

**MICROPROPAGAÇÃO E ASPECTOS
FITOQUÍMICOS DE CALOS DE
BARBATIMÃO [*Stryphnodendron adstringens*
(Mart.) Coville] - FABACEAE**

PATRICIA MATILE NICIOLI

2006

PATRICIA MATILE NICIOLI

**MICROPROPAGAÇÃO E ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE CALOS DE
BARBATIMÃO [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] -
FABACEAE**

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

Orientador

Prof. Dr. Renato Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2006

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

Nicoli, Patrícia Matile

Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão
[*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) - Coville] / Patrícia Matile
Nicoli. – Lavras: UFLA, 2006.

89 p.

Orientador: Renato Paiva

Dissertação (Mestrado) – UFLA

Bibliografia.

1. *Stryphnodendron adstringens*. 2. Cultivo. 3. Propagação. 4.
Germinação. 5. Organogênese. 6. Aclimatização. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.883322

PATRICIA MATILE NICIOLI

**MICROPROPAGAÇÃO E ASPECTOS FITOQUÍMICOS DE CALOS DE
BARBATIMÃO [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] -
FABACEAE**

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

APROVADA em 28 de julho de 2006.

Dr. José Raniere Ferreira de Santana

UEFS

Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro

UNILAVRAS

Prof. Dr. Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus grandes amigos de Lavras e de Jacutinga e os meus irmãos, Angelo e Renata,

OFEREÇO.

A Deus

Aos meus pais, Marcos Tadeu Nicioli e

Nesmi Matile Nicioli.

Ao meu namorado e grande companheiro, Rodrigo.

Ao meu orientador, Prof. Renato Paiva.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força presente mesmo nos dias mais difíceis e pela vida.

Ao meu pai, minha mãe e meus irmãos, por todo o apoio, todo amor e encorajamento que nunca faltaram e tudo o que fizeram para eu chegar até aqui.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação e por me acolher sempre bem.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador Renato Paiva, por toda a atenção, confiança e amizade durante estes anos de convivência.

Aos membros da banca examinadora, por se disporem a ler este trabalho e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo.

Aos professores da Fisiologia Vegetal, por todos os conhecimentos transmitidos, contribuindo para meu aprendizado durante o mestrado.

Ao meu namorado, Rodrigo por todo o amor e dedicação, pela paciência, que nunca faltou e, principalmente, por sempre incentivar minha carreira profissional.

A toda minha família, pelo incentivo que sempre deram a minha carreira acadêmica.

A grande amiga Raírys, agradeço pela convivência, por todos os esforços não medidos em sempre me ajudar e por todos os conhecimentos transmitidos. Valeu, ÉGUA!!!

Aos funcionários técnico-administrativos, pela disponibilidade e pela simpatia sempre constante.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Tina, Eduardo, Alvinho, Marcelo, Diogo, Letícia, Luciano, Vanessa, Aline, Gabriela, Marcelo (Pado), Lenaldo, Cristiano, Milene e Fernanda, pela ajuda e companheirismo durante todos esses anos.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal: Marilza, Anderson, Sidnei, Girlene, Karine, Graciele, Paula, Fernanda Nery, Samantha, Guto, Maiana, Fernanda Grisi e Ivana, pela convivência e amizade.

Ao colega Espeto, pela imensa ajuda nos cortes anatômicos e à professora Ana Hortência, pelas análises fitoquímicas.

A atual e ex-companheira de república, Fran e Larissa, pelos divertidos momentos que passamos e pelo companheirismo de sempre.

A minha grande amiga, Francine (Japa), pela amizade, companheirismo, força, conselhos e ajuda em todos os momentos em que precisei. Uma amizade conquistada na graduação e, com certeza, mesmo longe, estará sempre em meu coração.

Aos grandes amigos de Jacutinga, em especial Aline L., Felipe, Dani e Mariana, pelo apoio e amizade.

A todos vocês que, de uma forma ou de outra, torceram por mim nestes anos, agradeço de coração.

BIOGRAFIA

PATRÍCIA MATILE NICIOLI, filha de Marcos Tadeu Nicioli e Nesmi Matile Nicioli, nasceu em 18 de março de 1981, em Jacutinga, MG. Coursou até a 5º série do ensino fundamental na Escola Estadual Júlio Brandão. Posteriormente mudou-se para o Colégio Educação e Cultura Anglo Jacutinga, onde terminou o ensino fundamental e cursou todo o ensino médio, concluindo-o em 1998. Em agosto de 1999 iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Lavras (UFLA), concluindo-o em julho de 2004. De 2001 a 2004 foi bolsista de iniciação científica do CNPq no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, na Universidade Federal de Lavras, no Setor de Fisiologia Vegetal, sob a orientação do professor Renato Paiva. Em agosto de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em julho de 2006.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO I: Introdução geral.....	1
1 Introdução	2
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Descrição da espécie.....	4
2.2 Cultura de tecidos vegetais.....	5
2.3 Meio nutritivo.....	7
2.4 Aspectos anatômicos.....	9
2.5 Aspectos fitoquímicos.....	10
3 Referências bibliográficas.....	13
CAPÍTULO II: Aspectos da germinação <i>in vitro</i> do barbatimão.....	17
1 Resumo	18
2 Abstract.....	19
3 Introdução	20
4 Material e métodos.....	22
4.1 Material vegetal	22
4.2 Efeito do GA ₃ na germinação <i>in vitro</i>	22
4.3 Influência do pH na germinação <i>in vitro</i>	22
4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas	23
5 Resultados e discussão.....	23
5.1 Efeito do GA ₃ na germinação <i>in vitro</i>	23
5.2 Influência do pH na germinação <i>in vitro</i>	27
6 Conclusões	28
7 Referências bibliográficas.....	29
CAPÍTULO III: Organogênese direta em explantes caulinares de	

barbatimão	32
1 Resumo	33
2 Abstract.....	34
3 Introdução	35
4 Material e métodos.....	37
4.1 Efeito da cinetina na indução de brotações em segmentos caulinares.....	37
4.2 Efeito do ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	37
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	38
5 Resultados e discussão.....	38
5.1 Efeito da cinetina na indução de brotações em segmentos caulinares.....	38
5.2 Efeito do ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	42
6 Conclusões	46
7 Referências bibliográficas.....	46
CAPÍTULO IV: Indução de calos e avaliação dos teores de fenóis e taninos totais em segmentos nodais de barbatimão	50
1 Resumo	51
2 Abstract.....	52
3 Introdução	53
4 Material e métodos.....	55
4.1 Efeito do picloram e da cinetina na indução de calos em segmentos nodais.....	55
4.2. Avaliação dos teores de fenóis e taninos totais em calos induzidos <i>in vitro</i>	56
4.2.1 Preparo dos extratos.....	56
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	57
5 Resultados e discussão.....	57
5.1 Efeito do picloram e da cinetina na indução de calos em segmentos nodais.....	57

