



MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS

**CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-
EMBRIOGÊNICAS DE IPÊ-BRANCO**

**LAVRAS - MG
2010**

MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS

**CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE IPÊ-
BRANCO**

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

Orientadora
Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

LAVRAS – MG

2010

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

Reis, Michele Valquíria dos.

Caracterização de massas pró-embriogênicas de ipê-branco /
Michele Valquíria dos Reis. – Lavras: UFLA, 2010.
50 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.
Orientador: Patricia Duarte de Oliveira Paiva.
Bibliografia.

1. Embriogênese somática. 2. Viabilidade celular. 3. Análise
citoquímica. 4. Análise ultraestrutural. 5. Curva de crescimento de
calos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.5404165

MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS

**CARACTERIZAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE IPÊ-
BRANCO**

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

APROVADA em 31 de agosto 2010.

Dra. Fernanda Pereira Soares MA

Dr. Amauri Alves de Alvarenga UFLA

Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva
Orientadora

LAVRAS – MG

2010

A Deus, meus pais “Maria e Genício” e “Darcilene e Rezende” pelo amor
incondicional, apoio e exemplo de vida

OFEREÇO

Aos meus irmãos, Flávio, Fabiana, Danúbia, Letícia e Danilo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e familiares, por toda a paciência e amor em todos os momentos.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Dr. Patrícia Paiva, pela paciência, dedicação e apoio em todos os momentos.

Aos membros da banca, Dr. Fernanda Soares e Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pelas contribuições.

Aos servidores técnico-administrativos do Setor de Fisiologia Vegetal, pelo auxílio prestado.

Aos amigos do Laboratório de cultura de tecidos, Mary, Daí (Artur), Milene, Diogo, Pado, Tininha, Camila, Vanessa, pela amizade, companheirismo, apoio e tantos momentos inesquecíveis.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal, mestrado e doutorado, pela amizade.

Ao amigo Rogério pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos Leandro, Carlinha, Fabi, Amanda e Kamila, por terem sempre uma palavra amiga e um sorriso.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para essa conquista.

RESUMO

O ipê-branco é uma espécie que apresenta dificuldades de propagação devido à baixa taxa de germinação e curto período de viabilidade de suas sementes. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização de massas pró-embriogênicas de calos de ipê-branco. Para indução de calos, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de ANA, onde folhas cotiledonares foram inoculadas em meio MS contendo, 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ de ANA e após 30 dias avaliou-se a presença de calos. Após 90 dias no meio de indução, os calos foram classificados de acordo com sua coloração (branco, branco-amarronzado e marrom) e determinada a massa fresca e viabilidade celular em cada tratamento. Avaliou-se também a massa fresca e viabilidade celular pelo teste do CTT durante 3 subcultivos, aos 30, 50 e 70 dias após a inoculação no meio de indução. Para confirmação da presença de massas pró-embriogênicas, realizou-se análise ultraestrutural através da MEV e análise citoquímica através do Carmim acético/ azul de Evans, nos calos obtidos. A curva de crescimento de calos foi obtida da avaliação da massa fresca e seca dos calos e acompanhamento da viabilidade celular pelo teste do CTT, durante 36 dias. Aos 30 dias após a indução foi verificada a presença de calos em todos meios onde houve a adição de ANA, sendo responsivo ao aumento na concentração da intensidade de indução de calos. Maior porcentagem de calos com coloração branca foi verificada nas menores concentrações de ANA testada, o inverso aconteceu para calos com coloração marrom, onde ocorreu maior porcentagem em meio acrescido de 8 mg L⁻¹ de ANA. A maior massa fresca foi verificada em calos obtidos em meio de indução acrescido de 6 mg L⁻¹ de ANA, durante os três subcultivos. A viabilidade celular durante os subcultivos, apresentou maiores valores de absorvância no 1° e 3° para calos obtidos com tratamento 6 mg l⁻¹ de ANA. Através da análise ultraestrutural e citoquímica foram possíveis confirmar o potencial embriogênicos dos calos ipê-branco, sendo obtido maior proporção de células isodiamétricas com adição de 6mg.l⁻¹ e coloração vermelho intensa. A curva de crescimento de calos de ipê-branco apresentou comportamento sigmóide, com distinção das 5 fases de crescimento, fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionaria

Palavras-chave: *Tabebuia roseo alba*. Viabilidade celular. Análise ultraestrutural. Análise citoquímica. Curva de crescimento de calos.

ABSTRACT

The ipe-white is a species that is not easily spread due to the low germination rate and short viability of its seeds. Aim of this work was the characterization of mass pro-embryogenic callus-ipe white. For callus induction, we evaluated the effect of different concentrations of NAA, where cotyledons were inoculated on MS medium containing 0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg.L⁻¹ NAA. After 30 days, we evaluated the presence of calluses. After 90 days on induction medium, calli were classified according to their color (white, white-brown and brown) and determined the fresh weight and cell viability in each treatment. We also evaluated the fresh weight and cell viability test by CTT for 3 subcultures at 30, 50 and 70 days after inoculation in the induction medium. To confirm the presence of pro-embryogenic masses, ultrastructural analysis was performed by SEM analysis and cytochemistry by Carmine acetate / Evans blue in the callus. The growth of callus was obtained from the evaluation of fresh and dry weight of callus and cell viability by monitoring the CTT test for 36 days. At 30 days after induction was verified the presence of callus in all media was the addition of NAA, being responsive to the increase in the intensity of induction. Highest percentage of callus with white coloration was observed at lower concentrations of NAA tested, the reverse happened to have brown callus, where higher percentage in medium supplemented with 8 mg L⁻¹ NAA. The greatest weight was observed in callus on induction medium supplemented with 6 mg L⁻¹ NAA, during the three subcultures. The cell viability during subculture, with higher absorbance values in 1 ° and 3 ° for callus treatment with 6 mg l⁻¹ NAA. Through analysis and ultrastructural cytochemistry were possible to confirm the potential of embryogenic callus ipe-white, and obtained a higher proportion of isodiametric cells with added 6mg.l⁻¹ and intense red coloration. The growth of callus-ipe white showed a sigmoid, with the distinction of five phases, lag phase, exponential, linear deceleration and stationary.

Keywords: *Tabebuia roseo alba*. Viability. Ultrastructural. Cytochemical analysis. Growth curve of callus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Características gerais da espécie.....	11
2.2	Propagação.....	12
2.3	Propagação <i>in vitro</i>	14
2.4	Embriogênese somática.....	14
2.5	Curva de crescimento de calos.....	16
2.6	Microscopia eletrônica de varredura.....	17
2.7	Análises citoquímica.....	17
2.8	Viabilidade celular.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Indução de calogênese.....	20
3.2	Caracterização de massas pró-embriogênicas.....	21
3.2.1	Coloração de calos.....	21
3.2.2	Massa fresca e viabilidade celular de massas pró-embriogênicas de ipê-branco.....	23
3.2.3	Análise ultraestrutural.....	23
3.2.4	Análise citoquímica com carmin acético e azul de Evans.....	24
3.2.5	Determinação da curva de crescimento de calos.....	25
4	RESULTADOS.....	26
4.1	Indução de calos.....	26
4.2	Caracterização de massas pró-embriogênicas.....	28
4.2.1	Coloração de calos.....	28
4.2.2	Massa fresca e viabilidade celular de massas pró-embriogênicas de ipê-branco.....	31
4.2.3	Análise ultraestrutural.....	34
4.2.4	Análise citoquímica.....	36
4.2.5	Determinação da curva de crescimento.....	38
5	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

Excluído: 35

Excluído: 37

1 INTRODUÇÃO

O ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba*) é uma espécie utilizada para diversos fins, como a ornamentação e arborização de ruas e avenidas, devido ao seu exuberante florescimento e porte, assim como para recomposição florestal em terrenos secos e pedregosos.

As espécies do gênero *Tabebuia*, apesar de sua importância, têm sido afetadas pelo alto grau de desmatamento e consequente destruição de áreas florestais, seja pela expansão das fronteiras agrícolas, construção de rodovias ou exploração indevida, o que têm levado à diminuição das populações dessas espécies (OLIVEIRA, 2005). Ainda, algumas espécies desse gênero apresentam dificuldade de propagação com baixa taxa de germinação e curto período de viabilidade das sementes.

