

**CITOCININAS NOS PROCESSOS
ANATÔMICOS, CITOLÓGICOS E
FISIOLÓGICOS DURANTE O CULTIVO *IN*
VITRO E ACLIMATIZAÇÃO DE
Annona glabra L.**

LENALDO MUNIZ DE OLIVEIRA

2006

LENALDO MUNIZ DE OLIVEIRA

**CITOCININAS NOS PROCESSOS ANATÔMICOS, CITOLÓGICOS E
FISIOLÓGICOS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* E
ACLIAMATIZAÇÃO DE *Annona glabra* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Renato Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

Oliveira, Lenaldo Muniz de

Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L. / Lenaldo Muniz Oliveira. --
Lavras : UFLA, 2006.

104 p.: il.

Orientador: Renato Paiva

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Araticum. 2. *Annonaceae*. 3. Citocinina. 4. Micropropagação. 5.
Desenvolvimento I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.523

-634.41

LENALDO MUNIZ DE OLIVEIRA

**CITOCININAS NOS PROCESSOS ANATÔMICOS, CITOLÓGICOS E
FISIOLÓGICOS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* E
ACLIAMATIZAÇÃO DE *Annona glabra* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 06 de dezembro de 2006.

Prof. Dr. Nilton Nagib Jorge Chalfun	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Prof. Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA

Prof. Dr. Renato Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

BIOGRAFIA

Lenaldo Muniz de Oliveira é Técnico em Agropecuária pela Escola Média de Agropecuária da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Graduado em Engenharia Agrônômica pela Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia (EAUFBA) e Mestrado em Fitotecnia também pela Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia. Atualmente é Professor Assistente II de Citologia e Biologia Básica do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS-BA), onde ministra aulas para os cursos de Ciências Biológicas, Farmácia e Engenharia de Alimentos.

À minha mãe Racifa Bastos Muniz (*in memoriam*),

Ao meu pai Manoel de Oliveira Santos,

Às minhas irmãs Leni e Leilane,

Ao meu irmão Lenoel,

À minha esposa Mayara,

À minha filha Jamile.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Feira de Santana por ter me concedido à oportunidade e apoio financeiro para realização do curso de Doutorado.

À Universidade Federal de Lavras por ter me acolhido durante estes quatro anos, possibilitando a realização desse aperfeiçoamento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, pela amizade, orientação e apoio durante esse período.

Aos professores, funcionários e técnicos do Setor de Fisiologia Vegetal, pela agradável convivência e ajuda durante esses quatro anos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Nilton Nagib Jorge Chalfun, Prof. Dr. Eduardo Alves, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro e Prof. Dr. Marcelo Murad Magalhães, pela atenção e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa pela atenção e contribuição no preparo dos artigos científicos decorrentes desta tese.

Aos colegas do curso de Fisiologia Vegetal, em especial aqueles do Laboratório de Propagação de Plantas, pela amizade, companhia e ajuda durante essa jornada.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para concretização de mais uma etapa da minha formação, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I: Introdução Geral.....	1
1 Introdução	2
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 A espécie <i>Annona glabra</i> L.....	3
2.2 Propagação de anonáceas.....	6
2.3 Citocininas e morfogênese <i>in vitro</i>	11
3 Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO II: Anatomia e crescimento na presença e ausência de citocininas durante o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Annona glabra</i> L.	19
1 Resumo	20
2 Abstract.....	21
3 Introdução	22
4 Material e Métodos	24
4.1 Material vegetal e condições experimentais	24
4.2 Análises anatômicas	26
5 Resultados.....	27
6 Discussão.....	35
7 Conclusões.....	39
8 Referências Bibliográficas	39
CAPÍTULO III: Desenvolvimento do autotrofismo e acúmulo de minerais na presença e ausência de citocininas durante o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Annona glabra</i> L.	43
1 Resumo	44

2 Abstract.....	45
3 Introdução	46
4 Material e Métodos	48
4.1 Material vegetal e condições experimentais	48
4.2 Análises bioquímicas.....	50
4.3 Fotossíntese potencial.....	51
4.4 Ultra-estrutura dos cloroplastos.....	52
5 Resultados... ..	53
6 Discussão.....	60
7 Conclusões	64
8 Referências Bibliográficas	64
CAPÍTULO IV: Efeito da presença e ausência de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Annona glabra</i> L.	69
1 Resumo	70
2 Abstract.....	71
3 Introdução	72
4 Material e Métodos	74
4.2 Material vegetal e condições experimentais.....	74
4.2 Análises bioquímicas.....	76
5 Resultados.....	77
6 Discussão.....	82
7 Conclusões.....	85
8 Referências Bibliográficas.....	85
Considerações finais.....	89
Anexos.....	90

RESUMO

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Annona glabra L. destaca-se entre as anonáceas silvestres pelo elevado potencial frutífero e farmacológico. O cultivo *in vitro* representa uma alternativa viável para produção em larga escala de mudas dessa espécie, superando as dificuldades naturais para sua propagação. Contudo, sua utilização de forma mais ampla tem sido limitada pela dificuldade para indução de multibrotações nos explantes, elevada taxa de abscisão foliar e reduzido índice de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização. Entre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro* nessa espécie, têm-se as citocininas, que afetam diversas respostas morfofisiológicas. Entretanto, um melhor entendimento da ação dessas substâncias sobre o processo morfogenético de anonáceas ainda é necessário, apesar de sua ampla utilização no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Assim, avaliou-se neste trabalho a ausência e presença de fontes de citocininas, avaliando-se quatro fontes de citocininas, sendo uma natural e três sintéticas, sobre a anatomia de folhas e caules, retardo da senescência foliar, desenvolvimento do autotrofismo e acúmulo de minerais em plantas de *A. glabra*. Entre as fontes de citocininas testadas, 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina induziram aumento na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, maior redução da abscisão de folhas, maior diferenciação dos cloroplastos e maior fotossíntese potencial nas brotações. A utilização de BAP e cinetina durante a fase de multiplicação dessa espécie possibilitou, ainda, maior acúmulo de matéria seca, maior desenvolvimento da área foliar e maior taxa de sobrevivência das plantas durante as fases de enraizamento e aclimatização. Todas as fontes de citocininas testadas estimularam maior acúmulo de nitrogênio e boro nas brotações e menor acúmulo de cálcio. Thidiazuron (TDZ) promoveu desorganização do sistema lamelar dos cloroplastos dessa espécie, reduzindo o teor de clorofila “a” e a fotossíntese potencial de suas folhas.

* Orientador: Renato Paiva – UFLA

ABSTRACT

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Cytokinin in anatomical, cytological and physiological processes during *in vitro* culture and acclimatization of *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Annona glabra L. is one of the most important wild annonaceae with a high potential to produce fruits and pharmacological compounds. *In vitro* cultivation is a viable alternative for large scale production of plantlets of this species, overcoming the natural constraints for its propagation. However, its use in a broad form has been limited by the difficulty to induce various shoots in explants, high rate of leaf abscission and reduced plant survival index during the acclimatization phase. Among the factors that control the *in vitro* morphogenesis of this species, cytokinins affect diverse morphological responses. However, a better understanding of the action of these substances on the morphogenetic process of the annonaceae is still necessary, in spite of its broad use on *in vitro* cultivation of plant tissues. Therefore this paper evaluated the effect of four cytokinin sources, one natural and three synthetic, on leaves and shoots anatomy, delay in leaf senescence, development of autotrophism and mineral accumulation in plants of *A. glabra*. Among the cytokinin sources tested, 6-benzilaminopurine (BAP) and kinetin induced an expressive increment in palisade and spongy parenchyma thickness, higher retention on leaf area, higher chloroplast differentiation and higher photosynthetic rate in shoots. The use of BAP and kinetin during the multiplication phase promoted a higher dry matter accumulation, higher development of leaf area and higher plant survival rate during the acclimatization and rooting phases. All the sources of cytokinin used stimulated a higher nitrogen and boron accumulation in shoots and lower accumulation of calcium. Thidiazuron (TDZ) promoted a disorganization in the chloroplast lamellar system, reducing the chlorophyll “a” level and photosynthetic leaf potential.

* Adviser: Renato Paiva - UFLA

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Entre as grandes riquezas biológicas encontradas no Brasil, as frutíferas nativas ocupam lugar de destaque, com grande potencial para produção de frutos. Diversas espécies frutíferas representam ainda fonte de fármacos naturais que, apesar de pouco estudadas, fazem parte da medicina popular e cultura regional, despertando grande interesse científico.

Nesse contexto, a família *Annonaceae* é um importante representante dessa biodiversidade, apresentando 132 gêneros e cerca de 2.300 espécies. Diversas espécies silvestres de anonáceas são bastante promissoras como fonte de genes para o melhoramento genético e como porta-enxertos para espécies já cultivadas, a exemplo de *Annona glabra* L., que além de produzir frutos bastante saborosos, apresenta propriedades medicinais e inseticidas, sendo importante fonte de princípios ativos com propriedades fungicidas, inseticidas e citotóxicas.

Usualmente, essas espécies propagam-se por via sexual com polinização cruzada que, apesar de gerar grande diversidade nesse grupo de plantas, o que favoreceu em muito seu processo evolutivo, apresenta o inconveniente da desuniformidade no crescimento e na frutificação, o que inviabiliza sua utilização na produção de mudas para implantação de plantios comerciais. O cultivo *in vitro* representa uma alternativa viável para propagação dessas espécies, possibilitando a rápida propagação de plantas selecionadas, com grande uniformidade e elevado grau de sanidade. Entretanto, a micropropagação de anonáceas tem se deparado com grandes obstáculos, como a dificuldade para obtenção de multibrotações nos explantes, o que limita a taxa de multiplicação, e a abscisão foliar, o que dificulta a obtenção de brotações aptas para o processo de enraizamento e aclimatização, com elevada taxa de mortalidade das plantas durante a transição para o ambiente natural.

Entre os inúmeros fatores que afetam o cultivo *in vitro* e a regeneração de plantas em condições controladas, os reguladores de crescimento, tanto em

seus aspectos qualitativos quanto quantitativos, merecem destaque. Nesse ínterim, nenhuma outra classe hormonal parece estar tão ligada à biotecnologia de plantas como as citocininas. Embora as citocininas regulem muitos processos celulares, o controle da divisão celular é o processo central controlado por essa classe de reguladores, atuando no crescimento e desenvolvimento vegetal. Dessa forma, diversos processos fisiológicos têm sido relacionados às citocininas, como a indução de gemas e raízes, o retardo na senescência foliar, a quebra da dominância apical, a promoção do desenvolvimento do sistema vascular e a diferenciação dos cloroplastos. Um melhor conhecimento do papel desse grupo de reguladores de crescimento no processo morfogênético de anonáceas poderá trazer grandes avanços no desenvolvimento de protocolos mais eficientes para a micropropagação desse grupo de plantas.

Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de citocininas sobre características anatômicas, citológicas e fisiológicas de *A. glabra* durante seu cultivo *in vitro*, bem como seus reflexos sobre o processo de aclimatização das plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie *Annona glabra* L.

Annona glabra L., conhecida popularmente como “araticum-do-brejo”, é uma espécie frutífera tropical que ocorre naturalmente na América do Sul (Le et al., 1998). No Brasil, é encontrada espontaneamente desde a Amazônia até o estado de Santa Catarina (Braga, 1976) e, nos locais de ocorrência natural, ocupa freqüentemente áreas que estão submetidas a inundações periódicas (Mahdeen, 1990).

A planta apresenta porte mediano, alcançando entre 3 e 8m de altura e caule com 10 a 30cm de diâmetro, com casca grossa e aspecto avermelhado

(Figura 1). Apresenta copa em forma de umbela com folhas lustrosas, simples e alternas, com 7 a 17cm de comprimento e 3 a 8cm de largura, com pecíolo curto. O tronco é irregular e bastante ramificado, com um sistema radicular muito característico, na qual as raízes formam uma massa compacta na base (Mahdeen, 1990).

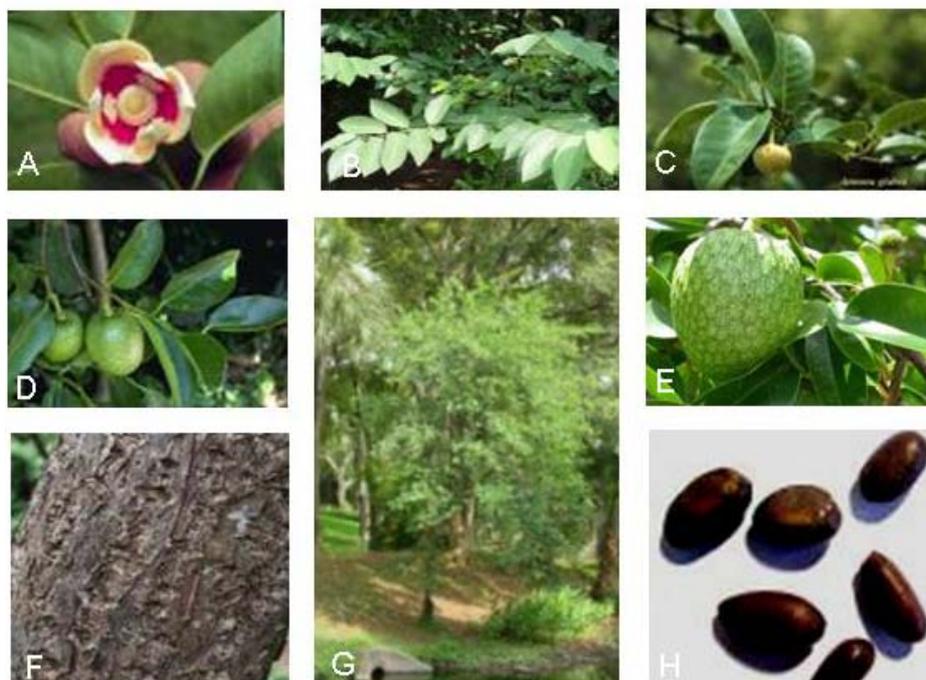


FIGURA 1 Aspecto visual da flor (A), folhas (B), botão floral (C), frutos (D e E), tronco (F), planta adulta (G) e sementes (H) de *Annona glabra* L. UFLA, Lavras, 2006.

Apresenta flores com pétalas de coloração creme-amarelada e, internamente, são roxas. São bastante visitadas por abelhas, coleópteros e outros insetos. Floresce e frutifica de março a outubro. O fruto é um sincarpo carnosos, ovóide globoso, de coloração verde brilhante, tornando-se amarelado após a maturação e, diferentemente das demais espécies de anonáceas, são lisos, sem a aparência rústica e forma de “pinhas”, como é típico nesse grupo de plantas

(Figura 1). Apresenta muitas sementes de coloração marrom-escura, com tamanho em torno de 1cm em seu comprimento, envoltas em uma polpa creme, de odor forte e bastante saborosa. As sementes são dispersas por animais (Mahdeen, 1990). Apesar de ser praticamente inexplorada, essa espécie apresenta elevado potencial frutífero e também características agrônômicas importantes, como grande capacidade de adaptação a solos encharcados ou sujeitos a inundações temporárias, resistência a doenças de solo e capacidade de conferir redução de porte, quando utilizada como porta-enxerto de anonáceas cultivadas. Tem sido demonstrado em trabalhos que há grande compatibilidade entre essa espécie e *Annona muricata* L., facilitando sua utilização como porta-enxerto para produção de mudas dessa espécie (Ferreira et al., 1987).

Grande atenção tem sido dada a essa espécie em razão do seu elevado potencial fitofarmacológico, já que apresenta em suas folhas, frutos e sementes componentes com propriedades biológicas, o que tem despertado grande interesse científico (Padmaja et al., 1995); as acetogeninas representam o grupo de substâncias mais investigado até o momento. Segundo Chin-Chuang et al. (2005), as acetogeninas representam uma classe original de metabólitos secundários de plantas da família *Annonaceae*. Na literatura, constam mais de 400 tipos de acetogeninas, com propriedades anticâncer, citotóxica, antiparasitária, inseticida e imunossupressiva, sendo consideradas como uma fonte provável de compostos para o desenvolvimento de drogas potenciais. Entre as acetogeninas com propriedades biológicas já identificadas em sementes de *A. glabra*, destacam-se os ciclopeptídeos glabracin A, B, C e D (Chao-Ming et al., 1999) e annoglacins A e B (Xiao-Xi et al., 1999), ambos com elevado potencial citotóxico contra células tumorais; annotemoyin-1 e annotemoyin-2, com propriedades antibactericidas (Rahman et al., 2005) e annonacin, forte inibidor do complexo mitocondrial I (Gallardo et al., 1998).

2.2 Propagação de anonáceas

A propagação natural das anonáceas nativas e cultivadas dá-se por via sexuada, apresentando elevada taxa de fecundação cruzada devido ao fenômeno da dicogamia. Como consequência desse modo de reprodução, observa-se, nessas plantas, elevadas taxas de segregação e recombinação genética e, conseqüentemente, populações extremamente heterogêneas nos seus mais diversos aspectos (Scaloppi Júnior, 2003).

Essa grande diversidade, resultante desse modo de reprodução, representa importantes bancos genéticos, disponíveis para futuros programas de melhoramento das espécies cultivadas; entretanto, quando se pensa em cultivos comerciais, há grandes inconvenientes, pelo fato de produzir populações muito heterogêneas, de porte elevado, com menor precocidade e de frutificação mais tardia (Decchetti, 2000).

A propagação vegetativa, via enxertia e estaquia, poderia ser uma boa alternativa para propagação das espécies de anonáceas; entretanto, problemas relacionados à identificação de porta enxertos compatíveis (São José et al., 1997), dificuldade para enraizamento de estacas (Scaloppi Junior, 2003) e acúmulo de diversos tipos de vírus (Hoffmann et al., 1996) têm limitado a utilização dessas técnicas, levando à rápida perda de vigor e da produtividade.

Em virtude desses problemas, a propagação clonal, utilizando técnicas de micropropagação, tem-se mostrado uma boa alternativa para a multiplicação das espécies de anonáceas (Decchetti, 2000; Rasai et al., 1995). Contudo, a micropropagação de espécies lenhosas tem sido dificultada por vários fatores, como a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas, a dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro* dos tecidos e produção de compostos fenólicos que oxidam os explantes. Para superar esses obstáculos, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências da planta e, em alguns casos, do explante em questão, tornando o processo

bastante específico (Deccetti, 2000). O desenvolvimento de protocolos eficientes para micropropagação de anonáceas possibilitará a rápida propagação de cultivares superiores e obtenção de populações mais uniformes. A técnica que tem sido preconizado prioritariamente para micropropagação de anonáceas é a microestaquia (Figura 2).

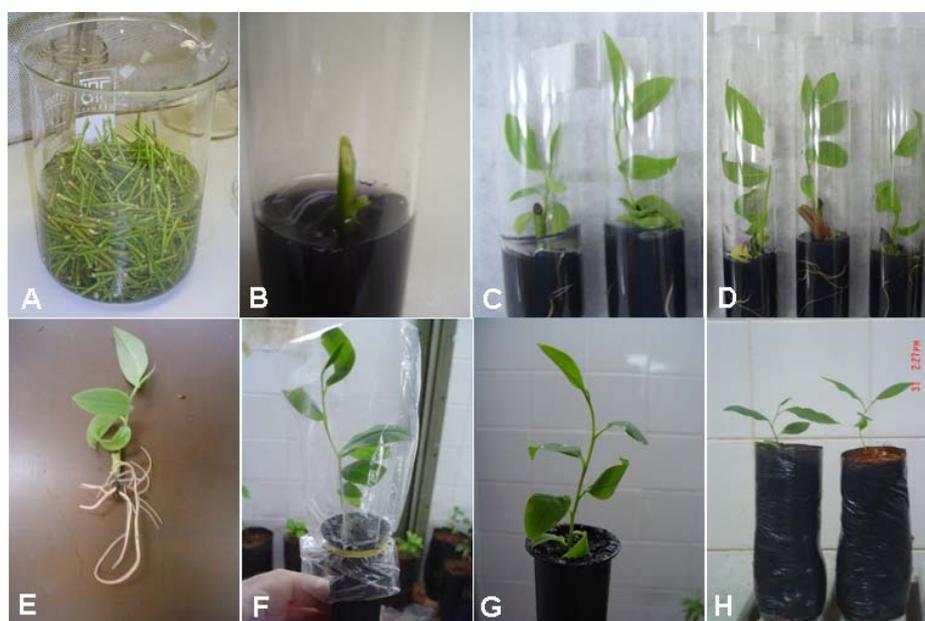


FIGURA 2 Fases do processo de microestaquia de *A. glabra*. Assepsia dos explantes (A), explante inoculado (B), indução de brotações (C), enraizamento (D), planta apta a aclimatização (E), planta em aclimatização (F) planta aclimatizada (G e H). UFLA, Lavras, 2006.