5.2 Avaliação dos teores de fenóis e taninos totais em calos induzidos <i>in vitro</i>	62
6 Conclusões.....	67
7 Referências bibliográficas.....	68
CAPÍTULO V: Aclimatização e caracterização anatômica do tecido foliar de plantas de barbatimão obtidas via cultivo <i>in vitro</i> e após transferência para ambiente <i>ex vitro</i>.....	72
1 Resumo	73
2 Abstract.....	74
3 Introdução	75
4 Material e métodos.....	76
4.1 Aclimatização de plantas cultivadas <i>in vitro</i>	76
4.2 Anatomia foliar <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	77
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	78
5 Resultados e discussão.....	79
5.1 Aclimatização de plantas cultivadas <i>in vitro</i>	79
5.2 Anatomia foliar <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	80
6 Conclusões.....	86
7 Referências bibliográficas.....	87

RESUMO

NICIOLI, Patrícia Matile. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. 89p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) é uma espécie nativa do Cerrado que apresenta grande valor econômico, devido ao seu potencial medicinal. A casca é adstringente e apresenta de 20% a 30% de taninos totais, sendo este o principal princípio ativo da espécie. A dormência tegumentar característica de suas sementes torna sua propagação sexuada dificultada. Além disso, grande parte das pesquisas realizadas no momento, busca aplicação de técnicas biotecnológicas visando ao aumento da produção de metabólitos secundários específicos *in vitro*. O presente trabalho teve por objetivo estudar a micropropagação do barbatimão e realizar análises fitoquímicas nos calos produzidos no cultivo *in vitro*. Os resultados indicaram que não houve efeito significativo dos diferentes pHs e das concentrações de GA₃ testadas na germinação de sementes. Maior percentagem média de germinação foi obtida quando o GA₃ estava presente no meio de cultivo (82%) e, com relação ao pH, quando este foi ajustado para 6,8. As concentrações de 5,0 e 1,0 mg L⁻¹ de cinetina foram as mais eficientes na indução, respectivamente, de brotações e gemas. O maior comprimento das brotações foi verificado em meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de cinetina. Os maiores número e comprimento de raízes foram observados em meio de cultura suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de ANA. A concentração de 0,5 mg L⁻¹ de picloram foi a mais eficiente na indução de calos em segmentos nodais. Alta produção de matéria fresca também foi verificada com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de picloram (0,1165 g). O maior teor de fenóis foi encontrado no explante inicial, com uma porcentagem média de 25,90%, seguida de 9,52% e 9,23% nos tratamentos ausência de reguladores de crescimento e 0,1 mg L⁻¹ de cinetina, respectivamente. Em relação aos taninos totais, a maior percentagem foi verificada no explante inicial, com valor médio de 4,94%, seguido dos tratamentos ausência de reguladores de crescimento (2,36%) e 2,0mg L⁻¹ de picloram (1,71%). As plantas aclimatizadas em substrato Plantmax apresentaram 50% de sobrevivência e as aclimatizadas em substrato vermiculita + Plantmax, 41%. Observaram-se diferenças anatômicas nas lâminas foliares de plantas provenientes do ambiente *in vitro* e em processo de

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co-orientador).

aclimatização. As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* apresentaram os parênquimas paliçádico e esponjoso e a epiderme adaxial mais espessos que nas plantas aclimatizadas nos dois tipos de substratos. Maior densidade estomática foi verificada nas plantas aclimatizadas em Plantmax[®] (208,12 estômatos por mm²). Os estômatos das folhas em ambiente *in vitro* apresentaram maior diâmetro polar (20,13µm) e das plantas aclimatizadas em Plantmax[®], maior diâmetro equatorial (14,06 µm).

ABSTRACT

NICIOLI, Patrícia Matile. **Micropropagation and phytochemical aspects of callus of barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. 89p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) is a native species from the savannah that shows great economical value, due to its medicinal potential. Its bark is astringent and shows from 20 to 30% total tannins, which is considered the most important active principle of the species. Sexual propagation is difficult due to the presence of seed tegument dormancy. Besides, most of the researches so far search for biotechnological techniques that may increase the *in vitro* production of specific secondary metabolites. The objectives of the present work were to study barbatimão's *in vitro* propagation and phytochemically analyze the callus formed. The results showed no significant effect of different pHs and GA₃ concentrations tested on seed germination. Higher germination average percentage was obtained when GA₃ was present (82%) and the pH adjusted to 6.8. The concentrations of 5.0 and 1.0 mg L⁻¹ kinetin were the most efficient for the induction of shoots and buds, respectively. Higher shoot length was observed in medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ kinetin. Higher number and length of roots were observed in the presence of 4.0 mg L⁻¹ NAA. The concentration of 5.0 mg L⁻¹ picloram was the most efficient in the induction of callus from nodal segments. Higher fresh matter was also observed using 2.0 mg L⁻¹ picloram (0.1165 g). The higher phenol level was found in the initial explant with an average percentage of 25.90%, followed by 9.52% and 9.23% in the control and 0.1 mg L⁻¹ kinetin, respectively. Higher percentage of total tannins was verified in the initial explant, with an average value of 4.94%, followed by the control (2.36%) and 2.0 mg L⁻¹ picloram (1.71%). Plants acclimatized in Plantmax[®] substrate showed 50% survival and those acclimatized in vermiculite + Plantmax[®], 41%. Anatomical differences in the leaves from *in vitro* plants and plants acclimatized were observed. The leaf structure developed *in vitro* showed parenchyma palisade and spongy and adaxial epidermis thicker than in the acclimatized plants in both substrates. Higher stomata density was verified in plants acclimatized in Plantmax[®] (208.12 stomata's per mm²). Leaf stomata from *in vitro* environment showed higher polar diameter (20.13 μm) and those from acclimatized plants in Plantmax[®] presented higher equatorial diameter (14.06 μm).

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co- Adviser).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo e contribui com, aproximadamente, 23% das espécies de plantas e de animais conhecidos no planeta, que encontram-se distribuídos nos diferentes biomas, entre eles o Cerrado. Este ocupa 24% da área total do país (204 milhões de hectares), estando presente em 13 estados brasileiros e no Distrito Federal. É a segunda maior biodiversidade da América do Sul, superada apenas pela Amazônia.

Estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado ainda são poucos, principalmente quando comparadas a sua grande diversidade e a área ocupada. No entanto, cerca de 40% do bioma já foi devastado e, atualmente, esta é a vegetação em maior risco de extinção no país. É preciso considerar que os recursos naturais oferecidos por ele, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações. Entre estes, pode-se considerar o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais.