Nesse contexto, a cultura de tecidos de plantas vem permitindo acelerar a produção de mudas de plantas com dificuldade de propagação, em relação aos métodos convencionais de propagação vegetativa. A possibilidade de obtenção de mudas em laboratório, em condições controladas e reprodutíveis, independentemente da sazonalidade dos ciclos agrícolas, torna a micropropagação a melhor alternativa para a obtenção de material vegetal de qualidade, com fixação de ganhos genéticos e fitossanidade garantida.

Utilizando-se dessa técnica, alguns trabalhos já foram realizados para o ipê-branco. Abbade et al. (2010) induziram a formação de calos a partir de segmentos foliares de ipê-branco utilizando diferentes reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura, indicando a possibilidade de propagação dessa espécie a partir da organogênese indireta. Já Porto (2009) avaliou o potencial embriogênico e organogênico de diferentes fontes de explantes de ipê-branco.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo, a caracterização de massas pró-embriogênicas de ipê-branco, com intuito de fornecer subsídios para a obtenção de embriões somáticos da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais da espécie

Os ipês (*Tabebuia spp*) pertencem à família Bignoniaceae e destacam-se pela sua beleza, sendo muito utilizados no paisagismo (arborização de parques e ruas) e no reflorestamento. Em adição, têm se identificado também algumas propriedades medicinais além do uso de sua madeira na construção civil (LORENZI, 2002).

A família Bignoniaceae apresenta cerca de 800 espécies, reunidas em 120 gêneros (JOLY, 1998). Sua distribuição é pantropical, com maior número de espécies nos Neotrópicos e menor número na zona temperada. Segundo Gentry (1992), o centro de diversidade da família está no Brasil, onde ocorrem 56 gêneros e cerca de 340 espécies, incluindo muitos táxons endêmicos. As espécies de Bignoniaceae são encontradas em diferentes tipos de ambientes, desde os cerrados abertos até as florestas úmidas e perenifólias.

O nome vulgar de várias espécies do gênero *Tabebuia* refere-se à coloração de suas flores, que podem ser brancas, amarelas, róseas ou roxas (FERRETTI et al., 1995). *Tabebuia roseo alba* (Ridl) Sandwith, popularmente conhecido como ipê-branco, dentre as espécies cultivadas, é a única que apresenta flores de coloração branca (MAEDA; MATTHES, 1984).

Ipê-branco, pau-d'arco ou ipê-do-cerrado é uma árvore com altura entre 7 a 16 metros, tronco de 40 a 60 cm de diâmetro; com ocorrência no norte do estado de São Paulo, em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás (SANTOS; SUGAHARA; TAKAKI, 2005). Apresenta madeira de densidade moderadamente pesada, macia, com superfície lustrosa, de ótima durabilidade em ambientes internos (LORENZI, 2002).

A árvore é extremamente ornamental, não somente pelo exuberante florescimento, mas também pela folhagem densa de cor verde-azulada, formando copa piramidal. É utilizada na arborização de ruas e avenidas, em função do porte mediano. Pela sua adaptação a terrenos secos e pedregosos é recomendada para reflorestamentos nesse tipo de ambiente, sendo utilizado para recomposição da vegetação arbórea (LORENZI, 2002).

2.2 Propagação

A propagação convencional do ipê-branco é feita essencialmente por meio de sementes, cuja germinação, segundo Gurgel Filho e Pásztor (1963), ocorre rapidamente, no período de 10 dias, em condições de campo. De acordo com Kageyama e Marques (1981), espécies do gênero *Tabebuia* são pioneiras e apresentam mecanismos adaptáveis que favorecem a dispersão das sementes e o seu rápido estabelecimento.

As sementes apresentam comprimento médio de $2,63 \pm 0,32$ cm, área total de $1,95 \pm 0,34$ cm², área do embrião de $0,42 \pm 0,07$ cm² e a biomassa de $15,76 \pm 3,32$ mg (DUARTE et al., 2010). No entanto, por possuírem pequena quantidade de reserva e elevado teor de óleo em sua composição química, apresentam um curto período de viabilidade (DEGAN et al., 2001).

Quando armazenadas, as sementes também perdem a viabilidade rapidamente, mantendo-se, apenas, por cerca de quatro meses (CABRAL; BARBOSA; SIMABUKURO, 2003; LORENZI, 2000). Martins, Lago e Andrade (2009) indicam que o armazenamento das sementes com teor de água de 10,1 ou 8,3 % e temperatura de 10 ou -20°C favorecem sua conservação.

Segundo Began et al. (2001), as sementes de ipê-branco apresentam durante o armazenamento comportamento que as classifica como ortodoxas, conforme ocorre com outras espécies de Bignoniaceae (CARVALHO; SILVA;

DAVIDE, 2006; MELLO; EIRA, 1995). Alterações no vigor de sementes dessas espécies são inicialmente identificadas pela redução da velocidade de germinação (BORBAFILHO; PEREZ, 2009).

De acordo com Berjalo (1995), outro problema verificado na germinação *ex vitro* de sementes do gênero *Tabebuia* é a presença de micro-organismos que, muitas vezes, somente se manifestam quando as sementes são colocadas para germinar.

A temperatura ideal para germinação de várias espécies do gênero *Tabebuia* é de 30°C em substrato papel, sendo que temperaturas constantes e inferiores a 20°C reduzem ou inibem a germinação de sementes de ipê-branco (STOCKMAN et al., 2007).

O ipê-branco, apesar de apresentar floração abundante produz, poucas sementes e muitas não viáveis. Mello e Eira (1995) obtiveram germinação máxima para sementes de ipê-branco variando de 50 a 60% em teste realizado em casa de vegetação. Confirmando, Abadde (2008) obteve 50% de germinação. Esses resultados estão de acordo com o relato de que as sementes de ipê-branco têm baixa porcentagem de germinação, mas, em geral, superior a 40% (LORENZI, 2002).

Ao contrário do que relata a literatura, Stockman et al. (2007) obtiveram germinação de 94% para sementes de ipê-branco, quando dispostas sobre duas folhas de papel, porém, após 30 dias de armazenamento essa taxa foi reduzida para 90%. Abadde (2008) obteve porcentagem de 50% de germinação de sementes em substratos constituídos por terra + areia ou apenas Plantmax®, utilizando sementes armazenadas por 1 ano.

2.3 Propagação *in vitro*

Com o intuito de ampliar essa taxa de germinação de sementes de ipê-branco, Abadde (2008) usou técnicas de cultura de tecidos para a germinação *in vitro*, utilizando o meio MS adicionado de 3 mg L⁻¹ de GA₃, ou acrescido de 1,52 mg L⁻¹ de GA₃ no meio MS com 50% de concentração de sais, obtendo 88 e 80% de germinação, respectivamente.

No cultivo *in vitro*, as células das plantas requerem o fornecimento exógeno de reguladores de crescimento para iniciar e continuar o processo de divisão celular, principalmente de auxinas e citocininas (LOYOLA-VARGAS; VÁQUEZ-FLORA, 2006).

Para as espécies lenhosas, a micropropagação apresenta algumas limitações, como a grande variabilidade genética existente em plantas nativas, a maior dificuldade de crescimento e a diferenciação dos seus tecidos *in vitro* (COELHO, 1999). Para superar esses obstáculos é importante o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências de cada espécie (DEC CETI, 2000).

2.4 Embriogênese somática

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, destaca-se a embriogênese somática, que é o processo pelo qual células somáticas diferenciam-se em embriões. Este processo se assemelha morfológicamente ao que ocorre com os embriões zigóticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). As células vegetais apresentam grande capacidade de diferenciarem-se ou desdiferenciarem-se durante o desenvolvimento, de modo especial as células somáticas (KERBAUY, 1999).

Outros termos também podem ser empregados além de embriogênese somática, como adventícia ou assexual, para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embrionários, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão dos gametas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Dois padrões de embriogênese somática podem ocorrer *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calos. O segundo corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões se formam a partir de calos, que apresentam diferentes estágios de diferenciação (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A embriogênese somática é um exemplo da plasticidade de desenvolvimento de plantas e o processo se inicia com a transição de células somáticas para o estado embriogênico, podendo ser induzida por certas condições *in vitro*, onde a presença de células competentes e estímulo pelas auxinas são pré-requisitos (GAJ, 2004).

