante na indução de calos é a seleção do explante. A escolha do material em um estado biológico adequado para o início da calogênese é fundamental, sendo os tecidos jovens mais adequados que os maduros.

Outros fatores que influenciam a formação de calos são: composição do meio nutritivo, tamanho do explante, condições físicas do ambiente (luz e temperatura), genótipo e estágio fisiológico da planta-mãe. Estes fatores interagem, podendo estimular ou inibir a formação de calos (George, 1996).

Este trabalho objetivou desenvolver um protocolo para calogênese em ipê-branco, a partir de explantes foliares submetidos a diferentes reguladores de crescimento, constituídos de duas auxinas (2,4-D e ANA) e duas citocininas (Cinetina e BAP).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Plantas matrizes de ipê-branco com 50cm foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, das quais extraíram-se os explantes.

Retiraram-se folhas jovens e procedeu-se à lavagem em água corrente com detergente por 10 minutos. Posteriormente, as folhas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, sendo retiradas e imersas em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), permanecendo por 5 minutos. Após isto, em condições assépticas, os explantes passaram por quatro lavagens em água destilada e autoclavada.

Os segmentos foliares com aproximadamente 1,0 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com os diferentes tratamentos. Os meios foram acrescidos com 30gL⁻¹ de sacarose e solidificados com 6gL⁻¹ de ágar e o pH corrigido para 5,8, antes da autoclavagem. O material foi cultivado em sala de crescimento com temperatura de 25°±2°C, sob escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por três tubos de ensaio contendo um explante cada, totalizando 12 explantes por parcela. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio da análise de variância e regressão. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, analisando-se a média de porcentagem de área foliar coberta por calos.

4.1 Experimento 1 - Efeito do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e BAP (benzilaminopurina)

Foram testadas as concentrações 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg L⁻¹ de 2,4-D e 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg L⁻¹ de BAP, em todas as combinações possíveis, adicionadas ao meio de cultura, constituindo um fatorial de 4X4.

4.2 Experimento 2 - Efeito do ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina)

Foram testadas as concentrações 0; 0,5; 1,0 e 2,0mg L⁻¹ de ANA e 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg L⁻¹ de BAP, em todas as combinações possíveis, adicionadas ao meio de cultura, constituindo um fatorial de 4X4.

4.3 Experimento 3 - Efeito do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e CIN (cinetina)

Foram testadas as concentrações 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg L⁻¹ de 2,4-D e 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg L⁻¹ de CIN, em todas as combinações possíveis, adicionadas ao meio de cultura, constituindo um fatorial de 4X4.

4.4 Experimento 4 - Efeito do ANA (ácido naftalenoacético) e CIN (cinetina)

Foram testadas as concentrações 0; 0,5; 1,0 e 2,0mg L⁻¹ de ANA e 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg L⁻¹ de CIN, em todas as combinações possíveis, adicionadas ao meio de cultura, constituindo um fatorial de 4X4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1 - Efeito do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e BAP (benzilaminopurina)

Em todas as concentrações testadas de 2,4-D em combinação com BAP, não houve a formação de calos. As folhas se mantiveram no meio de cultura sem nenhuma alteração, apenas ficaram levemente escurecidas.

Estudando a calogênese de caládio (*Caladium x hortulanum*) em meios MS com diferentes doses de 2,4-D e BAP, Rocha (1999), também não obteve a formação de calos. Este autor verificou que a adição tanto de ANA como de BAP no meio de cultivo foi mais satisfatória do que a adição de 2,4-D, obtendo calos mais vigorosos. Rodrigues (2000), não verificou a formação de calos em segmentos nodais de cupuaçu em meio suplementado com diferentes concentrações de 2,4 D.

5.2 Experimento2 - Efeito do ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina)

Pela análise de variância (Tabela 7A, Anexo A) houve diferença significativa entre a interação de diferentes concentrações de ANA e BAP suplementado ao meio de cultura. A interação entre ANA e BAP estimulou a formação de calos nos explantes foliares de ipê-branco cultivados *in vitro*. Os resultados são apresentados na Figura 1.

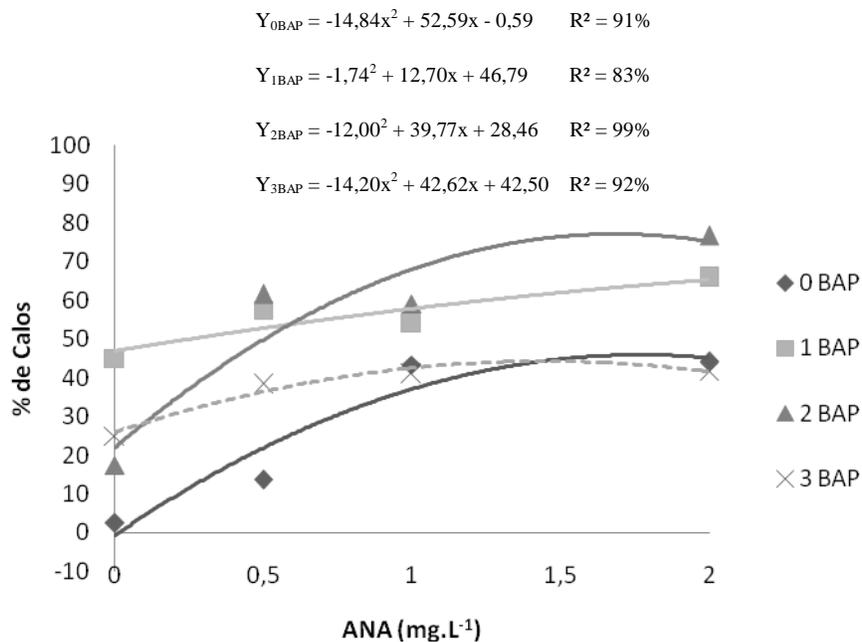


Figura 1. Formação de calos em explantes de ipê-branco cultivados em meio de cultura, acrescido com diferentes concentrações de ANA e BAP.

Observa-se na Figura 1 que a suplementação do meio de cultura com BAP, mesmo na ausência de ANA, proporcionou a ocorrência de calogênese. Ao contrário, na ausência de BAP, mas com adição de ANA também foram formados calos, indicando que a adição de reguladores de crescimento é fundamental para a indução de calogênese. À medida que as concentrações de ANA foram aumentadas, a porcentagem de calogênese também aumentou. Sendo que esta ocorreu em maior porcentagem nos explantes mantidos em meio de cultura suplementado com 1,62 mg L⁻¹ de ANA e 2mg L⁻¹ de BAP. Estes resultados assemelham aos observados por Cerqueira (2002), que obteve 100% de área coberta com calos em explantes foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens*) nas concentrações de 2mg L⁻¹ de ANA com 2mg L⁻¹ de BAP.

Santos et al. (2005), trabalhando com explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana*), obteve a indução de calos friáveis com a adição de 6mg L^{-1} de ANA e 2mg L^{-1} de BAP ao meio de cultura. Rocha & Quoirin (2004), estudando calogênese em explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla*), obtiveram 49% de calos nas concentrações de $0,1\text{mg L}^{-1}$ de ANA com 2mg L^{-1} de BAP.

O aspecto dos calos formados (Figura 2) pela interação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP é compacto e possui coloração verde escuro amarelado, apresentando, em todas as concentrações testadas, sinais leves de oxidação pela cor escurecida do meio de cultura.



Figura 2. Aspecto dos calos formados em explantes foliares de ipê-branco após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS acrescido dos reguladores de crescimento ANA e BAP.

5.3 Experimento 3 - Efeito do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e CIN (cinetina)

Avaliando-se a formação de calos nos explantes de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina, observou-se interação entre os reguladores de crescimento testados e também efeito isolado de 2,4-D e cinetina (Tabela 8A, Anexo A). As porcentagem de calos formados são apresentadas na Figura 3.

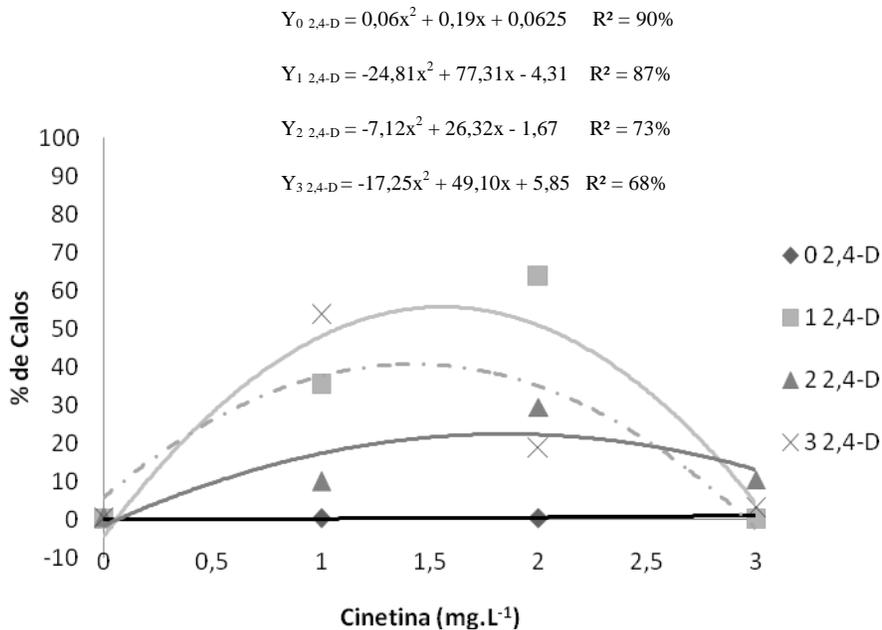


Figura 3. Porcentagem de calos formados em explantes foliares de ipê-branco cultivados em meio de cultura, acrescido com diferentes concentrações de Cinetina e 2,4-D.

Observa-se na Figura3 que na ausência de cinetina ou 2,4-D não ocorreu a formação de calos. À medida que as concentrações de 2,4-D foram aumentadas, a porcentagem de calogênese também aumentou. Sendo que maior porcentagem de calogênese ocorreu nos explantes mantidos em meio de cultura suplementado com 1,55 mg L⁻¹ de cinetina com de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Maciel et al. (2003), estudando explantes foliares de *Coffea arabica* cultivar Obatã, obtiveram a indução de calos primários mistos na combinação entre 4 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg L⁻¹ de cinetina. Guisso et al. (2003), estudando a jibóia (*Scindapsus pictus*), obtiveram melhor resultado para a calogênese com o

meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4D + 1,0 mg L⁻¹ de Cinetina, que se iniciou aos 21 dias após a inoculação.