O acelerado processo de destruição dos recursos naturais, nos diversos biomas brasileiros, vem acontecendo por meio do desmatamento nas regiões Sul e Sudeste até as áreas Centro-Oeste e Norte, acarretando a redução ou mesmo a extinção de várias populações de espécies vegetais de importância medicinal.

Esse recurso natural, se for manejado adequadamente, poderá garantir a ocupação permanente e a sobrevivência de um grande número de pessoas, além de fornecer matéria-prima para a indústria e preservação da biodiversidade, garantindo a conservação da fauna e flora nativa, bem como a manutenção da qualidade da água.

Desse modo, estudos relacionados à preservação desse bioma e à sua revegetação com espécies nativas são necessários, buscando reverter o atual quadro de desmatamento e, principalmente, a preservação e a manutenção das nascentes dos corpos d'água.

Uma das espécies que compõem este bioma é o *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, conhecida popularmente como barbatimão. Cresce no Cerrado de maneira isolada, sendo utilizado na construção civil e sua casca é importante fonte de tanino. Todavia, esta planta é mais conhecida na medicina popular. Ela é amplamente utilizada como anti-séptico e bactericida para tratamento de várias infecções cutâneas. Ainda é empregada no tratamento de gonorréia, hérnia, feridas hemorrágicas, diarreias, gastrite, dores de garganta e hemorróidas. Com menos frequência, sua casca é usada para curtir o couro.

Um dos problemas que têm limitado a ampla utilização dessa espécie é a produção de mudas, pois suas sementes apresentam baixo índice de germinação, devido à dormência tegumentar.

Devido às dificuldades encontradas no processo de propagação desta espécie, a técnica do cultivo *in vitro* representa uma importante alternativa para a produção de mudas e conservação desse recurso genético, com destaque para a micropropagação, que permite obter plantas com características genéticas idênticas, em larga escala e em curto espaço de tempo.

A utilização de técnicas biotecnológicas em plantas pode resolver alguns dos problemas relacionados com a utilização de metabólitos secundários de origem vegetal. Assim sendo, grande parte das pesquisas realizadas objetiva a aplicação dessas técnicas, visando ao aumento e ao direcionamento da produção de metabólitos secundários específicos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos estabelecer um protocolo de micropropagação para barbatimão, estudar aspectos da anatomia foliar de plantas cultivadas *in vitro* e em ambiente *ex vitro* e avaliar os teores de fenóis e taninos totais nos calos produzidos no cultivo *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville pertence à família Fabaceae, sendo também conhecido como barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, charãozinho-roxo e casca-da-virgindade. Tem hábito arbóreo, com plantas de 2 a 6 m de altura, copa arredondada, madeira com a parte interna vermelha, casca grossa, rígida e acinzentada, que se destaca facilmente. Seus ramos são grossos, tortuosos e curtos. As folhas são alternas, recompostas (10 folíolos), com folíolos ovalados. Apresenta o ciclo perene, florescendo entre outubro e fevereiro e produzindo vagem de outubro a março. Cresce no Cerrado de maneira isolada, não sendo encontradas várias árvores juntas. O desenvolvimento das mudas no campo é lento. O fruto é uma vagem lenhosa, curta, grossa, carnosa, com 8 a 10 cm de comprimento. Suas sementes são achatadas e envoltas por uma faixa escura. As flores são dispostas em espigas, pequenas e numerosas; tem floração escura e discreta (Lorenzi 2000) (Figura 1).

É uma espécie popularmente explorada, devido ao fato de sua casca possuir elevada concentração de taninos (cerca de 20% a 30%) (Almeida, 1998). Tal exploração baseia-se no fato de os taninos possuírem atividades farmacológicas, principalmente na cicatrização superficial de ferimentos. Na medicina alternativa, sua casca, reduzida a pó, é empregada no tratamento de úlceras e, ainda, atuam contra a leucorréia e de catarros uretral e vaginal.

O barbatimão, apesar da grande quantidade de vagens e sementes produzidas, apresenta uma germinação muito irregular, conseqüente da dormência tegumentar que a espécie apresenta (Barradas & Handro, 1974). Além disso, o ataque de pragas em suas sementes diminui significativamente sua propagação natural.

Mesmo apresentando grande utilização popular e, potencialmente, grande importância econômica, o manejo do barbatimão necessita de estudos, devido às poucas informações existentes acerca dessa espécie e de seu cultivo.



FIGURA 1. Aspecto visual de uma planta adulta (A); da inflorescência (B); dos frutos (C); das sementes (D); da casca (E) e da madeira (F) de barbatimão. Fonte: Lorenzi, 2000. UFLA, Lavras, 2005.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

A biotecnologia é um conjunto de técnicas que utiliza seres vivos, ou partes destes, para produzir ou modificar produtos, aumentar a produtividade de plantas e animais de maneira eficiente ou, ainda, produzir microorganismos para usos específicos (Torres et al., 2000).

Dentre essas técnicas, a cultura de tecidos vegetais apresenta como principal aplicação a micropropagação, possibilitando a produção de mudas livres de doenças e exigir pouco espaço físico. Segundo Mroginski & Roca (1993), o incremento acelerado do número de plantas derivadas de determinado genótipo, a redução no tempo de multiplicação, o maior controle sobre a sanidade do material que se propaga e a possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade na qual existam poucos indivíduos são as principais vantagens da micropropagação. Essa técnica consiste no cultivo asséptico e *in vitro* de pequenos fragmentos vegetais ou explantes, que sob controle hormonal específico, passam por padrões morfogenético distintos, podendo recompor novas plantas.

Segundo Caldas et al. (1990), a composição e a concentração hormonal no meio de cultura são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas utilizados na cultura de tecidos.

Várias são as modalidades de cultura de tecidos, podendo ser por via direta, com desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, como a cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (Caldas, 1996).

Segundo Pierik (1990), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta cinco estágios diferentes. A fase 0 corresponde aos tratamentos dados à planta matriz, de onde são retirados os explantes. A fase 1 representa o momento em que um explante é isolado sob condições estéreis. A fase 2 é a fase de propagação, em que se objetiva conseguir a propagação do material vegetal sem a perda da estabilidade genética. A fase 3 envolve a preparação das brotações ou das plântulas obtidas na fase 2, para a transferência ao solo. Esse processo pode envolver a interrupção da formação de brotos axilares e o início do seu

elongamento. Posteriormente, deve-se induzir a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A quarta e última fase é a da transferência das plântulas do tubo de ensaio para o solo e o conseqüente estabelecimento.

2.3 Meio nutritivo

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas), que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*.

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas. Assim, ao se excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meio nutritivo para suplementar suas necessidades exógenas, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (Torres et al., 2001).