As auxinas, principalmente o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), estão diretamente envolvidos na indução e na iniciação de embriões somáticos, formando as massas pró-embriogênicas (MPE). Essas MPE apresentam células pequenas, com citoplasma denso, semelhante às células meristemáticas (FÉHER et al., 2003; FILONOVA et al., 2000).

Para a regeneração de plantas via embriogênese somática é necessário estudos de fontes de explantes e reguladores de crescimento, bem como, a concentração desse.

A propagação via embriogênese somática de algumas espécies lenhosas vem sendo reportada com sucesso, tanto por via direta, como indireta, por exemplo, em *Araucária angustifolia* (STERINER et al., 2005), *Cassia angustifolia* (AGRAWAL; SARDAL, 2007), *Coffeae arabica* (TEIXEIRA et al.,

2004), *Jatropha curcas* (SANTOS, 2010) e *Pinus brutia* (YILDRIM; KAYA; ISIK, 2006).

2.5 Curva de crescimento de calos

Calos podem ser formados a partir de qualquer parte da planta. Durante a calogênese é importante estabelecer a curva de crescimento de calos, a partir da qual é possível determinar o momento exato da repicagem dos calos para um meio fresco ou a possibilidade de sua utilização em suspensões celulares.

O crescimento *in vitro* de calos geralmente apresenta um padrão sigmoidal, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária, segundo George, Hall e Klerk(2008).

A fase lag se caracteriza como a de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para o início da divisão celular, visando sua expansão. Também ocorre o início da mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e compostos específicos, resultando em um pequeno crescimento de calos. A fase exponencial é biossintética, ocorrendo maior crescimento dos calos, devido à alta taxa de divisão celular e ao aumento do número de células. A fase linear caracteriza-se por redução no processo de divisão e aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, pois ocorre a redução de nutrientes, produção de toxinas e secagem do ágar, devido à redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (SMITH, 1992).

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de caracterização microestrutural bem versátil, que se encontra aplicada nas mais diversas áreas do conhecimento.

A interação de um fino feixe de elétrons focalizado sobre área ou microvolume a ser analisado gera uma série de sinais que podem ser utilizados para caracterizar propriedades da amostra, tais como composição, superfície topográfica, cristalografia, etc.

A imagem é formada pelos secundários emitidas da superfície do espécime irradiada pelo feixe de elétrons primários ou pelos elétrons retroespalhados (que geram imagens de pior qualidade, mas podem indicar diferenças na composição elementar da amostra) segundo Alves (2009).

2.7 Análises citoquímica

Os corantes carminacético e azul de Evans possibilitam a identificação de células com potencial embriogênico em culturas de calos (STEINER et al., 2005). Células embriogênicas apresentam-se com citoplasma denso, isodiamétricas e reativas ao corante carmin acético, resultando em coloração avermelhada. A reação positiva ao carmin acético está associada à competência das células para o desenvolvimento embriogênico (STEINER et al., 2005) e integridade cromossômica (MUNHOZ et al., 2008).

Células alongadas são normalmente vacuoladas. A vacuolização é o primeiro sinal da morte celular, a qual vem acompanhada de ruptura das membranas (FILONOVA et al., 2000). O azul de Evans é um corante que penetra através da ruptura da membrana, colorindo de azul o interior dessas células (BHARGAVA et al., 2007).

Silveira et al. (2006) e Steiner et al. (2005) utilizaram do teste da dupla coloração em embriogênese somática de *Araucaria angustifolia* para análise de histodiferenciação e cultura de suspensões celular.

2.8 Viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular é importante para fornecer informações sobre as condições do material em cultivo. O uso de corantes específicos vem fornecendo importante subsídio para essa determinação.

O cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (CTT), dentre os corantes utilizados, tem uma posição de destaque, tendo sido inicialmente utilizado em ensaios de viabilidade de sementes (MIKULA; NIEDZIELSKI; RYBCZNSKI, 2006) e para detectar danos causados pelo congelamento em plantas (STEPONKUS; LANPHEAR, 1967). Em cultura de tecidos, o uso do CTT foi descrito pela primeira vez por Stein e Gerade (1950) e Twuille Mazur (1975).

O CTT é um composto bastante conhecido pelo alto potencial redox, podendo ser inserido na cadeia respiratória mitocondrial e ser reduzido a um composto de coloração intensa, o trifenilformazan (TFF) ou simplesmente formazan. A atividade de uma desidrogenase mitocondrial reduz o não colorido CTT ao trifenilformazan de coloração vermelha (STEPONKUS, 1971; STEPONKUS; LANPHEAR, 1967; TWUILL; MAZUR, 1975) e insolúvel em água (DUNCAN; WIDHOLM, 2004; SILVA; YUFFÁ, 2006).

O CTT entra na cadeia respiratória no lugar do oxigênio funcionando como acceptor final de elétrons entre o citocromo a_1 até o a_3 , no complexo citocromo oxidase (AMUTHA et al., 2007; KALINA; PALMER, 1968), e assim demonstrando a integridade funcional e estrutural do aparato respiratório (TWOILL; MAZUR, 1975).

Através do teste de CTT é possível determinar o nível respiratório das amostras testadas, com base na atividade enzimática de células vivas (WHITERS, 1985). A quantidade do produto final (formazan), que é extraído em etanol, pode ser determinada espectrofotometricamente (ZAPATA et al., 1991), sendo essa quantidade de formazan produzido por células vivas relacionada com o grau de viabilidade dos tecidos amostrados (NAM et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Lavras - MG, utilizando-se sementes de ipê-branco cedidas pela Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), Lavras - MG.

Sementes de ipê-branco foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, por meio da imersão em álcool 70% (v/v) por 20 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos. As sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada, entre cada etapa.

Posteriormente, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE;SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (3,0%) e ágar (0,6%), acrescido de 0,5 mg L de GA₃, segundo recomendação de Abbade et al. (2009). O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a uma temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em salas de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 43 μmol m² e temperatura de 25 ± 2°C.

3.1 Indução de calogênese

Depois das sementes germinadas (20 dias após inoculação) realizou-se a excisão dos explantes. As folhas cotiledonares com área média de 0,25cm² conforme Porto (2009) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (3,0 %) e ágar (0,6%) e acrescidas do regulador de crescimento ácido

naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ constituindo os tratamentos.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a uma temperatura de 121°C e pressão de 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento, onde foram mantidos na ausência de luz e em temperaturas de 25 ± 2°C durante 30 dias. A variável analisada foi a presença ou a ausência de calos nos explantes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas por 5 avaliadores, sendo avaliados 15 tubos por cada tratamento, retirados aleatoriamente. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

3.2 Caracterização de massas pró-embriogênicas

Folhas cotiledonares de ipê-branco germinadas *in vitro* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (3,0 %) e ágar (0,6%) e acrescidas de ácido naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 2,0, 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ constituíram os tratamentos. Não foi testada a ausência de ANA no meio de cultivo, pois esse não induz a formação de calos.

O material foi mantido em sala de crescimento na ausência de luz e em temperaturas de 25 ± 2°C.

3.2.1 Coloração de calos

Foram realizados subcultivos a cada 30 dias, em um período de 90 dias. Após esse período, foi realizada a classificação dos calos em relação a sua

coloração, considerando como branco, branco-amarronzado e marrom. Essa classificação foi realizada por 4 avaliadores.

A partir dessa classificação, realizaram-se as avaliações de massa fresca e a viabilidade celular desse material através do teste do Tetrazólio. A massa fresca foi obtida através da pesagem de 6 calos de cada cor determinada, para os diferentes tratamentos.

Para determinação da viabilidade celular, pelo Teste do Tetrazólio amostras contendo 500 mg de calos, foram subdivididas em cinco amostras de 100 mg cada, em tubos de ensaio, homogeneizada em três mililitros de reagentes de CTT 0,6% (p/v) preparados em solução-tampão fosfato e encubados por 24 horas no escuro. Após esse período, foi adicionado 7 mL de etanol 95% (v/v) no tubo. O composto Formazan foi extraído mediante incubação dos tubos em água fervente durante 4 minutos. Após a extração, o material foi centrifugado por duas vezes a 600 rpm durante 20 minutos, sendo o sobrenadante reservado para as leituras de absorbância.