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos visando à micropropagação de anonáceas, a exemplo dos trabalhos conduzidos com *A. muricata* (Lemos & Blake, 1996b; Lemos & Baker, 1998), *A. squamosa* (Lemos & Blake, 1996a; Nagori & Purohit, 2004; Zobayed et al., 2002), *A. cherimola* (Encina et al., 1994), atemoia (Nair et al., 1984), *A. glabra* (Deccetti, 2000; Deccetti, 2004;

Santana, 2003), *A. cauliflora* Mart. (Santana, 2003), *A. coriaceae* Mart. (Santana, 2003), *A. bahiensis* St. Hill. (Santana, 2003) e *Rollinia silvatica* St. Hill. (Santana, 2003).

Entre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro* de anonáceas, destacam-se os reguladores de crescimento, o balanço entre estes reguladores, sobretudo entre auxinas e citocininas, a fonte de carbono e o tipo de fechamento dos recipientes. O 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido o regulador de crescimento mais utilizado para induzir brotações em diversas espécies de anonáceas (Rasai et al., 1995). Lemos & Blake (1996b) obtiveram o maior número de brotos por explante de *A. muricata* com a utilização de 2mg L⁻¹ de BAP e 0,5mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), utilizando hipocótilos como explantes. Esses mesmos autores obtiveram alta taxa de enraizamento nessa espécie utilizando meio líquido, após exposição das brotações a 4mg L⁻¹ de ANA durante 15 dias. Por outro lado, Lemos & Blake (1996a) demonstraram não ser necessário à adição de citocininas ao meio de cultura para induzir brotações em hipocótilos de *A. squamosa*. Verificaram ainda que as maiores taxas de enraizamento nessa espécie podem ser obtidas com a utilização de ANA ou ácido indolbutírico (AIB), ambos em concentrações de 8,0mg L⁻¹, na presença de carvão ativado e no escuro. Contudo, Nagori & Purohit (2004) demonstraram que a adição de citocininas no meio de cultura é essencial para indução de brotos adventícios em segmentos de hipocótilos de *A. squamosa* e que um maior número de brotações poderia ser obtido com a utilização de BAP ou cinetina em concentrações de 5,0mg L⁻¹ e 0,5mg L⁻¹, respectivamente. Entretanto, o BAP nessa concentração exerceu efeito inibitório sobre o alongamento das brotações.

Encina et al. (1994) estudaram a morfogênese em explantes jovens de *A. cherimola* e verificaram que a utilização de benziladenina e zeatina, em concentrações de 0,15mg L⁻¹ e 0,3mg L⁻¹, possibilitou a obtenção de maior número de brotos por explante e maior comprimento das brotações. Verificaram

também que zeatina, em concentração de $1,0\text{mg L}^{-1}$, promoveu a formação de brotos atrofiados após várias subculturas.

Com relação à morfogênese *in vitro* de *A. glabra*, Deccetti (2000) verificou ser possível à indução de brotações a partir de segmentos nodais dessa espécie sem a utilização de citocinina exógena, obtendo um número máximo de 1,5 brotações por explante. Em contrapartida, Santana (2003), comparando o efeito do BAP, thidiazuron (TDZ) e cinetina, verificou que a utilização de BAP, em concentração de $4,0\text{mg L}^{-1}$, possibilitou a obtenção de maior número de brotações por segmento nodal dessa espécie, com efeito inibitório desse regulador sobre a indução de raízes. Contudo, em nenhum dos tratamentos hormonais até aqui adotados obteve-se uma taxa de brotação que possibilite a rápida multiplicação dessa espécie durante as repicagens *in vitro*, diferentemente dos resultados obtidos por Lemos & Blake (1996b) e Nair et al. (1984), trabalhando com *A. muricata* e atemóia, respectivamente, que obtiveram maior número de brotações por explante com a utilização de BAP e cinetina em concentrações inferiores a $2,0\text{mg L}^{-1}$.

Mesmo com todos os avanços já alcançados no cultivo *in vitro* de anonáceas, ainda há uma série de limitações que precisam ser solucionadas para que a micropropagação dessas espécies possa ser utilizada em larga escala. A elevada incidência de contaminação dos explantes (Santana et al., 2003), a alta concentração de compostos fenólicos em seus tecidos (Rasai et al., 1995), a elevada taxa de abscisão foliar (Armstrong et al., 1997; Lemos, 2000) e a grande taxa de mortalidade das plantas durante a fase de aclimatização (Deccetti, 2004; Rasai et al., 1995) são os principais fatores que dificultam a micropropagação de anonáceas.

A baixa taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização resulta, em parte, de marcantes desordens morfológicas e fisiológicas no nível celular, de tecidos e de órgãos. Nesse contexto, a análise anatômica de tecidos e

ultra-estrutural das células poderá contribuir para o entendimento dessas desordens. Segundo Brainerd & Fuchigami (1981), o estresse hídrico é a principal causa da morte de plantas durante a aclimatização, sendo resultado da transpiração excessiva por todas as partes da planta, principalmente folhas, e da inadequada absorção de água pelas raízes. A perda excessiva de água das plantas após a transferência para o ambiente *ex vitro* tem sido atribuída a alterações no desenvolvimento estomático e reduzido controle no mecanismo de fechamento dos estômatos. A reduzida diferenciação do mesófilo das folhas, com alta proporção de espaços intercelulares também pode contribuir para a excessiva perda de água.

Com relação à abscisão foliar, problema recorrente no cultivo *in vitro* de anonáceas, o cultivo de plantas em recipientes com circulação forçada de ar, objetivando a redução do acúmulo de etileno, tem sido proposto. Armstrong et al. (1997) verificaram maior número de folhas em *A. squamosa* durante o cultivo com esse tipo de recipiente. Zobayed et al. (2002), estudando o cultivo *in vitro* de *A. squamosa* e *A. muricata* sob três tipos de ventilação, reportaram que em ambas as espécies houve significativo aumento no número de folhas, na área foliar e no número de nós por brotação, com o aumento da aeração nos recipientes de cultivo, havendo forte inibição da abscisão foliar. Entretanto, o uso de ventilação forçada cria um custo adicional significativo, podendo inviabilizar sua utilização em sistemas comerciais.

Diversas técnicas e metodologias alternativas têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a taxa de sobrevivência das plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. A micropropagação fotoautotrófica ou mixotrófica têm sido sugeridas como alternativas para obtenção de plantas mais aptas ao processo de aclimatização. Segundo Deccetti (2004), o aumento da irradiância de $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na sala de crescimento e das trocas gasosas entre os recipientes de cultivo e o meio

ambiente, pela utilização de membranas permeáveis, possibilitam aumentos significativos na capacidade fotossintética das plantas de *A. glabra* durante a fase de multiplicação, com reflexos positivos sobre o acúmulo de açúcares solúveis e amido nas folhas. Para esse autor, o cultivo em condições fotoautotróficas poderá contribuir para a qualidade das plantas micropropagadas, melhorando a capacidade de sobrevivência durante a transição para o ambiente natural. Entretanto, a definição das condições ótimas para o crescimento fotoautotrófico *in vitro* depende de considerações adicionais, em função da complexidade do processo de aquisição da fotoautotrofia, o qual envolve inúmeros fatores fisiológicos e ambientais.

2.3 Citocininas e morfogênese *in vitro*

As citocininas, juntamente com as auxinas, são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos, existindo uma grande variedade desses reguladores, naturais e sintéticos, havendo também grande diversidade de respostas em função do tipo utilizado.

A história das citocininas está ligada ao desenvolvimento da biotecnologia de plantas, sobretudo à cultura tecidos vegetais *in vitro*. Curiosamente, a primeira vez que se conseguiu cultivar um órgão isolado *in vitro* foi uma raiz (White, 1934), mesmo antes de se descobrir a primeira citocinina na década de 1950. Hoje se sabe que uma das possíveis causas desse sucesso teria sido o fato de as raízes serem os principais centros produtores de citocininas nas plantas. Contudo, é necessário considerar que outros tecidos meristemáticos, tais como os ápices caulinares, também podem produzir citocininas.

Atualmente, processos biotecnológicos, como a rápida obtenção de plantas homozigotas, a partir da produção de haplóides *in vitro*, de híbridos entre espécies incompatíveis, através da fusão de protoplastos, e a produção de plantas

transgênicas, têm em comum a necessidade de se controlar a taxa de divisão e a diferenciação celular *in vitro*, processos esses dependentes do emprego de citocininas (Grattapaglia & Machado, 1998). As citocininas são substâncias que, além de serem essenciais à citocinese, promovem alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, indução de formação de órgãos, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos e aumento da longevidade de tecidos e órgãos.

Trabalhos têm apontado para o efeito das citocininas sobre a diferenciação de tecidos fotossintetizantes, promovendo uma amplificação no aparato fotossintético de plantas estioladas, levando à cloroplastos com sistema granal mais amplo e maior acúmulo de clorofilas e enzimas fotossintéticas, sugerindo que as citocininas, juntamente com outros fatores, como luz e nutrição, regulam a síntese dos pigmentos e proteínas (Taiz & Zeiger, 2004).

Para Chernyad'ev (2000), as citocininas desempenham importante papel durante a ontogenia da folha e, juntamente com as auxinas, regulam a taxa de divisão das células. Nas fases iniciais da ontogenia foliar, há um predomínio da atividade das citocininas, determinando a máxima taxa de divisão dos cloroplastos e das células, a formação de membranas e a síntese de proteínas. Após essa fase de crescimento linear, ocorre redução da atividade das citocininas e, em contraste, ocorre aumento na atividade das auxinas, estimulando aumento no alongamento das células do mesofilo.

Outro aspecto do papel das citocininas sobre a fisiologia das plantas diz respeito à capacidade de essas substâncias estimularem o movimento de nutrientes minerais e orgânicos para determinadas regiões da planta, que atuam como drenos. Essas observações sugerem um envolvimento das citocininas sobre a diferenciação do sistema vascular das plantas, como verificado por Dalessandro (1973), trabalhando com medula de alface (*Lactuca sativa*), demonstrando que a concentração de citocinina no meio de cultura era um fator

limitante para a diferenciação do xilema. Aloni (2001) demonstrou que além da ação sobre a formação de células precursoras do sistema vascular, as citocininas desempenham papel importante no aumento da sensibilidade dessas células à auxina, estimulando indiretamente o processo de diferenciação dos vasos. Em estudos recentes, verificou-se que o desenvolvimento vascular em raiz de *Arabidopsis* requer a participação de uma proteína que funciona como um receptor para citocininas (Inoue et al., 2001), comprovando o papel desse regulador sobre a formação do sistema vascular.

Um dos principais nutrientes com o qual as citocininas interagem é o nitrogênio, sugerindo a participação das citocininas na regulação das enzimas envolvidas com o metabolismo assimilatório desse elemento. Nesse sentido, existem evidências de que as citocininas são ativadoras da enzima nitrato redutase (Samuelson et al., 1995). Além disso, já se constatou que a aplicação de nitrato leva ao acúmulo de citocininas primeiro nas raízes, depois na seiva xilemática e, finalmente, nas folhas.

Em diversos trabalhos tem-se associado à aplicação de citocininas ao retardo da senescência de folhas, pois, há evidências de uma diminuição abrupta na concentração de citocininas em órgãos maduros, induzindo o início da senescência (Tian et al., 1994). Por outro lado, o tratamento de folhas isoladas de muitas espécies com citocininas promove o retardo desse processo natural de envelhecimento. Ferrante et al. (2002) compararam o efeito de algumas fontes de citocininas sobre a senescência de folhas de *Alstroemeria*, verificando maior efetividade do thidiazuron (TDZ) na prevenção da degradação de clorofilas e proteínas e, conseqüentemente, na prevenção do amarelecimento das folhas dessa espécie. Entretanto, ainda não é conhecida a razão da maior eficiência da aplicação exógena do TDZ nesse processo em relação a outras fontes de citocininas. Para Genkov et al. (1997), a competência para retardar a senescência foliar varia amplamente entre os diversos tipos de citocininas.

Por outro lado, a análise de plantas transgênicas, portadoras do gene *ipt* do plasmídeo Ti da *Agrobacterium*, resultando na superprodução de citocininas, tem demonstrado a formação de brotos portadores de teratomas e de difícil enraizamento, apresentando tendência ao atrofiamento (Taiz & Zeiger, 2004). Sobre esse aspecto, Akasaka et al. (2000) verificaram que o TDZ, apesar de ser a fonte de citocinina mais eficiente para indução de brotos em *Arachis hypogaea* L., quando utilizado por períodos prolongados, provocou crescimento anormal dos brotos, com intensa desorganização dos feixes vasculares.

Grattapaglia & Machado (1998) citam que os efeitos das citocininas no cultivo *in vitro* não se restringem a uma subcultura, pois, diversas vezes, constataram efeito residual de uma subcultura para outra. Esse efeito residual é positivo quando se trata, por exemplo, do processo de rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas, pelas seguidas exposições à citocinina, embora possa ser problemático quando afeta o alongamento e enraizamento das brotações. Ainda segundo esses autores, eficiente mudança da fase adulta para a juvenil tem sido obtida mediante sucessivas multiplicações de gemas na presença de BAP, acompanhada da redução do tempo entre os subcultivos. Outros efeitos residuais atribuídos às citocininas têm sido observados nas plantas após a transferência para o ambiente *ex vitro*, como, por exemplo, menor capacidade de sobrevivência durante a aclimatização, decorrente da vitrificação dos tecidos, da quebra de dominância apical, da manutenção de um hábito arbustivo e da miniaturização das plantas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKA, Y.; DAIMON, H.; MII, M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. **Plant Science**, Clare, v. 156, n. 2, p. 169-175, July 2000.

ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, n. 1, p. 22-34, Mar. 2001.

ARMSTRONG, J.; LEMOS, E. E. P.; ZOBAYED, S. M. A.; JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. A humidity-induced convective through flow ventilation systems benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut calloid. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 1, p. 31-39, Jan. 1997.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1976. 540 p.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization os aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, 1981.

CHAO-MING, L.; NING-HUA, T.; HUI-LAN, Z.; QING, M.; XIAO-JIANG, H.; YI-NENG, H.; JUN, Z. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 1047-1052, June 1999.

CHERNYAD'EV, I. I. Ontogenetic Changes in the Photosynthetic Apparatus and Effects of Cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, 2000.

CHIH-CHUANG, L.; FANG-RONG, C.; SHU-LI C.; CHIN-CHUNG W.; KUO-HSIUNG L.; YANG-CHANG, W. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona sp.* **Biorganic & Medicinal Chemistry**, San Diego, v. 13, n. 15, p. 4767-4776, Aug. 2005.

DALESSANDRO, G. Hormonal control of xylogenesis in pith parenchima explants pf *Lactuca*. **Annals of Botany**, London, v. 37, n. 150, p. 375-382, 1973.

DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

ENCINA, C. L.; BARCELÓ-MUNHOZ, A.; HERRERO-CASTAÑO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, Nov. 1994.

FERRANTE, A.; HUNTER, D. A.; HACKETT, W. P.; REID, M. S. Thidiazuron – a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 333-338, July 2002.

FERREIRA, S. A. N.; CLEMENT, C. R.; MARTEL, J. H. I. Avaliação de diferentes porta-enxertos para gravioleira na Amazônia central. Métodos de enxertia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1987, **Anais...** 1987. v. 2, p. 475-479.

GALLARDO, T.; ARAGON, R.; TORMO, J. R.; BLAZQUEZ, M. A.; ZAFRA-POLO, C.; CORTES D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 811-816, Mar. 1998.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 16, n. 3, p. 169-172, 1997.

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: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de. **Fruticultura comercial**: propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABAK, S.; SHINOZKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 409, n. 6823, p. 1060-1063, Feb. 2001.

LE, H. T.; HANCOCK, J. F.; TRINH, T. T. The fruit crops of Vietnam: introduced species and their native relatives. **Fruit Varieties Journal**, Massachusetts, v. 52, n. 3, p. 158-168, July 1998.

LEMOS, E. E. P. Organogênese e micropropagação em anonáceas. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 3., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.

LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 105-112, July 1998.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 77-79, July 1996a.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, May 1996b.

MAHDEEN, H. Other Annonaceous fruits. **Fairchild Tropical Garden: Tropical Fruit World**, Miami, v. 4, n. 1, p. 118-120, 1990.

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D. *In vitro* planted regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyls segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, Jan. 2004.

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona hybrid* (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.). **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 41, n. 2, p. 160-165, June 1984.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, Aug. 1995.

RAHMAN, M. M.; PARVIN, S.; HAQUE, E. H.; ISLAM, M. E.; MOSADDIK, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, Milan, v. 76, n. 5, p. 484-489, July 2005.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.

SAMUELSON, M. E.; CAMPBELL, W. H.; LARSSON, C. M. The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in arley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 3, p. 533-539, Mar. 1995.

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

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I.; LEMOS, E. E. P. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of *Annonaceae* leaf segments cultured *in vitro*. **Fruits**, Paris, v. 58, n. 4, p. 357-361, 2003.

SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. **Anonáceas: produção e mercado**. Vitória da Conquista-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 1997. 306 p.

SCALOPPI JUNIOR, E. J. **Clonagem de quatro espécies de *Annonaceae* (*Annona glabra* L., *Annona montana* Macfad, *Rollinia emarginata* e *Rollinia mucosa* Baill.) com potenciais como porta-enxertos**. 2003. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre-RS: Editora Artmed, 2004. 719 p.

TIAN, M. S.; DOWNS, C. G.; LILL, R. E.; KING, G. A. A role for ethylene in the yellowing of broccoli. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 2, p. 276-281, Mar. 1994.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, Rockville, v. 9, p. 585-600, 1934.

XIAO-XI, L.; FERAS, Q. A.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 815-821, Mar. 1999.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 155-165, May 2002.

CAPÍTULO II

ANATOMIA E CRESCIMENTO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CITOCININAS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE *Annona glabra* L.

1 RESUMO

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Anatomia e crescimento na presença e ausência de citocininas durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Entre os fatores que afetam a morfogênese *in vitro* de *Annona glabra* L., as citocininas merecem destaque, afetando a diferenciação de gemas e o crescimento das brotações. A análise anatômica dos órgãos das plantas poderá contribuir para a identificação das fontes de citocininas mais efetivas no cultivo *in vitro* dessa espécie, assim como na caracterização de possíveis alterações nos tecidos de plantas cultivadas na presença dessas substâncias. Avaliaram-se o efeito da ausência e presença de quatro fontes de citocininas, usadas durante a fase de multiplicação de *A. glabra*, sobre a espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, dimensões dos estômatos, índice e densidade estomática, além do número e diâmetro dos feixes vasculares de folhas e caules das brotações. Avaliaram-se ainda a matéria seca, a área foliar e a taxa de sobrevivência das brotações durante as demais fases da micropropagação. 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina induziram aumento na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, enquanto zeatina, seguida de BAP e thidiazuron (TDZ) promoveram aumento na densidade dos estômatos e índice estomático. Zeatina, seguida de cinetina e BAP, promoveram maior desenvolvimento do sistema vascular de folhas. A utilização de cinetina e BAP durante a fase de multiplicação proporcionou maior acúmulo de matéria seca, maior área foliar e maior taxa de sobrevivência das plantas durante as fases de enraizamento e aclimatização. Não foram detectados alterações nos tecidos das plantas cultivadas na presença desses compostos.