Dentre os principais meios nutritivos utilizados para o cultivo *in vitro*, há o MS, desenvolvido por Murashige & Skoog (1962) e o WPM, formulado por Lloyd & Mc Cown (1980) (George, 1996).

O melhor crescimento de células e tecidos de plantas em meio MS tem sido atribuído, em grande parte, à alta concentração de amônio e nitrato. Além do nitrogênio, o potássio no meio 'MS' encontra-se também em dosagens altas, assim como outros macronutrientes, porém, em dosagens menos elevadas. O aumento na concentração dos sais encontrados no meio 'MS' proporcionou ganhos significativos no crescimento de tecidos e células em diversas espécies de plantas, tornando-o o meio de cultivo mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos vegetais. Entretanto, este meio apresenta baixo nível de fosfato que,

para muitos pesquisadores, é insuficiente para sustentar crescimento de muitas culturas.

O meio WPM foi desenvolvido para cultura de brotações em plantas lenhosas. Este apresenta 1/4 das concentrações de íons de nitrato, amônia e potássio do meio MS e os níveis de PO_4^{3-} dobrados. Este meio tem sido recomendado para espécies lenhosas, por apresentar baixas concentrações totais de íons.

Uma das peculiaridades da cultura de tecidos vegetais é a possibilidade quase absoluta de controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Isso não seria possível sem a adição dos reguladores de crescimento ao meio de cultura, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado (Pasqual, 2001).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), até pouco tempo atrás, os principais grupos de hormônios vegetais (e reguladores de crescimento) eram: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Entretanto, atualmente, há fortes evidências da existência de um outro grupo de hormônios vegetais, os brassinoesteróides. A morfogênese *in vitro* requer, geralmente, um ajuste nos níveis de auxinas e citocininas. Uma relação mais alta entre auxina e citocinina é geralmente requerida para que o processo da rizogênese ocorra. O contrário é necessário para a indução de brotações.

Existem vários processos morfogenéticos, dentre eles, a rizogênese. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento. Porém, o sistema radicular adventício emitido em meio semi-solidificado com ágar ou produto equivalente é, em geral,

pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares (Leite, 1995), de modo que as raízes assim formadas são pouco eficientes na absorção de água e nutrientes, durante a aclimatização (Hoffmann et al., 2001).

A formação de raízes adventícias em várias espécies lenhosas tem sido beneficiada pelo uso de carvão ativado no meio de enraizamento. Dotada de uma alta capacidade de adsorção, esta substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presentes no agar, que possam afetar negativamente o crescimento. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado é o favorecimento do processo de enraizamento, devido à redução da intensidade de luz na região de formação de raiz (Assis & Teixeira, 1998).

2.4 Aspectos anatômicos

A desordem estrutural e funcional nas plantas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987).

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam cutícula pouco desenvolvida, bem como mecanismo de abertura e fechamento de estômatos pouco funcional e uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e as brotações, tornando-as muito suscetíveis ao estresse hídrico durante a aclimatização (Pierik, 1990).

Além das alterações anatômicas nos tecidos das plantas micropropagadas, o número e o formato dos estômatos também são afetados. Estudos indicam que a estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas apresenta grande diferença em relação às plantas que cresceram em casa de vegetação ou no campo (Preece & Sutter, 1991).

De acordo com Preece & Sutter (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando são submetidos a condições adversas, como o ambiente natural. Por esse motivo, torna-se necessária uma gradual aclimatização, a fim de que as plântulas sobrevivam quando transferidas para diferente condição ambiental.

Desse modo, estudos anatômicos de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* podem fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação.

2.5 Aspectos fitoquímicos

De acordo com Taiz & Zaiger (2004), os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, classificados como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários são também conhecidos como produtos secundários ou produtos naturais. Estes metabólitos também diferem dos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, entre outros) por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, enquanto os metabólitos primários são encontrados em todo reino vegetal.

A produção de metabólitos secundários é sensível a vários fatores ambientais, como temperatura, umidade, fotoperíodo, fertilidade do solo, competição com outros vegetais, com animais e microrganismos.

Dentre os metabólitos secundários conhecidos, têm-se os taninos, que possuem uma grande importância farmacológica no meio popular. Os taninos são polifenóis de elevado peso molecular, encontrados nas cascas de plantas arbóreas, estando também frequentemente presentes na madeira (Pizzi & Mittal, 1994). Possuem a propriedade de complexar fortemente com carboidratos e proteínas (Garro-Galvez et al., 1997), devido à sua adstringência característica.

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e estão associados com o mecanismo de defesa. São amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo comuns tanto em gimnospermas como em angiospermas. Nas angiospermas, os taninos são mais comuns nas dicotiledôneas. Ricas em taninos são as espécies pertencentes às famílias Fabaceae, Anacardiaceae, Combretaceae, Rhizophoraceae, Myrtaceae e Polinaceae. Em espécies lenhosas, os taninos ocorrem, mais predominantemente, na casca e no cerne das madeiras. Suas propriedades variam entre e dentro das espécies, dependendo do tecido vegetal de que são extraídos. São encontrados, principalmente, nos vacúolos das plantas e, nestes locais, não interferem no metabolismo da planta; somente após lesão ou morte das plantas eles agem e têm metabolismo eficiente (Prance & Prance, 1993).

Os taninos vegetais são classificados em duas grandes categorias: os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis. Os taninos hidrolisáveis apresentam, na sua constituição, monômeros de ácido gálico (tanino gálico) ou ácido elágico (tanino elágico), enquanto os taninos condensados são formados pela polimerização de unidades de catequina (Santos & Mello, 1999).

Atualmente, muitos produtos naturais são obtidos somente a partir de maciças quantidades de material vegetal (Stockigt et al., 1995), o que tem contribuído para a extinção de muitos recursos naturais. De acordo com Dicosmo & Misawa (1995), mesmo diante desta dificuldade, a extração de metabólitos de plantas medicinais cultivadas ou selvagens continua, devido à falta de alternativas confiáveis. Estas dificuldades têm estimulado esforços para encontrar fontes alternativas para a produção destes metabólitos e a necessidade de um suprimento seguro tem gerado também outras estratégias de pesquisa.

Segundo Dornenburg & Knorr (1995), sistemas de cultura de calos ou suspensões celulares representam uma fonte potencial renovável de muitos destes produtos naturais (medicinais, sabor, essências, entre outros). Porém,

atualmente, poucas culturas produzem estes compostos em quantidades úteis comercialmente, sendo necessários mais estudos visando à otimização deste processo de produção, bem como para a quantificação e a extração desses produtos.

Vários métodos analíticos têm sido utilizados para quantificar fenóis em amostras vegetais (Müeller-Harvey, 2001). Entre eles, citam-se os métodos colorimétricos, gravimétricos e físico-químicos (Parra Pozo, 1997).