O calo formado pela combinação de 2,4-D e cinetina possui aspecto áspero e consistente, de coloração verde escuro tendendo a marrom amarelado.



Figura 4. Aspecto dos calos formados em explantes foliares de ipê-branco após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS, acrescido dos reguladores de crescimento 2,4-D e cinetina.

5.4 Experimento 4 - Efeito do ANA (ácido naftalenoacético) e CIN (cinetina)

Em todas as concentrações testadas de ANA em combinação com cinetina, não houve a formação de calos. As folhas mantiveram-se no meio de cultura sem nenhuma alteração, apenas ficaram levemente escurecidas.

Foi verificado que, para a indução de calos em explantes foliares de ipê-branco, é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. A interação entre ANA com cinetina, ou 2,4-D com BAP, não promove a formação de calos. No entanto, a combinação de ANA com BAP ou 2,4-D e cinetina são eficientes para a calogênese. Os calos formados a partir de ANA e

BAP iniciam-se mais rapidamente do que quando se utiliza 2,4-D e cinetina, porém, estes apresentam oxidação no meio de cultura.

6 CONCLUSÃO

- A maior indução de calos em explantes de ipê-branco ocorre com a suplementação de meio de cultura em combinação com 1,55 mg L⁻¹ de Cinetina com de 1mg L⁻¹ de 2,4-D ou com a utilização de 1,62 mg L⁻¹ de ANA e 2mg L⁻¹ de BAP .

- O uso de 2,4-D associado ao BAP ou ANA associado à cinetina, não é eficiente para a indução de calos em ipê-branco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARASU, N. T.; PARANJOTHY, K. Tissue culture as na AID in crop improvement. In: RAJARAO, J .C; PARANJOTHY, K (Eds.). NATIONAL PLANT TISSUE CULTURE SYMPOSIUM, 1975, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malasia, 1975. p. 1-7.

AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos as anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; CASTRO, N. E. A. de; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento

utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p.301-308, 2002

CONSTABEL, F. Callus culture: initiation and maintenance. In: VASIL, I. k. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics plant**: laboratory procedures and their applications. Orlando: Academic Press, 1984. p. 27-35.

DUNSTAN, D. I.; TAUTORUS, T. E.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 471-538.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture** : part 1- the technology. Edington: Exergetics, 1996. 574 p.

GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; SOUZA, J. A. de.; DONINI, L. P.; PEREIRA, J. M.; VIÉGAS, J. Indução de calogênese em lâminas foliares de aráceas ornamentais. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PRÊMIO PESQUISADOR, 12., 2003, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: UFPe, 2003. 1 CD-ROM.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (Croton urucurana Baill)**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. da; DUTRA, L. F Embriogênese somática indireta em explantes

foliares de *Coffea arabica* L. CV. OBATÃ. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p.107-116, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A. C. **Micropropagação de uvaieira**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NICIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) - Coville]**. 2006, 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabolitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEFE, 2001. 102 p.

REY, H.; MROGINSKI, L. A. FERNANDEZ, A. Inducción *in vitro* de callos y raices em explanaos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pitón**, Buenos Aires, v.3, n.1, p.161-170, 1980.

ROCHA, M. T. R. **Propagação *in vitro* dos gêneros *Anthurium* e *Caladium***. 1999. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitomelhoramento) -

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,
Pelotas.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 91-101, 2004.

RODRIGUES, E. F. **Desenvolvimento do eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius).** 2000. 70 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C. NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510-514, , 2005.

TISSERAT, A. A.; NOGA, G. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 35, 2002.

CAPITULO IV

CURVA DE CRESCIMENTO E ANALÍSES BIOQUÍMICAS DE CALOS DE IPÊ-BRANCO

1 RESUMO

ABBADE, Leticia Caravita. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de ipê-branco. In: _____. **Aspectos do cultivo *in vitro* de Ipê-branco.** 2008, cap. 4, p.60-82. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O entendimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento dos calos pode fornecer subsídios ao processo de estabelecimento *in vitro*, além permitir a determinação de substâncias presentes nestas estruturas, como metabólitos secundários. Com o objetivo de determinar a curva de crescimento de calos de ipê-branco e analisá-los bioquimicamente, por meio da determinação de açúcares solúveis totais, de açúcares redutores, proteínas solúveis totais e de aminoácidos, segmentos foliares de ipê-branco foram inoculados em meio MS suplementados com sacarose (30gL^{-1}), ágar (6gL^{-1}) e 1mg. L^{-1} de 2,4-D associado a 2mg. L^{-1} de cinetina. O material foi mantido no escuro por 90 dias. A coleta do material foi feita a cada 15 dias para as análises. A curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de ipê-branco apresenta crescimento sigmóide, com cinco fases distintas. A repicagem dos calos para um novo meio de cultura deve ser realizada entre o 60° e 75° dia de cultivo. Teores máximos de açúcares solúveis totais e açúcares redutores foram observados no 45° dia de cultivo. As proteínas solúveis totais apresentaram maiores teores no dia da inoculação, reduzindo em seguida. Teores máximos de aminoácidos foram observados no 15° dia de cultivo.

* Comitê Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Orientadora), Renato Paiva (Co-orientador).

2 ABSTRACT

ABBADE, Leticia Caravita. Growth curve and biochemical analysis of callus induced in leaf segments of *Tabebuia roseo-alba*. In: _____. **Aspects of the *in vitro* culture of *Tabebuia roseo-alba***. 2008. cap. 4, p.60-82. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

The known of the biochemical changes that occurs during growth and development of callus can supply subsidies to the process of *in vitro* establishment, as well as to determine the presence of secondary metabolites. The objective of this work was to determine the growth curve of callus and to analyze their biochemical charactersits, through the determination of total soluble sugars, reducing sugars, proteins and amino acids. Leaf explants were inoculated in MS culture medium, supplemented with 1 mg L⁻¹ of 2,4-D and 2mg L⁻¹ of Kinetin and maintained in the dark during 90 days. Samples were collected each 15 days intervals. Growth curve of the callus followed a shape sigmoid, with five different phases. The callus should be transfer to a new culture medium between 60° and 75° days. The maximum levels of total soluble sugars and reducing sugars were observed in 45° day of cultivation. The maximum levels of total soluble protein were observed in the day of the inoculation. Higher levels of amino acids were observed in 15° day of cultivation.

* Guidance Committee: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, DAG - UFLA (Adviser), Renato Paiva, DBI – UFLA (Co-adviser.)

3 INTRODUÇÃO

O calo é uma massa de células que se prolifera desordenadamente, mais ou menos organizada, que geralmente surge em órgãos e tecidos diferenciados (Pierik, 1990). Assim como as plantas superiores, os calos apresentam um padrão típico de crescimento, o qual é caracterizado por meio de fases distintas.

O estudo do crescimento dos calos envolve a determinação dos períodos em que ocorrem essas fases, sendo cada uma delas representada por eventos que lhe são peculiares. A importância desse tipo de trabalho está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do crescimento dos calos. A partir desse estudo, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem do calo para um meio fresco ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando à produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (Azevedo, 2003).

Segundo Santos et al. (2003), as fases de crescimento da cultura de calos têm sido caracterizadas pelo crescimento celular, cujos parâmetros incluem peso de matéria fresca da célula, número de células e proteína celular total, atividades metabólicas e concentrações de nutrientes nos meios de cultura. De acordo com George (1993), os diversos períodos que compõem o crescimento dos calos são a fase lag, fase log ou exponencial, fase de crescimento linear, fase de desaceleração e a fase estacionária. A fase lag é considerada como produtora de energia e correspondente ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Caracteriza-se pelo número estacionário de células, pelo início da mobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento do calo. A fase exponencial é considerada como biossintética. É nessa fase que se observa

o maior crescimento do calo, conseqüência da máxima taxa de divisão celular característica desse período. Na fase linear, ocorre a redução da taxa de crescimento de divisão celular, tornando a divisão uniforme. O que caracteriza essa fase é o crescimento e desenvolvimento celular. Na quarta fase ocorre a desaceleração causada pela diminuição da divisão celular e conseqüente expansão da célula. Observa-se a desaceleração no crescimento do calo, causada pela redução dos nutrientes no meio de cultura, presença de produtos tóxicos, secagem do ágar e diminuição do oxigênio no interior das células. É nesta fase que o calo deve ser transferido para um novo meio, possibilitando e estimulando a retomada do crescimento. Na última fase, estacionária, não se observa divisão ou crescimento celular, não há síntese de biomassa, nem aumento no número de células, e assim o peso do calo é mantido constante. Essa fase caracteriza-se pelo acúmulo de metabólitos secundários nas células (Phillips & Henshaw, 1977; Noé et al., 1980; Lindsey & Yeoman, 1983; Nakagawa et al., 1986).

A determinação da curva de crescimento e a realização das análises bioquímicas já foram realizadas por outros autores (Serra et al., 2000; Mesquita et al., 2002; Azevedo, 2003; Soares, 2003; Lima et al., 2007) com o objetivo de conhecer as mudanças bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento dos calos, podendo fornecer subsídios ao processo morfogênético durante o cultivo, além de possibilitar a identificação de substâncias presentes nestas estruturas.

Segundo Passos (1996), a determinação dos níveis de carboidratos em calos revela a reserva prontamente disponível ao crescimento da planta e possui várias aplicações em estudos fisiológicos. Torna possível ainda, a determinação da fase de crescimento ou desenvolvimento celular que propicie uma maior produção de compostos celulares específicos (Serra, 1999).

Segundo Phan et al. (1987), os calos podem apresentar composição bioquímica e exigências nutricionais distintas, em relação ao explante de origem.

As determinações quantitativas e qualitativas de macro e micromoléculas, que constituem os tecidos vegetais, podem auxiliar na determinação das diferentes fases da vida de um vegetal, de acordo com o aumento ou diminuição dos níveis de compostos essenciais (Santos et al., 2003).

A determinação do nível de proteínas e aminoácidos em tecidos é das análises mais comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). As proteínas macromoléculas que podem apresentar funções enzimáticas e estruturais. Estudos fisiológicos e bioquímicos envolvendo sua quantificação, localização, determinação de atividade enzimática *in vitro* devem ser estimulados.