* Orientador: Renato Paiva – UFLA

2 ABSTRACT

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Anatomy and growth in presence and absence of cytokinin during *in vitro* culture of *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Among the factors that affect *in vitro* morphogenesis of *Annona glabra* L., the cytokinin need attention, due to their influence on bud differentiation and shoot growth. The anatomical analysis of plant organs will contribute for the identification of more effective cytokinin sources for *in vitro* culture of this species, as well as the possible alterations in tissue plants cultivated in the presence of these compounds. The effect of presence and absence of four cytokinin sources, used during the multiplication phase of *Annona glabra* L., on palisade and spongy parenchyma thickness, dimensions, density and stomatic index, number and diameters of vascular strands in leaves and stems of shoot. There were also evaluated the dry matter, leaf area and shoot survival rate during the other phases of micropropagation. The 6-benzilaminopurine (BAP) and kinetin induced an increase in palisade and spongy parenchyma thickness, while the zeatin, followed by BAP and thidiazuron (TDZ) promoted an increase in stomatic density and index. Zeatin, followed by kinetin and BAP caused a higher development of leaves vascular system. The utilization of kinetin and BAP during the multiplication phase caused higher dry matter accumulation, leaf area and plant survival rate during rooting and acclimatization phases. There were not detected alterations in tissue plants cultivated in the presence of these compounds.

* Adviser: Renato Paiva - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Annona glabra L. é uma espécie frutífera tropical, pertencente à família *Annonaceae* e de ocorrência natural na América do Sul (Le et al., 1998). Apresenta elevado potencial agrônômico, pelo fornecimento de frutos para consumo *in natura* e, mais recentemente, pela produção de fitoquímicos, apresentando em suas folhas, frutos e sementes componentes com propriedades antibactericida, antifúngica, inseticida e citotóxica (Padmaja et al., 1995; Liu et al., 1999).

Assim como muitas outras espécies nativas, essa espécie apresenta limitações na sua propagação sexuada, com germinação lenta, desuniforme e pouco expressiva, além do inconveniente de gerar populações muito heterogêneas e de frutificação tardia. A micropropagação tem se mostrado como uma ferramenta viável para a propagação de espécies de anonáceas (Rasai et al., 1995; Lemos & Blake, 1996; Nagori & Purohit, 2004), o que poderá favorecer a seleção e multiplicação de plantas com maior capacidade produtiva. Contudo, para a multiplicação *in vitro* dessas espécies, ainda é necessário um melhor conhecimento dos fatores que controlam sua morfogênese, o que tem limitado a taxa de multiplicação, de enraizamento e de sobrevivência das plantas micropropagadas (Rasai et al., 1995).

Entre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro*, as citocininas merecem destaque. Na micropropagação de anonáceas, as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina têm sido as mais utilizadas, em concentrações que variam de 0,2 a 2,0mg L⁻¹, independentemente do tipo de explante e do meio de cultura utilizado, a exemplo dos trabalhos realizados com atemóia (Nair et al., 1984), *Annona cherimola* Mill. (Encina et al., 1994), *Annona muricata* L. (Lemos & Blake, 1996) e *Annona squamosa* L. (Nagori &

Purohit, 2004). Além do BAP, a zeatina foi utilizada na micropropagação juvenil de *A. cherimola* induzindo à formação de maior número de brotos por explante e folhas mais expandidas, em relação aos obtidos com benziladenina (Encina et al., 1994); entretanto, sua utilização durante várias gerações promoveu a formação de brotos atrofiados. Já o thidiazuron (TDZ), apesar de ser uma das mais ativas fontes de citocininas, especialmente para espécies lenhosas recalcitrantes (Murthy et al., 1998), tem sido pouco usado na micropropagação de anonáceas. Há relatos, entretanto, da formação de meristemas apicais histologicamente anormais em brotos de *Arachis hypogaea* L. cultivados na presença desse regulador (Akasaka et al., 2000).

As citocininas atuam em diversos processos morfogênicos, como o desenvolvimento do sistema vascular (Aloni, 2001; Estelle, 2001), formação e manutenção do aparato fotossintético (Chernyad'ev, 2000; Kulaeva et al., 2002), expansão de células (Huff & Ross, 1975) e funcionalidade dos estômatos (Pospíšilová et al., 2000; Vaseleva et al., 2005). Alterações na diferenciação dos estômatos e do mesófilo, sobretudo na proporção de espaços intercelulares, tem grande efeito sobre a atividade fotossintética das plantas (Araus et al., 1986) e a capacidade das plantas de suportarem a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* durante a fase de aclimatização (Capellades et al., 1990). Assim, o estudo anatômico das plantas cultivadas *in vitro* poderá fornecer informações mais seguras, não só sobre possíveis alterações histológicas provocadas pelas citocininas, mas, sobretudo, sobre o processo morfogênico de plantas multiplicadas na presença desse tipo de regulador.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de citocininas sobre a indução de brotações, espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, dimensões dos estômatos, índice e densidade estomática, número e diâmetro dos feixes vasculares de folhas e caules das brotações durante o cultivo *in vitro*.

Buscou-se ainda avaliar a matéria seca, a área foliar e a taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no período de julho a dezembro de 2004. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal dessa mesma instituição.

4.1 Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizados como explante segmentos nodais de *A. glabra* contendo uma gema e tamanho aproximado de 1,5cm, retirados de plantas matrizes juvenis, com aproximadamente 2 anos, e mantidas em sala de crescimento à temperatura ambiente e fotoperíodo de 16 horas. Os explantes foram lavados em água corrente por 6 horas e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos, seqüencialmente, em álcool etílico 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 15 minutos e água destilada e autoclavada por três vezes de 1 minuto cada, sendo mantidos em solução de ácido ascórbico na concentração de 200mg L⁻¹ durante 10 minutos antes da inoculação.

Em seguida, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 15mL do meio Wood Plant Medium (WPM) definido por Lloyd & Mccown (1980), suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 1g L⁻¹ de carvão ativado e 500mg L⁻¹ de benlate, solidificado com 0,65% de ágar e pH corrigido para 5,7. Os tratamentos consistiram da adição das fontes de citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), cinetina e zeatina,

na concentração de $1,0\text{mg L}^{-1}$, além do tratamento controle (sem adição de citocinina). O BAP, o TDZ e a cinetina foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem (20 minutos a 121°C), ao passo que zeatina foi adicionada ao meio somente após autoclavagem e resfriamento do meio, sendo filtrada em filtro milipore com $22\mu\text{m}$ de malha. Após inoculação, os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 55 dias.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, analisando-se 20 plantas por tratamento. Para análise estatística foi utilizado o programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Aos 55 dias quantificaram-se o percentual de explantes com brotação, número médio de brotos por explante e altura média das brotações. Em seguida, as plantas foram transferidas para meio de enraizamento constituído dos sais do meio WPM, com 30g L^{-1} de sacarose, 1g L^{-1} de carvão ativado, 2mg L^{-1} de AIB (ácido indolbutírico) e pH do meio ajustado para 5,0. Decorridos 40 dias, quantificaram-se o número de raízes por brotação e o comprimento da maior raiz, procedendo-se a aclimatização das plantas.

Para aclimatização, as plantas foram transferidas para tubetes de polietileno com capacidade para 288cm^3 e preenchidos com substrato comercial plantmax. As brotações foram cobertas com sacos plásticos transparentes e os tubetes foram parcialmente imersas em solução contendo 50% dos sais do meio WPM. A cobertura plástica foi perfurada gradativamente, durante 21 dias, quando foi totalmente removida, mantendo-se as plantas por mais 40 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de $55\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. No final das fases de enraizamento e de aclimatização foi quantificada a matéria seca, a área foliar e a taxa de

sobrevivência das brotações. A quantificação da área foliar foi realizada por um scanner HP4C deskjet, acoplado a um PC K6II 400MHz, utilizando-se o software QUANT (Fernandes Filho et al., 2001).

4.2 Análises anatômicas

Para realização dos estudos anatômicos, foram coletadas folhas completamente expandidas e segmentos de caules, os quais foram fixados em FAA 70% (Formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) por 72 horas e, posteriormente, conservados em álcool etílico 70 °GL (Johansen, 1940). O estudo anatômico das folhas baseou-se no exame microscópico de seções transversais, obtidas com micrótomo manual, e de seções paradérmicas das superfícies abaxial e adaxial das folhas, obtidas à mão livre, ambos da região mediana das folhas. O estudo anatômico do caule foi efetuado com base no exame microscópico de seções transversais, também obtidas com micrótomo manual, da região localizada abaixo da inserção da primeira folha.

As seções transversais foram clarificadas com hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada, coradas com azul de astra e safranina e montadas em glicerina 50%, segundo metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). As determinações da espessura dos tecidos foram realizadas com ocular micrométrica acoplada em microscópio de luz, avaliando-se cinco folhas oriundas de cinco brotações diferentes, sendo efetuadas três medições no terço mediano de cada folha, totalizando 15 repetições por tratamento.

As lâminas com seções paradérmicas das faces abaxial e adaxial das folhas foram montadas com solução corante de safranina 1% em água glicerinada. A contagem do número de estômatos foi realizada em microscópio OLYMPUS CBB, utilizando-se câmara clara. As fotomicrografias foram obtidas com fotomicroscópio OLYMPUS BX 60 e filme ASA 400 colorido. O cálculo do índice estomático (IE) foi realizado por meio da fórmula de Cutter (1986) e a densidade estomática foi expressa em número de estômatos por mm², segundo a

técnica de Labouriau et al. (1961). A amostragem consistiu de cinco folhas de cinco brotações diferentes, avaliando-se quatro campos do terço mediano de cada folha, totalizando 20 repetições por tratamento. Foram quantificadas as espessuras dos parênquimas paliçádico e esponjoso e das epidermes adaxial e abaxial das folhas, o número e diâmetro dos feixes vasculares de folhas e caules, o diâmetro polar e equatorial dos estômatos e a densidade e índice estomático das folhas de *A. glabra*.

5 RESULTADOS

Pelos resultados obtidos na análise de variância, verificou-se que a presença de citocininas no meio de cultura, durante a fase de multiplicação, afetou de modo significativo a espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso (Anexo 2A), o diâmetro equatorial dos estômatos (Anexo 3A), a densidade e o índice estomático (Anexo 4A), o número e o diâmetro dos feixes vasculares das folhas e dos caules (Anexo 5A), o percentual de explantes com brotações, o número médio de brotações por explante e a altura média das brotações (Anexo 6A), o número de raízes por brotação e o comprimento da maior raiz (Anexo 7A), além da matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência das brotações no final da fase de enraizamento (Anexo 8A) e de aclimatização de *A. glabra* (Anexo 9A).

As folhas de *A. glabra* apresentaram organização dorsiventral (Figura 1) e hipostomática. As diversas fontes de citocininas utilizadas neste experimento não promoveram efeitos significativos sobre a espessura das epidermes das faces adaxial e abaxial das folhas dessa espécie; entretanto, as espessuras dos parênquimas paliçádico esponjoso e, conseqüentemente, do limbo foliar (Anexo 2A), foram afetadas pela presença de BAP e cinetina no meio de cultura, promovendo um aumento na espessura do parênquima paliçádico, em relação à média dos demais tratamentos, de 12,78% e 18,36%, respectivamente, e de

20,21% e 19,09%, na espessura do parênquima esponjoso (Tabela 1 e Figura 1). Além da maior espessura dos parênquimas foliares de plantas submetidas aos tratamentos com BAP e cinetina, foi verificada maior diferenciação do mesofilo, com reduzida proporção de espaços intercelulares.

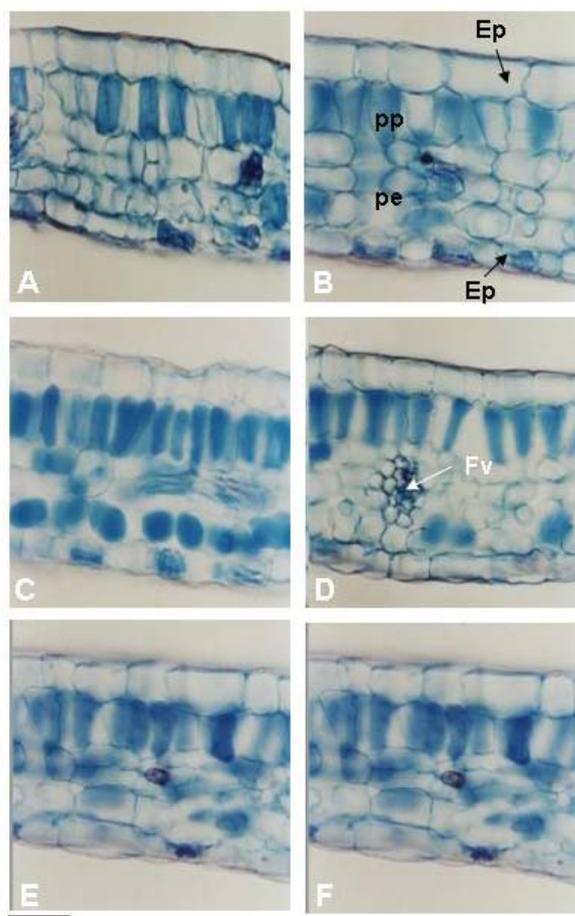


FIGURA 1 Fotomicrografias de seções transversais de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM, acrescido de diferentes fontes de citocininas: (A) TDZ, (B) BAP, (C) Cinetina, (D) Zeatina, demonstrando a presença de feixe vascular com maior diâmetro e (E e F) Controle. Ep – epiderme, pp – parênquima paliçádico, pe – parênquima esponjoso e Fv – feixe vascular (Barra = 50 μ m).

TABELA 1 Espessura da epiderme da face adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, epiderme da face abaxial e do limbo foliar de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Espessura (μm)				
	Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Limbo foliar
Controle	30,09 a	21,56 a	36,52 b	59,40 b	147,60 b
BAP	29,42 a	22,30 a	40,23 a	72,92 a	164,94 a
TDZ	30,30 a	22,41 a	36,43 b	60,44 b	148,00 b
Cinetina	28,75 a	22,49 a	42,22 a	72,24 a	165,71 a
Zeatina	30,68 a	21,96 a	34,08 b	62,14 b	148,88 b

*Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Zeatina e TDZ promoveram o desenvolvimento de plantas com maior número de feixes vasculares nas folhas, enquanto que zeatina induziu a formação de maior número de feixes vasculares por seção transversal de caule (Tabela 1). Zeatina, seguida de cinetina e BAP, estimularam desenvolvimento de feixes vasculares com maior diâmetro nas folhas (Tabela 2). Já cinetina, seguida de BAP e zeatina, promoveram o maior crescimento em diâmetro nos feixes vasculares do caule. Não foram detectadas alterações na estrutura dos feixes vasculares das folhas e caules das plantas cultivadas na presença dessas fontes de citocininas.

TABELA 2 Número de feixes vasculares/mm² de seção transversal de folha, diâmetro médio dos feixes vasculares da folha, número de feixes vasculares por seção transversal de caule e diâmetro médio dos feixes vasculares do caule de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Nº de feixes vasculares por mm ² de seção transversal de folha	Diâmetro médio dos feixes vasculares das folhas	Nº de feixes vasculares por seção transversal de caule	Diâmetro médio dos feixes vasculares do caule
Controle	29,98 b	32,97 c	6,13 b	39,16 c
BAP	28,29 b	39,45 b	5,40 c	93,67 b
TDZ	33,75 a	35,64 c	6,60 b	37,20 c
Cinetina	26,26 b	42,46 b	5,06 c	111,35 a
Zeatina	34,12 a	51,76 a	9,20 a	94,14 b

*Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

As plantas cultivadas na presença de zeatina e TDZ apresentaram estômatos com maior diâmetro equatorial em relação às plantas submetidas aos tratamentos com BAP, cinetina e o controle, não havendo diferenças estatísticas entre esses últimos tratamentos (Tabela 3). Não foram detectadas diferenças estatísticas para o diâmetro polar e para a relação entre o diâmetro polar e o diâmetro equatorial dos estômatos. Zeatina, seguida de BAP e TDZ, proporcionaram o desenvolvimento de folhas com maior densidade de estômatos e maior índice estomático.

TABELA 3 Diâmetro equatorial (DE), diâmetro polar (DP), relação DP/DE, densidade estomática e índice estomático em folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Diâmetro equatorial (μm)	Diâmetro polar (μm)	Relação DP/DE	Densidade estomática	Índice Estomático
Controle	21,38 b	38,49 a	1,81 a	182,78 c	14,88 c
Cinetina	21,52 b	39,43 a	1,83 a	171,68 c	14,72 c
BAP	21,68 b	39,25 a	1,81 a	236,06 b	16,75 b
Zeatina	22,35 a	39,34 a	1,78 a	303,40 a	18,55 a
TDZ	23,04 a	39,63 a	1,73 a	228,66 b	16,78 b

*Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Nas plantas cultivadas na presença de zeatina, além da maior densidade estomática, verificou-se a presença de paredes celulares menos sinuosas, em relação aos demais tratamentos (Figura 2).

O maior percentual de explantes com brotações foi verificado no tratamento com BAP e zeatina, sendo, em média, 60,48% superior em relação à média obtida nos demais tratamentos (Tabela 4). Zeatina induziu a formação de maior número de brotações por explante nessa espécie (multibrotações), com uma média de 2,93 brotações por explante (Tabela 4 e Figura 3). Cinetina e BAP proporcionaram o maior crescimento das brotações, enquanto que o TDZ promoveu o menor crescimento em altura das brotações.

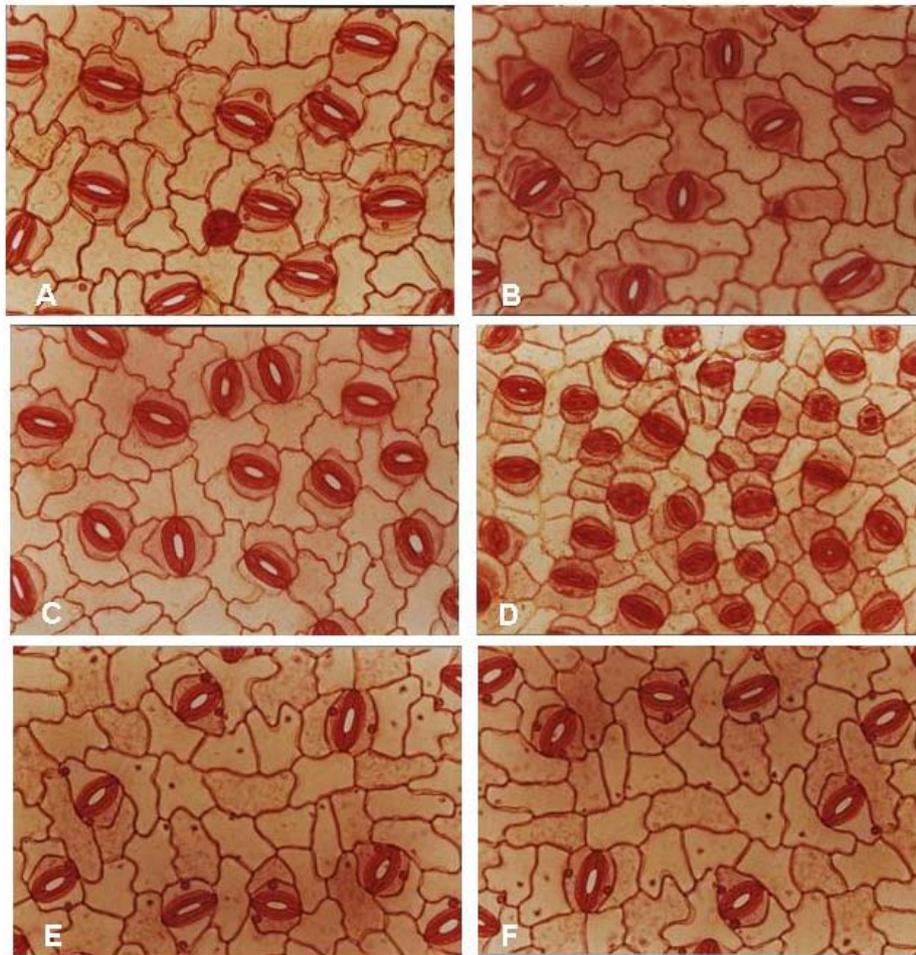


FIGURA 2 Fotomicrografias de seções paradérmicas da superfície abaxial de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM acrescido de diferentes fontes de citocininas: (A) TDZ, (B) Controle (C) BAP, (D) Zeatina, indicando elevada densidade estomática e presença de paredes celulares menos sinuosas (E e F) Cinetina. (Barra = 50 μ m).