Os métodos colorimétricos são amplamente utilizados devido a sua simplicidade e alta sensibilidade. Nesta classe, inclui-se o método de Folin-Denis (Folin & Denis, 1915) para a determinação de fenóis totais. Entretanto, Hagerman (1987) relata que este método não é específico e não distingue fenóis de baixo peso molecular. Para Müeller-Harvey (2001), os testes colorimétricos devem ser utilizados somente para comparações semi-quantitativas. O método de Folin-Denis fundamenta-se na redução de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico-fosfotúngstico, em solução alcalina, pelos fenóis totais presentes na amostra vegetal, resultando na formação de um cromóforo azul representado pelo complexo fosfomolibidato/fosfotungstato, de estrutura ainda não definida, que é quantificado por espectrofotometria.

Os métodos gravimétricos apresentam a vantagem de não necessitar de padrões. Entretanto, são menos sensíveis que os métodos colorimétricos comuns, além de serem específicos para fenóis totais (Parra Pozo, 1997).

Vários métodos físico-químicos também têm sido desenvolvidos para quantificar taninos vegetais. Segundo Parra Pozo (1997), estes métodos baseiam-se na precipitação de proteínas por taninos presentes nos extratos vegetais. Um dos métodos mais utilizados para a quantificação de taninos é o método da difusão radial, descrito por Hagerman (1987), em que o extrato é aplicado em cavidades feitas com um gel de agarose adicionado de proteína (BSA). À medida que os taninos difundem-se no gel, vão se complexando com a

albumina, desenvolvendo um halo de precipitação. A área do halo é proporcional à quantidade de tanino no extrato. A área obtida é comparada com uma curva padrão, preparada a partir de soluções de ácido tânico de concentrações conhecidas. Segundo Hargeman (1987), este método é simples, sensível e específico, podendo ser aplicado, especialmente, em estudos envolvendo um grande número de amostras.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P. de. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.261-296.

BARRADAS, M.M.; HANDRO, W. Algumas observações sobre a germinação da semente do barbatimão, *Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Mart. (Leguminosae-Mimosoideade). **Boletim de Botânica**, v.2, p.139-150, 1974.

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

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.13, n.3, p.425-453, 1995.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v.7, n.8, p.674-684, Aug. 1995.

FOLIN, O.; DENIS, W. A colorimetric method for determination of phenols (and phenols derivatives) in urine. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.22, n.2, p.305-308, 1915.

GARRO-GALVEZ, J.M.; RIEDL, B.; CONNER, A.H. Analytical studies on Tara tannins. **Holzforschung**, v.51, n.3, p.235-243, 1997.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v.1, p.183-260.

HAGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n.3, p.437-449, Mar. 1987.

HOFFMANN, A. et al. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.11, p.1371-1379, nov. 2001.

KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; GOTTLIEB, O.R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n.66, p.50-55, 1994. (Supl. 1 - Parte 1).

LEITE, G.B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97**. 1995. 50p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LLOYD, G.; MC COWN, 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.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v.1, 370p.

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la agricultura-fundamentos y plantarum**. Cali: CIAT, 1993. p.19-40.

MÜELLER-HARVEY, I. Analysis of hidrolisable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.91, n.1/2, p.3-20, May 2001.

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.

PARRA POZO, L.A. **Estudo “in vitro” do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais sobre o *Clostridium difficile***. 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

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

PIZZI, A.; MITTAL, K.L. **Handbook of adhesive technology**. New York: M. Dekker, 1994. 680p.

PRANCE, G.T.; PRANCE, A.E. **Bark**: the formation, characteristics and uses of bark around the world. Portland: Timber, 1993. 175p.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, n.80, p.223-230, 1997.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. de. Taninos. In: _____. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC, 1999. p.517-544.

STOCKIGT, J. et al. Natural products and enzymes from plant cell cultures. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v.43, n.2, p.97-109, Nov. 1995.

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

TORRES, A.C. et al. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA, 2001. 19p. (Circular Técnica, 24).

TORRES, A.C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128p.

ZIV, M. "In vivo" hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (Ed.). **Plant tissue and its agricultural applications**. London: Butterwoths, 1987. p.187-196.

CAPÍTULO II

ASPECTOS DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DO BARBATIMÃO

1 RESUMO

NICIOLI, Patrícia Matile. Aspectos da germinação *in vitro* do barbatimão. In: _____. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap. 2, p.17-31. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

As dificuldades de propagação do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) por meio de sementes, devido, principalmente, à dormência tegumentar, têm levado à busca por soluções alternativas para a produção de mudas de maneira rápida, eficiente e, principalmente, sadia. O objetivo deste trabalho foi estudar a germinação de sementes de barbatimão em condições *in vitro*. Frutos maduros, coletados de populações naturais, passaram por processo de beneficiamento, tiveram suas sementes retiradas, armazenadas em frasco de vidro em geladeira por 90 dias e, então, utilizadas como explantes. Foram testados cinco níveis de GA₃ (0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹) no meio de cultura MS, com 10,0 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem. Para o experimento de influência de pH, foram testados cinco níveis de pH (4,8; 5,2; 5,8; 6,2 e 6,8) no meio de cultura MS, suplementado com 10,0 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar. Após a inoculação, para ambos os experimentos, as sementes foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura média de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹. Aos 30 dias da inoculação, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas. Observou-se que não houve efeito significativo dos diferentes pHs e das concentrações de GA₃ testadas na germinação. O percentual médio de germinação foi de 82%, quando o GA₃ estava presente no meio de cultura e 72%, na ausência do regulador. Em relação ao pH, a maior porcentagem média de germinação (76%) foi obtida em pH 6,8.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

NICIOLI, Patrícia Matile. Aspects of *in vitro* germination of barbatimão. In: **Micropropagation and phytochemical aspects of callus of barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap.2, p.17-31. Dissertation (Master in Agronomy. Plant Physiology)-Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] propagation by seeds is difficult due to the presence of tegument dormancy which has led to a search of plant propagation alternatives. The objective of this work was to study the barbatimão seed germination on *in vitro* conditions. Mature fruits were collected from natural populations after which their seeds were extracted and stored for 90 days in the refrigerator. Five dosages of GA₃ (0.0; 1.0; 2.0; 5.0 and 10.0 mg L⁻¹) were tested in the MS medium supplemented with 10.0 g L⁻¹ sucrose and 6.0 g L⁻¹ agar. The pH was adjusted to 5.8 prior autoclaving. To verify the influence of pH, five levels (4.8; 5.2; 5.8; 6.2 and 6.8) were tested. After the inoculation, the seeds were maintained in the growth room under the temperature of 25 ± 2° C, photoperiod of 16 h and 36 μmol m⁻² s⁻¹ photon irradiance. After 30 days of inoculation, germination percentage was evaluated. It was observed no significant effect from the different pHs and the GA₃ concentrations tested. The average germination percentage was 82% when GA₃ was present in the culture medium and 72% in its absence. A higher average germination percentage (76%) was obtained at the pH 6.8.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co- Adviser).