Outra classe de biomoléculas que se destaca em tecidos vegetais são os açúcares, os quais atuam como forma de armazenamento de energia, como importantes constituintes de suporte de tecidos ou também como provedores de esqueletos de carbono para compostos orgânicos sintetizados pelas células (Serra et al., 2000). A determinação dos níveis de açúcares tem aplicação em vários estudos fisiológicos, já que revela a reserva prontamente disponível para o crescimento (Passos, 1996). Nos cultivos *in vitro*, os açúcares são acrescentados ao meio de cultura como fonte de energia para o desenvolvimento do explante. Esses tecidos apresentam uma taxa fotossintética bastante reduzida, tornando-se praticamente heterotróficos (Azevedo, 2003).

O entendimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento e o desenvolvimento de calos pode fornecer a determinação de subsídios para o estabelecimento *in vitro*, além de poder identificar metabólitos secundários (Lima, 2004).

O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos originados de explantes foliares de ipê-branco e analisá-los bioquimicamente, por meio da determinação dos teores de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de ipê-branco

Para a obtenção da curva de crescimento de calos, segmentos de folhas jovens de plantas matrizes de ipê-branco mantidas em sala de crescimento foram utilizados como explantes.

Os segmentos foliares com aproximadamente 1,0 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1mg L⁻¹ de 2,4-D e 2mg L⁻¹ de cinetina, 30g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C por 20 min. Os explantes permaneceram em sala de crescimento a 25±2°C, no escuro.

Para a determinação da curva de crescimento, 20 explantes foram retirados dos tubos de ensaio aleatoriamente e pesados em intervalos de 15 dias, durante 90 dias de cultivo. As pesagens foram realizadas a partir do primeiro dia da inoculação. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo a equação determinada por Lameira et al. (1996):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{P_f - P_i}{P_f} * 100$$

Onde P_i = peso inicial e P_f = peso final de calos.

4.2 Análises bioquímicas de calos de ipê-branco

Os calos destinados às análises bioquímicas foram formados a partir de explantes foliares de plantas matrizes de ipê-branco e inoculados em meio MS

suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de cinetina, mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, no escuro.

Para a realização das análises bioquímicas, utilizaram-se intervalos de 15 dias para as coletas de calos, durante um período de 90 dias de cultivo. As pesagens foram realizadas a partir do primeiro dia da inoculação. Pesaram-se 500mg de calos para cada repetição, num total de duas, os quais, em seguida, foram armazenados em freezer à temperatura de -80°C.

O procedimento para a obtenção do extrato bruto dos calos foi baseado na metodologia descrita por Lemos et al. (1999). Cada amostra de 500mg de calos foi homogeneizada em graal com nitrogênio líquido e, posteriormente, centrifugada a 10000g, durante 10 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado do "pellet", e colocado em eppendorf de 1,5mL e posteriormente armazenado em freezer a -4°C para ser utilizado na quantificação de proteínas, aminoácidos, açúcares redutores e açúcares solúveis totais.

O teor de açúcares solúveis totais foi determinado segundo a metodologia descrita por Yemm & Willis (1954). Em alíquotas de 4μL do extrato bruto foram adicionadas 996μL de água destilada e 2,0 mL do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5 mL de água destilada e 10 mL de H₂SO₄ concentrado). Após agitação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. Estas foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 620nm. Os valores foram expressos em miligramas de glicose por grama de matéria fresca (mg glicose g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

A determinação dos açúcares redutores foi realizada por meio da metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em alíquota de 40μL do extrato bruto, foram adicionados 1,1 mL de água destilada e 1,0 mL do reagente DNS. A mistura

formada foi homogeneizada em agitador e levada ao banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. As amostras foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores foram expressos em miligramas de glicose por grama de matéria fresca (mg glicose g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

Para a determinação dos teores de aminoácidos utilizou-se o método descrito por Stein & Moore (1948). Em alíquotas de 20µL do extrato bruto foram adicionados 998µL de água destilada. Foi adicionado, também, 1,7mL dos reagentes: tampão citrato de sódio 0,2M, pH 5,0; reagente de ninhidrina 5% em metilcelosolve e KCN 2% em metilcelosolve. As misturas foram agitadas e levadas ao banho-maria, 100°C, durante 20 minutos. Para leitura a 570 nm em espectrofotômetro, foi adicionado 1,3 mL de etanol 60% (v/v). Os valores foram expressos em miligramas de aminoácidos por grama de massa fresca (mg aminoácidos g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicina.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), que se baseia no princípio da associação entre proteína e corante. Em alíquotas de 100µL do extrato bruto foram adicionados água destilada e 5,0 mL do reagente Commassie Blue (constituído de 0,01% de Commassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol). Após, homogeneizou-se as amostras em agitador, e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 595nm. Os valores foram expressos em miligramas de proteína por grama de massa fresca (mg proteína g⁻¹ de MF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento da curva crescimento de calos de ipê-branco

A Figura 1 mostra o aspecto geral da formação de calos em segmentos foliares de ipê-branco inoculados em meio MS na presença de 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 2 mg L^{-1} de cinetina, desde a inoculação até 90 dias de cultivo.

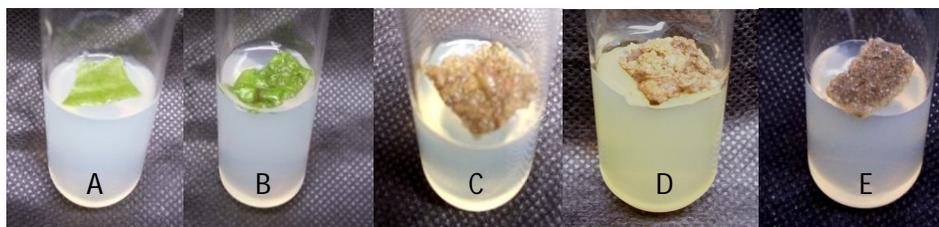


Figura 1. Aspecto geral de calos de ipê-branco formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 2 mg L^{-1} de cinetina. A- inoculação, B - 15 dias, C - 45 dias, D - 75 dias e E - 90 dias.

A curva de crescimento de calos de ipê-branco apresentou um padrão tipo sigmóide, podendo-se distinguir as cinco fases de crescimento (Figura 2). Esse tipo de curva de crescimento sigmóide já foi observado em outras espécies de plantas lenhosas como a lichieira (Mesquita, 1999), castanha-do-brasil (Serra, 2000), cafeeiro (Santos et al., 2003), copaiba (Azevedo, 2003), sangra d'água (Lima et al., 2007).

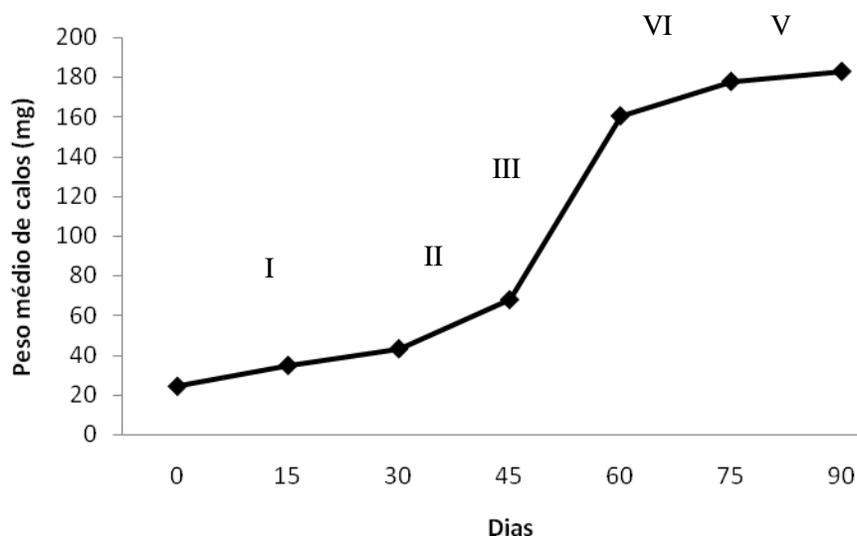


Figura 2. Curva de crescimento de calos de ipê-branco formados a partir de segmentos foliares. I - fase lag, II - fase exponencial, III - fase de crescimento linear, IV – fase de desaceleração e V – fase estacionária.

A fase lag, na qual as células do explante preparam-se para divisão, ocorreu até o 30º dia de inoculação, representando 43% do crescimento *in vitro*. Serra et al., (2000) avaliando o crescimento de calos obtidos com base em segmentos foliares de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) também observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30º dia após a inoculação.

A fase de crescimento exponencial, período no qual se observa máxima divisão celular, ocorreu entre os 30º e o 45º dia após a inoculação, com crescimento observado de 36%. A fase lag pode ser considerada como uma fase produtora de energia e a fase exponencial como fase biossintética (Shimizu, 1977). Santos et al. (2003) estudando o crescimento de calos obteve a fase de

crescimento exponencial entre o 42° até o 77° dia de cultivo em explantes foliares de café (*Coffea arabica*, cultivar Rubi)

O período de crescimento linear, no qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre o 45° e o 60° dia de inoculação, representando 57% de crescimento *in vitro*. Embora o período de crescimento linear de calos de ipê-branco tenha sido atingido com aproximadamente dois meses de inoculação, outras espécies podem atingir essa fase mais rapidamente, principalmente quando se utilizam explantes secundários, em que o tecido se apresenta mais homogêneo. Soares (2003), por exemplo, estudando a curva de crescimento de calos induzidos baseando-se em explantes foliares de ingá (*Inga vera*) observou a ocorrência da fase linear entre o 30° e 60° dia após a inoculação. Lima et al. (2007) observou que a fase linear da curva de crescimento de explantes foliares de sangra d'água (*Croton urucurana*) ocorreu somente entre o 70° e 98° dias de cultivo.

O intervalo de desaceleração do crescimento foi observado entre o 60° e o 75° o dia de inoculação, com apenas 9% de crescimento. Segundo Smith (1992), é nessa fase que os calos devem ser repicados em razão principalmente da redução de nutrientes, secagem do ágar ou mesmo acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura. Baseado nesse contexto, os resultados desses estudos indicam que a repicagem de calos provenientes de folhas de ipê-branco deve ser efetuada no início da fase de desaceleração, ou seja, aos 60 dias de cultivo. Lima et al. (2007) estudando a curva de crescimento de calos de sangra d'água (*Croton urucurana*), também recomenda que a repicagem fosse feita próxima aos 70 dias após a inoculação. O crescimento dos calos chegou à fase estacionária entre o 75° e o 90° dia de inoculação, sendo observado neste período 3% de crescimento.

Os resultados apresentados pela curva de crescimento de calos de ipê-branco formados com base em segmentos foliares indicam que seu crescimento

é lento, o qual possivelmente está associado à ocorrência de um ciclo celular também lento (Alberts et al., 1997).