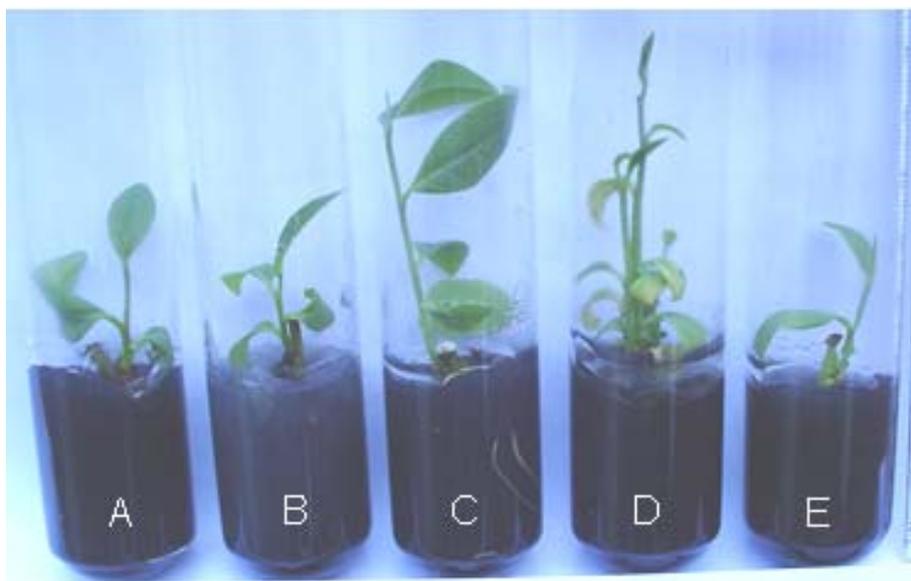


FIGURA 3 Fotografia indicando os aspectos das brotações de *Annona glabra* L. cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas, no final da fase de multiplicação. (A) Controle, (B) BAP, (C) cinetina, demonstrando aspecto mais robusto (D) zeatina, indicando a presença de multibrotações e (E) TDZ.

A utilização de citocininas durante a fase de multiplicação das brotações afetou o desenvolvimento das plantas durante as fases de enraizamento e aclimatização das plantas. No final da fase de enraizamento, nas plantas que foram multiplicadas na presença de citocininas, verificou-se um menor número de raízes, sobretudo as cultivadas na presença de zeatina; entretanto, as plantas cultivadas na presença de BAP, cinetina e zeatina apresentaram raízes com maior comprimento em relação às plantas multiplicadas na presença de TDZ e na ausência de citocinina (Tabela 4).

TABELA 4 Percentual de explantes com brotações, número de brotações por explante, altura média das brotações, número de raízes por brotação e comprimento da maior raiz de plantas de *Annona glabra* L. cultivadas em meio WPM, suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Explantes com brotações (%)	Nº de brotações por explante	Altura média das brotações (cm)	Número de raízes por brotação	Comp. da maior raiz (cm)
Controle	49,98 c	0,59 c	1,76 b	4,89 a	2,08 b
BAP	95,00 a	1,33 b	2,22 a	3,12 b	6,58 a
TDZ	49,80 c	0,93 c	1,15 c	2,36 b	2,63 b
Cinetina	75,00 b	1,26 b	2,67 a	2,99 b	4,94 a
Zeatina	92,00 a	2,93 a	1,92 b	1,39 c	4,98 a

*Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

As plantas multiplicadas na presença de cinetina e BAP apresentaram maior matéria seca, maior área foliar e maior taxa de sobrevivência no final da fase de enraizamento e de aclimatização (Tabela 5). A utilização de TDZ e zeatina durante a fase de multiplicação das plantas promoveu uma redução da taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização em relação ao controle.

TABELA 5 Matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência no final das fases de enraizamento e de aclimatização das plantas de *Annona glabra* L., multiplicadas em meio WPM, suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Matéria seca (g)	Área foliar (cm ²)	Taxa de sobrevivência (%)
Enraizamento			
Controle	0,082 b	4,55 b	68,50 c
Cinetina	0,170 a	11,25 a	88,50 a
BAP	0,165 a	8,87 a	78,00 b
TDZ	0,111 b	5,81 b	73,00 c
Zeatina	0,082 b	6,85 b	66,50 c
Aclimatização			
Controle	0,110 b	5,92 c	75,50 b
Cinetina	0,191 a	12,17 a	84,00 a
BAP	0,183 a	8,14 b	85,75 a
TDZ	0,117 b	6,65 c	62,25 c
Zeatina	0,093 b	5,47 c	53,25 c

*Em cada fase da micropropagação e na mesma coluna, as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

6 DISCUSSÃO

As citocininas desempenham um papel relevante durante a ontogenia das folhas, sobretudo nos estágios iniciais, durante os quais ocorre a máxima taxa de divisão das células e plastídios (Chernyad'ev, 2000). Neste trabalho,

verificou-se maior desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e esponjoso nas plantas de *A. glabra* submetidas aos tratamentos com BAP e cinetina, enquanto que zeatina promoveu a formação de feixes vasculares com maior diâmetro nas folhas dessa espécie.

As citocininas atuam sobre a síntese de DNA e divisão celular, gerando células competentes ao processo de diferenciação do sistema vascular (Aloni, 1995). Além da ação sobre a formação de células precursoras do sistema vascular, as citocininas desempenham papel importante no aumento da sensibilidade dessas células à auxina, estimulando indiretamente o processo de diferenciação dos vasos (Aloni, 2001). Dalessandro (1973) já havia demonstrado que a concentração de citocinina no meio de cultura era um fator limitante para a diferenciação do xilema, mas que somente citocininas não poderiam induzir a diferenciação do xilema. Esse autor verificou também que padrões ligeiramente diferentes de feixes vasculares foram originados quando a fonte de citocinina associada ao ácido indol-3-acético (AIA) era a zeatina ou cinetina, o que corrobora os resultados aqui obtidos. Mais recentemente, Estelle (2001) e Zheng-Hun (2002) demonstraram que mutantes de *Arabidopsis thaliana*, defectivos para o gene WOL/CRE1, que codifica um receptor para citocinina, não desenvolvem um sistema vascular compatível com seu crescimento, o que limita seu desenvolvimento completo.

A ação da cinetina e BAP na formação dos tecidos foliares de *A. glabra* confirma a maior eficácia dessas duas fontes de citocininas na micropropagação de anonáceas e, conseqüentemente, o uso mais freqüente desses reguladores no cultivo *in vitro* dessas plantas, como demonstram os trabalhos de Nair et al. (1984), Encina et al. (1994), Lemos & Blake (1996), Nagori & Purohit (2004). O TDZ, apesar de sua grande ação citocinínica em plantas lenhosas (Huetteman & Preece, 1993), não se mostrou efetivo no estímulo ao desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e esponjoso e do sistema vascular de folhas e caules de

plantas de *A. glabra* cultivadas *in vitro*; entretanto, não foram verificadas alterações histológicas nos tecidos das plantas cultivadas na presença desse regulador, discordando dos resultados encontrados por Akasaka et al. (2000), trabalhando com *Arachis hypogaea*.

As plantas mantidas no ambiente *in vitro* normalmente apresentam características estomáticas bem peculiares, como aumento no tamanho e na densidade dos estômatos e reduzido controle no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos (Capellades et al., 1990). Contudo, não tem sido relatada a ação das citocininas sobre a formação dos estômatos, apesar de ser amplamente conhecido o papel desses reguladores sobre o controle da abertura estomática (Pospíšilová et al., 2000; Vasekova et al., 2005). Neste trabalho, verificamos um aumento na relação entre o número de estômatos e de células epidérmicas, representado pelo aumento no índice estomático, nas plantas cultivadas em meio com BAP, TDZ e, principalmente, com zeatina (Tabela 3 e Figura 2), o que poderá representar um incremento na capacidade fotossintética das plantas, pelo aumento na difusão de CO₂ para os tecidos de assimilação da folha. Entretanto, esse aumento na relação estômatos/células epidérmicas poderá implicar também em maior perda de água por parte das plantas durante a fase de aclimatização, caso o mecanismo de controle na abertura e fechamento dos estômatos não seja adequadamente desenvolvido durante o cultivo *in vitro*, como já verificado por Donnelly et al. (1985).

Sobre esse aspecto e apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas na relação DP/DE dos estômatos de *A. glabra* (Tabela 3), verifica-se que o aumento no diâmetro equatorial dessas estruturas, nos tratamentos com TDZ e zeatina, implicou na formação de estômatos com formatos mais arredondados. Contudo, há evidências de uma maior funcionalidade dos estômatos com formas mais elipsóides, conforme trabalhos de Lee & Wetzstein (1988) e Sciutti & Morini (1995). Entretanto, a menor sinuosidade nas paredes

celulares das plantas cultivadas na presença de zeatina (Figura 2), sugere uma maior deposição de substâncias, o que poderá reduzir a perda de água via transpiração cuticular.

O maior desenvolvimento dos parênquimas paliçádico e esponjoso nas plantas multiplicadas na presença de cinetina e BAP coincidiram com a maior acumulação de matéria seca nas plantas durante as fases de enraizamento e aclimatização (Tabela 5).

Chernyad'ev (2000) comenta que tratamentos com citocininas aumentam a densidade das folhas mediante incremento do número de células por unidade de área foliar. Mesmo havendo uma considerável taxa de substituição de folhas durante o processo de aclimatização de *A. glabra*, a utilização de cinetina e BAP durante a fase de multiplicação refletiu-se em considerável aumento na área foliar das plantas durante o processo de enraizamento e aclimatização. Por outro lado, a presença contínua de citocininas no meio de multiplicação reduziu a formação de raízes laterais nas brotações. O efeito inibitório das citocininas sobre a iniciação de raízes laterais também foi verificado em arroz (*Oryza sativa*) por Debi et al. (2005).

Pelos resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que a utilização de cinetina e BAP durante a fase de multiplicação de brotações de *A. glabra* estimulou maior desenvolvimento das plantas, dotando-as de maior capacidade para suportarem a transição do ambiente heterotrófico para o autotrófico durante a aclimatização das plantas, o que proporcionou uma maior taxa de sobrevivência nessa fase.

7 CONCLUSÕES

A utilização de citocininas afeta a diferenciação dos parênquimas paliçádico e esponjoso, a densidade estomática e o desenvolvimento dos feixes vasculares de *A. glabra* durante o cultivo *in vitro*. BAP e cinetina são as fontes de citocininas que mais afetam o desenvolvimento dos tecidos foliares dessa espécie, induzindo maior altura nas brotações e maior comprimento nas raízes. A utilização de BAP e cinetina durante o cultivo *in vitro* de *A. glabra* induz maior área foliar, maior acúmulo de matéria seca e maior taxa de sobrevivência nas plantas durante a fase de aclimatização.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKA, Y.; DAIMON, H.; MII, M. Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. **Plant Science**, Clare, v. 156, n. 2, p. 169-175, July 2000.

ALONI, R. The induction of vascular tissue by auxin and cytokinin. In: _____. **Plant hormones and their role in plant growth development**. 2. ed. Netherlands, 1995. p. 531-546.

ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, n. 1, p. 22-34, Mar. 2001.

ARAUS, J. L.; ALEGRE, L.; TAPIA, L.; CALAFELL, R.; SERRET, M. D. Relationships between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American Journal of Botany**, Stanford, v. 73, n. 12, p. 1760-1770, Dec. 1986.

CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

CHERNYADEV, I. I. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, 2000.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1986. 304 p.

DALESSANDRO, G. Hormonal control of xylogenesis in pith parenchima explants of *Lactuca*. **Annals of Botany**, London, v. 37, n. 150, p. 375-382, 1973.

DEBI, B. R.; TAKETA, S.; ICHII, M. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 162, n. 5, p. 507-515, June 2005.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, 1985.

ENCINA, C. L.; BARCELÓ-MUNHOZ, A.; HERRERO-CASTAÑO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, Nov. 1994.

ESTELLE, M. Cytokinin receptor: just another histidine kinase. **Current Biology**, Massachusetts, v. 11, n. 7, p. 271-273, Apr. 2001.

FERNANDES FILHO, E. I.; VALLE, F. X. R.; LIBERATO, J. R. **QUANT - A software to quantify plant disease severity**. 2001. Patente: n.00046606.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

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

HUFF, A. K.; ROSS, C. W. Promotion of radish cotyledon enlargement and reducing sugar content by zeatin and red light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, n. 3, p. 429-433, Mar. 1975.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**, Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

KULAEVA, O. N.; BURKHANOVA, E. A.; KARAVAIKO, N. N.; SELIVANKINA, S. Y.; PORFIROVA, S. A.; MASLOVA, G. G.; ZEMLYACHENKO, Y. U.; BORNER, T. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 159, n. 12, p. 1309-1316, Dec. 2002.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Toledo. I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p.237-257, jun. 1961.

LE, H. T.; HANCOCK, J. F.; TRINH, T. T. The fruit crops of Vietnam: introduced species and their native relatives. **Fruit Varieties Journal**, Massachusetts, v. 52, n. 3, p. 158-168, 1998.

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **The Journal of the American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 113, n.1, p. 167-171, Jan. 1988.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, May 1996.

LIU, X. X.; PILARINOU, E.; McLAUGHLIN, J. L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 6, p. 848-852, June 1999.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis – Review. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 34, n. 4, p. 267-275, Oct./Dec. 1998.

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, Jan. 2004.

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona hybrid* (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.). **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 41, n. 2, p. 160-165, June 1984.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, Aug. 1995.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; RULCOVÁ, J. Cytokinins and water stress. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 43, n. 3, p. 321-328, 2000.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.

SCIUTTI, B. R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 70, n.2, p. 221-228, Mar. 1995.

VASELOVA, S. V.; FARHUTDINOV, R. G.; VASELOV, S. Y.; KUDOYAROVA, G. R.; VASELOV, D. S.; HARTUNG, W. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 162, n. 1, p. 21-26, 2005.

ZHENG-HUN, YE. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 183-202, 2002.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO AUTOTROFISMO E ACÚMULO DE MINERAIS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CITOCININAS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE *Annona glabra* L.

1 RESUMO

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Desenvolvimento do autotrofismo e acúmulo de minerais na presença e ausência de citocininas durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O papel das citocininas sobre a diferenciação do aparato fotossintético tem sido amplamente divulgado, o que poderá ampliar a capacidade das plantas micropropagadas de suportarem a transição do meio heterotrófico para o autotrófico durante as fases de enraizamento e aclimatização. Brotações de *Annona glabra* L. multiplicadas em meio Wood Plant Medium (WPM), com sacarose e diferentes fontes de citocininas foram transferidas para meio de enraizamento, na presença e ausência de sacarose, e aclimatizadas. Após 45 dias da inoculação, quantificou-se o número, comprimento, largura e diferenciação dos cloroplastos; o teor de clorofilas, carotenóides e açúcares solúveis totais nas folhas, além da fotossíntese potencial e acúmulo de minerais nas brotações. Avaliou-se ainda a matéria seca, a área foliar e a taxa de sobrevivência das plantas durante as fases de enraizamento e aclimatização. No final da fase de multiplicação, as plantas cultivadas na presença de cinetina apresentaram maior teor de clorofilas e carotenóides. Cinetina e zeatina induziram a formação de cloroplastos com maiores dimensões e o maior número de cloroplastos por área de seção transversal da folha. Cinetina e 6-benzilaminopurina (BAP) promoveram maior diferenciação dos cloroplastos e maior taxa fotossintética, enquanto thidiazuron (TDZ) promoveu desorganização do sistema lamelar, alterando o formato dos cloroplastos. Todas as fontes de citocininas testadas promoveram maior acúmulo de nitrogênio e boro nas brotações e menor acúmulo de cálcio. A utilização de cinetina e BAP durante a fase de multiplicação promoveu maior acúmulo de matéria seca e maior taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização, sobretudo quando as plantas foram enraizadas na ausência de sacarose.

* Orientador: Renato Paiva – UFLA

2 ABSTRACT

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Development autotrophism and mineral accumulation in presence and absence of cytokinin during *in vitro* culture of *Annona glabra* L.**. 2006. 104 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The role of cytokinins on differentiation of the photosynthetic apparatus has been largely studied, which can favor the micropropagated plants capacity to support the transition from the heterotrophic medium to autotrophic during the rooting and acclimatization phases. Shoot of *Annona glabra* L. multiplied in Wood Plant Medium (WPM) with sucrose and different cytokinin sources were transferred to rooting medium, in it presence and absence of sucrose and acclimatized. After 45 days of inoculation it was quantified the number, length, width and differentiation of the chloroplasts; the chlorophylls “a” and “b”, carotenoids and total soluble sugars it was quantified in the leaves, besides the potential photosynthesis and mineral accumulation in the brotações. There were also evaluated the dry matter, leaf area and shoot survival rate during rooting and acclimatization phases. At the final period of the multiplication phase, plants cultivated in presence of kinetin showed higher levels of chlorophylls and carotenoids. Kinetin and zeatin induced the chloroplasts formation with larger dimensions and the higher chloroplasts number for area of traverse section of the leaf. Kinetin and 6-benzilaminopurine (BAP) promoted higher differentiation of chloroplasts and higher photosynthetic rate, while the thidiazuron (TDZ) promoted desorganization of system lamelar, altering the format of the chloroplasts. All the cytokinin sources tested stimulated higher accumulation of nitrogen and boron in shoots and lower accumulation of calcium. The use of kinetin and BAP during the multiplication phase promoted a higher dry matter accumulation and higher plant survival rate during acclimatization phase, especially on those rooting in the absence of sucrose.

* Adviser: Renato Paiva – UFLA

3 INTRODUÇÃO

Entre as anonáceas silvestres, a *Annona glabra* L. tem sido uma das mais estudadas, não só pelo elevado potencial fitofarmacológico de suas folhas, frutos e sementes (Rupprecht et al., 1990; Padmaja et al., 1995), mas também por suas características agronômicas, como fornecedora de porta-enxertos para anonáceas cultivadas (Bourke, 1985).

Em razão do crescente interesse comercial por espécies de anonáceas e em virtude das dificuldades para a propagação de forma convencional, a micropropagação surge como alternativa viável, já sendo elevado o número de artigos publicados sobre esse tema e havendo um considerável número de informações acerca dos fatores que afetam a morfogênese *in vitro* dessas espécies (Rasai et al., 1995; Lemos & Blake, 1996; Nagori & Purohit, 2004). Entretanto, a micropropagação de anonáceas ainda enfrenta algumas limitações, como a elevada taxa de abscisão foliar (Lemos, 2000) e a reduzida taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização (Rasai et al., 1995).

A grande vulnerabilidade das plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* decorre de alterações anatômicas de suas folhas, como ausência de cera epicuticular, pequena diferenciação do mesofilo e baixa funcionalidade dos estômatos (Brainerd & Fuchigami, 1981), de alterações morfológicas do sistema radicular, com pouca ramificação e conexão vascular incipiente entre as raízes e as brotações (Díaz-Pérez et al., 1995). A reduzida atividade fotossintética das folhas, atribuída à baixa concentração de clorofilas, pouco desenvolvimento dos cloroplastos e reduzida atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco), também tem sido apontado como fatores que dificultam a transição da nutrição heterotrófica para a autotrófica durante a fase de aclimatização (Amâncio et al., 1999).

O cultivo fotoautotrófico, caracterizado pela não-suplementação do meio de cultura com uma fonte artificial de carbono, tem sido proposto com uma possível alternativa para obtenção de plantas mais aptas a suportar a transição de ambientes durante a fase de aclimatização (Kozai et al., 1997). Para sua ocorrência, tornam-se necessárias algumas modificações nas condições de cultivo em relação ao cultivo *in vitro* convencional, como aumento na disponibilidade de CO₂ e nos níveis de radiação, aliado a uma redução na umidade relativa (Seko & Nishimura, 1996). De acordo com Zobayed et al. (2002), o cultivo fotoautotrófico de *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. tem contribuído para o aumento na capacidade fotossintética, redução da taxa de abscisão foliar e aumento da taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização.

Mesmo em condições heterotróficas ou mixotróficas, algumas práticas podem estimular um maior desenvolvimento da capacidade fotossintética das plantas durante o cultivo *in vitro*, como a redução do teor de sacarose (Seko & Nishimura, 1996), a utilização de maiores concentrações de Mg (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997) e a adição de citocininas ao meio de cultura (Chernyad'ev, 2000; Arigita et al., 2005).