3 INTRODUÇÃO

A falta de uma política ambiental mais severa, de conhecimentos técnicos e de consciência ecológica tem contribuído para a exploração desordenada das espécies vegetais, com conseqüente diminuição da biodiversidade e perdas de recursos genéticos com elevados valores econômicos. Além disso, acarreta problemas ambientais, como a redução da cobertura florestal e a destruição dos mananciais hídricos, prejudicando a fauna e a flora, aumentando o risco de extinção de muitas espécies (Couto et al., 2004).

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), espécie nativa do Cerrado de grande valor medicinal e utilizada na recuperação de áreas degradadas, tem sua propagação sexuada dificultada pelo fato de suas sementes apresentarem dormência. Assim, estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* desta espécie são importantes, visando maximizar a taxa de germinação e a obtenção de plântulas com qualidade genética e fitossanitária adequadas, além de possibilitar um melhor entendimento da fisiologia do processo germinativo da espécie.

A taxa de germinação de sementes de algumas espécies pode aumentar muito quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente quando as sementes apresentam dormência, endosperma reduzido ou grande infestação de microrganismos (Fay, 1992).

A germinação é considerada um dos mais críticos estádios do desenvolvimento vegetal, sendo caracterizada por processos fisio-metabólicos de natureza complexa, que levam à retomada do crescimento do eixo embrionário da semente e à protrusão da radícula no tegumento. Inicia-se com a absorção de água pela semente (embebição) e finaliza-se com o início da elongação do eixo embrionário, usualmente a radícula (Bewley & Black, 1994).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George, 1996).

A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é também importante na regulação da germinação *in vitro*. Sabe-se, hoje, que as giberelinas têm um papel chave neste processo, estando envolvidas tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento. Segundo Taiz & Zeiger (2004), a giberelina promove a produção e ou secreção de várias enzimas hidrolíticas envolvidas na solubilização de reservas das sementes, entre as quais, principalmente, a α -amilase.

O pH é considerado um fator crítico do meio de cultura (Murashige, 1974), influenciando na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (Grattapaglia & Machado, 1990). Usualmente, é ajustado numa faixa que varia de 5,0 a 6,5 (Pierik, 1987), para o crescimento adequado da maioria das espécies, sendo que, em níveis inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, geralmente, ocorre paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (Murashige, 1974).

Resultados de pesquisa preconizam o uso de reguladores vegetais como forma de acelerar e melhorar a germinação das sementes e também de promover o crescimento das mudas (Burns & Coggins, 1969; Abdalla *et al.*; 1978; Muller & Young, 1982 e Kiang, 1984).

Neste contexto, objetivou-se estudar o efeito do pH e de GA₃ na germinação *in vitro* de sementes de barbatimão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Frutos maduros de barbatimão foram coletados de populações naturais, em área de formação campestre com fisionomia de cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, região Sul do estado de Minas Gerais.

Após a coleta, as sementes foram retiradas manualmente dos frutos e, em seguida, selecionaram-se aquelas que apresentavam boa integridade física. Depois, as sementes foram transferidas para frasco de vidro transparente e armazenadas em geladeira, a 4°C, por 90 dias.

4.2 Efeito do GA₃ na germinação *in vitro*

Sementes descritas no item 4.1, em câmara de fluxo laminar, foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos e lavadas em água destilada por três vezes.

Foram testados cinco níveis de GA₃ (0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹) no meio de cultura MS, com 10,0 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar 6,0 g L⁻¹. O pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem, a 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento.

4.3 Influência do pH na germinação *in vitro*

O processo adotado para assepsia das sementes foi semelhante ao descrito no item 4.2.

Foram testados cinco níveis de pH (4,8; 5,2; 5,8, 6,2 e 6,8) no meio de cultura MS, suplementado com 10,0 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar 6,0 g L⁻¹.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento.

4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinquenta repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo uma semente em cada tubo. Os dados das variáveis avaliadas foram analisados por meio de regressão polinomial e pelo teste de médias Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do GA₃ na germinação *in vitro*

A partir do quinto dia após a inoculação, as sementes começaram a germinar, com o aparecimento da radícula. Não houve efeito significativo do GA₃, em todas as concentrações testadas, durante a germinação de sementes de barbatimão (p>0,05) (Tabela 1).

TABELA 1: Resumo da análise de variância de efeito do GA₃ na germinação *in vitro* de sementes de barbatimão. Lavras, UFLA, 2005.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	4	100,00 N.S.
Erro	20	190,00
C.V. (%)	17,23	

N.S. – Não significativo, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram encontrados por Cordeiro et al. (2002), que não encontraram diferença significativa na percentagem de germinação de sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber), quando inoculadas em meio MS com a metade da concentração de sais e na presença ou na ausência de 3,0 mg L⁻¹ de GA₃.

Pinheiro et al. (2001) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de GA₃ na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira e verificaram que a adição de 0,1 mg L⁻¹ desse regulador favoreceu o processo germinativo. No entanto, concentrações iguais ou superiores a 0,3 mg L⁻¹ provocaram uma diminuição na percentagem de germinação.

Mesmo não havendo efeito significativo do GA₃, verificou-se uma percentagem pouco maior de germinação (82%) quando se utilizou uma suplementação de GA₃ nestas sementes previamente armazenadas, ao passo que, na ausência do regulador de crescimento, a percentagem média de germinação obtida foi de 72% (Tabela 2).

TABELA 2: Porcentagem média de germinação de sementes de barbatimão para cada concentração de GA₃ acrescentada ao meio de cultura MS. UFLA, Lavras, 2005.

Tratamentos (mg L ⁻¹)	Germinação (%)
0	72
1	82
2	82
5	82
10	82

As giberelinas bioativas, como o GA₃, promovem a germinação de sementes em diversas espécies de plantas (Yamaguchi & Kamiya, 2002). Holey (1994) relata que o GA₃ promove a germinação da semente estimulando o crescimento do embrião e induzindo a produção de hidrolases para enfraquecer as estruturas ao redor do embrião.

Para Soares (2005), o GA₃ mostrou-se eficiente na germinação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes.), em que a maior porcentagem de germinação (90%) foi obtida em meio de cultura WPM, suplementado com 15,0 g L⁻¹ de sacarose e 0,2 mg L⁻¹ de GA₃, diferenciando-se significativamente do tratamento controle, no qual se encontravam ausentes a sacarose e o ácido giberélico, obtendo germinação de 55%.