5.2 Análises bioquímicas de calos de ipê-branco

A análise de variância demonstrou que houve diferenças estatísticas para a quantificação de açúcares solúveis totais e redutores, proteínas e aminoácidos obtidos de calos de ipê-branco durante 90 dias de cultivo a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS, 1mg L^{-1} de 2,4-D e 2mg L^{-1} de cinetina (Tabela 9A, Anexo A). Pelos testes realizados, foi possível determinar as características bioquímicas dos calos. Os resultados são apresentados a seguir.

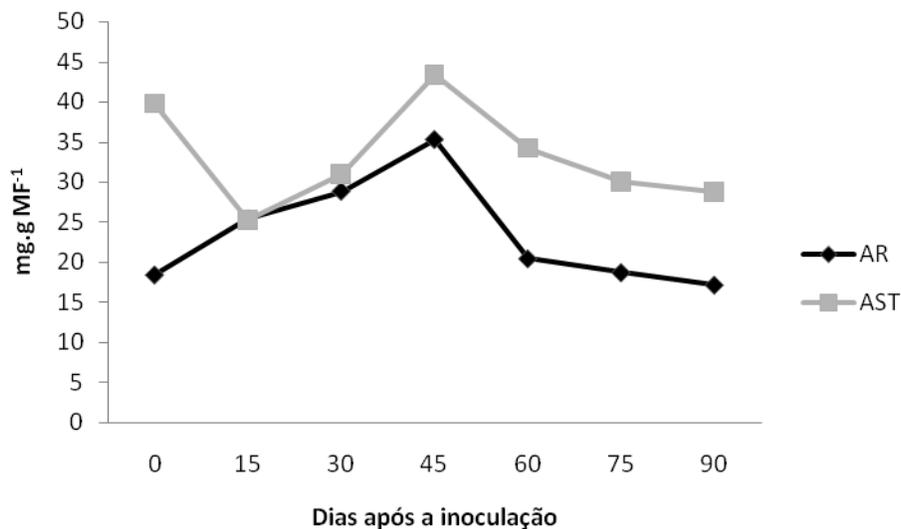


Figura 3. Teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores obtidos de calos de ipê-branco formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado 1mg L^{-1} de 2,4-D e 2mg L^{-1} de cinetina, durante 90 dias de cultivo.

Os teores de açúcares solúveis totais (AST) apresentavam-se no

dia da inoculação altos, ocorrendo em seguida, uma queda brusca e posterior síntese chegando aos maiores níveis no 45° dia de cultivo. Após esse período, houve novamente uma redução destes teores, conforme se observa na Figura 3.

O elevado teor de AST no dia da inoculação pode estar relacionado aos açúcares contidos nas folhas da planta-mãe fornecedora dos explantes, consumidos posteriormente, para suprir a demanda metabólica do crescimento dos calos. (Lima et al., 2007) Na fase estacionária a redução indica que este incremento está relacionado com a energia utilizada, assim como o esgotamento no meio de cultura.

Lima et al. (2007), encontrou teores máximos de açúcares solúveis totais no dia da inoculação e no 21° dia, que corresponde a fase lag da curva de crescimento de calos de explantes foliares de sangra d'água (*Croton urucurana*), da curva apenas. Azevedo (2003), observou o máximo de AST no 84° dia após a inoculação em explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). Nogueira (2003) observou teores máximos de AST aos 70 dias de cultivo, coincidindo com o período indicado para repicagem dos calos para o murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*).

Serra et al. (2000) obtiveram resultados diferentes com calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). Os teores de AST apresentaram constante redução durante todo o período de cultivo. Soares (2003) também observou que os teores de AST permaneceram relativamente constantes, ocorrendo um leve acréscimo no 80° dia após a inoculação em explantes foliares de ingá (*Inga vera*).

Para os teores de açúcares redutores houve primeiramente um acúmulo e posterior queda após o 45° dia cultivo. Nessa data, foi observado o maior nível de açúcares redutores (AR), conforme se visualiza na Figura 4.

Relacionando-se os teores de AR com a curva de crescimento, percebe-se que esses teores se estiveram decrescentes na fase de crescimento linear. Em trabalhos com castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), cita-se que a redução nos teores de AR indica que certos explantes possivelmente apresentam dificuldades de absorver a fonte de carboidrato presente no meio de cultura (Serra et al., 2000).

Lima et al. (2007) verificou que os açúcares redutores aumentaram nos dias 35 e 77 e foram crescentes na fase exponencial nos explantes foliares de sangra d'água (*Croton urucurana*). Soares (2003) com explantes foliares de ingazeiro (*Inga vera subsp. affinis*). Este autor verificou grande variação nos teores de AR ao longo período de 110 dias de inoculação. Resultados contrários foram verificados por Nogueira (2003), constatou decréscimo constante dos teores de AR ao longo de todo o período de cultivo de explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*).

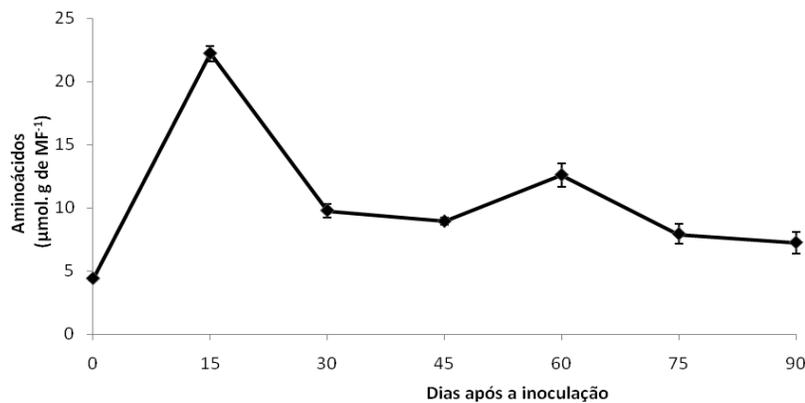


Figura 5. Teores de aminoácidos obtidos de calos de ipê-branco formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado 1mg L⁻¹ de 2,4-D e 2mg L⁻¹ de cinetina, durante 90 dias de cultivo.

Os teores de aminoácidos obtidos nos calos de explantes foliares de ipê-branco mostrou um acúmulo até o 15° dia após a inoculação, reduzindo muito até o 45° dia. Após esse período, houve uma pequena elevação até o 60° dia de cultivo (Figura 6). Esses resultados estão de acordo com Paiva Neto et al. (1997) obteve em calos de moreira, teor máximo de aminoácidos no 15° dia após a inoculação. E em calos originados de segmentos foliares de castanha-do-brasil, Serra et al. (2000) também observaram que os teores de aminoácidos até o 15° de inoculação aumentaram. Os autores observaram, ainda que, esses teores coincidiram com a fase lag de crescimento dos calos e obtiveram redução nos teores de aminoácidos a partir do 30° dia de inoculação. Soares (2003) também observou que em explantes foliares de ingá (*Inga vera*), que os teores de aminoácidos aumentaram logo até o 20° dia após a inoculação, apresentado queda e posterior aumento a partir do 40° dia. Azevedo (2003) observou o máximo de aminoácidos aos 56° dia após a inoculação em explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e o mínimo no dia da inoculação.

O aumento inicial e posterior redução no teor de aminoácidos também foram detectados por Sacchi et al. (1995), em calos de kiwi (*Actinidia deliciosa*). Relacionando os teores de aminoácidos encontrados nos calos de explantes foliares às fases da sua curva de crescimento, percebe-se que, ao contrário das proteínas, ocorreu acúmulo inicial de aminoácidos durante a fase lag. A partir deste ponto, os teores de aminoácidos começaram a decrescer até o 60° dia, na fase linear, quando voltou novamente à ocorrer acúmulo de aminoácidos até o início da fase estacionária.

A elevação nos teores de aminoácidos logo no início do período de cultivo, provavelmente expressa a síntese aminoácidos formados a partir da degradação de proteínas. (Serra et al., 2000). Além disso, o aumento no

teor de aminoácidos obtidos pode ser causado pela absorção considerável do íon amônio e da glicina do meio de cultura. Segundo George et al. (1988), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais são produzidos utilizando-se energia liberada no catabolismo dos carboidratos.

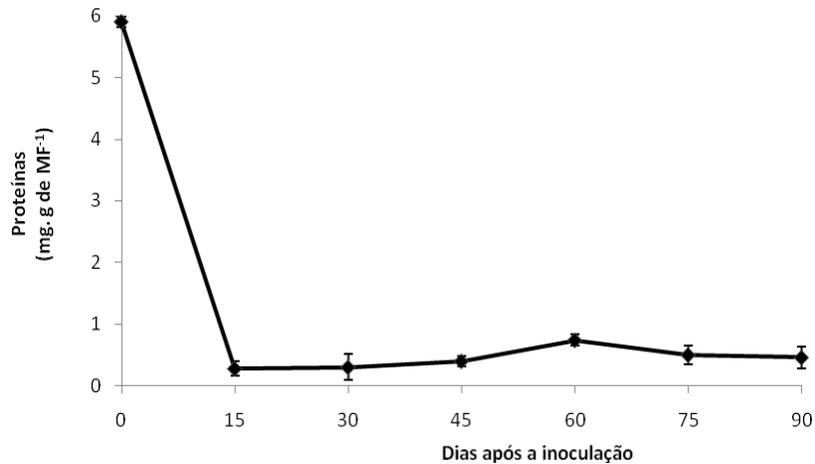


Figura 6. Teores de proteínas solúveis em água obtidas de calos de ipê-branco formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado 1mg L^{-1} de 2,4-D e 2mg L^{-1} de cinetina, durante 90 dias de cultivo.

Observa-se que os teores máximos de proteínas foram observados no início do período de cultivo, seguidos de uma redução drástica a partir do 15º dia de inoculação (Figura 5). Este decréscimo sugere que os calos possivelmente utilizaram a reserva de proteínas dos explantes no dia da inoculação, originada da planta matriz. A partir do 30º dia de inoculação observou-se um aumento nos teores de proteína, permanecendo até o 60º dia de cultivo, com posterior queda.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2007) com explantes foliares de sangra d'água (*Croton urucurana*), que obteve teores máximos no início do cultivo e decréscimo brusco no 7º dia, na fase lag e um leve aumento das proteínas entre o 14º e 42º dia e nova queda na fase exponencial. Entre o 45º a 60º dia de cultivo, houve pequeno aumento proteínas, com posterior queda. Este aumento coincide com a fase de crescimento linear, indicando que houve síntese e consumo dessas proteínas, uma vez que, nesta fase, ocorrem as maiores taxas de divisão celular.