As citocininas estimulam o desenvolvimento do sistema vascular, propiciando maior translocação de nutrientes (Aloni, 2001), exercem efeitos diretos sobre a diferenciação dos cloroplastos (Kulaeva et al., 2002), aumentam a atividade fotoquímica do PS II (Goltsev et al., 2001) e reduzem a degradação de clorofilas (Downs et al., 1997). Contudo, diferenças de atividade entre as diversas fontes de citocininas têm sido verificadas sobre a estabilidade das membranas fotossintéticas (Genkov et al., 1997), eficiência fotossintética (Goltsev et al., 2001) e morfogênese das brotações (Nagori & Purohit, 2004).

Na micropropagação de anonáceas, as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina têm sido as mais utilizadas, em concentrações que variam de

0,2 a 2,0mg L⁻¹, independentemente do tipo de explante e do meio de cultura utilizado, a exemplo dos trabalhos realizados com atemóia (Nair et al., 1984), *Annona cherimola* Mill. (Encina et al., 1994), *A. muricata* (Lemos & Blake, 1996) e *A. squamosa* (Nagori & Purohit, 2004). Entretanto, ainda é bastante escasso o que se sabe sobre o papel dessas e de outras fontes de citocininas sobre o desenvolvimento da atividade fotossintética em anonáceas.

Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito das fontes de citocininas rotineiramente utilizadas no cultivo *in vitro* sobre o acúmulo de minerais nas brotações, a formação e diferenciação dos cloroplastos, a síntese de pigmentos fotossintetizantes e a fotossíntese potencial das plantas de *A. glabra* e seus impactos sobre o desenvolvimento do autotrofismo durante as fases de enraizamento e aclimatização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de julho a dezembro de 2005. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA e as análises ultra-estruturais, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

4.1 Material vegetal e condições experimentais

Segmentos nodais de hastes caulinares não lenhosos, com 1,5cm de comprimento e uma gema, foram extraídos de plantas matrizes juvenis de *A. glabra*, com aproximadamente 2 anos, e mantidas em sala de crescimento sob

fotoperíodo de 16 horas e temperatura ambiente. Os explantes foram lavados em água corrente por 6 horas, imersos em álcool etílico 70% por 1 minuto e solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo por 15 minutos e lavados novamente, por três vezes, em água destilada e autoclavada. Finalmente, os explantes foram isolados e mantidos em solução de ácido ascórbico a 200mg L^{-1} por 10 minutos, sendo, então, inoculados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 15mL do meio Wood Plant Medium (WPM), definido por Lloyd & McCown (1980), suplementado com 30g L^{-1} de sacarose, 1g L^{-1} de carvão ativado, 500mg L^{-1} de benlate e 0,65% de ágar, tendo seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Os tratamentos consistiram da adição de 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), cinetina e zeatina, todos na concentração de 1mg L^{-1} , além do controle, sem adição de citocinina. Apenas zeatina foi adicionada após autoclavagem do meio, após filtragem em filtro milipore com malha de $22\mu\text{m}$. Após inoculação, os tubos foram fechados com tampas e filmes plásticos. Os explantes foram incubados no escuro durante 7 dias e transferidos para ambiente com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após 55 dias de cultivo, as plantas foram transferidas para meio de enraizamento, constituído dos sais do meio WPM, suplementado 1g L^{-1} de carvão ativado, 2mg L^{-1} de AIB (ácido indolbutírico) e pH do meio ajustado para 5,0, na presença de 30g L^{-1} de sacarose (meio heterotrófico) e na ausência de sacarose (meio autotrófico). Decorridos 40 dias do início da fase de enraizamento as plantas foram aclimatizadas em tubetes de polietileno com capacidade para 288cm^3 , preenchidos com substrato comercial plantmax, envolvendo-se as brotações com sacos plásticos transparentes. Os tubetes foram parcialmente mergulhados em solução contendo 50% dos sais do meio WPM. A cobertura plástica foi perfurada gradativamente, durante 21 dias, quando foi totalmente removida, mantendo-se as plantas por mais 40 dias em sala de

crescimento, com 16 horas de luz, irradiância de fótons de $55\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 45 dias da fase de multiplicação quantificou-se o teor de clorofilas, carotenóides, açúcares solúveis totais (AST) nas folhas e o teor de minerais nas brotações. Neste período quantificou-se também a fotossíntese potencial e características ultra-estruturais dos cloroplastos. No final das fases de enraizamento e aclimatização avaliou-se o acúmulo de matéria seca, a área foliar e a taxa de sobrevivência das plantas.

Para análises bioquímicas, da fotossíntese potencial e de características ultra-estruturais dos cloroplastos adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, avaliando-se quatro repetições por tratamento, com três plantas por unidade experimental. Para análise mineral foram avaliadas três repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 5g de matéria fresca. Para avaliação da matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência adotou-se o delineamento em blocos casualizados, sendo cada tipo de meio de enraizamento (autotrófico e heterotrófico) considerado um bloco. Foram avaliadas 5 repetições, com 3 plantas por parcela para matéria seca e área foliar e 4 repetições, com 4 plantas por parcela para taxa de sobrevivência das plantas. Para análise estatística, foi utilizado o programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

4.2 Análises bioquímicas

A quantificação de clorofila “a”, “b” e total (a + b) foi realizada conforme método proposto por Arnon (1949). Para o doseamento dos carotenóides totais procedeu-se à extração em hexano e leitura espectrofotométrica a 450nm, segundo método AOAC (1990) e, para análise do teor de açúcares solúveis totais, adotou-se o método de antrona (Dische, 1962),

utilizando-se como padrão glicose anidro. Para conversão dos valores obtidos para matéria seca, determinou-se o teor de água nos tecidos.

Para análise mineral as brotações foram lavadas em água destilada, submetidas à secagem em estufa de aeração forçada, com temperatura mantida entre 60°C e 70°C, pesadas, moídas e digeridas para a obtenção dos extratos. Os teores de P foram determinados pelo método da colorimetria do molibdato; os de K, por fotometria de chama; os de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, por espectrofotometria de absorção atômica; os de S, por turbidimetria do BaCl₂; os de N, pelo método semimicro Kjeldahl e os de B, por colorimetria de curcumina/ácido bórico (Malavolta et al., 1997).

4.3 Fotossíntese potencial

A fotossíntese potencial das brotações foi determinada sob saturação de CO₂ e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando-se um monitor de oxigênio com eletrodo tipo Clark. Como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de halogênio, ajustando-se a DFFFA desejada em função da distância entre a fonte de luz e o sensor do monitor de O₂ com um quantômetro acoplado a um porômetro (modelo 1600M, LI-COR). Foram utilizadas todas as folhas de uma planta, medindo-se a área foliar correspondente a partir de imagens obtidas por um scanner HP4C deskjet, acoplado a um PC K6II 400MHz, com o software QUANT (Fernandes Filho et al., 2001). Após colocação das folhas, procedeu-se ao fechamento da câmara, iniciando-se a incidência de luz e medindo-se os valores de mV correspondentes à evolução de O₂ a cada minuto, até sua estabilização (± 7 minutos). No cálculo da fotossíntese potencial, adotaram-se a média dos valores obtidos entre 3 e 5 minutos.

4.4 Ultra-estrutura dos cloroplastos

Para análise ultra-estrutural coletou-se folhas completamente expandidas (3ª folha a partir do ápice). As amostras foram imersas em solução fixativa (Karnovsky modificado), pH 7,2, por um período de 24 horas, lavadas em tampão cacodilato por 3 vezes, pós-fixada em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, lavadas por 2 vezes de 15 minutos em água destilada e transferidas para solução a 0,5% de acetato de uranila. Em seguida, as amostras foram desidratadas em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), por 3 vezes de 10 minutos e imersas em gradiente crescente de Spurr/acetona, 30% (8 horas), 70% (12 horas) e 100% (2 vezes de 24 horas), sendo os espécimes montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa a 70°C por 48 horas.

Os blocos obtidos foram levados a um aparelho de “Trimming” para retirada dos excessos e, em seguida, obtiveram-se seções semifinas (0,85µm) e ultrafinas (< 100nm) com ultramicrotomo Reichert Jung (Ultracut) com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e montados permanentemente em meio Permalt. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro, secas em raques de alumínio e pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 Kv.

Para mensuração do número, comprimento e largura dos cloroplastos os cortes semifinos foram analisados com um microscópio óptico Olympus BX 41 acoplado a um sistema de análise de imagem (Win CELL versão Pro-plus). As imagens foram coletadas em câmara digital e transferidas para o microcomputador, realizando-se as medições com um software específico.

5 RESULTADOS

Pela análise de variância dos dados, verificou-se efeito significativo das fontes de citocininas testadas sobre o teor de clorofilas “a”, “b” e total (Anexo 1B), de carotenóides, AST e fotossíntese potencial (Anexo 2B), sobre o comprimento, largura e número de cloroplastos por unidade de área de seção transversal de folhas (Anexo 3B), sobre a matéria seca e área foliar das plantas no final da fase de enraizamento e de aclimatização (Anexo 4B), sobre a taxa de sobrevivência das plantas no final da fase de aclimatização (Anexo 5B) e sobre o acúmulo de minerais nas brotações de *A. glabra* (Anexo 6B).

Na tabela 1 vê-se que a cinetina e a zeatina promoveram maior desenvolvimento dos cloroplastos, tanto em comprimento quanto em largura, seguidos do controle e do tratamento com BAP. As plantas submetidas ao TDZ apresentaram os menores cloroplastos. Cinetina, BAP e zeatina estimularam maior número de cloroplastos para cada $1000\mu^2$ corte transversal de folha.

TABELA 1 Comprimento, largura e número de cloroplastos por $1000\mu^2$ em folhas de *A. glabra* L. cultivadas *in vitro* em meio WPM com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Cloroplastos		
	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Número por $1000\mu^2$
Controle	5,76 b	2,05 b	6,65 b
BAP	5,74 b	2,03 b	8,58 a
Cinetina	6,21 a	2,45 a	8,63 a
TDZ	5,16 c	1,73 c	6,36 b
Zeatina	6,25 a	2,25 a	8,12 a

*As médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A análise ultra-estrutural demonstrou que BAP e cinetina induziram a formação de cloroplastos com maior desenvolvimento do sistema granal e maior acúmulo de grãos de amido, enquanto TDZ estimulou a formação de cloroplastos com formatos anormais e muitas estruturas globulares e bastante eletro-densas, denominados de plastoglobulinas (Figura 1).

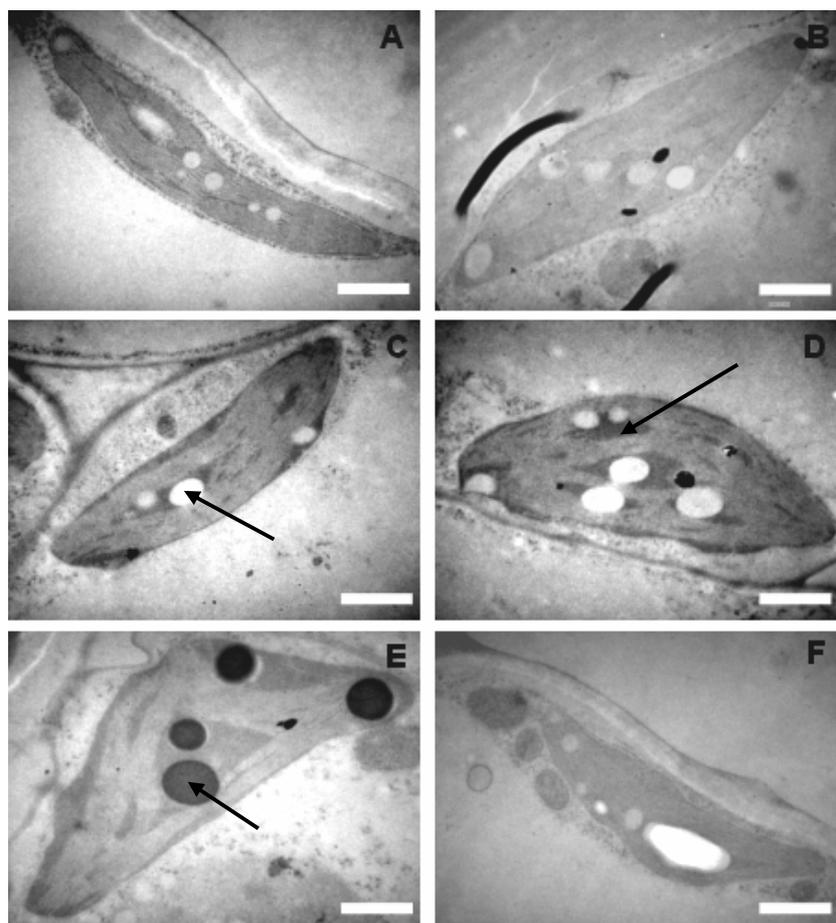


FIGURA 1 Eletromicrografia de transmissão dos cloroplastos de folhas de *Annona glabra* L. cultivada meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. A – Zeatina; B – TDZ; C – BAP (seta indica grão de amido); D – Cinetina (seta indica granum); E – TDZ (seta indica presença de plastoglobulinas); F – Sem adição de citocinina. Barra = 1μm. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Na tabela 2 vê-se que a presença de citocininas no meio de cultura promoveu aumento na concentração de clorofilas nas folhas de *A. glabra*. Cinetina e zeatina, seguidas de BAP e TDZ induziram maiores teores de clorofila “a”. Cinetina, seguida de zeatina, estimulou maior síntese de clorofila “b”. Cinetina foi a única fonte de citocinina, entre as testadas, que promoveu redução na relação clorofila a/b.

TABELA 2 Teor de clorofila “a”, clorofila “b” e razão clorofila “a”/clorofila “b” em plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Clorofila “a”	Clorofila “b”	Razão a/b
	(µg g ⁻¹ MS)		
Controle	131,12 c	51,35 c	2,55 a
BAP	134,36 b	52,95 c	2,53 a
Cinetina	141,31 a	61,16 a	2,31 b
TDZ	128,44 d	51,88 c	2,47 a
Zeatina	142,14 a	56,30 b	2,55 a

*As médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Cinetina, seguida de BAP induziu o maior acúmulo de carotenóides, sendo estatisticamente superiores em relação aos demais tratamentos (Tabela 3). Todas as fontes de citocininas possibilitaram maior acúmulo de AST nas folhas de *A. glabra*. Cinetina, juntamente com o BAP, induziu a maior taxa de fotossíntese potencial nas folhas de *A. glabra*, sendo, em média, 178,73%, 83,01% e 28,53% superiores em relação às taxas fotossintéticas potenciais obtidas em plantas cultivadas na presença de TDZ, no controle e com zeatina, respectivamente. TDZ promoveu uma taxa fotossintética potencial menor que a obtida no controle.

TABELA 3 Teor de carotenóides, fotossíntese potencial e teor de açúcares solúveis totais (AST) em plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Carotenóides	Fotossíntese potencial	AST
	($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	(mg g^{-1} MS)
Controle	6,74 d	7,950 c	0,74c
BAP	8,24 b	14,59 a	0,88b
Cinetina	8,84 a	14,52 a	1,03a
TDZ	7,05 c	5,220 d	0,98a
Zeatina	6,97 c	11,32 b	0,88b

*As médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Entre os elementos minerais analisados, apenas N, K, Ca, Mg, B, Fe e Zn tiveram suas concentrações afetadas pela presença de citocininas no meio de cultura (Tabela 4).

Os maiores teores de nitrogênio foram obtidos em plantas submetidas aos tratamentos com BAP e zeatina, seguidos por TDZ e cinetina, ao passo que nas plantas que não foram multiplicadas na presença de citocinina, obteve-se a menor concentração desse elemento. Apenas zeatina estimulou maior acúmulo de potássio e magnésio. Todas as fontes de citocinina reduziram indistintamente o teor de cálcio e aumentaram o de boro. O BAP e a zeatina induziram os maiores teores de ferro, enquanto que BAP, cinetina e zeatina induziram os maiores teores de zinco nas brotações.

TABELA 4 Teor de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) em plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Macronutrientes (g kg ⁻¹)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Controle	25,26 c	7,37 a	19,39 b	6,61 a	2,11 b	7,91 a
BAP	50,80 a	6,08 a	19,09 b	4,86 b	2,18 b	8,77 a
Cinetina	44,66 b	6,70 a	20,13 b	4,67 b	2,04 b	7,95 a
TDZ	47,13 b	6,56 a	20,30 b	5,37 b	2,05 b	8,61 a
Zeatina	50,37 a	6,74 a	22,27 a	5,00 b	3,16 a	8,05 a

Fonte de citocinina	Micronutrientes (mg Kg ⁻¹)				
	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Controle	76,00 b	11,66 a	165,66 b	273,00 a	110,33 b
BAP	91,00 a	10,66 a	191,33 a	249,66 a	131,33 a
Cinetina	100,0 a	10,33 a	162,00 b	255,00 a	126,00 a
TDZ	95,66 a	12,33 a	165,00 b	225,33 a	112,33 b
Zeatina	96,66 a	9,33 a	197,00 a	245,33 a	129,00 a

*As médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O acúmulo de matéria seca durante a fase de enraizamento foi maior nas plantas cultivadas na presença de cinetina e BAP, tanto em condições heterotróficas quanto autotróficas (Figura 2).

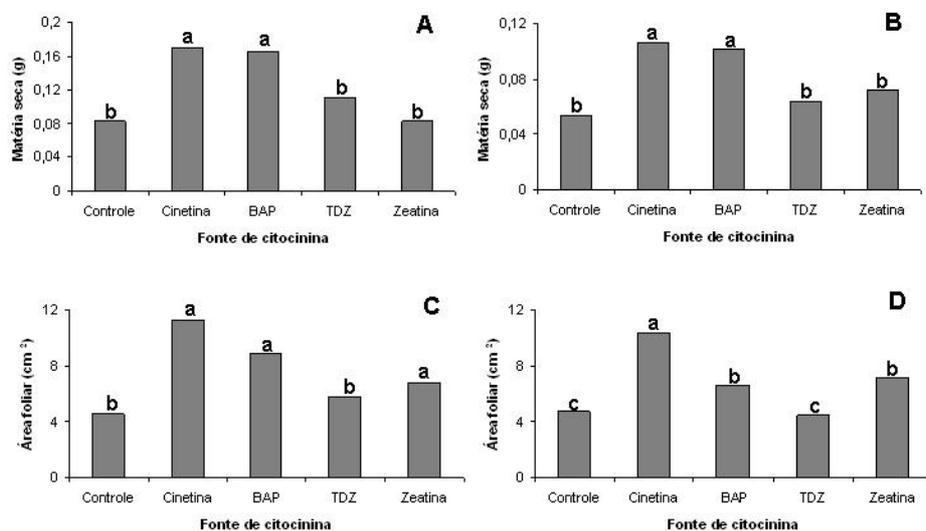


FIGURA 2 Matéria seca e área foliar no final da fase de enraizamento das plantas de *Annona glabra* L. multiplicadas na presença de diferentes fontes de citocininas e enraizadas em meio WPM heterotrófico (A e C) e autotrófico (B e D). As médias seguidas pelas mesmas letras em cada gráfico não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.

As plantas multiplicadas na presença de cinetina, BAP e zeatina apresentaram também maior área foliar durante a fase de enraizamento quando mantidas em meio heterotrófico, não havendo distinção estatística entre seus efeitos, enquanto que, sob condições autotróficas, cinetina e BAP, seguida de zeatina promoveram maior desenvolvimento da área foliar (Figura 2).

Durante a fase de aclimatização, verificou-se também nas plantas que foram multiplicadas na presença de cinetina e BAP os maiores acúmulos de matéria seca. Cinetina, seguida de BAP, promoveu o maior desenvolvimento da área foliar nesta fase, sobretudo quando enraizadas em condições heterotróficas. Nas plantas enraizadas em meio autotrófico TDZ e zeatina induziram a menor

área foliar no final da fase de aclimatização em relação ao tratamento controle (Figura 3).