Carmo et al. (2005) avaliaram o efeito de diferentes dosagens do GA₃ na germinação *in vitro* de sementes de antúrio e observaram que a maior taxa de germinação foi obtida utilizando-se 1,0 mg L⁻¹ do regulador de crescimento.

Barradas & Handro (1974) citam a necessidade da escarificação mecânica (retirada de uma parte do tegumento com auxílio de um bisturi) nas sementes de barbatimão, visando quebrar a dormência tegumentar relatada na espécie, e melhorar os resultados de germinação. Os resultados obtidos neste

experimento divergem destes pesquisadores, pois altas taxas de germinação foram obtidas sem que nenhum tipo de escarificação mecânica fosse realizado.

A ausência de efeitos significativos de GA₃ sobre a germinação do barbatimão indica a ausência de dormência embrionária e um balanço hormonal endógeno que não limita a germinação, pois as sementes germinaram bem, mesmo na ausência do regulador de crescimento. Entretanto, novas pesquisas devem ser conduzidas, buscando-se averiguar o possível efeito do resfriamento sobre o tegumento da semente, bem como sobre a mobilização de suas reservas e, conseqüentemente, na germinação de suas sementes.

Segundo Corder & Borges Junior (1999), a utilização de reguladores de crescimento pode afetar o vigor germinativo das sementes e promover a formação de plântulas anormais ou sua morte. No entanto, para todos os tratamentos utilizados neste experimento, não ocorreu a formação de plântulas anormais. O aspecto visual de germinação *in vitro* de sementes de barbatimão pode ser visualizado na Figura 1.

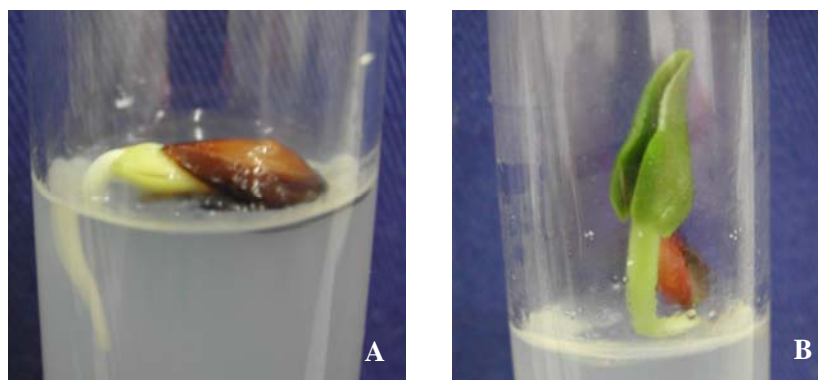


FIGURA 1. Aspecto visual do processo de germinação *in vitro* de sementes de barbatimão: (A) protrusão e alongação radicular e (B) alongação do epicótilo. UFLA, Lavras, 2005.

5.2. Influência do pH na germinação *in vitro*

Não houve diferença nos resultados obtidos nos diferentes níveis de pHs testados durante a germinação de sementes de barbatimão ($p > 0,05$) (Tabela 3).

TABELA 3: Resumo da análise de variância de influência do pH na germinação *in vitro* de sementes de barbatimão. Lavras, UFLA, 2005.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	4	466,00 N.S.
Erro	20	198,00
C.V. (%)	21,58	

N.S. – Não significativo, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Therios (1982), trabalhando com *Prunus amygdalus*, obteve resultados semelhantes aos deste experimento, constatando que estas sementes germinam em ampla faixa de pH, sem apresentar diferenças percentuais significantes.

Em relação a trabalhos em que se usou outro tipo de explante, os resultados foram iguais àqueles encontrados por Soares et al. (2005), que não verificaram influência do pH na germinação de grãos-de-pólen de bananeira quando seus valores situaram-se entre 5,8 e 7,0.

A maior porcentagem de germinação (76%) foi verificada em pH 6,8, enquanto a menor (50%) foi verificada em pH 4,8 (Tabela 4).

TABELA 4: Porcentagem média de germinação de sementes de barbatimão para cada concentração de GA₃ acrescentada ao meio de cultura MS. UFLA, Lavras, 2005.

Tratamentos (pH)	Germinação (%)
4,8	50
6,2	64
5,2	66
5,8	70
6,8	76

Mesmo não tendo sido detectados efeitos significativos, pode-se inferir que, para o barbatimão, valores mais elevados de pH são mais satisfatórios para promover a germinação de suas sementes. No entanto, provavelmente, valores acima de 6,8 modificarão muito a consistência do meio de cultura e dificultarão a germinação, uma vez que, neste pH, o meio de cultivo já se encontrava com uma consistência mais dura que aquelas geralmente utilizadas no cultivo *in vitro*. Sabe-se que o pH é um fator controlador das vias metabólicas e da permeabilidade das membranas celulares, uma vez que afeta inúmeras reações enzimáticas (Davis, 1980), além de afetar a disponibilidade dos nutrientes no meio de cultura, sobretudo dos íons fosfato.

6 CONCLUSÕES

- Altas taxas de germinação (82%) podem ser obtidas *in vitro* em meio de cultura MS sem adição de GA₃.
- As sementes de barbatimão apresentam a mesma porcentagem de germinação em faixas de pH de 4,8 a 6,8.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, K.M.; WAKEEL, A.T.; MASIRY, H.H.L. Effect of gibberellic acid on seed germination of some citrus rootstocks. **Research Bulletin, Ain Shans University, Faculty of Agriculture**, Cairo, n.944, p.25, 1978.

BARRADAS, M.M.; HANDRO, W. Algumas observações sobre a germinação da semente do barbatimão, *Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Mart. (Leguminosae-Mimosoideade). **Boletim de Botânica**, v.2, p.139-150, 1974.

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

BURNS, R.M.; COGGINS JR., C.W. Sweet orange germination and growth aided by water and gibberellin seed soak. **California Agriculture**, Oakland, v.23, n.12, p.18-19, 1969.

CARMO, D.O. do et al. Germinação *in vitro* de sementes de antúrio (*Anthurium andraeanum*). **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.604, ago. 2005. Suplemento.

CORDEIRO, I.M.C.C. et al. Germinação *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber). **Biociência**, v.27, p.58-61, jul./ago. 2002.

CORDER, M.P.M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v.9, n.2, p.1-7, 1999.

COUTO, J.M.do F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, set./out. 2004.

DAVIS, D.D. **Biochemistry of plants**. New York: Academic, 1980. v.2, p.581-611.

FAY, M.F. Conservation of rare and endangered plant using *in vitro* methods. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v.28, p.1-4, 1992.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.

HOOLEY, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.26, p.1529-1555, 1994.

KIANG, C.K. Effect of soil application of Promalin on the root growth of citrus seedlings. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Gainesville, v.96, p.56, 1984.