A curva padrão, absorbância/peso fresco de calos foi obtida com cinco leituras de absorbância para cada ponto da curva, sendo a viabilidade celular expressa como absorbância/g de peso fresco de acordo com Benson (1994). Para cada subcultivo foram realizadas 5 leituras de absorbância por dia de amostragem. O espectrofotômetro utilizado foi o Beckman DU[®] a 490 nm de comprimento de onda.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. A determinação da porcentagem dos calos com as diferentes colorações foi realizada por 4 avaliadores e retirados 30 tubos aleatoriamente de cada tratamento, por cada avaliador. Para avaliação da massa fresca, foram retirados 6 tubos aleatoriamente. Para análise do CTT, foram utilizados 5 repetições para cada tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

3.2.2 Massa fresca e viabilidade celular de massas pró-embriogênicas de ipê-branco

Para a determinação do efeito dos subcultivos e purificação dos calos foram realizados 3 subcultivos, aos 30, 50 e 70 dias após a inoculação dos explantes. Em cada subcultivo, os calos foram transferidos para meio fresco com igual concentração de sais e reguladores de crescimento utilizados no meio de indução. A cada subcultivo foram retirados 15 tubos para determinação da massa fresca e 4 tubos para o viabilidade celular pelo teste do Tetrazólio.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

3.2.3 Análise ultraestrutural

Objetivando-se observar se as células possuíam características embriogênicas, foi realizada análise ultra-estrutural dos calos dos quatro tratamentos (2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ de ANA adicionada ao meio de indução de calo). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia e análise Ultra-estrutural da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras - MG.

Aos 70 dias foram coletadas as amostras constituídas de calos dos quatro tratamentos, as quais foram imersas em solução fixadora Karnovsky (pH 7,2) por um período de 24 horas.

Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,056 M três vezes por um período de 10 minutos cada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 4 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas por 3 vezes em água destilada e, em seguida,

realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), por 10 minutos e três vezes com 100%, por 10 minutos cada.

Após a desidratação para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico CDP 030, por meio de CO₂ líquido e, então, montadas em stubs para metalização com ouro. Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20 kV.

3.2.4 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans

Para a realização do teste de dupla coloração com carmim acético e azul de Evans visando a confirmação da existência de células pró-embriogênicas, utilizaram-se calos após 70 dias de cultivo no meio de indução de calos. Coletaram-se as amostras constituídas de 500 mg de calos que foram homogeneizadas em 5 mL de solução de manitol 0,6 M de CaCl₂ 0,03M pH 5,8 por 30 minutos à 70 rpm em temperatura ambiente na ausência de luz.

Após 30 minutos, as amostras foram filtradas em peneiras de 100 µm para retirada dos agregados maiores. Coletou-se 1 mL dessa suspensão e adicionou 200 µl de CA(2%), deixando agir por 1 minuto e, em seguida, lavou-se o material com água destilada, para retirar o excesso do corante. Em seguida, adicionou-se ao material 100 µl de AE (0,1%) por 30 segundos, repetindo o processo de lavagem do material com água destilada para retirada do excesso de corante, conforme metodologia adaptada de Valente (2007).

Em eppendorf, foram adicionados 200 µL de água glicerina 50%. Em cada lâmina foram adicionados 20 µL dessa suspensão corada. A visualização foi realizada em microscópio de luz em um aumento de 10 vezes, modelo Bell Photomic®.

3.2.5 Determinação da curva de crescimento de calos

Foram realizados três subcultivos dos calos, aos 30, 50 e 70 dias após a inoculação dos explantes. Após o terceiro subcultivo teve início a determinação da curva de crescimento, onde 10 tubos foram retirados aleatoriamente em intervalos de três dias, durante 36 dias de cultivo. Desses 10 tubos, 8 foram utilizados para determinação da massa fresca e massa seca (determinada através da secagem em estufa de circulação fechada de ar à 45° C até peso constante).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 8 repetições para cada coleta. Os resultados foram submetidos à análise de regressão no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Indução de calos

O meio em que não houve adição de ANA, não houve a indução de calos, verificando a necessidade de adição de regulador de crescimento ao meio para a indução de calos (Gráfico 1).

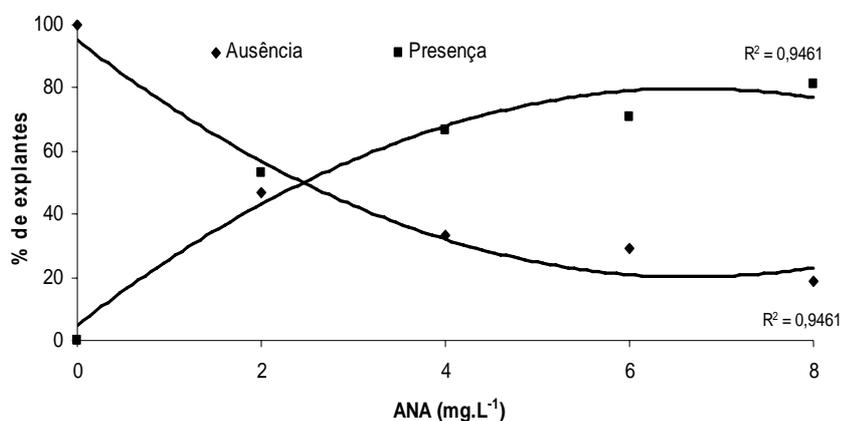


Gráfico 1 Indução de calos (%) em folhas cotiledonares de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de ANA

Em todos os tratamentos onde foi adicionado ANA ao meio de cultura, verificou-se alta porcentagem de formação de calos brancos e de aspecto friável nos explantes aos 30 dias de cultivo. Neste estudo confirmou-se o rápido efeito do ANA para indução de calos, não sendo necessária combinação com outro regulador de crescimento conforme comumente utilizado por outros autores.

As respostas dos explantes no meio de indução são influenciadas pelo balanço entre auxina e citocinina endógenos (GEORGE; HALL; KLERK,

2008). Em ipê-branco, o fornecimento da auxina foi suficiente para promover uma relação favorável com a citocinina endógena e assim promover a indução de calos.

Martin et al. (2007) obtiveram em *Ophiorrhiza prostrata* D. Don (Rubiaceae) formação de raízes em explantes quando o meio de cultura foi acrescido de ANA mas, com a utilização de apenas 2,4-D ou em combinação com N6-benziladenina (BA) ou cinetina (KIN), houve formação de calos embriogênicos.

Os resultados seguiram uma tendência linear para a formação de calos, indicando que o aumento nas concentrações do regulador de crescimento ANA promoveu também um aumento na porcentagem de explantes com presença de calos. Os resultados deste trabalho estão semelhantes ao de Nogueira et al. (2007), que observaram comportamento semelhante, em murici-pequeno utilizando como fonte de auxina 2,4-D.

Explantes cultivados em meios sob a influência da menor concentração (2 mg.L^{-1} de ANA) foram os que apresentaram maior porcentagem de explantes sem a formação de calos, sendo que 43% dos explantes não induziram calos na referida concentração (Gráfico1).

Flores, Nicoloso e Vasconcellos (2006) obtiveram em *Pfaffia tuberosa* maior intensidade de formação de calos com aumento na concentração de ANA acrescido ao meio de cultivo, nos diferentes explantes testados (segmentos nodais, entrenós e raízes).

4.2 Caracterização de massas pró-embriogênicas

4.2.1 Coloração de calos

Após 90 dias de cultivo dos explantes de ipê-branco no meio de indução, passando por 3 subcultivos de 30 dias cada, foi possível verificar diferentes colorações dos calos, conforme visualiza na Figura 1.

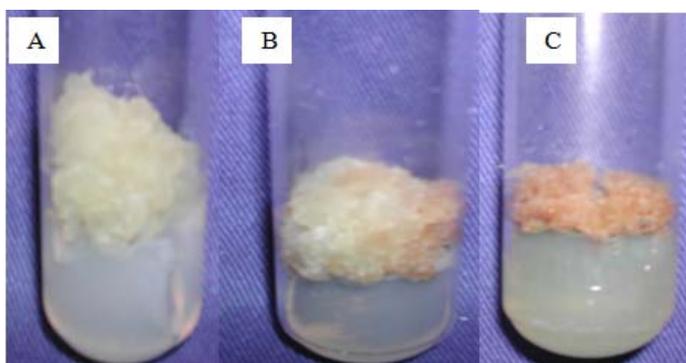


Figura 1 Diferentes colorações de calos de ipê-branco aos 90 dias de cultivo. A - Branco, B - branco-amarronzado e C - Marrom

Observou-se a formação de calos de coloração branca, branco-amarronzado e marrom. À medida que se aumentaram as concentrações de ANA houve uma redução na porcentagem de calos com a coloração branca (Gráfico 2). A adição de ANA promoveu um aumento da porcentagem de calos de coloração marrom, sendo essa porcentagem máxima verificada na concentração 6mg L^{-1} . Redução nessa porcentagem de calos marrons foi verificada em concentrações maiores que está com aumento na porcentagem de calos de coloração branco-amarronzado.