Mesquita et al. (2002) estudando calos de lechieira (*Licthi chinensis*) oriundos de explantes foliares, observaram teor máximo de proteínas no 42º dia após a inoculação com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e, no 70º dia de cultivo, para explantes inoculados com 6 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Analisando a relação entre os teores de proteínas e aminoácidos, observamos que aos 15 dias após a inoculação, a relação era de 22,2µm de aminoácidos para 0,27mg de proteína. Aos 60 dias de cultivo, o teor de aminoácidos foi de 12,5µmol e as proteínas com 0,73mg de proteínas. A relação entre proteínas e aminoácidos aumentou de 0,012 para 0,058, indicando que a biossíntese de aminoácidos aumentou.

Foi verificado que na fase lag, ocorreu primeiramente degradação de açúcares solúveis totais, gerando um pequeno aumento de açúcares redutores, as proteínas foram degradadas e os aminoácidos aumentaram. Na fase exponencial, houve síntese de açúcares solúveis totais e redutores, e os aminoácidos foram consumidos. Na fase de crescimento linear, os açúcares solúveis totais e redutores foram degradados, as proteínas e os aminoácidos foram sintetizados. Nas fases de desaceleração e estacionárias, os açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos reduziram, indicando seu consumo pelos calos.

6 CONCLUSÕES

- A curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de ipê-branco apresenta crescimento sigmóide, com cinco fases distintas.

- A repicagem dos calos para um novo meio de cultura deve ser realizada entre 60° e 75° dias cultivo.

- Teores máximos para açúcares solúveis totais e açúcares redutores foram observados no 45° dia de cultivo.

- As proteínas solúveis totais apresentaram maiores teores no dia da inoculação, reduzindo em seguida. Teores máximos de aminoácidos foram observados no 15° dia de cultivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos as anatomia foliar de copaíba (Copaifera langsdorffii Desf.)**. 2003. 86 p.
Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254. 1976.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part I – the technology**. 2.ed. Edington: Exergetics, 1993. 574p.

GEORGE, E.F.; PUTTOCK, J.M.; H.J. **Plant culture media: commentary and analysis**. Edington: Exergetics, 1988. 420p.

LAMEIRA, O. A. ; PINTO, José Eduardo Brasil Pereira ; ARRIGONII-BLANK, M. F. ; PEREIRA, F. D. . Estabelecimento da curva de crescimento em calos de Erva-baleeira (*Cordia Verbenacea* L.). **Horticultura Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 92-93, 1996

LEMONS, G. B. ; DELÚ FILHO, Nelson ; OLIVEIRA, L. E. M. ; PURCINO, A. A. C. . Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, DF, v. 11, n. 2, p. 113-118, 1999.

LIMA, E.C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill)**. 2004. 105p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E. B.; NICIOLI, P. M. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.) **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.

LINDSEY Y.K.; YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 34, n. 145, p. 1055-1065, 1983.

MESQUITA A.C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise**

bioquímica de calos. 1999. 67. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MESQUITA, A. C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A. DE; PAIVA⁴ P. D. O., PAIVA; L. V. PAIVA; GOMES, G. A. C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechiera (*Litchi chinensis* Sonn.) **Magistra**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, 2002.

MILLER, G.L. use o dinitrosalicílico acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428. 1959.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962

NOÉ, W.; LANGEBARTELS, C.; SEITZ, H.U. Anthocyanin accumulation in PAL Searlet rose cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 23, p. 75-91, 1980.

PAIVA NETO, V. B.; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; PÓVOA, J. S. R. Comportamento *in vitro* de segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 1, p. 135-141, 1997.

PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal.** Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 233p.

PHAN, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of "*in vitro*" culture of

plants; problems and applications, comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. **Experimental Biological**, v. 46, n. 3, p. 58, 1987.

PHILLIPS, R.; HENSHAW, G.G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acerpseudoplatanus* L. **Journal of Experimentei Botany**, v. 28, ri. 105, p. 785-794, 1977.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins Nijoff, 1990, 326 p.

SACCHI, G.A.; MORGUTTI, S.; ABRUZZESE, A. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in Kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Berkeley, v. 106, n. 1, p. 107-113, Mar. 1995.

SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA; P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar RUBI. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p.571-577, 2003.

SERRA, A.G.P; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.4, p. 833-840, 2000.

SHIMIZU, T.; CLITTO, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M .W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in

batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, p.125-129, 1977.

SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.)** 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras.

STEIN, W.; MOORE, S.A. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesday, v.176.], p. 367-372, 1948

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. the estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemistry Journal**, London, p. 508-514, 1954.

CAPITULO V

**ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE PLANTAS DE IPÊ-
BRANCO PROVENIENTES DO CULTIVO *EX VITRO* E *IN*
*VITRO***

1 RESUMO

ABBADE, Leticia Caravita. Anatomia foliar comparada de plantas de ipê-branco provenientes do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. In: _____. **Aspectos do cultivo *in vitro* de Ipê-branco**. 2008, cap. 5, p.83-102. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento das estruturas anatômicas na definição de um protocolo de micropropagação do ipê-branco. Este estudo teve como objetivo comparar a estrutura interna de folhas de ipê-branco cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. Para as avaliações anatômicas foram utilizadas folhas do primeiro nó de ramos, com 30 dias de cultivo *in vitro* e de árvores de campo. O estudo anatômico foi feito em de seções transversais e paradérmicas das folhas e analisado em microscópico. As estruturas foliares de plantas de ipê apresentam epiderme uniestratificada, e o mesofilo possui uma organização dorsiventral. São hipostomáticas e apresentam tricomas em todas as faces. Folhas de plantas cultivadas *ex vitro*, em comparação as culturas *in vitro*, apresentaram maior espessura do limbo foliar, nervura central, epiderme adaxial e abaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso. Em folhas oriundas do cultivo *ex vitro*, observou-se se cutícula e esclerênquima, estruturas ausentes nas folhas cultivadas *in vitro*. Folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor número de estômatos e maior número de tricomas quando comparadas com as cultivadas em *in vitro*. Os estômatos dessas são maiores em comparação com o das folhas cultivadas *ex vitro*.

* Comitê Orientador: Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Orientadora), Renato Paiva (Co-orientador), Evaristo Mauro de Castro (Colaborador)

2 ABSTRACT

ABBADE, Leticia Caravita. *Ex vitro* and *in vitro* characteristics of leaf's anatomical of *Tabebuia roseo alba*. In: _____. **Aspects of the *in vitro* culture of *Tabebuia roseo-alba***. 2008. cap. 5, p.83-103. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

An appropriate understanding of the basic plant or organ structure is essential to get knowledge of a certain plant. Considering the importance of knowledge of anatomical structures in the protocol definition to micropropagation of *Tabebuia roseo-alba*, this study had as propose comparing the leaves internal structure *in vitro* and *ex vitro*. To the anatomical evaluations, were used the first leaf with 30 days of *in vitro* growth and from field adult tree. The anatomical study was made utilizing in microscope from transversal and paradermics sections from leaf blade. The leaves structures from plants *ex vitro* show uniseriate epidermis, and mesophly with dorsiventral organization. They are hipostomatic and present trichomes in all the faces. Leaves from plants cultivate *ex vitro*, in compared with culture *in vitro* were largest in limb, central nervure, adatial and abbatial epidermis and palisade and sponges parenchyma. In leaves of cultivate *ex vitro*, cuticle and sclerenchym were present, but these structures were not find in plants cultivated in vitro. Leaves from plants cultivated *ex vitro* presented minor number of stomate and greater number of trichomes when compared with plants *in vitro*. Stomate of these plants showed highest size then the other from leaves of plants cultivated in *vitro*.

* Guidance Committee: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, DAG - UFLA (Adviser), Renato Paiva, DBI – UFLA (Co-adviser.), Evaristo Mauro de Castro

3 INTRODUÇÃO

Espécies lenhosas propagadas *in vitro* são freqüentemente afetadas por vários fatores do meio de cultura, que podem ocasionar degeneração metabólica e morfológica. A compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento adaptativo do vegetal (Castro, 2002). Diferentes condições ambientais influenciam diretamente nas suas estruturas anatômicas (Lima, 2004). Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente à fotossíntese e transpiração. Muitas dessas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa durante os vários estágios da cultura de tecidos são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica de plantas cultivadas *in vitro* (Fidelis, 1998)

As desordens anatômicas são menos significativas em caule e raízes, porém sua manifestação nas folhas afeta os dois principais processos realizados por estas, isto é, a fotossíntese e as trocas gasosas (Deberg & Maene, 1984).

A anatomia foliar em plantas micropropagadas é de grande importância para estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros. Esses estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma elevada mortalidade, muitas vezes, inviabilizando a micropropagação de algumas espécies (Martinotto, 2004).

De acordo com Preece e Compton (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à

incapacidade de controlar as perdas de água quando estas são submetidas a condições adversas, como o ambiente natural.

As plantas crescidas *in vitro* podem apresentar características peculiares como: abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima), estômatos não funcionais e baixa atividade autotrófica e outros tipos de desordens (Campostrini & Otoni, 1996).

Em estudos histológicos de órgãos vegetativos de plantas propagadas *in vitro* foi verificado que os mesmos apresentavam estruturas pouco diferenciadas se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação ou ambiente natural. (Fidelis et al., 2000; Santos, 2001; Soares, 2003).

Considerando a importância do conhecimento das estruturas anatômicas para a definição de um protocolo de micropropagação para o ipê-branco, este estudo teve como objetivo comparar a estrutura interna de folhas desta espécie, oriundas de plântulas cultivadas *ex vitro* e *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para as avaliações anatômicas foram utilizadas folhas coletadas do primeiro nó de ramos, da base para o ápice, de plântulas mantidas *in vitro* e de uma árvore adulta de campo (*ex vitro*), localizada próximo a portaria do campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada a 855m de altitude, 21°13'51.91"S de latitude e 44°59'41.01"W GRW de longitude.

As folhas de plântulas cultivadas *in vitro* foram oriundas de sementes de ipê-branco inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com 50% de concentração de sais, suplementado com 30 gL⁻¹ de sacarose e 1 gL⁻¹ de GA₃ e 0,6gL⁻¹ de ágar em tubo de ensaio mantidas por 30 dias em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura 25±2°C, fotoperíodo de

16 horas e irradiância de $35\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

Os materiais vegetais *ex vitro* e *in vitro*, foram fixados em FAA (0,5% de formaldeído, 0,5% de ácido acético e 90% de álcool 70°GL) por 72 horas e posteriormente conservadas em álcool 70°GL. O estudo anatômico das folhas se baseou no exame microscópico de seções paradérmicas abaxiais e adaxiais e seções transversais do limbo foliar.