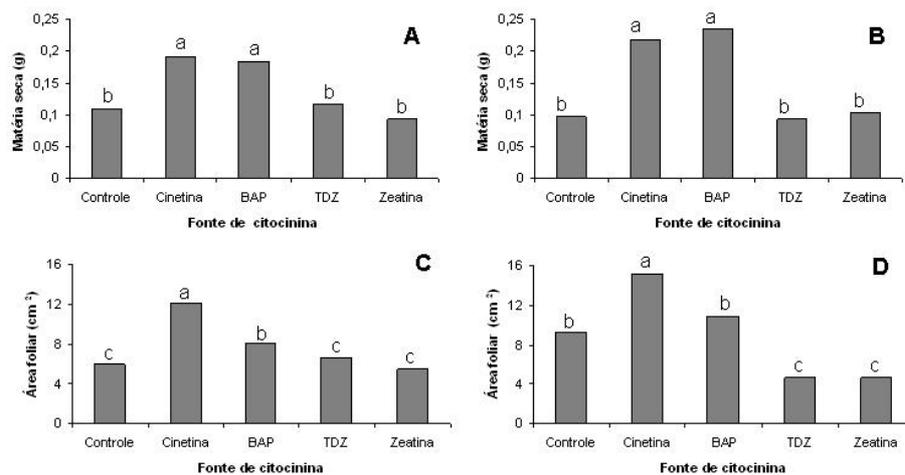


FIGURA 3 Matéria seca e área foliar no final da fase de aclimatização das plantas de *Annona glabra* L. multiplicadas na presença de diferentes fontes de citocininas e enraizadas em meio WPM heterotrófico (A e C) e autotrófico (B e D). As médias seguidas pelas mesmas letras em cada gráfico não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A taxa de sobrevivência durante a fase de aclimatização (Anexo 5B), após enraizamento em condições heterotróficas e autotróficas, foi maior nas plantas que foram multiplicadas na presença de cinetina e BAP (Tabela 5).

Entre as plantas que enraizaram sob condições heterotróficas, a utilização de TDZ e zeatina durante a fase de multiplicação proporcionou taxa de sobrevivência inferior em relação às plantas que foram multiplicadas em meio sem adição de citocinina.

TABELA 5 Taxa de sobrevivência das plantas de *Annona glabra* L. durante a fase de aclimatização, após cultivo *in vitro* em meio WPM, suplementado com diferentes fontes de citocininas e sob condições heterotróficas e autotróficas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Taxa de sobrevivência (%)	
	Condições heterotróficas	Condições autotróficas
Controle	75,5 b	64,7 b
BAP	85,7 a	79,0 a
Cinetina	84,0 a	78,5 a
TDZ	62,2 c	55,5 b
Zeatina	53,2 c	58,5 b

*As médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

6 DISCUSSÃO

Há evidências abundantes que as citocininas ativam a síntese de proteínas e de pigmentos fotossintetizantes nos cloroplastos, estimulando também a diferenciação de suas membranas (Goltsev et al., 2001; Kulaeva et al., 2002; Kubo & Kakimoto, 2000). Neste trabalho, verificou-se que a presença de citocininas afetou o número, a largura, o comprimento e a diferenciação dos cloroplastos (Tabela 1 e Figura 1), o acúmulo de clorofilas e a razão clorofila “a” e clorofila “b”(Tabela 2), o acúmulo de carotenóides, de AST e a fotossíntese potencial (Tabela 3) e o acúmulo de minerais (Tabela 4) nas brotações. A utilização de citocininas afetou também o acúmulo de matéria seca e

o desenvolvimento da área foliar das plantas de *A. glabra* durante o enraizamento e aclimatização (Figuras 2 e 3).

A maior efetividade de cinetina, BAP e zeatina sobre as variáveis analisadas confirmam a maior eficácia dessas fontes de citocinina, sobretudo do BAP, no cultivo *in vitro* de anonáceas (Nair et al., 1984; Rasai et al., 1995). Zeatina, apesar de sua elevada atividade sobre as variáveis bioquímicas, não estimulou maior crescimento das plantas durante as fases de enraizamento e de aclimatização, havendo, inclusive, inibição sobre o desenvolvimento das folhas durante essas fases (Figura 3). Encina et al. (1994) já haviam demonstrado que a utilização de zeatina promove a formação de brotos atrofiados em *A. cherimola*, embora, apenas, após várias gerações de cultivo na presença desse regulador.

A maior concentração de clorofila “b”, de carotenóides e a menor razão entre as clorofilas “a” e “b” nas plantas cultivadas na presença de cinetina sugerem uma adaptação das plantas ao ambiente *in vitro*, caracterizado pela baixa irradiância, possibilitando uma maior absorção de comprimentos de onda diferentes dos absorvidos pela clorofila “a”, o que, certamente, está associado à maior fotossíntese potencial verificada nesse tratamento. O maior acúmulo de carotenóides nas plantas pode ter sido de grande importância na manutenção dos fotossistemas, através da organização do sistema lamelar, tendo em vista o papel fotoprotetor desse pigmento, conforme resultados obtidos por Chernyad’ev (2000).

O TDZ inibiu praticamente todas as variáveis testadas, principalmente o acúmulo de clorofilas (Tabela 2) e a fotossíntese potencial das plantas (Tabela 3). Além disso, os cloroplastos das plantas cultivadas na presença desse regulador apresentaram formatos irregulares e presença de grandes corpos de lipídeos, denominados plastoglobulinas (Figura 1). Plastoglobulinas são estruturas bastante eletro-densas após fixação com glutaraldeído e tetróxido de ósmio, contendo principalmente lipídeos e inclusões de plastoquinona

(Mostowska et al., 1996). Segundo esses mesmos autores, a presença abundante dessas estruturas nos cloroplastos está associada com o decréscimo das membranas dos tilacóides e redução da performance fotossintética das plantas e tem sido utilizado como parâmetro para detecção de efeitos tóxicos de alguns herbicidas. Para Olmos & Hellín (1998) a presença dessas estruturas em *Dianthus caryophyllus* cultivado *in vitro* é uma característica marcante de plantas hiperhídricas. Dessa forma, o grande acúmulo dessas estruturas em cloroplastos de *A. glabra* pode ser uma indicação citológica do início do processo de hiperhidricidade nas plantas cultivadas na presença do TDZ.

Efeitos nocivos de reguladores à base de fenil-uréias, como o TDZ, também têm sido demonstrados por outros autores, afetando a biogênese de cloroplastos e a atividade funcional do PS II (Goltsev et al., 2001), assim como a capacidade de regeneração de plantas (Nagori & Purohit, 2004). Por outro lado, o TDZ tem-se mostrado um potente inibidor da senescência foliar, retardando a degradação de clorofilas (Ferrante et al., 2002). Neste trabalho, verificou-se que a utilização de TDZ durante a fase de multiplicação refletiu-se nas demais fases da micropropagação de *A. glabra*, promovendo uma redução na taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização, tanto nas plantas enraizadas em meio heterotrófico quanto autotrófico, quando comparadas com as respostas obtidas no tratamento controle (Tabela 5).

A elevada relação entre taxa fotossintética nas plantas multiplicadas na presença de BAP e cinetina e o acúmulo relativo de matéria seca durante a fase de enraizamento, tanto em condições heterotróficas quanto autotróficas, demonstra o papel diferenciado dessas fontes de citocinina sobre a atividade assimilatória das plantas micropropagadas. Esses efeitos induziram maior acúmulo de matéria seca durante a fase de aclimatização, sendo relativamente maior nas plantas que foram enraizadas em meio autotrófico, com incremento de matéria seca de 135,5% em relação às plantas que foram multiplicadas em meio

sem adição de citocinina, contra apenas 70% nas plantas enraizadas em meio heterotrófico. Contudo, verificou-se menor acúmulo de matéria seca e menor desenvolvimento de área foliar nas plantas enraizadas em meio autotrófico, o que, certamente, resulta do baixo nível de irradiância utilizado na sala de crescimento e da reduzida troca gasosa entre os tubos e o meio, como proposto por Seko & Nishimura (1996).

A utilização de cinetina e BAP aumentou a taxa de sobrevivência em 12,3% nas plantas enraizadas sob condições heterotróficas e em 21,7% nas plantas enraizadas sob condições autotróficas, o que demonstra maior efetividade desses reguladores de crescimento sobre as plantas cultivadas na ausência de sacarose. Resposta semelhante foi obtida por Arigita et al. (2005), quando demonstraram que a organogênese, o crescimento e a aclimatização de kiwi (*Actinidia deliciosa*) são favorecidos pela adição de benziladenina ao meio de cultura, com posterior transferência das plantas para meio sem sacarose e tubos com ventilação.

A presença de citocinina afetou o acúmulo de alguns minerais, sobretudo nitrogênio, cálcio e boro. O nitrogênio é essencial para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas e desempenha um papel importante como regulador de muitas funções fisiológicas (Konno et al., 1999). A maior concentração de nitrogênio nas brotações cultivadas na presença de citocininas pode ter sido um dos principais fatores que contribuíram para o maior desenvolvimento das plantas cultivadas na presença desse regulador, indicando, ainda, uma possível interação entre as citocininas e as enzimas envolvidas com a assimilação desse elemento, conforme sugerido por Samuelson et al. (1995).

Todas as fontes de citocinina reduziram o teor de cálcio nas brotações de *A. glabra*. O cálcio participa da formação de complexas redes de moléculas de pectina, que estão envolvidas com a resistência das paredes celulares (Konno et al., 1999). Para esses mesmos pesquisadores, a estrutura e o metabolismo das

moléculas pécnicas em culturas de células são alterados pela privação desse elemento. Murch et al. (1997) já haviam revelado que o tratamento com TDZ pode resultar em mudanças significativas no acúmulo de minerais em tecidos, incluindo manganês, ferro, cobre, cálcio, magnésio e potássio e em aumento dos níveis de compostos biológicos envolvidos na resposta de estresse da planta. Barberaki & Kintzios (2002) também demonstraram que a acumulação de macronutrientes em tecidos cultivados *in vitro* é seriamente afetada pela presença de reguladores de crescimento. Para esses autores, a cinetina afeta o acúmulo de potássio, fósforo, cálcio e magnésio em calos de *Viscum album* L.

7 CONCLUSÕES

O conteúdo de clorofilas, de carotenóides, a fotossíntese potencial e o tamanho e diferenciação dos cloroplastos são maiores em plantas multiplicadas na presença de cinetina e BAP. TDZ provoca desorganização o aparato fotossintético das plantas. A presença de citocininas aumenta a absorção e assimilação de nitrogênio e de boro e reduz a de cálcio. Cinetina e BAP favorecem o desenvolvimento do autotrofismo em plantas de *A. glabra* durante o cultivo *in vitro*, aumentando a taxa de sobrevivência das plantas na fase de aclimatização.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, n. 1, p. 22-34, Mar. 2001.

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J. P.; CHAVES, M. M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 31-37, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, DC, 1990. 1298 p.

ARIGITA, L.; FERNÁNDEZ, A. G.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatization and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 2, p. 161-167, Feb. 2005.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.

BARBERAKI, M.; KINTZIOS, S. Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: effect of medium composition and explant source. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 133-150, Aug. 2002.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

BOURKE, D. O'D. Annona ssp. In: GARNER, R. J.; CHAUDHRI, S. A. **The propagation of tropical fruit tree**. Maidstone: FAO/CAB, 1985. p. 223-247.

CHERNYAD'EV, I. I. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, 2000.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *in vitro* formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue cultured apple shoots. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 3, p. 435-440, May 1995.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1997.

DISCHE, Z. General collor reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.) **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

DOWNS, C.G.; SOMERFIELD, S. D.; DAVERY, M. C. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 93-100, June 1997.

ENCINA, C. L.; BARCELÓ-MUNHOZ, A.; HERRERO-CASTAÑO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, Nov. 1994.

FERRANTE, A.; HUNTER, D. A.; HACKETT, W. P.; REID, M. S. Thidiazuron – a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 333-338, July 2002.

FERNANDES FILHO, E. I.; VALLE, F. X. R.; LIBERATO, J. R. **QUANT - A software to quantify plant disease severity**. 2001. Patente: n.00046606.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 16, n. 3, p. 169-172, 1997.

GOLTSEV, V.; GENKOV, T.; LEXA, M.; IVANOVA, I. Effect of benzyladenine, 4-PU-30 and thidiazuron on millisecond delayed and prompt chlorophyll fluorescence of *Dianthus caryophyllus* L. axillary buds cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 41-54, June 2001.

KONNO, H.; NAKASHIMA, S.; MAITANI, T.; KATOH, K. Alteration of pectic polysaccharides in cell walls, extracellular polysaccharides and glycanhydrolytic enzymes of growth-restricted carrot cells under calcium deficiency. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 107, n. 3, p. 287-293, Nov. 1999.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

KUBO, M.; KAKIMOTO, T. The cytokinin-hypersensitive genes of *Arabidopsis* negatively regulate the cytokinin-signaling pathway for cell division and chloroplast development. **The Plant Journal**, Hestington York, v. 23, n. 3, p. 285-294, Aug. 2000.

KULAEVA, O. N.; BURKHANOVA, E. A.; KARAVAIKO, N. N.; SELIVANKINA, S. Y.; PORFIROVA, S. A.; MASLOVA, G. G.; ZEMLYACHENKO, Y. U.; BORNER, T. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 159, n. 12, p. 1309-1316, Dec. 2002.

LEMOS, E. E. P. Organogênese e micropropagação em anonáceas. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 3., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, May 1996.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, 416, Aug. 1980. Abstract. 321.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MOSTOWSKA, A.; SIEDLECKA, M.; PARYS, E. Effect of 2-bipyridyl, a photodynamic herbicide, on chloroplast ultrastructure, pigment content and photosynthesis rate in pea seedlings. **Plant Physiology**, Maryland, v. 18, p. 153-164, 1996.

MURCH, S. J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Thidiazuron-induced morphogenesis of Regal geranium (*Pelargonium domesticum*): a potential stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p. 183-191, Sept. 1997.

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D. *In vitro* planted regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyls segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, Jan. 2004.

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona hybrid* (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.). **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 41, n. 2, p. 160-165, June 1984.

OLMOS, E.; HELLÍN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 75, p. 91-101, 1998.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, Aug. 1995.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: A review. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 53, n. 2, p. 237-278, Mar./Apr. 1990.

SAMUELSON, M. E.; CAMPBELL, W. H.; LARSSON, C. M. The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in arley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 3, p. 533-539, Mar. 1995.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effects of CO₂ and light on survival and growth *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 257-264, Sept. 1996.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 155-165, May 2002.

CAPÍTULO IV

EFEITO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CITOCININAS NA SENESCÊNCIA E ABSCISÃO FOLIAR DURANTE O CULTIVO *IN* *VITRO* DE *Annona glabra* L.

1 RESUMO

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Efeito da presença e ausência de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A micropropagação de anonáceas tem sido limitada pela abscisão foliar nas brotações, o que dificulta a manutenção e desenvolvimento das plantas no ambiente *in vitro*. Esse fenômeno tem sido atribuído principalmente ao acúmulo de etileno nos tubos fechados; entretanto, tem sido demonstrado em pesquisas que é a relação etileno/citocinina nas folhas que regula o início do processo. Com o presente trabalho, objetivaram-se avaliar o efeito da ausência e presença de quatro fontes de citocinina sobre o retardo da senescência e abscisão foliar em brotações de *Annona glabra* L. e suas implicações sobre o desenvolvimento das plantas. Segmentos nodais foram cultivados em tubo de ensaio contendo meio WPM, suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 500mg L⁻¹ de benomyl e 1g L⁻¹ de carvão ativado. A esse meio adicionaram-se 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), cinetina e zeatina, todos na concentração de 1mg L⁻¹. Decorridos 45 dias após a inoculação, plantas foram submetidas à senescência em ambiente escuro por um período de 9 dias, coletando-se folhas a cada três dias para quantificação de clorofila “a”, clorofila “b”, carotenóides, proteínas e açúcares solúveis totais. No final das fases de multiplicação e enraizamento, quantificou-se a matéria seca, a área foliar e o número de folhas que sofreram abscisão nas plantas que não foram submetidas à senescência. Cinetina e zeatina, seguidas de BAP e TDZ, retardaram a degradação de clorofilas “a”, “b” e de carotenóides durante todo o período de senescência induzida, ao passo que, no tratamento sem adição de citocinina, verificou-se maior acúmulo de açúcares solúveis totais. BAP e cinetina possibilitaram maior retenção da área foliar durante a fase de multiplicação, refletindo-se em maior acúmulo de matéria seca e maior desenvolvimento da área foliar no final da fase de enraizamento, demonstrando a importância da utilização de citocininas no controle da abscisão foliar e desenvolvimento das plantas durante o cultivo *in vitro*.

* Orientador: Renato Paiva – UFLA

2 ABSTRACT

OLIVEIRA, Lenaldo Muniz de. **Effect the presence and absence of cytokinin in leaf senescence and abscission during *in vitro* culture of *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The micropropagation of *Annonaceae* has been limited leaf abscission in shoots, which difficults the maintenance and development of plants *in vitro* environment. This phenomenon has been attributed mainly to ethylene accumulation in closed tubes, although, studies have shown that the relation ethylene/cytokinin in leaves regulates the onset of the process. The present work evaluates the effect the presence and absence of four cytokinin sources on leaf senescence and abscission delay in shoots of *Annona glabra* L. and its implications on the development of this plants. Node segments were cultivated in test tubes containing of WPM medium, supplemented with 30g L⁻¹ of sucrose, 500mg L⁻¹ of benomyl and 1g L⁻¹ of activated charcoal. It was added to this medium 6-benzilaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ), kinetin and zeatin, all of them in the concentration of 1mg L⁻¹. After 45 days of inoculation, plants were submitted to senescence in dark environment during 9 days, collecting the leaves each three days for chlorophylls “a” and “b”, carotenoids, proteins and total soluble sugars quantification. In the final steps of multiplication and rooting, it was obtained a dry matter accumulation, a leaf area index and the number of abscised leaves in plants without senescence treatments. Kinetin and zeatin, followed by thidiazuron (TDZ) and 6-benzilaminopurine (BAP), kept a higher level of chlorophyll “a” and “b” and carotenoids during all period of senescence induced by darkness, while in the treatment without cytokinin a higher total soluble sugar accumulation was verified. BAP and kinetin caused higher leaf area retention during the multiplication phase, reflecting a higher dry matter accumulation and higher leaf area development at the end of the rooting phase, showing the importance of the use of cytokinins to control leaf abscission and plant development during *in vitro* culture.

* Adviser: Renato Paiva – UFLA

3 INTRODUÇÃO

Annona glabra L. é uma espécie frutífera tropical, pertencente à família *Annonaceae*, que ocorre naturalmente na América do Sul (Le et al., 1998). Essa espécie tem sido estudada como promissora fonte de porta-enxerto para anonáceas cultivadas, tanto pelo seu sistema radicular resistente a condições de excesso de umidade no solo como pelo seu poder ananizante sobre a copa enxertada (Bourke, 1985), além de seu grande potencial fitofarmacológico, apresentando componentes com propriedades antibactericida, antifúngica, inseticida e citotóxica (Padmaja et al., 1995).

A micropropagação tem se mostrado como uma ferramenta tecnicamente viável e uma promissora alternativa para propagação de *A. glabra* e outras espécies do gênero *Annona* (Rasai et al., 1995), já havendo um considerável número de informações acerca dos fatores que afetam sua morfogênese *in vitro*. Para indução e multiplicação *in vitro* de brotações de anonáceas, basicamente tem-se utilizado uma fonte de citocinina acrescida ao meio de cultivo. O 6-benzilaminopurina (BAP), isoladamente ou combinado com outros reguladores de crescimento, tem sido empregado em concentrações entre 0,2 a 2,0mg L⁻¹ na maioria dos sistemas de micropropagação de anonáceas, independentemente do tipo de explante e do meio de cultura utilizado, a exemplo dos trabalhos realizados com atemóia (Nair et al., 1984), *Annona cherimola* Mill. (Encina et al., 1994), *Annona muricata* L. (Lemos & Blake, 1996a) e *Annona squamosa* L. (Nagori & Purohit, 2004).

Entretanto, a multiplicação *in vitro* e de forma massiva desse grupo de plantas ainda tem se confrontado com algumas limitações, como a contaminação endógena dos explantes (Santana et al., 2003), a alta concentração de compostos fenólicos em seus tecidos (Martinez-Cayuela et al., 1988; Jordan et al., 1991) e, principalmente, a abscisão foliar (Lemos, 2000), ocasionada pelo acúmulo de

etileno nos tecidos confinados no ambiente *in vitro*, prejudicando o vigor e o crescimento das brotações. Para Lemos (2000), ultrapassar essa dificuldade representa o grande desafio na obtenção de um protocolo consistente para a micropropagação de anonáceas.