Calos de *Passiflora giberte* com coloração clara e aspecto granular apresentaram maior potencial morfogênético (FIGUEIREDO, 2007). Rodrigues et al. (2009) indicam que parâmetros como coloração e textura de calos têm sido utilizados como indicativos de capacidade regenerativa.

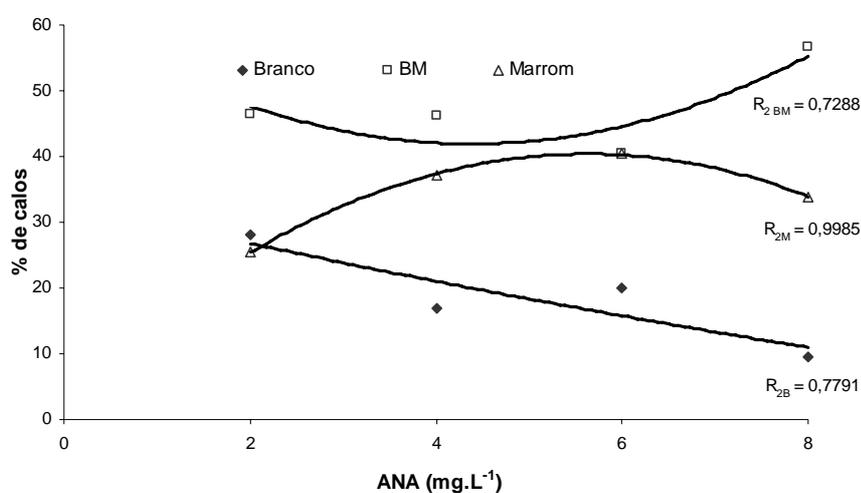


Gráfico 2 Porcentagem de calos de coloração branco, branco-amarronzado (BM) e marrom formados em explantes de folhas cotiledonares de ipê-branco em diferentes concentrações de ANA

Carvalho et al. (2007), trabalhando com duas espécies de maracujazeiro nativo (*Passiflora spp.*), obtiveram calos com coloração amarelo-esverdeada e textura friável. Não houve relação entre a massa fresca e a coloração dos calos de ipê-branco nos diferentes tratamentos testados.

O teste de viabilidade celular demonstrou que, calos com a coloração branca apresentaram maiores valores de absorvância no tratamento com 4 mg.L⁻¹ de ANA (Gráfico 3). Em calos com coloração marrom, os maiores valores de absorvância foram encontrados em tratamentos acrescidos de 8 mg.L⁻¹ de ANA.

Silva et al. (2009) utilizaram do teste CTT, para caracterização de massas pró-embriogênicas de calos de murici-pequeno, relatando a absorvância de 0,58897. Em calos de banana cv. Prata anã, Lima (2009) utilizou-se do teste do CTT e obteve valores de absorvância de 0,9376.

Duncan e Widholm (2004) utilizaram o CTT para verificar o efeito do ABA e de outros sobre os condicionadores osmóticos em calos de milho. Esses autores indicam que é necessária cautela para interpretar valores de viabilidade de células ou tecidos que foram incubados em diferentes condições ambientais. Não podendo assim comparar valores de absorvância para calos de diferentes espécies, mas sim o comportamento desses.

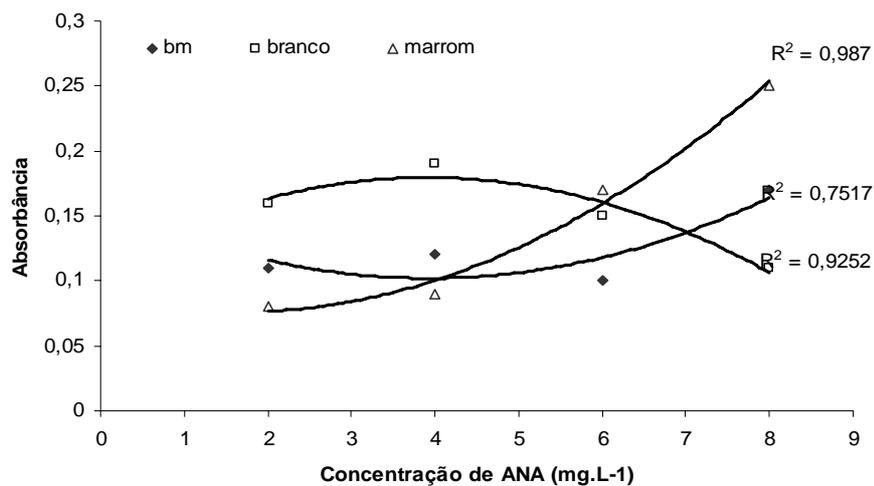


Gráfico 3 Viabilidade celular para os calos branco, branco amarronzado e marrom nas diferentes concentrações de ANA

Calos com coloração branca apresentaram menores valores de absorvância na maior concentração de ANA (8 mg.L⁻¹). À medida que se aumentaram as concentrações de ANA, houve uma redução da absorvância dos calos de coloração branca, enquanto que para os calos de coloração marrom e branco

amarronzado, houve um aumento na absorvância, sendo que os calos de coloração marrom apresentaram maiores valores de absorvância. O pico de absorvância para os calos de coloração marrom pode ser devido ao início de morte celular, conseqüentemente, aumento da taxa respiratória.

Pelo teste de CTT é possível inferir sobre o nível respiratório das amostras testadas, com base na atividade enzimática de células vivas. Amostras que apresentam maior taxa respiratória quando incubadas em tetrazólio formarão maiores quantidades de formazam e assim terão maiores valores de absorvância.

Artioli (2010) obteve alta viabilidade para calos de *Passiflora giberti*, em uma análise 30 dias após o subcultivo, indicando que a alta viabilidade em ambos os tratamentos pode sugerir uma alta taxa respiratória das células por estarem em um estágio de morte celular programada.

4.2.2 Massa fresca e viabilidade celular de massas pró-embriogênicas de ipê-branco

Após 30 dias da indução, foi realizado o primeiro subcultivo e avaliada a massa fresca dos calos, não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos testados (Gráfico 4).

Segundo Guerra, Torres e Teixeira (1999) recomenda-se a realização de subcultivos para que ocorra a purificação e a estabilização da cultura, de maneira que sejam consideradas linhagens celulares embriogênicas

Entretanto, no 2º subcultivo houve diferença entre os tratamentos testados, mas as repostas aos tratamentos não se ajustaram a um modelo polinomial (Gráfico 4). Maiores valores de indução de massa fresca foram obtidos na concentração de 6 mg.L⁻¹.

Aos 70 dias (3º subcultivo), também foram observadas diferenças entre os tratamentos. Com o aumento nas concentrações testadas de ANA, verificou-

se um aumento na massa fresca dos calos, ocorrendo o valor máximo na concentração de 6 mg L^{-1} , reduzindo após esse valor.

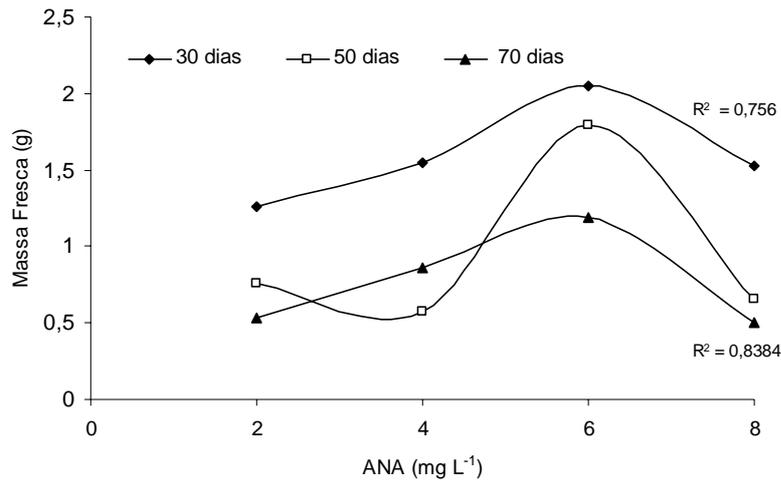


Gráfico 4 Massa fresca dos calos de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de ANA e em diferentes subcultivos

A indução de calos embriogênicos em *Cassia angustifolia* utilizando ANA como fonte de auxina, foi responsiva ao aumento da concentração do regulador, sendo obtida a maior porcentagem utilizando-se $10 \mu\text{M}$, segundo Agrawal e Sardal (2007).