Para a avaliação dos tecidos foliares (espessura da nervura central, limbo foliar, epiderme adaxial e abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso), foram realizados cortes transversais na região mediana das folhas obtidos em micrótomo, clarificados em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos, e submetidos à coloração de azul de astra (95%)/safranina (5%), baseada na metodologia adaptada de Kraus & Arduin (1997). As lâminas foram montadas em glicerina 50%.

Para os estudos relativos à caracterização dos estômatos (número médio por mm^2 , diâmetro polar e equatorial, densidade estomática e densidade dos tricomas) foram realizados cortes paradérmicos na região mediana das folhas, na epiderme abaxial e adaxial, manualmente com auxílio de lâmina de aço, clarificados em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 5 minutos, e submetidos à coloração de Azul de Toluidina. As lâminas foram montadas em glicerina 50%.

A partir das seções paradérmicas e transversais, com o auxílio de ocular micrométrica, foram efetuadas as medições. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se o microscópio Ken-a-Vision TT18 e a câmera digital Canon PowerShot A620. O Software de Medição utilizado foi o Sigma Pro.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de 24 repetições nos cortes transversais e 48 repetições nos cortes paradérmicos, correspondentes a 3 folhas oriundas de ipê-branco. Os tratamentos foram

representados por duas condições de cultivo (*ex vitro* e *in vitro*). Após a análise de variância, utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, para a comparação das médias entre tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças anatômicas entre os tecidos de folhas provenientes do cultivo *in vitro* e *ex vitro*. Essas diferenças também foram observadas por diversos autores que compararam as anatomias de folhas *in vitro* e *ex vitro* de outras espécies como mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*) (Fidelis et al., 2000), ingá (*Inga vera*) (Soares, 2003), *Annona glaba* (Deccetti, 2004), sangra d'água (*Croton urucurana*) (Lima; 2004), candeia (*Eremanthus erythropappus*) (Rosal, 2004), cagaita (*Eugenia dysenterica*) (Martinotto, 2004), abacaxi (Barbosa et al., 2006), entre outras.

As folhas de ipê-branco, cultivadas tanto *in vitro* como *ex vitro*, apresentaram organização dorsiventral conforme se visualiza na Figura 1. Esses resultados condizem com Metcalfe & Chalk (1957), segundo os todas as espécies de Bignoniaceae são dorsiventrais, sendo registrada estrutura isobilateral apenas no gênero *Kigelia*.

No entanto, Souza & Oliveira (2004) estudando *Tabebuia avellanedae* e *T. chrysotricha* encontraram a dorsiventralidade apenas nos eófilos, isobilateralidade nos metafílos.

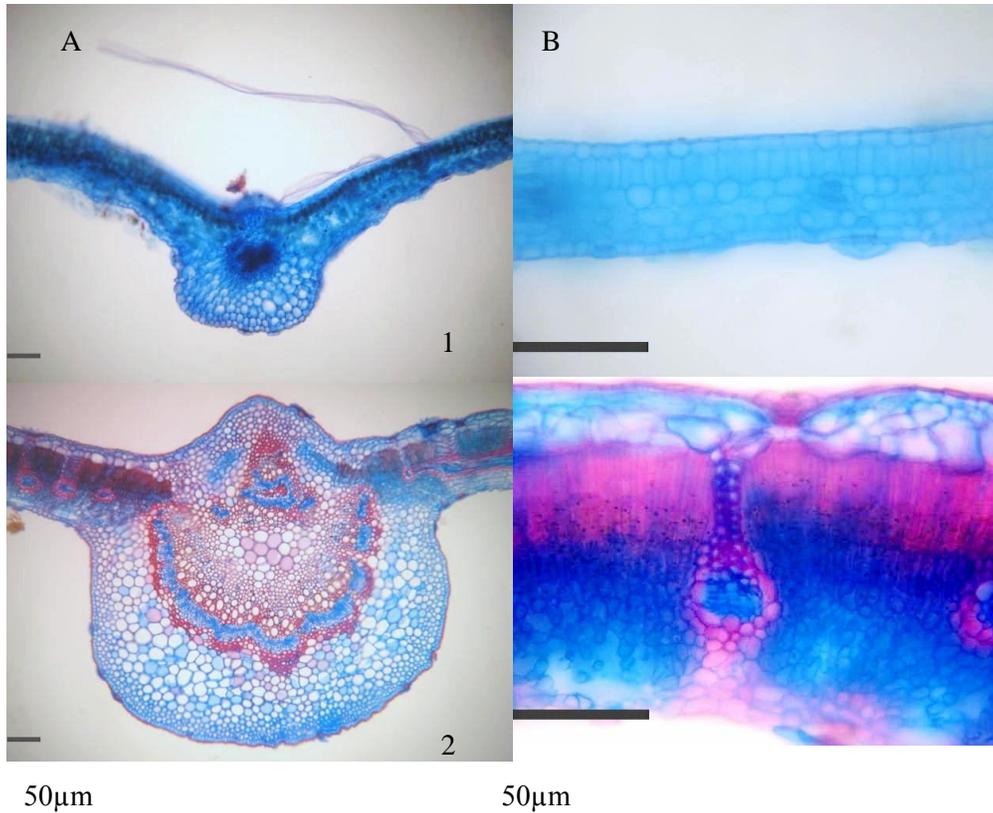
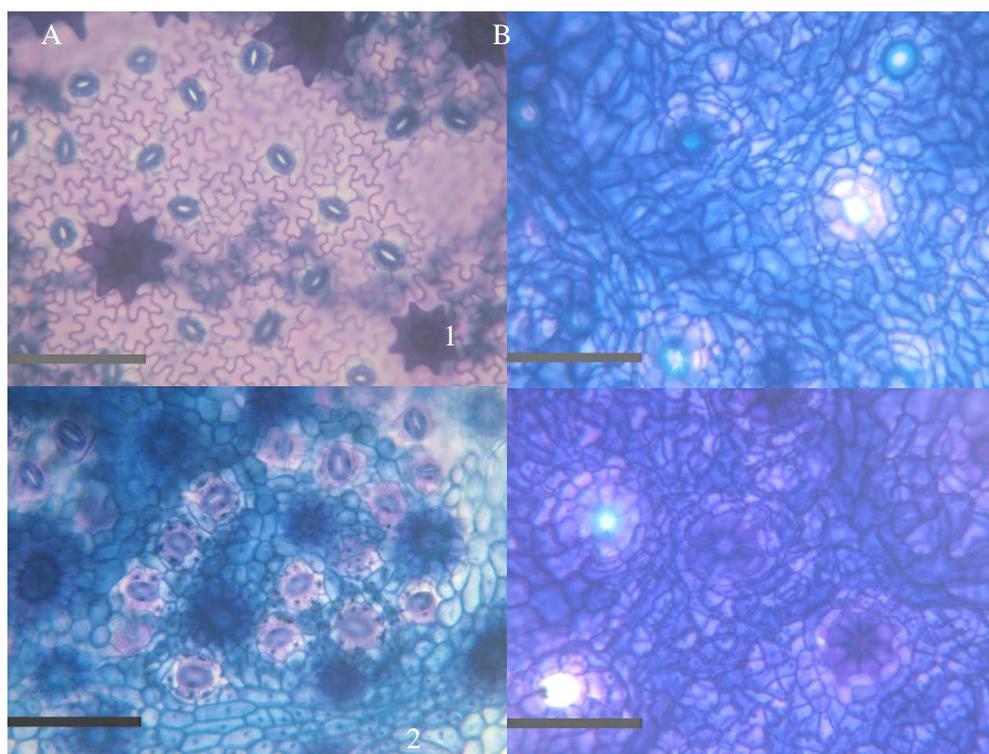


Figura 1 Fotomicrografias de seções transversais de folhas de ipê-branco cultivados *in vitro* (1) e *ex vitro* (2), nervura central 10X (coluna A) e limbo foliar 40X (coluna B).

Seções transversais das lâminas foliares de todos os ambientes de cultivo demonstraram que tanto a epiderme adaxial quanto a epiderme abaxial apresentam-se uniestraficadas. O parênquima paliçádico está voltado para a superfície adaxial e o parênquima esponjoso voltado para a superfície abaxial conforme se visualiza na Figura 1. Ocorre um maior desenvolvimento de todas as estruturas nas estruturas *ex vitro*. Em folhas de plantas cultivadas *in vitro* não há cutícula e o parênquima paliçádico é pouco diferenciado. Segundo Fráguas

(2003), a ausência de formação de ceras epicuticulares aliada à alteração na composição química das mesmas, é uma das características que possivelmente pode ser induzida pela condição *in vitro*, contribuindo para a dessecação das mudas após transferência para a casa de vegetação causada pela excessiva perda de água.



50 μ m

Figura 2. Fotomicrografias de seções paradérmicas de folhas de ipê-branco cultivados *in vitro* (1) e *ex vitro* (2), das epidermes abaxial (A) e epiderme adaxial (B).

Pelo corte paradérmico, observa-se que as folhas de ipê-branco são hipostomáticas e apresentam tricomas estrelados em ambos os lados. Souza & Oliveira (2004) também encontraram estômatos somente na face abaxial nas espécies de *Tabebuia avellanedae* e *T. chrysotricha*.

Tricomas também são encontrados nas espécies de *T. avellanedae*, apresentando se com tamanho reduzido, extremidade afilada e são unicelulares. Em *T. chrysotricha*, os tricomas tectores são pluricelulares, alongados e ramificados (Souza & Oliveira, 2004).

5.1 Espessura do limbo foliar e nervura central

De acordo com a análise de variância, houve diferença estatística significativa entre os tecidos foliares de ipê-branco cultivados *in vitro* e *ex vitro* (Tabela 10A, Anexo A). As folhas *ex vitro*, provindas de plantas de campo tiveram espessuras superiores as do cultivo *in vitro*, quanto à espessura do limbo foliar, nervura central, da epiderme adaxial e abaxial e os parênquimas paliádico e esponjoso (Tabela 1).