Lemos & Blake (1996b) estudaram a ação do etileno sobre a abscisão foliar precoce em explantes de *A. squamosa* cultivados *in vitro* mediante uso de compostos absorventes do etileno (carvão ativado e permanganato de potássio), compostos inibidores da síntese do etileno (cloreto de cobalto, L- α -aminoetoxivinil glicina – AVG e ácido aminooxiacético) e compostos inibidores da ação do etileno (nitrato e tiosulfato de prata). Embora os resultados obtidos tenham mostrado redução significativa da abscisão foliar, principalmente quando foram usados inibidores da ação do etileno, os efeitos produzidos não foram duráveis.

Zobayed et al. (2002) estudaram o efeito da aeração dos frascos de cultura na indução de brotações em segmentos nodais de *A. squamosa* e *A. muricata* sob três tipos de ventilação e verificaram que, em ambas as espécies, o número de folhas, a área foliar e o número de nós por brotação aumentaram quando foi utilizada ventilação forçada, enquanto que a abscisão foliar foi inibida; entretanto, esse método requer um custo adicional por conta da aparelhagem necessária para gerar uma ventilação pressurizada nos recipientes de cultura.

Contudo, tem-se inferido que a senescência é um processo regulado pelo balanço entre etileno e citocinina nos tecidos. A concentração de citocinina diminui abruptamente em órgãos maduros, induzindo o início da senescência (Tian et al., 1994), ao passo que o tratamento de folhas isoladas de muitas espécies com citocininas promove o retardo da senescência, como observado em *Alstroemeria* (Ferrante et al., 2002) e *Brassica oleracea* L. (Downs et al., 1997). Entretanto, a competência para retardar a senescência foliar varia amplamente

entre os diversos tipos de citocininas (Genkov et al., 1997). Entre as citocininas sintéticas, o thidiazuron (TDZ) tem-se mostrado como a mais efetiva no controle da senescência (Ferrante et al., 2002). Já entre as citocininas naturais, a zeatina ribosídeo e a diidrozeatina ribosídeo têm sido mais ativas nesse controle (Nooden et al., 1990).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a senescência foliar em *A. glabra* mantidas *in vitro*, comparando o efeito da ausência e presença de diferentes fontes de citocininas no retardo da degradação de clorofilas, proteínas, carotenóides e AST, bem como o acúmulo de matéria seca, a área foliar e o número de folhas caídas durante o cultivo *in vitro* dessa espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de janeiro a junho de 2005. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

4.1 Material vegetal e condições experimentais

As brotações foram obtidas de segmentos nodais extraídos de hastes caulinares jovens (não-lenhosos), contendo uma gema e aproximadamente 1,5 cm de comprimento, de plantas matrizes de *A. glabra* com aproximadamente 2 anos de vida e mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura ambiente.

Os explantes foram lavados em água corrente por 6 horas e imersos, seguidamente, em álcool etílico 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio, com 1% de cloro ativo, por 15 minutos e por três vezes de 1 minuto cada

em água destilada e autoclavada. Os explantes foram isolados e mantidos em solução de ácido ascórbico na concentração de 200mg L^{-1} por 10 minutos e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 15mL do meio Wood Plant Medium (WPM), definido por Lloyd & McCown (1980), suplementado com 30g L^{-1} de sacarose, 500mg L^{-1} de benomyl e 1g L^{-1} de carvão ativado. O meio foi solidificado com 0,65% de ágar, tendo seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Os tratamentos consistiram da adição de 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), cinetina e zeatina, todos na concentração de 1mg L^{-1} e, como controle, utilizou-se o tratamento sem adição de citocinina. Apenas zeatina foi adicionada após autoclavagem do meio, após filtragem em filtro milipore (22 μm de malha). Após a inoculação dos explantes, procedeu-se a vedação dos tubos com tampas e filmes plásticos. Os explantes foram incubados no escuro por um período de 7 dias, sendo, em seguida, transferidos para ambiente com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 45 dias após a inoculação, selecionaram-se 48 plantas de cada tratamento, com aproximadamente o mesmo tamanho e aspecto. Essas plantas foram submetidas à senescência em ambiente escuro por um período de 9 dias, coletando-se folhas no 1º, 3º, 6º e 9º dia para realização das análises bioquímicas. Em cada período, procederam-se à quantificação de clorofila “a”, clorofila “b”, clorofila total (a + b), carotenóides, proteínas e açúcares solúveis totais (AST). No mesmo período, discos foliares com 2cm^2 foram coletados de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento (*ex vitro*) e mergulhados em solução contendo os sais do meio WPM, acrescida de uma fonte de citocinina (BAP, TDZ, cinetina e zeatina), também na concentração de $1,0\text{mg L}^{-1}$, além do tratamento controle, submetendo-os ao mesmo tratamento escuro e às mesmas avaliações bioquímicas descritas anteriormente.

Os experimentos foram instalados em delineamento blocos casualizados, com cada período de senescência induzida sendo considerado um bloco. Em cada período coletaram-se quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por três plantas. Para análise estatística, foi utilizado o programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999). As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Aos 55 dias após a inoculação, período correspondente ao final da fase de multiplicação, quantificou-se nas plantas que não foram submetidas à senescência em ambiente escuro a matéria seca, a área foliar e o número e percentual de folhas que sofreram abscisão, utilizando-se cinco repetições por tratamento, com duas plantas por parcela experimental. Essas mesmas avaliações foram realizadas no final da fase de enraizamento, quando as plantas multiplicadas sob as diferentes fontes de citocininas foram transferidas para meio WPM, suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 1g L⁻¹ de carvão ativado e 2mg L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico) e pH do meio ajustado para 5,0 antes da autoclavagem. A avaliação nesse período teve por objetivo verificar o efeito residual dessas fontes de citocininas sobre o desenvolvimento das plantas de *A. glabra* durante a fase de enraizamento. Para determinação da área foliar, foi utilizado um scanner HP4C deskjet, acoplado a um PC K6II 400MHz, quantificando-se a área correspondente a cada imagem com o software QUANT (Fernandes Filho et al., 2001).

4.2 Análises bioquímicas

A quantificação de clorofila “a”, “b” e total (a + b) foi realizada conforme método proposto por Arnon (1949), realizando-se leituras espectrofotométricas a 645 e 663nm. Para o doseamento dos carotenóides totais, procedeu-se à extração em hexano e posterior leitura espectrofotométrica a 450nm, segundo método AOAC (1990).

Para análise do teor de açúcares solúveis totais, adotou-se o método de antrona (Dische, 1962), utilizando-se como padrão glicose. A determinação da fração protéica foi realizada por meio do doseamento do nitrogênio total pelo método Micro-Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando-se o fator de 6,25 para conversão dos valores de nitrogênio total para fração protéica. Em cada período de escuro induzido, coletaram-se amostras para determinação do teor de água nos tecidos foliares, sendo os valores obtidos utilizados para conversão dos resultados correspondentes à matéria fresca para matéria seca.

5 RESULTADOS

Tanto nas plantas *in vitro* como nos discos foliares de plantas mantidas em casa de vegetação verificou-se efeito significativo das fontes de citocininas e do tempo de senescência induzida sobre o teor de clorofilas (Anexo 1C e 3C, respectivamente) e de AST, proteínas e carotenóides (Anexo 2C e 4C, respectivamente). As fontes de citocininas promoveram efeitos significativos sobre a matéria seca, área foliar e número e percentual de folhas senescentes no final da fase de multiplicação (Anexo 5C) e de enraizamento (Anexo 6C).

Nas plantas *in vitro*, aos 45 dias de cultivo, cinetina e zeatina, promoveram maior acúmulo de clorofila total (Tabela 1). Esse mesmo padrão manteve-se ao longo dos nove dias de escuro; entretanto, as diferenças entre os tratamentos tornaram-se mais acentuadas. Aos nove dias de tratamento escuro, as plantas cultivadas na presença de cinetina e zeatina apresentaram teores de clorofila totais semelhantes estatisticamente (161,34 e 159,69 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS, respectivamente) sendo, em média, 17,44%, 30,82% e 39,67% superiores em relação aos resultados obtidos nas plantas submetidas aos tratamentos com TDZ, BAP e sem adição de citocinina, respectivamente. Nesse mesmo período, a razão clorofila a/b foi significativamente menor nas plantas submetidas aos

tratamentos com adição de citocininas (2,99, 3,25, 3,44 e 3,29 para cinetina, zeatina, BAP e TDZ, respectivamente). Nas plantas multiplicadas na ausência de citocinina, esse valor foi de 3,94.

TABELA 1 - Teor de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofila total em folhas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* na presença de diferentes fontes de citocininas e submetidas à senescência induzida. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Tempo de senescência induzida (Dias)			
	0	3	6	9
Clorofila “a” ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)				
Controle	131,13 c	115,02 d	111,48 d	91,67 d
TDZ	128,44 d	118,81 c	114,09 c	104,85 b
BAP	134,13 b	117,64 c	111,54 d	95,09 c
KIN	141,31 a	133,22 b	127,61 b	120,95 a
ZEA	142,14 a	135,86 a	132,28 a	122,19 a
Clorofila “b” ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)				
Controle	51,35 c	41,19 b	33,28 d	23,23 e
TDZ	51,87 c	47,49 a	37,96 c	31,80 c
BAP	52,95 c	48,45 a	41,12 b	27,57 d
KIN	61,15 a	46,99 a	43,87 a	40,38 a
ZEA	56,33 b	46,32 a	41,38 b	37,49 b
Clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)				
Controle	182,48 d	156,52 c	144,61 c	114,91 d
TDZ	180,32 d	166,31 b	152,05 b	136,66 b
BAP	187,09 c	166,10 b	152,65 b	122,67 c
KIN	202,47 a	180,21 a	171,49 a	161,34 a
ZEA	198,48 b	182,18 a	173,92 a	159,66 a

* Em cada coluna, as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O teor de carotenóides totais foi maior nas plantas cultivadas na presença de citocinina no meio de cultura durante todo o período de indução da senescência foliar (Tabela 2).

TABELA 2 - Teor de carotenóides, proteínas e açúcares solúveis totais (AST) em folhas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* na presença de diferentes fontes de citocininas e submetidas à senescência induzida. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Tempo de senescência induzida (Dias)			
	0	3	6	9
Carotenóides ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)				
Controle	6,74 d	3,94 c	1,80 d	1,67 d
TDZ	7,05 c	5,57 b	2,92 c	2,90 b
BAP	6,98 c	5,49 b	2,91 c	2,46 c
KIN	8,24 b	5,69 b	3,25 b	3,06 b
ZEA	8,84 a	5,93 a	3,70 a	3,37 a
Proteínas (mg g^{-1} MS)				
Controle	8,46 b	7,34 c	6,35 a	6,01 b
TDZ	8,48 b	8,20 a	6,50 a	6,33 b
BAP	8,05 c	7,24 c	6,43 a	6,19 b
KIN	8,89 a	8,30 a	6,71 a	6,70 a
ZEA	7,96 c	7,79 b	6,32 a	6,30 b
AST (mg g^{-1} MS)				
Controle	0,74 c	1,98 a	2,85 a	2,94 a
TDZ	0,98 a	1,83 b	2,25 b	2,40 b
BAP	0,88 b	1,88 b	2,25 b	2,47 b
KIN	1,03 a	1,28 d	1,59 c	2,05 c
ZEA	0,88 b	1,40 c	1,66 c	2,11 c

* Em cada coluna, as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No início do tratamento escuro, zeatina, seguida de cinetina, promoveram os maiores valores de carotenóides totais. Nos tratamentos com TDZ e BAP os teores de carotenóides foram semelhantes estatisticamente nesse mesmo período. Apesar de ter ocorrido uma tendência de degradação mais rápida desse pigmento ao longo do período de senescência induzida em todos os tratamentos, somente aos seis e aos nove dias de tratamento em ambiente escuro ficou mais claro o papel das fontes de citocininas testadas sobre a inibição da degradação de carotenóides em relação ao tratamento sem esse tipo de regulador. Aos nove dias de escuro, as plantas cultivadas na presença de zeatina, cinetina, TDZ e BAP apresentaram teores de carotenóides superiores em 101,79%, 83,23%, 73,65% e 47,30%, em relação às plantas cultivadas em meio sem adição de citocinina, respectivamente.

O teor de proteínas nas folhas de *A. glabra* submetidas ao tratamento escuro sofreu uma redução gradativa. Cinetina promoveu maior retardo na degradação de proteínas no 1º e 9º dia de senescência induzida. As demais fontes de citocininas não afetaram a degradação protéica aos nove dias de senescência induzida. No sexto dia de senescência induzida não foram detectados efeitos significativos de nenhuma fonte de citocinina sobre o retardo na degradação protéica (Tabela 2).

Por outro lado, os teores de AST sofreram um aumento gradativo durante o tratamento escuro. As plantas cultivadas na ausência de citocinina apresentaram o menor teor de AST aos 45 dias de cultivo *in vitro* em relação às plantas cultivadas na presença de citocininas (Tabela 2). Nesse período, TDZ e cinetina proporcionaram o maior acúmulo de açúcares. Entretanto, com o início do tratamento em ambiente escuro induzido e durante todo o período escuro, as plantas submetidas ao tratamento sem adição de citocinina apresentaram maiores teores de AST, sendo estatisticamente superiores a partir do sexto dia de

tratamento escuro. Zeatina e cinetina foram às fontes de citocininas que promoveram menores acúmulos de AST no 3º, 6º e 9º dia de senescência.

Durante a fase de multiplicação das brotações de *A. glabra*, apenas o BAP estimulou maior desenvolvimento de área foliar entre as fontes de citocininas testadas (Tabela 3). Nessa mesma fase, BAP e cinetina promoveram a maior retenção da área foliar, em virtude do menor número e percentual de folhas caídas, enquanto que cinetina e zeatina estimularam o maior acúmulo de matéria seca.

TABELA 3 Matéria seca, área foliar, número de folhas caídas e percentual de área foliar senescente no final das fases de multiplicação e enraizamento de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* na presença de diferentes fontes de citocininas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Fonte de citocinina	Matéria seca (g)	Área foliar (cm ²)	Nº de folhas caídas	Área foliar caída (%)
Multiplicação				
Controle	0,016 b	4,16 b	2,40 b	11,24 b
TDZ	0,020 b	2,62 b	1,80 b	10,26 b
BAP	0,022 b	6,34 a	1,00 a	5,70 a
KIN	0,044 a	4,68 b	0,60 a	3,28 a
ZEA	0,044 a	3,43 b	2,60 b	13,02 b
Enraizamento				
Controle	0,082 b	4,55 b	3,40 b	19,16 c
TDZ	0,111 b	5,81 b	2,40 b	12,30 b
BAP	0,165 a	8,87 a	0,80 a	5,460 a
KIN	0,170 a	11,25 a	0,60 a	4,240 a
ZEA	0,082 b	6,85 b	2,00 b	10,98 b

* Em cada fase da micropropagação e na mesma coluna, as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Já durante a fase de enraizamento, BAP e cinetina estimularam maior retenção de área foliar, seguida dos tratamentos com zeatina, TDZ e o controle, não havendo diferenças estatísticas entre esses últimos. BAP e cinetina promoveram a maior retenção da área foliar nesta fase. Os maiores valores de matéria seca também foram verificados nas plantas submetidas aos tratamentos com BAP e cinetina (Tabela 3).

6 DISCUSSÃO

A Abscisão foliar tem criado grandes dificuldades para manutenção de brotações de anonáceas *in vitro*, dificultando o alongamento e enraizamento destas. Esse processo, apesar de controlado pela planta, é acelerado pela aplicação exógena de etileno ou seus precursores e retardado pelo tratamento com citocininas exógenas (Ferrante et al., 2002).

Neste trabalho, verificou-se uma ação efetiva das fontes de citocinina testadas sobre o retardo na degradação de clorofilas durante a senescência em ambiente escuro em brotações de *A. glabra* mantidas *in vitro* (Tabela 1). As respostas semelhantes entre os resultados obtidos em plantas *in vitro* e discos foliares extraídos de plantas mantidas em casa-de-vegetação e submetidas aos mesmos tratamentos demonstra a elevada permanência desses reguladores no meio de cultura, provavelmente em virtude da elevada resistência desses compostos à ação de enzimas oxidativas. A grande efetividade da zeatina no retardo da degradação de clorofila confirma a maior atividade dessa fonte natural de citocinina no cultivo *in vitro* de anonáceas, conforme resultados obtidos por Encina et al. (1994). Para Sing et al. (1992), a maior atividade dessa fonte de citocinina decorre de sua maior capacidade de conjugação com açúcares, tornando-as mais resistentes à clivagem enzimática. Entre as fontes sintéticas, a cinetina mostrou-se como a mais eficiente no retardo da degradação

de clorofila *in vitro*. TDZ e BAP demonstraram pouca efetividade no controle da degradação de clorofila, apesar da elevada atividade do BAP na indução de brotações de anonáceas (Lemos & Blake, 1996a), e do TDZ na inibição da senescência foliar em *Alstroemeria* (Ferrante et al., 2002). Entretanto, Carimi et al. (2004) demonstraram que o BAP, em concentrações elevadas, pode promover a morte celular programada em cultura de células, acelerando a senescência.

A adição de citocinina ao meio de cultura, mesmo antes do início do tratamento escuro e independente da fonte de citocinina, induziu uma redução na razão clorofila a/b. Para Engel & Poggiani (1991), a proporção entre clorofilas “a” e “b”, de uma maneira geral, tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa, condição freqüente no ambiente *in vitro*, com uma maior proporção relativa de clorofila “b”. Para esses mesmos autores, o aumento no teor de clorofila “b” está associado a uma degradação mais lenta desse pigmento, quando comparado com a clorofila “a”. A menor razão clorofila a/b pode representar um aumento na eficiência fotossintética das plantas submetidas à baixa intensidade de fluxo de fótons, pois uma maior proporção relativa de clorofila “b” possibilita a captação de energia de outros comprimentos de onda, transferindo-a para a clorofila “a”, que efetivamente participa das reações fotoquímicas.

De modo semelhante, a preservação de uma maior quantidade de carotenóides nas folhas, devido à adição de citocininas ao meio de cultura (Tabela 2), pode possibilitar maior captação de energia pelos fotossistemas, atuando na fotoproteção das membranas fotossintéticas, como sugerido por Chernyad'ev (2000).

O maior teor de AST nas plantas submetidas aos tratamentos com adição de citocinina no primeiro dia do tratamento em ambiente escuro (Tabela 2), demonstra o papel desses reguladores sobre a biossíntese e/ou absorção desses compostos do meio de cultura. Por outro lado, a menor degradação de clorofilas

e carotenóides durante a senescência induzida, nos tratamentos com citocininas, resultou em menor acumulação de açúcares nos tecidos foliares, já que esses compostos resultam, em parte, da própria degradação dos pigmentos foliares (Quirino et al., 2000).

A presença de BAP no meio de cultura induziu a menor concentração de proteínas nas folhas de *A. glabra* no primeiro dia de tratamento escuro, não afetando sua degradação nos demais períodos, indicando sua pequena efetividade no controle desse processo. Contrariamente, Kulaeva et al. (2002), avaliando a senescência induzida em *Hordeum vulgare* L. na presença desse regulador, sugeriu a participação ativa desse composto na biossíntese de proteínas nos cloroplastos.

A prevenção da senescência foliar durante o cultivo *in vitro* de *A. glabra*, pela adição de citocinina ao meio de cultura, teve reflexos positivos sobre a retenção da área foliar nas brotações durante as fases de multiplicação e enraizamento, em virtude da menor taxa de abscisão foliar (Tabela 3), sobretudo pela adição de BAP e cinetina. Apesar de o BAP ter sido menos efetivo na preservação de clorofilas e carotenóides durante a senescência em ambiente escuro, esse foi mais eficiente na prevenção da abscisão foliar, o que redundou em maior preservação da área foliar, confirmando sua grande efetividade no cultivo *in vitro* de anonáceas. Além da maior retenção de área foliar durante a fase de enraizamento, BAP e cinetina induziram maior acúmulo de matéria seca nas plantas nesse mesmo período, sendo, em média, 104,2% superior em relação aos valores obtidos com adição de zeatina e sem a adição de citocinina e 50,9% superior em relação ao obtido no tratamento com TDZ. Esses resultados demonstram que o efeito do BAP e da cinetina sobre o desenvolvimento das plantas estende-se além da fase em que foram adicionados ao meio de cultura.