Dentre as auxinas, as mais utilizadas para a indução de embriões somáticos são 2,4-D e ANA, sendo este efeito promovido sobre o explante influenciado pela concentração do regulador de crescimento, tipo de explante, condições de cultivo e genótipo utilizado (JIMÉNEZ, 2005).

Para o teste de tetrazólio verificou-se diferença significativa entre as diferentes concentrações de ANA. No 1º subcultivo realizado, aos 30 dias, a concentração 6 mg.L^{-1} de ANA acrescida ao meio de cultura foi a que

proporcionou maior viabilidade celular, com absorvância de 0,10668, enquanto que a utilização de 8 mg.L⁻¹ de ANA proporcionou menor valor (Gráfico 5).

Os dados de absorvância encontrados para o primeiro subcultivo (30 dias) não se ajustaram a um modelo de regressão polinomial. No 2º subcultivo, 50 dias após a indução, não foi observado diferença nos valores de absorvância entre os tratamentos testados, mas em todos houve um aumento nos valores de absorvância em relação ao primeiro subcultivo (Gráfico 5).

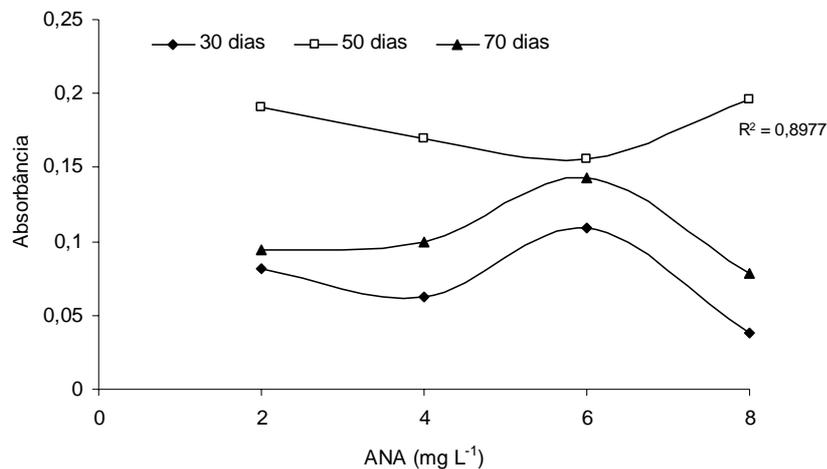


Gráfico 5 Avaliação da viabilidade celular em calos de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de ANA durante subcultivos (30; 50 e 70 dias)

Aos 70 dias, foi realizado o 3º subcultivo e a viabilidade celular pelo teste do tetrazólio apresentou diferença entre os tratamentos testados. A utilização de 6 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultivo proporcionou maiores valores de absorvância em relação aos demais tratamentos, mas observou-se uma diminuição em relação ao segundo subcultivo.

Silva et al. (2009) verificaram uma diminuição nos valores de viabilidade celular no terceiro subcultivo de calos de murici-pequeno. A diminuição nos valores de absorvância pode ser um indicativo de perda de vigor do material.

4.2.3 Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural dos calos, através da microscopia eletrônica de varredura, permitiu confirmar o potencial dos calos na formação de embriões somáticos para todos os tratamentos, através da visualização de células isodiamétricas.

A microscopia eletrônica de varredura para análise ultraestrutural, é uma ferramenta que permite o conhecimento das células e suas camadas de tecidos envolvidos nos eventos morfogênicos segundo Silva et al. (2009). Essa técnica também foi utilizada por Santos (2010) para o esclarecimento da capacidade morfogênica de explantes de pinhão-manso cultivados *in vitro*.

No presente estudo, no meio contendo 2 mg L⁻¹ de ANA foi possível a visualização de células isodiamétricas, alongadas e com membranas rompidas (Figura 2A). No meio de cultura acrescido com 4 mg L⁻¹ de ANA, a quantidade de células alongadas e com a membrana rompida foi maior em relação às células isodiamétricas (Figura 2 B).

Segundo Filanova et al. (2000), células alongadas apresentam vacuolização, sendo esse um primeiro sinal da morte celular acompanhado da ruptura de suas membranas.

Em calos induzidos em meio com a adição de 6 mg L⁻¹ de ANA, as células apresentaram melhores características embriogênicas, como maior proporção de células isodiamétricas em relação às células rompidas e alongadas (Figura 2C). Por meio das imagens é possível caracterizar o potencial

morfogenético dos calos formados na concentração de 6 mg L^{-1} de ANA, pois, segundo Steiner et al. (2005) calos embriogênicos são, em sua maioria, compostos por células isodiamétricas.

As MPE podem ser definidas como aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos (XU; HUANG, 2008), constituídas de células com tamanho reduzido e, portanto, citoplasma denso (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; FILANOVA et al., 2000).

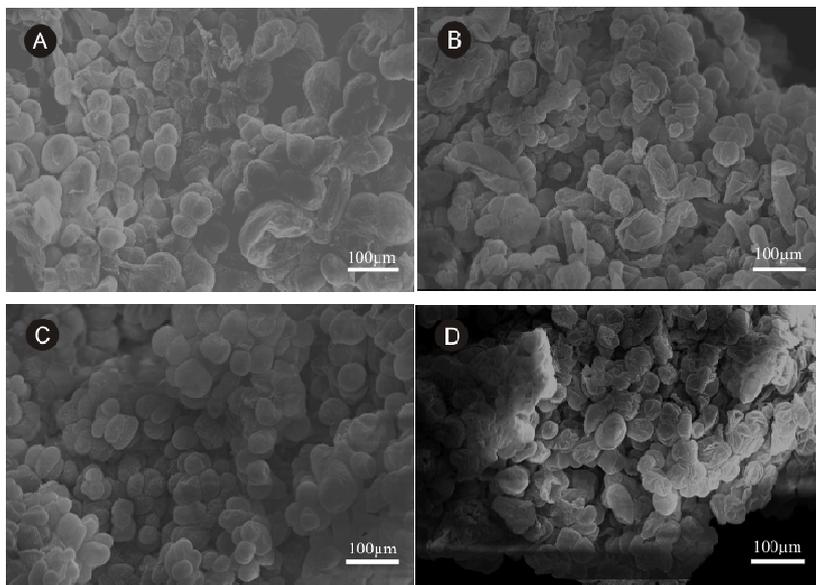


Figura 2 Análise ultraestrutural de calos de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de A) 2 mg.L^{-1} B) 4 mg.L^{-1} C) 6 mg.L^{-1} e D) 8 mg.L^{-1} de ANA

Segundo Nogueira et al. (2007), o uso de análises ultraestruturais por meio da microscopia eletrônica de transmissão e varredura é útil para

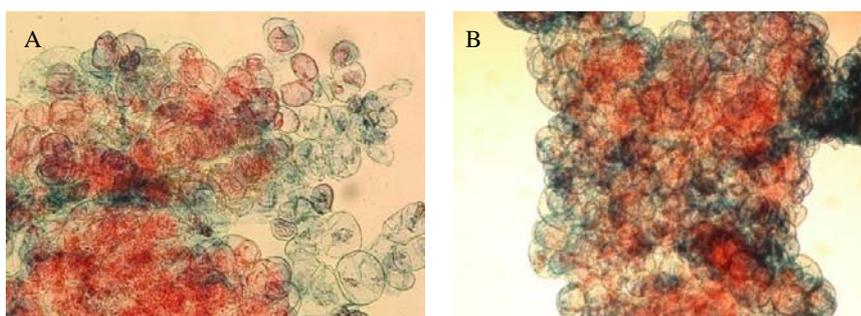
caracterização de MPE, fornecendo detalhes da morfologia interna e externa dos tecidos embriogênicos.

4.2.4 Análise citoquímica

O teste citoquímico determinado através da dupla coloração dos corantes azul de Evans e carmim acético confirmou o potencial embriogênico dos calos de ipê-branco formados em todas as concentrações de ANA testadas (Figura 3).