Tabela 1. Espessura média do limbo foliar e da nervura central de lâminas foliares de ipe-branco cultivados *ex vitro* e *in vitro* por 30 dias

Tipo de Cultivo	Espessura (µm)	
	Limbo Foliar	Nervura Central
<i>Ex vitro</i>	177,44 a	951,55 a
<i>In vitro</i>	84,95 b	360,21 b

*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem ao teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Uma das diferenças verificadas entre a região vascular da nervura central das folhas produzidas *in vitro* e *ex vitro* é o esclerênquima. Pela figura 3, observa-se que este envolve completamente os feixes vasculares das folhas *ex vitro* e esteve ausente no cultivo *ex vitro*. O esclerenquima é um tecido que fica próximo ao eixo vascular, responsável por dar maior sustentação as plantas. Soares (2003), também observou essa característica ao comparar folhas de ingá (*Inga vera*) *in vitro* e *ex vitro*, e afirma que a ausência dessa estrutura em folhas micropropagadas as torna menos resistentes e com aparência mais frágil.

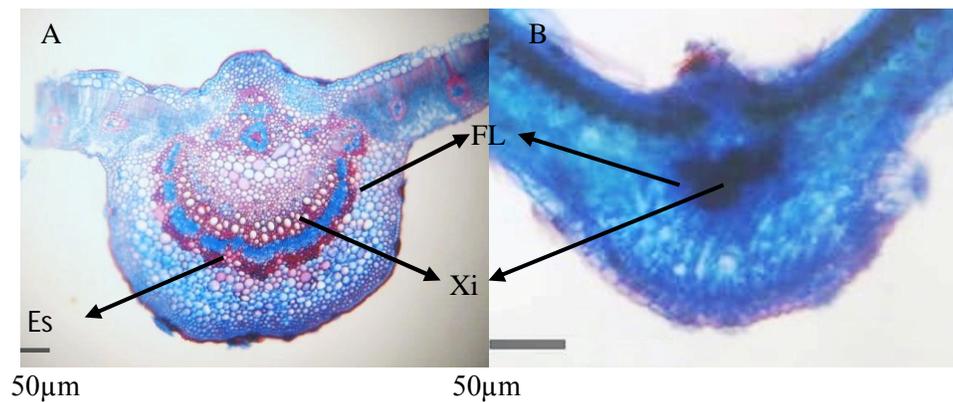


Figura 3. Seções transversais da nervura central de folhas de plantas ipê-branco cultivados *ex vitro* (A) e *in vitro* por 30 dias (B), evidenciando o xilema (Xi), o floema (Fl) e o esclerênquima (Es).

Trabalhando com cortes histológicos da nervura de folhas obtidas *in vitro* e *ex vitro* de cafeeiro (Santos, 2001) e ingá (*Inga vera*) (Soares, 2003), obtiveram resultados bastante semelhantes, com aumento do número de células do xilema em largura e espessura em plantas oriundas do ambiente natural.

5.2 Espessura das epidermes abaxial e adaxial e parenquimas paliçádico e esponjoso

A análise de variância (Tabela 11A, Anexo A) mostrou que houve diferenças estatísticas significativas para a espessura das epidermes abaxial e adaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso. Plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram, espessuras superiores em todos os tecidos, as do cultivo *in vitro*. Resultados semelhantes também foram encontrados por Fidelis (2000); Lima (2004) e Martinotto (2004) trabalhando respectivamente com mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*), sangra d'água (*Croton urucurana*) e cagaita (*Eugenia dysenterica*), cultivadas in ambiente natural e *in vitro*.

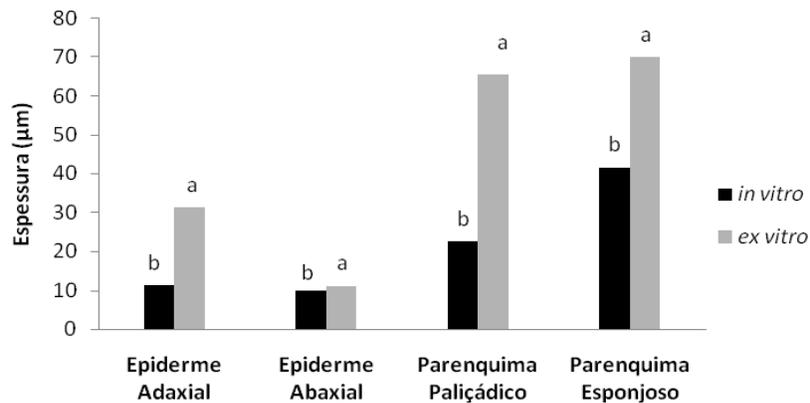


Figura 3. Espessura de tecidos foliares de ipê-branco cultivados *ex vitro* e *in vitro* por 30 dias. Médias seguidas de mesma letra não diferem ao teste de Tukey a nível de 5% de significância.

No ambiente natural, a alta intensidade luminosa contribui para o espessamento foliar e a alongação do parênquima paliçádico (Castro et al., 1998). Folhas de plantas crescidas em ambientes ensolarados apresentam uma taxa fotossintética mais elevada e são menores, mais pesadas e mais espessas por unidade de área em comparação com plantas crescidas à sombra (Boardman

1977 e Bjorkman, 1981). O aumento na espessura da folha, especialmente pelo alongamento ou adição de células paliçádicas, está relacionado a uma redução na resistência do mesofilo ao dióxido do carbono (Nobel, 1977) e correlacionado com aumento de fatores potencialmente limitantes à fotossíntese como a RuBisco, carregadores de elétrons ou condutância estomatal (Bjorkman, 1981). Chazdon e Kaufman (1993) estudando duas espécies de *Piper* observaram que a capacidade fotossintética estava correlacionada com a espessura do mesofilo.

5.3 Densidade estomática

Houve diferença estatística nas avaliações da densidade estomática para plantas mantidas *in vitro* e *ex vitro*. (Tabela 12A, Anexo A). Plantas mantidas *ex vitro* apresentaram menor número de estômatos e maior número de tricomas. O maior número de estômatos observados em plântulas cultivadas *in vitro* provavelmente foi provocado pelo ambiente do tubo, com alta umidade e temperatura amena.

Esses resultados concordam com Martinotto (2004) que observou em seu estudo com *E. dysenterica*, que a densidade estomática é maior em folhas de plântulas *in vitro* do que em folhas campo. As condições ambientais que influenciam as trocas gasosas provocam alterações no desenvolvimento estomático, segundo Fráguas (2003) a baixa luminosidade e a pequena troca gasosa do ambiente *in vitro*, provoca o aumento no número de estômatos pois esses são menos funcionais que os estômatos *ex vitro*.

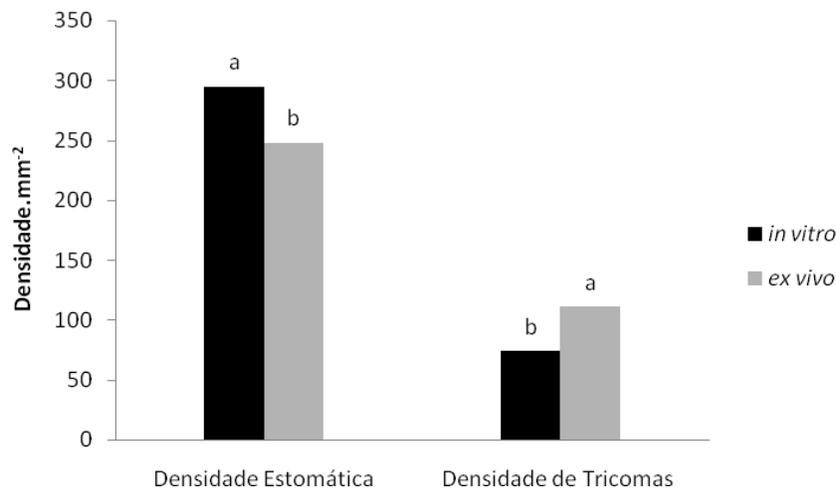


Figura 4. Densidade estomática e densidade dos tricomas na superfície abaxial de folhas de ipê-branco cultivados *ex vitro* e *in vitro* por 30 dias. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem ao teste de Tukey a nível de 5% de significância.

A densidade estomática das folhas de ipê *in vitro* e *ex vitro*, diferem estatisticamente. Ocorreu maior número de estômatos por área no cultivo *in vitro*, onde a umidade era alta, pois os estômatos são responsáveis por pelas perdas de água na planta (Taiz & Zeiger, 2004). No ambiente natural, a menor quantidade de estômatos diminui a perda de água planta, possibilitando a sobrevivência em condições de estresse hídrico. O maior número de tricomas nas folhas *ex vitro* também contribui para diminuir o excesso de transpiração.

5.4 Diâmetro polar e equatorial dos estômatos

Houve diferenças estatísticas nos diâmetros polares e equatoriais para plantas mantidas *in vitro* e *ex vitro*. (Tabela 13A, Anexo A). Conforme a figura 5, os estômatos de folhas cultivadas *in vitro* são maiores em comparação com os estômatos de folhas *ex vitro*.

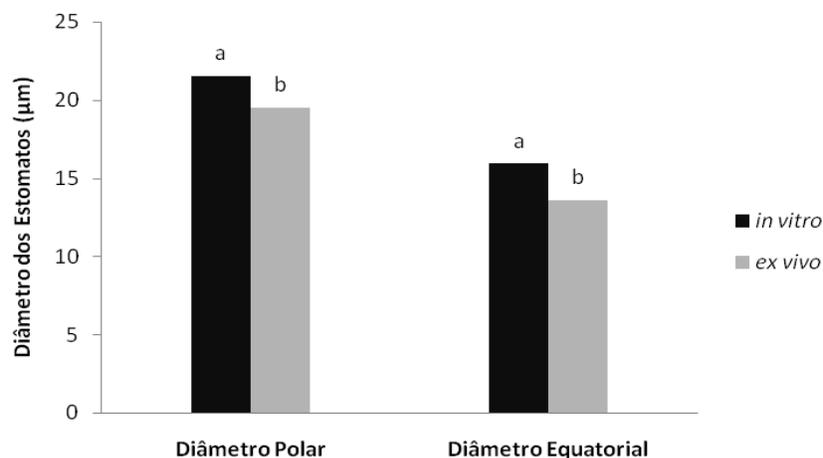


Figura 5. Diâmetros equatoriais e polares de ipê-branco cultivados *ex vitro* e *in vitro* por 30 dias. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem ao teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Houve diferença estatística entre os diâmetros polares e equatoriais das folhas *in vitro* e *ex vitro*. O maior diâmetro ocorreu nas folhas *in vitro*, indicando que estes eram maiores que os diâmetros das folhas *ex vitro*.