A adição de zeatina, apesar de ter promovido maior prevenção na degradação de clorofilas e carotenóides durante o período de indução da

senescência, não assegurou menor taxa de abscisão foliar e, conseqüentemente, maior área foliar durante as fases de multiplicação e de enraizamento das brotações. A pequena área foliar nessas plantas resultou também da reduzida expansão das folhas, o que demonstra efeito tóxico dessa fonte de citocinina na concentração utilizada. Encina et al. (1994), estudando a morfogênese em explantes de *A. cherimola* Mill., já haviam reportado a formação de brotos atrofiados com a utilização de zeatina.

O efeito da adição de citocininas sobre o retardo da senescência em *A. glabra*, demonstra a importância da utilização desses reguladores na redução da abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de anonáceas, possibilitando maior desenvolvimento das plantas no ambiente *in vitro*, o que poderá possibilitar a obtenção de maior número de plantas aptas ao processo de aclimatização.

7 CONCLUSÕES

A adição de citocininas ao meio de cultura permite uma redução da senescência foliar durante o cultivo *in vitro* de *A. glabra*, possibilitando maior capacidade de desenvolvimento das brotações. As fontes de citocininas BAP e cinetina permitem menor abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* dessa espécie, possibilitando maior acúmulo de matéria seca durante a fase de enraizamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, DC, 1990. 1298 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Arlington, 1995. 1141 p.

- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.
- BOURKE, D. O'D. Annona ssp. In: GARNER, R. J.; CHAUDHRI, S. A. **The propagation of tropical fruit tree**. Maidstone: FAO/CAB, 1985. p. 223-247.
- CARIMI, F.; TERZI, M.; DE MICHELE, R.; ZOTTINI, M.; SCHIAVO, F. L. High levels of the cytokinin BAP induce PDC by accelerating senescence. **Plant Science**, Clare, v. 166, n. 4, p. 963-969, Apr. 2004.
- CHERNYAD'EV, I. I. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 36, n. 6, p. 527-539, 2000.
- DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.
- DOWNS, C. G.; SOMERFIELD, S. D.; DAVERY, M. C. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 93-100, June 1997.
- ENCINA, C. L.; BARCELÓ-MUNHOZ, A.; HERRERO-CASTAÑO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, Nov. 1994.
- ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.3, n.1, p.39-45, jun. 1991.
- FERNANDES FILHO, E. I.; VALLE, F. X. R.; LIBERATO, J. R. **QUANT - A software to quantify plant disease severity**. 2001. Patente: n.00046606.
- FERRANTE, A.; HUNTER, D. A.; HACKETT, W. P.; REID, M. S. Thidiazuron – a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 333-338, July 2002.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 16, n. 3, p. 169-172, 1997.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L.; ROVEMRO, C.; GOREUX, A.. Promotion of *Annona cherimola in vitro* shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. **Society Biology of Chile**, Punta de Tralca, v. 56, n. 5, p. 224-227, 1991.

KULAEVA, O. N.; BURKHANOVA, E. A.; KARAVAIKO, N. N.; SELIVANKINA, S. Y.; PORFIVORA, S. A.; MASLOVA, G. G.; ZEMLYACHENKO, Y. V.; BORNER, T. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v. 159, n. 12, p. 1309-1316, Dec. 2002.

LE, H. T.; HANCOCK, J. F.; TRINH, T. T. The fruit crops of Vietnam: introduced species and their native relatives. **Fruit Varieties Journal**, Massachusetts, v. 52, n. 3, p. 158-168, 1998.

LEMOS, E. E. P. Organogênese e micropropagação em anonáceas. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 3., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 5, p. 721-728, Sept. 1996a.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, May 1996b.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 416, Aug. 1980. Abstract 321.

MARTINEZ-CAYUELA, M.; SANCHEZ DE MEDINA, L.; FAUS, M.J.; GIL, A. Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) polyphenoloxidase: monophenolase and dihydroxyphenolase activities. **Journal Food Science**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 1191-1194, July/Aug. 1988.

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, Jan. 2004.

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona hybrid* (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.). **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 41, n. 2, p. 160-165, June 1984.

NOODEN, L. D.; SINGH, S.; LETHAM, D. S. Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 1, p. 33-39, May 1990.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, Aug. 1995.

QUIRINO, B. F.; NOH, Y. S.; HIMELBLAU, E.; AMASINO, R. M. Molecular aspects of leaf senescence. **Trends of Plant Science**, London, v. 5, n. 7, p. 278-282, July 2000.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I.; LEMOS, E. E. P. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured *in vitro*. **Fruits**, Paris, v. 58, n. 4, p. 357-361, 2003.

SING, S.; LETHAM, D. S.; PALINI, L. M. S. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 86, n. 3, p. 388-397, Nov. 1992.

TIAN, M. S.; DOWNS, C. G.; LILL, R. E.; KING, G. A. A role for ethylene in the yellowing of broccoli. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 2, p. 276-281, Mar. 1994.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 155-165, May 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de cinetina e BAP durante a fase de multiplicação *in vitro* promove aumento na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso em folhas de *A. glabra*.

Zeatina afeta a densidade de estômatos e o índice estomático em folhas de *A. glabra*.

Entre as citocininas testadas, zeatina é a única fonte que induz multibrotações nos explantes dessa espécie.

Todas as fontes de citocininas testadas reduzem a emissão de raízes secundárias nas brotações.

Cinetina e zeatina aumentam o número e o tamanho dos cloroplastos de *A. glabra* durante o cultivo *in vitro*.

Cinetina e BAP estimulam maior diferenciação dos cloroplastos e maior taxa de fotossíntese potencial nas brotações de *A. glabra* promovendo, ainda, maior acúmulo de matéria seca e maior taxa de sobrevivência durante a fase de enraizamento e de aclimatização das plantas.

TDZ na concentração de 1mg L^{-1} induz à desorganização do sistema lamelar dos cloroplastos de *A. glabra*, reduzindo a fotossíntese potencial das brotações.

Todas as fontes de citocininas estimulam maior acúmulo de nitrogênio e boro e menor acúmulo de cálcio nas brotações de *A. glabra*.

Todas as fontes de citocininas testadas retardam a degradação de clorofilas e de carotenóides durante a senescência induzida de *A. glabra*.

Entre as fontes de citocininas testadas, apenas BAP e cinetina reduzem a abscisão foliar em brotações de *A. glabra* mantidas *in vitro*.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	92
Resumo da análise de variância para espessura da epiderme adaxial e abaxial em folhas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 2A	92
Resumo da análise de variância para espessura do parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e limbo foliar em folhas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 3A	93
Resumo da análise de variância para diâmetro equatorial (DE), diâmetro polar (DP) e relação entre diâmetro equatorial e diâmetro polar dos estômatos (DE/DP) de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 4A	93
Resumo da análise de variância para densidade estomática e índice estomático em folhas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 5A	94
Resumo da análise de variância para o nº de feixes vasculares por mm ² de seção transversal de folha, diâmetro médio dos feixes vasculares das folhas, nº de feixes vasculares por seção transversal de caule e diâmetro médio dos feixes do caule de <i>A. glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 6A	94
Resumo da análise de variância para o percentual de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e altura média das brotações de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	

TABELA 7A	Resumo da análise de variância para número de raízes por brotação e comprimento da maior raiz de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	95
TABELA 8A	Resumo da análise de variância para matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência no final da fase de enraizamento das brotações de <i>Annona glabra</i> L. multiplicadas <i>in vitro</i> em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	95
TABELA 9A	Resumo da análise de variância para matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência no final da fase de aclimatização das brotações de <i>Annona glabra</i> L. multiplicadas <i>in vitro</i> em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	96

TABELA 1A Resumo da análise de variância para espessura da epiderme adaxial e abaxial em folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z	
		Espessura da epiderme adaxial	Espessura da epiderme abaxial
Fonte de citocinina	4	8,834 ns	2,200 ns
Resíduo	70	50,969	23,315
CV (%)		23,92	21,80
Média geral		29,85	22,15

ns – Não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 2A Resumo da análise de variância para espessura do parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e limbo foliar em folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Limbo foliar
Fonte de citocinina	4	160,462*	654,294*	1331,049*
Resíduo	70	42,782	134,637	531,003
CV (%)		17,26	17,73	14,86
Média geral		37,90	65,43	155,02

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 3A Resumo da análise de variância para diâmetro equatorial (DE), diâmetro polar (DP) e relação entre diâmetro equatorial e diâmetro polar dos estômatos (DE/DP) de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Diâmetro equatorial	Diâmetro polar	Relação DE/DP
Fonte de citocinina	4	9,545*	3,794 ns	0,0292 ns
Resíduo	95	3,859	10,074	0,0385
CV (%)		8,93	8,09	10,93
Média geral		21,99	39,23	1,79

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ns – Não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 4A Resumo da análise de variância para densidade estomática e índice estomático em folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2005.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z	
		Densidade estomática	Índice estomático
Fonte de citocinina	4	54533,293*	50,095*
Resíduo	95	6239,757	5,887
CV (%)		35,18	14,85
Média geral		224,51	16,34

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 5A Resumo da análise de variância para o nº de feixes vasculares por mm² de seção transversal de folha, diâmetro médio dos feixes vasculares das folhas, nº feixes vasculares por seção transversal de caule e diâmetro médio dos feixes vasculares do caule de *A. glabra* cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z			
		Nº de feixes mm ² de seção transversal da folha	Diâmetro médio dos feixes da folha	Nº de feixes por seção transversal de caule	Diâmetro médio dos feixes do caule
Fonte de citocinina	4	175,195*	794,548*	40,113*	17793,06*
Resíduo	70	61,164	53,990	1,032	206,304
CV (%)		25,63	18,16	15,68	19,12
Média geral		30,48	40,46	6,48	75,12

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 6A Resumo da análise de variância para o percentual de explantes com brotações, nº médio de brotações por explante e altura média das brotações de *A. glabra* cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Percentual de explantes com brotações	Número médio de brotações por explante	Altura média das brotações
Fonte de citocinina	4	2393,858*	4,038*	1,573*
Resíduo	95	162,862	0,106	0,237
CV (%)		17,64	23,13	25,04
Média geral		72,35	1,41	1,94

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 7A Resumo da análise de variância para número de raízes por brotação e comprimento da maior raiz de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z	
		Número de raízes por brotação	Comprimento da maior raiz
Fonte de citocinina	4	8,231*	17,216*
Resíduo	95	0,792	1,898
CV (%)		30,11	32,47
Média geral		2,95	4,24

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 8A Resumo da análise de variância para matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência no final da fase de enraizamento das brotações de *Annona glabra* L. multiplicadas *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Matéria seca	Área foliar	Taxa de sobrevivência
Fonte de citocinina	4	0,0093*	45,125*	0,030*
Resíduo	95	0,0007	3,509	0,004
CV (%)		21,93	22,62	8,59
Média geral		0,122	8,28	0,749

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 9A Resumo da análise de variância para matéria seca, área foliar e taxa de sobrevivência no final da fase de aclimatização das brotações de *Annona glabra* L. multiplicadas *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Matéria seca	Área foliar	Taxa de sobrevivência
Fonte de citocinina	4	0,010*	36,746*	0,0791*
Resíduo	95	0,000	2,541	0,0062
CV (%)		15,43	20,77	10,98
Média geral		0,139	7,67	0,721

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

ANEXO B	Página
TABELA 1B	98
Resumo da análise de variância para concentração de clorofila “a”, clorofila “b”, clorofila total e razão clorofila “a”/clorofila “b” em plantas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 2B	98
Resumo da análise de variância para teor de carotenóides, açúcares solúveis totais (AST), fotossíntese potencial em plantas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 3B	99
Resumo da análise de variância para comprimento dos cloroplastos, largura dos cloroplastos e número de cloroplastos por 1000 μ^2 de corte transversal de folhas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 4B	99
Resumo da análise de variância para matéria seca e área foliar no final das fases de enraizamento e aclimatização de brotações de <i>Annona glabra</i> L., multiplicadas <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 5B	100
Resumo da análise de variância para taxa de sobrevivência no final da fase de aclimatização das plantas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas e sob condições autotróficas e heterotróficas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	
TABELA 6B	100
Resumo análise de variância para teor de minerais nas plantas de <i>Annona glabra</i> L. cultivada <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	

TABELA 1B Resumo da análise de variância para concentração de clorofila “a”, clorofila “b”, clorofila total e razão clorofila “a”/clorofila “b” em plantas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z			
		Clorofila “a”	Clorofila “b”	Clorofila total	Razão a/b
Citocinina	4	148,75*	66,57*	386,08*	0,0390*
Resíduo	15	0,672	0,879	1,258	0,0021
CV (%)		0,61	1,71	0,59	1,88
Média geral		135,43	54,73	190,17	2,47

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 2B Resumo da análise de variância para teor de carotenóides, açúcares solúveis totais (AST), fotossíntese potencial em plantas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Carotenóides	AST	Fotossíntese potencial
Citocinina	4	3,370*	0,0496*	132,103*
Resíduo	15	0,025	0,0022	0,7875
CV (%)		2,09	5,26	7,09
Média geral		7,57	0,906	12,52

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 3B Resumo da análise variância para comprimento dos cloroplastos, largura dos cloroplastos e número de cloroplastos por 1000 μ^2 de corte transversal de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Comprimento dos cloroplastos	Largura dos cloroplastos	Número de cloroplastos por 1000 μ^2
Citocinina	4	3,936*	1,440*	23,674*
Resíduo	95	0,551	0,165	0,614
CV (%)		12,74	19,28	10,22*
Média geral		5,82	2,10	7,67

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 4B Resumo da análise de variância para matéria seca e área foliar no final das fases de enraizamento e aclimatização de *Annona glabra* L., multiplicadas *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z			
		Enraizamento		Aclimatização	
		Matéria seca	Área foliar	Matéria seca	Área foliar
Citocinina (A)	4	0,0107*	68,509*	0,0326*	120,617*
Meio (B)	1	0,0226*	31,824*	0,0013ns	19,656*
A x B	4	0,0013ns	5,308 ns	0,0023*	15,349*
Resíduo	40	0,0005	3,216	0,0005	2,335
CV (%)		23,96	23,96	16,30	18,41
Média geral		0,100	7,48	0,144	8,30

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ns – Não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 5B Resumo da análise de variância para taxa de sobrevivência no final da fase de aclimatização das plantas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas e sob condições autotróficas e heterotróficas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z
		Taxa de sobrevivência
Citocinina (A)	4	0,1205*
Tipo de meio (B)	1	0,0240*
A x B	4	0,0072ns
Resíduo	30	0,0053
CV (%)		10,47
Média geral		69,70

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ns – Não- significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 6B Resumo da análise de variância para teor de minerais nas plantas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Mineral	QM ^z	Fc	Pr>Fc	CV (%)
N	593,769	720,93	0,000*	2,21
P	3,064	6,031	0,179ns	11,03
K	53,160	108,337	0,000*	3,64
Ca	1,460	20,430	0,000*	5,06
Mg	3,101	54,962	0,000*	9,34
S	0,682	4,133	0,0269*	4,96
B	1532,483	69,239	0,000*	5,43
Cu	3,933	1,553	0,258ns	14,81
Fe	5839,020	91,905	0,000*	4,81
Mn	11390,600	134,323	0,000*	3,92
Zn	2489,387	124,469	0,000*	3,89

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ns – Não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ANEXO C		Página
TABELA 1C	Resumo da análise de variância para concentração de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofila total em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro induzido em plantas de <i>Annona glabra</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	102
TABELA 2C	Resumo da análise de variância para concentração de proteínas, açúcares solúveis totais (AST) e carotenóides em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro induzido em plantas de <i>Annona glabra</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> , em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	102
TABELA 3C	Resumo da análise de variância para concentração de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofila total em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro induzido em discos foliares submetidos à imersão em diferentes fontes de citocininas, provenientes de <i>Annona glabra</i> L. mantida em condições <i>ex vitro</i> . UFLA. Lavras, MG, 2006.	103
TABELA 4C	Resumo da análise de variância para concentração de proteínas, AST e carotenóides em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro em discos foliares submetidos à imersão em diferentes fontes de citocininas, provenientes de <i>A. glabra</i> L. mantida em condições <i>ex vitro</i> . UFLA. Lavras, MG, 2006.	103
TABELA 5C	Resumo da análise de variância para área foliar, matéria seca, nº de folhas caídas e percentual de folhas caídas no final da fase de multiplicação de brotações de <i>Annona glabra</i> L. cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	104
TABELA 6C	Resumo da análise de variância para área foliar, matéria seca, número de folhas caídas e percentual de folhas caídas no final da fase de enraizamento de brotações de <i>Annona glabra</i> L. multiplicadas em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.	104

TABELA 1C Resumo da análise de variância para concentração de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofila total em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro induzido em plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Clorofila “a”	Clorofila “b”	Clorofila total
Citocinina (A)	4	1509,35*	258,78*	2844,26*
Tempo (B)	3	2779,64*	1854,24*	9134,07*
A x B	12	68,65*	33,87*	151,38*
Resíduo	60	0,93	1,36	1,95
CV (%)		0,79	2,70	0,85
Média geral		121,47	43,14	164,22

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 2C Resumo da análise de variância para concentração de proteínas, AST e carotenóides em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro induzido em plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Proteína	AST	Carotenóides
Citocinina (A)	4	0,99*	1,15*	8,21*
Tempo (B)	3	21,40*	8,51*	105,37*
A x B	12	0,14*	0,27*	0,41*
Resíduo	60	0,04	0,02	0,01
CV (%)		2,93	2,81	2,52
Média geral		7,25	1,78	4,62

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 3C Resumo da análise de variância para concentração de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofila total em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro induzido em discos foliares submetidos à imersão em diferentes fontes de citocininas, provenientes de *Annona glabra* L. mantida em condições *ex vitro*. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Clorofila “a”	Clorofila “b”	Clorofila total
Citocinina (A)	4	2001,64*	910,40*	5462,73*
Tempo (B)	3	57614,00*	12017,32*	121651,76*
A x B	12	402,64*	213,58*	1029,16*
Resíduo	60	58,23	13,43	78,94
CV (%)		2,28	2,80	1,91
Média geral		335,10	130,83	465,94

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 4C Resumo da análise de variância para concentração de proteínas, AST e carotenóides em relação ao tempo de senescência em ambiente escuro em discos foliares submetidos à imersão em diferentes fontes de citocininas, provenientes de *Annona glabra* L. mantida em condições *ex vitro*. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z		
		Proteína	AST	Carotenóides
Citocinina (A)	4	2,23*	22,02*	95,00*
Tempo (B)	3	59,98*	208,14*	648,61*
A x B	12	1,46*	4,30*	21,11*
Resíduo	60	0,09	0,14	0,90
CV (%)		2,77	5,69	4,93
Média geral		11,06	6,68	19,31

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 5C Resumo da análise de variância para área foliar, matéria seca, número de folhas caídas e percentual de folhas caídas no final da fase de multiplicação de brotações de *Annona glabra* L. cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z			
		Área foliar	Matéria seca	Nº de folhas caídas	% de folhas caídas
Citocinina	4	9,86*	0,00092*	3,76*	82,40*
Resíduo	20	2,06	0,00004	1,02	16,92
CV (%)		33,82	22,82	60,12	47,29
Média geral		4,24	0,029	1,68	8,70

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados

TABELA 6C Resumo da análise de variância para área foliar, matéria seca, número de folhas caídas e percentual folhas caídas no final da fase de enraizamento de brotações de *Annona glabra* L. multiplicadas em meio WPM suplementado com diferentes fontes de citocininas. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios ^z			
		Área foliar	Matéria seca	Nº de folhas caídas	% de folhas caídas
Citocinina	4	45,12*	0,0093*	6,74*	178,78*
Resíduo	20	3,50	0,0007	0,82	23,16
CV (%)		22,62	21,93	49,21	46,16
Média geral		8,28	0,1 22	1,84	10,42

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

^z – Dados não transformados