Silva et al. (2009) obtiveram a confirmação da presença de massas pró-embriogênicas em calos de *Passiflora cincinnata* através da coloração com o corante carmim acético, onde populações de células apresentaram coloração vermelho intenso.

Calos de ipê-branco desenvolvidos em meio acrescido de 2 mg.L⁻¹ de ANA apresentaram reação aos dois corantes, sendo corados de azul, as células alongadas e rompidas (Figura 3A). Calos formados em meio com 4 mg.L⁻¹ de ANA apresentaram áreas com reação em maior intensidade ao corante azul de Evans (Figura 3B). Esse tipo de reação, segundo Silveira et al. (2006) e Steiner et al. (2005) indica que essas células não possuem potencial para formação de embriões.



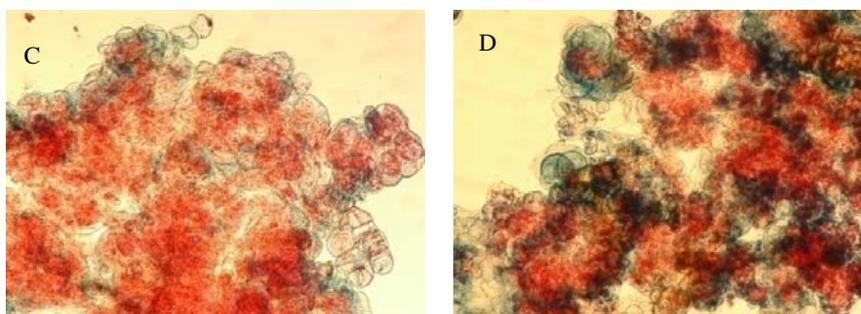


Figura 3 Dupla coloração azul de Evans e carmim acético em calos de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido A-) 2 mg.L⁻¹ B) 4 mg.L⁻¹ C) 6 mg.L⁻¹ D) 8 mg.L⁻¹ de ANA

A indução de calos com células apresentando características pró-embriogênicas é a primeira etapa para se obter a regeneração de plantas via embriogênese somática indireta. Os resultados da análise ultraestrutural através da MEV e da análise citoquímica pela dupla coloração indicaram que 6 mg L⁻¹ de ANA é a melhor concentração para a indução de calos embriogênicos.

Porto (2009) também utilizou das análises citoquímicas e ultraestruturais para determinação da melhor fonte de explante para a indução de calos embriogênicos em ipê-branco, as quais permitiram a esse autor concluir que as folhas cotiledonares constituíam o melhor explante.

A utilização da dupla coloração Carmim acético/azul de Evans tem sido relatada para identificação de massas calosas com potencial embriogênico para várias outras espécies como, murici-pequeno (SILVA et al., 2009), banana (LIMA, 2009) e pinhão-mansão (SANTOS, 2010).

4.2.5 Determinação da curva de crescimento

A curva de crescimento de calos de ipê-branco foi determinada num período de 36 dias sendo que, no final desse período, os calos já apresentavam alterações visíveis na sua coloração, tornando-se mais escuros (Gráfico 6). O tempo para a formação da curva foi curto se comparado com outras espécies como murici (SERRA; PAIVA; PAIVA, 2000), castanha-do-pará (NOGUEIRA et al., 2008) e café (SANTOS; FERREIRA; SARUBO, 2010), que apresentaram uma curva de 100, 90 e 60 dias, respectivamente.

A curva de crescimento de calos foi obtida através da determinação da massa fresca e seca. A curva apresentou crescimento do tipo sigmoidal, com tendência de acúmulo de matéria seca em função do aumento do tempo de cultivo, sendo possível identificar as fases de crescimento dos calos.

A fase lag ocorreu até 3 dias após a inoculação, quando as células estão se preparando para a divisão. Lameira et al. (2009) relata que a fase lag, em calos de *Cordea verbenaceae*, ocorreu até o quarto dia. Em *J. curcas*, não foi verificada a presença da fase lag (SANTOS, 2010). A fase de crescimento exponencial (fase biossintética), ocorreu entre 3 e 15 dias. Nessa fase ocorre a máxima divisão celular. A fase linear ocorreu entre 15 e 21 dias, onde se verificou a diminuição da taxa de divisão e aumento da área.

O início da fase de desaceleração ocorreu entre os dias 21 e 30 dias. Nessa etapa o calo deve ser repicado devido à redução da quantidade de nutrientes no meio, ressecamento do ágar, produção de produtos tóxicos e redução do O₂ no interior das células e calos (SMITH, 1992). Para pinhão-mansão a fase de desaceleração compreendeu o período de 14 a 28 dias (SANTOS, 2010). A fase estacionária ocorreu 30 dias após a inoculação.

Passado a fase de crescimento, as células entram na fase estacionária onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão e essas células entram em um estágio de diferenciação celular (LAMEIRA et al., 2009).

Maior matéria seca de calos foi obtida próximo aos 27 dias após o subcultivo em meio fresco, sendo, o estabelecimento da curva ocorrendo após o 30º dia da inoculação.

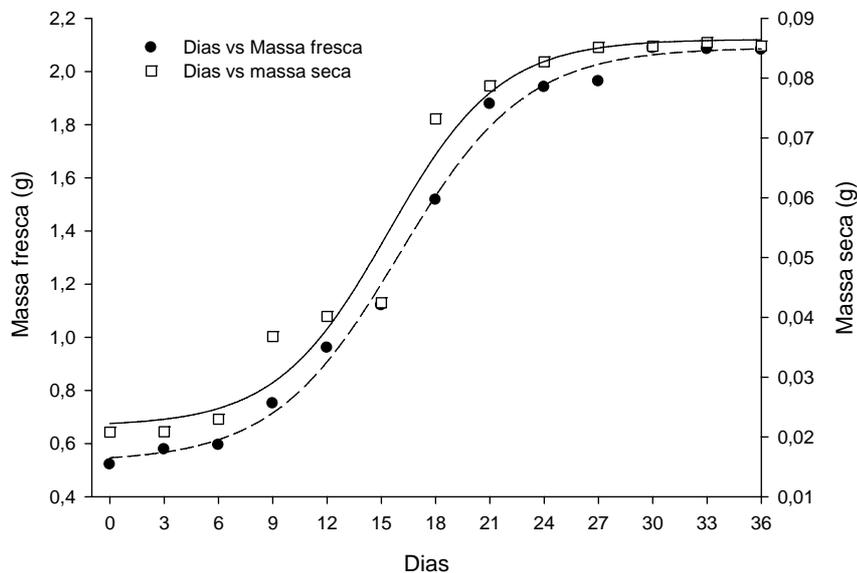


Gráfico 6 Curva de crescimento de calos de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de 6 mg.L-1, obtidas através da massa fresca e massa seca dos calos

No teste do CTT, foi determinada a viabilidade celular desse material o que permitiu verificar o comportamento respiratório durante a fase de crescimento (Gráfico 7).

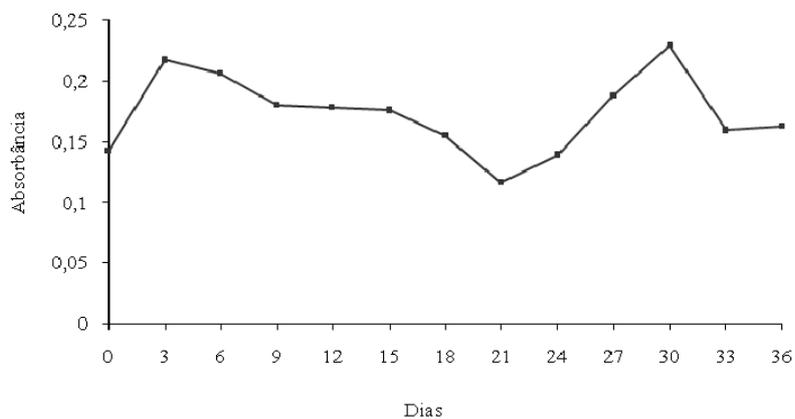


Gráfico 7 Viabilidade celular de calos de ipê-branco cultivados em meio de cultura acrescido de 6 mg.L^{-1} de ANA, durante curva de crescimento de calos

Três dias após a inoculação foi verificado um aumento na respiração, que pode ter ocorrido devido ao fato de estar presente matéria em estágios iniciais de morte. A determinação da viabilidade pelo teste do CTT auxilia na tomada de decisão quanto ao momento para realização do subcultivo.