Tabela 2. Relação entre os diâmetros polares e equatoriais do tecido epidérmico abaxial de lâminas foliares de ipê-branco cultivadas *ex vitro* e *in vitro* por 30 dias.

Tipo de Cultivo	Relação DP/DE
<i>Ex vitro</i>	1,44 a
<i>In vitro</i>	1,35 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem ao teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Pela relação DP/DE, os estômatos das folhas *ex vitro* são mais ovais, tendo o diâmetro polar maior. Isso pode indicar que os estômatos das folhas *ex*

vitro são mais fechados e, portanto, mais funcionais que os estômatos das folhas *in vitro*.

6 CONCLUSÃO

- As estruturas foliares de plantas de ipê apresentam epiderme uniestratificada, e o mesofilo possui uma organização dorsiventral. São hipostomáticas e apresentam tricomas em todas as faces.

- Folhas de plantas cultivadas *ex vitro*, encontram se cutícula e esclerênquima que são ausentes nas folhas *in vitro*.

- Folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram maior espessura em comparação com as do cultivo *in vitro*, quanto à espessura do limbo foliar, nervura central, da epiderme adaxial e abaxial e os parênquimas paliçádico e esponjoso.

- Folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor número de estômatos e maior número de tricomas quando comparadas com o cultivo *in vitro*. Os estômatos de folhas cultivadas *in vitro* são maiores que os estômatos de folhas *ex vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA ,S. B. S. C. ; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.185-194, 2006.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. IN: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. **Encyclopedia of plant physiology new series**, Berlin, v.12a, p. 57-107, 1981.

BOARDMAN, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.355-377, 1977.

CASTRO, E. M. de; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, D. M. de; GAVILANES, T. O. T. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, 1998.

CASTRO, E.M. de. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. 221p. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimação de plantas: abordagens recentes**. In: TORRES, A. C.; LACORTE, C. (Eds.). Brasília: CNPH/Embrapa, ABCTP, 1996. p.2-12. (Notícias, 25).

CHAZDON, R.L.; KAUFMAN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, London, v.7, p.385-394, 1993.

DEBERG, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to in vivo culture of plant. **Parasitica**, London, v. 40, n. 1. p. 69-75.1984.

DECCEITI, S.F.C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glaba* L.** 2004. 93p. Tese (Doutorado em fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FIDELIS, I. CASTRO, E. M. DE; PINTO, J. E. B.P.; GAVILANES M. L.; SANTIAGO, E. J. A. DE. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Trec. Desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.327-336, 2000.

FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii* Trec. (Mama-cadela) uma espécie considerada medicinal.** 1998. 109p. 1998. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FRÁGUAS, C.B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’.** 2003. 110p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplantation of cauliflower plant regenerated from meristem culture. I. Water loss and transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edingburgh, v. 17, n.1, p. 1-7, 1997.

GROUT, B.W.W.; DONKIN, M.E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture *ex vitro* and at a transplanting into soil. **Acta Horticulture**, Den Haag, v.212, p.323-327, 1987.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of the CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. In: Ducate, G; Jacob, M.; SIMEON, A. (Eds.). Symposium Florizel: **Plant micropropagation in horticultural industries**. Arlon, Belgium. 1987, p. 135-143.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 18p.

LIMA, E.C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de Sangra d'água (Croton urucurana Bail)**. 2004. 105p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfológicos de cagaiteira (Eugenia dysenterica DC.)** 2004, 84p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem**. 2nd edition. Oxford: Clarendon Press, 1988. v. 1. 276p.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962.

NOBEL, P.S. Internal leaf área and cellular CO₂ resistance: Photosynthetic implication of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, n.2, p. 137-144, 1977.

PREECE, F.F.; COMPTON, M.E.I. Problems with explants exudation in micropropagation. In BAJAM Y.P.S. **Hight-tech and micropropagation**. Berlin, Spring Verlag, 1991, p.168-189.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish**. 106p. 2004. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTIAGO, E.J.A. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) em condições *in vitro* e *ex vitro***. 1999. 118p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, Cíntia Guimarães dos. **Micropropagação e caracterização bioquímica anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001 110 p. Tese (doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.)** 2003. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA, L.A.de., OLIVEIRA, J.H.G. Morfologia e Anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanedae* Lor ex Griseb e *T. Chrysotricha* (mart ex Dc) Stande (Bignoniaceae) **Acta Scientiarum Biological.**, Maringá, v.26, n. 2, Abril-Junho, 2004

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720 p.

ANEXOS

ANEXO A - TABELAS

Tabela 1A. Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes de ipê-branco dispostas em diferentes sustratos.

FV	GL	Quadrado Médio
Substratos	3	225,000*
Erro	12	9,166
Total	15	
CV = 6,92		

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 2A. Resumo das análises de variância para a porcentagem de desinfestação, com sementes normais, contaminadas e oxidadas em sementes de ipê-branco dispostas *in vitro* com o meio MS.

FV	GL	Quadrados Médios		
		% Normais	% Contaminação	% Oxidação
Tratamentos		587,65*	188,85*	625,753*
Erro		5,975	6,65	39,325
Total				
CV (%)		3,33	14,45	61,47

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 3A. Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes de ipê-branco dispostas em meio MS, MS com 50% de concnetração de sais e MS com carvão ativado.

FV	GL	Quadrados Médios (% Germinação)		
		MS	MS 50%	MS com Carvão Ativado
Tratamentos	4	2209,562*	583,543*	1737,968*
Erro	19	37,703	6,223	53,092
Total	23			
CV (%)		12,50	3,80	14,05

* Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 4A. Resumo das análises de variância para o índice de velocidade de germinação (IVG) para sementes de ipê-branco dispostas em meio MS, MS com 50% de concnetração de sais e MS com carvão ativado.

FV	GL	Quadrados Médios (IVG)		
		MS	MS 50%	MS com Carvão Ativado
Tratamentos	4	0,207*	0,447*	0,053*
Erro	19	0,055	0,028	0,001
Total	23			
CV (%)		38,98	23,10	9,25

* Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 5A. Resumo das análises de variância para a porcentagem de germinação de sementes de ipê-branco dispostas em meio WPM, WPM com 50% de concnetração de sais e WPM com carvão ativado.

FV	GL	Quadrados Médios (% Germinação)		
		WPM	WPM 50%	WPM com Carvão Ativado
Tratamentos	4	1380,208*	1068,583*	861,968*
Erro	19	18,447	19,210	3,342
Total	23			
CV (%)		7,93	18,01	3,56

* Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 6A. Resumo das análises de variância para o índice de velocidade de germinação (IVG) para sementes de ipê-branco dispostas em meio WPM, WPM com 50% de concnetração de sais e WPM com carvão ativado.

FV	GL	Quadrados Médios (IVG)		
		WPM	WPM 50%	WPM com Carvão Ativado
Tratamentos	4	0,222*	0,044*	0,240*
Erro	19	0,001	0,0001	0,038
Total	23			
CV (%)		10,09	6,67	46,77

* Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 7A. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos formados a partir de explantes foliares de ipê-branco em diferentes concentrações de ANA e BAP.

FV	GL	QM
ANA	3	3228,958*
BAP	6	5086,125*
ANA X BAP	6	447,322*
Erro	52	433,322
Total	63	
CV (%) = 48,49		

*Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 8A. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos formados a partir de explantes foliares de ipê-branco em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina.

FV	GL	QM
2,4-D	3	1730,854*
Cinetina	3	3280,739*
2,4-D X Cinetina	9	1180,965*
Erro	48	24,937
Total	63	
CV (%) = 49,73		

*Significativo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 9A. Resumo das análises de variância para a quantificação de açúcares solúveis totais e redutores, proteínas e aminoácidos obtidos de calos de ipê-branco durante 90 dias de cultivo a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS, 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2mg L⁻¹ de cinetina.

FV	GL	Quadrados Médios			
		AST	AR	PTN	AA
Tratamentos	5	223,128*	0,0069*	24,983*	186,943*
Erro	24	4,833	0,0001	0,008	0,445
Total	29				
CV (%)		6,49	7,95	6,72	6,09

* Significativo, a 5% de probabilidade pelo teste de F

Tabela10A. Resumo das análises de variância para as medidas de espessura do limbo e nervura central de folhas de ipê-branco cultivadas *in vivo* e *in vitro* por 30 dias.

FV	GL	Quadrados Médios	
		Limbo Foliar	Nervura Central
Tratamentos	1	51328,250*	2098109,800*
Erro	22	175,069	2230,525
Total	23		
CV (%)		10,09	7,20

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 11A. Resumo das análises de variância para as medidas de espessura das epidermes abaxial e adaxial e parenquimas paliçádico e esponjoso obtidas de folhas de ipê-branco cultivadas *in vivo* e *in vitro* por 30 dias.

FV	GL	Quadrados Médios			
		Epiderme Abaxial	Parenquima Paliçádico	Parenquima Esponjoso	Epiderme Adaxial
Tratamentos	1	8,760*	11068,215*	4822,335*	2393,001*
Erro	22	1,957	125,710	61,871	5,693
Total	23				
CV (%)		13,38	23,53	14,13	11,27

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 12A. Resumo das análises de variância para densidade estomática e densidade de tricomas na epiderme abaxial obtidas de folhas de ipê-branco cultivadas *in vivo* e *in vitro* por 30 dias.

FV	GL	Quadrados Médios	
		Densidade Estomatos	Densidade Tricomas
Tratamentos	1	25715,020*	16465,020*
Erro	46	1624,049	918,618
Total	47		
CV (%)		14,86	32,80

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 13A. Resumo das análises de variância para os diâmetros polar e equatorial e a relação dos diâmetros polar e equatorial (DP/DE) epiderme abaxial obtidas de folhas de ipê-branco cultivadas in vivo e *in vitro* por 30 dias.

FV	GL	Quadrados Médios		
		Diâmetro Polar	Diâmetro Equatorial	Relação DP/DE
Tratamentos	1	49,816*	64,867*	0,099*
Erro	46	5,89	142,482	0,018
Total	47			
CV (%)		11,83	11,93	9,73

ANEXO B – Meios de Cultura

Tabela 1B. Tabela 1. Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).

COMPONENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83
Micronutrientes		
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .4H ₂ O	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Vitaminas		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,1
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Outros		
Ágar		7,0
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,0

Tabela 2B. Composição do meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980).

COMPONENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	400
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	96
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
Micronutrientes		
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Sulfato de manganês	MnSO ₄ . H ₂ O	22,3
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
Vitaminas		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,1
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Outros		
Ágar		7,0
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,0