A partir de 3 dias houve uma diminuição nos valores de absorbância, durante as fases exponencial e linear. A absorbância voltou a aumentar durante a fase de desaceleração, obtendo seu pico máximo aos 30 dias, na fase de desaceleração e caindo novamente. Esse pico final é um indicativo do início da morte celular, devido ao aumento da respiração.

5 CONCLUSÕES

- a) o aumento nas concentrações de ANA promove um aumento na indução de calos em folhas cotiledonares de ipê-branco;
- b) a adição de 6 mg L⁻¹ de ANA proporciona maior quantidade de massa fresca e maior viabilidade celular de calos durante os subcultivos;
- c) a adição de ANA ao meio de cultivo promove a formação de massas pró-embriogênicas em folhas cotiledonares de ipê-branco;
- d) a curva de crescimento de calos de ipê-branco apresentou comportamento do tipo sigmóide e duração de 36 dias.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- ABBADE, L.C. et al. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) Bignoniaceae, proveniente do cultivo ex vitro e in vitro. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, jul./set. 2009.
- _____. Growth curve and biochemical analyses of callus of ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, São José do Rio Preto, 2010. No prelo.
- AGRAWAL, V.; SARDAR, P. R. In vitro regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 43, n. 6, p. 585-592, Aug. 2007.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2009. 56 p.
- AMATHUA, R. et al. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Genotypes for high temperature stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Jordan, v. 3, n. 4, p. 245-251, July/Aug. 2007.
- ARTIOLE, F. P. **Caracterização celular e avaliação de vitamina C e fenóis totais em calos de *Passiflora gibertii* N. E. Brown**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas, v. 5, n. 3, p. 201-208, mar. 2001.

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL, 1994. p. 101-121.

BERJALO, P. The role of microorganisms in the deterioration during storage of recalcitrant and intermediate seeds. In: QUÉDRAOGO, A. S.; POULSEN, K.; STULESGAARD, F. (Ed.). **Intermediate recalcitrant tropical forest tree seeds: proceeding of a workshop on improved methods for handling and storage of intermediate recalcitrant tropical forest tree seeds**. Rome: IPGRI; Denmark: Danida, 1995. p. 121-126.

BHARGAVA, A. et al. Expression of a phytoalexin variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, n. 3, p. 301-312, Mar. 2007.

BORBA FILHO, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A. Armazenamento de sementes de ipê-branco e ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Semente**, Pelotas, v. 31, n. 1, p. 259-269, jan./mar. 2009.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 609-617, dez. 2003.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 15-25, abr./jun. 2006.

CARVALHO, M. A. F. et al. Indução *in vitro* de Calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 4, p. 288-290, out./dez. 2007.

COELHO, M. E. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth). Benth)**. 1999. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Lavras, Lavras, 1999.

DECCETI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra***. 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas, v. 5, n. 3, p. 492-496, mar. 2001.

DUARTE, A.P.M. et al. Anemocoria em ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sandwith - Bignoniaceae). **Naturalia**, Rio Claro, v. 33, n. 1, p. 1-7, maio 2010.

DUNCAN, D. R.; WIDHOLM, J. M. Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus culture. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 4, p. 397-403, Sept. 2004.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, Mar. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

- FERRETTI, A. R. et al. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 73-77, mar./jun. 1995.
- FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora sp.*** 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- FILONOVA, L. H. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, Dec. 2000.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Ptaffia tuberosa* (spreng.) Kicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.
- GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 43, n. 1, p. 27-47, May 2004.
- GENTRY, A. H. **Bignoniaceae: part II (Tribe Tecomeae): flora neotropica**. New York: Flora Neotropica, 1992. 370 p. (Monograph, 25).
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 520 p.
- GUERRA, P. M.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação; EMBRAPA Hortaliça, 1999. v. 2, p. 533-568.
- GURGEL FILHO, O. A.; PÁSZTOR, Y. P. C. Fenologia e comportamento em alfobre de espécies florestais e ornamentais. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 291-304, 1963.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulator on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 91-110, Nov. 2005.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777 p.

KAGEYAMA, P. Y.; MARQUEZ, F. C. M. Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero *Tabebuia*. **Publicación Especial Instituto Nacional de Investigaciones Forestales**, Coyoacán, v. 35, n. 3, p. 347-352, Dec. 1981.

KALINA, M.; PALMER, J. M. The reduction of tetrazolium salts by plant mitochondria. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 366-374, 1964.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação; EMBRAPA Hortaliça, 1999. v.2, p. 519-531.

LAMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 7-11, jan./mar. 2009.

LIMA, C. D. F. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões de bananeira cv. Prata-anã**. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LORENZI, A. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas brasileiras. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1, 368 p.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. Totowa: Humana, 2006. 416 p.

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

MARTIN, K. P. et al. *In vitro* propagation of *Ophiorrhiza prostrate* through somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n. 4, p. 769-772, Mar. 2007.

MARTINS, L.; LAGO, A.; ANDRADE, A. C. S. de. Armazenamento de sementes de ipê-branco: teor de água e temperatura no ambiente. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.3, p.775-708, jun./set. 2009.

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

MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZNSKI, J. J. The use of TCC reduction assay for assessment of *Gertiana* spp. Cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Paris, v. 28, n. 4, p. 315-324, Aug. 2006.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, jun. 2008.

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

NAM, B. H. et al. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 31-36, Feb. 1998.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de Murici-pequeno (*Brysonima intermédia* A. Juss). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 48-50, jul. 2007.

OLIVEIRA, L. M. et al. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 642-648, maio/jun. 2005.

PORTO, J. M. P. **Potencial embriogênico e organogênico em explantes de ipê-branco**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

RODRIGUES, M. et al. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 21-26, jan./fev. 2009.

SANTOS, D. L.; SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich., *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex Dc.) Standl. e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. – Bignoniaceae. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 87-92, jan./mar. 2005.

SANTOS, D. N. **Caracterização de massas pró-embriogênicas de pinhão-manso (*Jatropha curca* L.)**. 2010. 131 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 133-136, jan./mar. 2010.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análise bioquímica de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.4, p.833-840, jul./ago. 2000.

SILVA, M. L. et al. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 10, p. 47-54, Oct. 2009.

SILVA, R. F.; YUFFÁ, A. M. Viability in protoplast and cell suspensions of *coffea arábica* cv. Catiomor. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 5, p. 593-597, Oct. 2006.

SILVEIRA, V. et al. Polyamines effects on the endogenous polyamines contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) o. Ktze. **Plant Science**, Shannon, v. 171, n. 1, p. 91-98, July 2006.

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

STEIN, R. J.; GERADE, H. W. Triphenyltetrazolium chloride in tissue culture. **Science**, Washington, v.111, n.2895, p. 691-695, June 1950.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, n.6, p.895-903, Nov. 2005.

STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of *Hedera helix*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.47, p. 175-180, Aug. 1971.

STEPONKUS, P. L.; LAMPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyltetrazolium chloride method of determining cold injury. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.42, n.1, p.1423-1426, Oct. 1967.

STOCKMAN, A. L. et al. Sementes ipê-branco (*Tabebuia rosea-alba* (Ridl) Sand-BIGNONIACEAE): temperatura e substrato para o teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.3, p.139-143, set.2007.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffe arábica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p. (Documentos, 121).

TWOILL, L. E.; MAZUR, P. Studies on the reduction of 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.52, n.2, p.1097-1102, Jan. 1975.

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocôndrias em *Araucaria angustifolia***. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WHITERS, L. A. Cryopreservation of culture plant cells and protoplast. In: VASIL, J. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plant: cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation**. Orlando: Academic, 1985. v. 2, p. 253-316.

XU, C.; HUANG, B. Root proteomic response to heat stress in two *Agrotis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**, New Brunswick, v. 59, n. 15, p. 4248-4194, Nov. 2008.

YILDRIM, T.; KAYA, Z.; ISIK, K. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 67-69, Apr. 2006.

ZAPATA, M. J. et al. Reduction of de 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by the KCN-insensitive: salicylhydroxamic acid-sensitive alternative respiratory pathway of mitochondria from cultured grapevine cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 11, p. 579-582, Dec. 1991.