MULLER, J.A.; YOUNG, M.J. Influence of gibberellic acid and effectiveness of several carriers on growth of sour orange (*Citrus aurantium* L.) seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v.17, n.4, p.673-674, 1982.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants.** Dordrecht: M. Nyhoff, 1987. 344p.

PINHEIRO, C.S.R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.413-416, 2001.

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).** 2005. 122p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, T.L. et al. Influência do pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de bananeira. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.604, ago. 2005. Suplemento.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artemed. 2004. 719p

THERIOS, I.N. Effects of temperature, moisture stress and pH on the germination of seeds of almond (*Prunus amygdalus*). **Seed Science & Technology**, v.10, p.585-594, 1982.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellins and light-stimulated seed germination. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.20, p.369-376, 2002.

CAPÍTULO III

ORGANOGENESE DIRETA EM EXPLANTES CAULINARES DE BARBATIMÃO

1 RESUMO

NICIOLI, Patrícia Matile. Organogênese direta em explantes caulinares de barbatimão. In: _____. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap.3, p 32-49. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) destaca-se por possuir um grande potencial de utilização medicinal. Como suas sementes apresentam dormência, a propagação sexuada dessa espécie torna-se difícil, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas por via assexuada. Neste contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de cinetina na indução de brotações. Para isso, segmentos caulinares provenientes de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de cinetina (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura média de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons 36 μmol m⁻² s⁻¹. Aos 60 dias de inoculação, avaliaram-se o número de brotações e gemas e o comprimento da maior brotação. Para o enraizamento, o meio de cultura MS foi suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar, 0,1% de carvão ativado e diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (0,0; 1,0; 2,0, 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). As brotações permaneceram em sala de crescimento, com temperatura média de 25 ± 2°C, no escuro, por 15 dias, quando foram transferidas para meio MS com 50% da sua concentração original de sais, sem reguladores de crescimento, permanecendo no escuro por mais 30 dias. A concentração de 5,0 mg L⁻¹ de cinetina e a ausência do regulador foram os tratamentos mais eficientes na indução, respectivamente, de brotações e gemas, em segmentos caulinares. O maior comprimento das brotações foi verificado em meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de cinetina. A auxina ANA mostrou-se eficiente no enraizamento *in vitro* de brotações, tendo o maior número e comprimento de raízes sido observados em meio de cultura suplementado com 4,0 mg L⁻¹.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

NICIOLI, Patrícia Matile. Direct organogenesis in stem explants of barbatimão. In: _____. **Micropropagation and phytochemical aspects of callus of barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap.3, p.32-49. Dissertation (Master in Agronomy. Plant Physiology)-Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] stands out for having a great potential in medicinal properties. Sexual propagation for this species is difficult due to the presence of seed dormancy and a need to obtain plants by asexual means is an important process. In this context, *in vitro* culture techniques are alternatives to be considered. The objective of the present work was to evaluate the effect of different concentrations of kinetin in shoot induction. Stem segments obtained from seedlings germinated *in vitro* were inoculated in MS medium, supplemented with different kinetin concentrations (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg L⁻¹), 30.0 g L⁻¹ sucrose and 6.0 g L⁻¹ agar. The pH was adjusted for 5.8. After the inoculation, the explants were maintained in a growth room under the temperature of 25 ± 2° C, under photoperiod of 16 h and 36 μmol m⁻² s⁻¹ irradiance of photons. After 60 days of inoculation, the number of shoots, buds and the length of higher shoot were evaluated. For rooting, MS medium was supplemented with 30.0 g L⁻¹ sucrose, 6.0 g L⁻¹ agar, 0.1% activated charcoal and different concentrations of NAA (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹). The shoots were maintained in a growth room under the temperature of 25 ± 2° C, in the dark, for 15 days after which they were transferred to MS medium with 50% of its original salt concentration, without growth regulators, and maintained in the dark for 30 more days. The 5.0 mg L⁻¹ kinetin concentration and the regulator absence were the most efficient treatments in the induction, respectively, of shoots and buds, in stem segments. The longer shoot length was verified in the culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ kinetin. The auxin NAA showed to be efficient on the *in vitro* rooting of shoots, with higher number and length of the roots been observed in the presence of 4.0 mg L⁻¹.

¹ Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co- Adviser).

3 INTRODUÇÃO

O barbatimão é uma espécie arbórea de ampla ocorrência nos cerrados. Apresenta grande valor medicinal e é empregado na recuperação de áreas degradadas podendo, ainda, ser utilizado com sucesso no paisagismo. Entretanto, seu extrativismo predatório vem aumentando a cada ano, o que está contribuindo significativamente para a diminuição das populações naturais da espécie.

A irregularidade na germinação de suas sementes dificulta a obtenção de mudas. Além disso, o desenvolvimento das mudas e das plantas no campo ocorre de maneira lenta e bastante heterogênea (Lorenzi, 2000).

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação de espécies vegetais. Dentre essas técnicas, a micropropagação é a mais utilizada para a multiplicação em larga escala de clones selecionados (Grattapaglia & Machado, 1998), sendo esta uma técnica promissora para a propagação do barbatimão.

A micropropagação pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática. Na organogênese ocorre a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. A embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* (Ahuja, 1992). Segundo George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares, como no cultivo de segmentos nodais. Neste caso, ocorre a inoculação de uma gema, juntamente com uma porção de caule, para se obter um broto a partir desta (Pierik, 1990). Esta técnica tem sido a mais empregada para micropropagação de espécies lenhosas. Soares (2005), Decchetti et al. (2005), Soares (2003), e

Santana (2003) utilizaram esta técnica para micropropagar mangaba, *Annona glabra* L., ingá e algumas espécies de *Annonaceae*, respectivamente.

O crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (George, 1996).

Dentre esses reguladores, temos as citocininas, que são responsáveis por superar a dominância apical e liberar gemas laterais da dormência (George, 1996), como é o caso da cinetina.

De acordo com Preece (1995), as citocininas têm função primordial na divisão celular e atuam também na quebra da dominância apical e na indução e crescimento de brotações. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam, ainda, que o tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Além das citocininas, as auxinas representam outro grupo de reguladores de grande importância na cultura de tecidos, sendo utilizado, sobretudo, para indução de enraizamento *in vitro*. As auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Assis & Teixeira, 1998). Contudo, as respostas às auxinas não são universais. Certas espécies enraízam com dificuldade, ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso delas no seu enraizamento (Rohr & Hanus, 1987).

França et al. (1995) desenvolveram um protocolo para micropropagação de *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão), a partir de segmentos nodais, com a utilização de 13,3 µM de BAP, 0,006 µM de AIA + 8,88 µM de BAP e 0,006 µM de AIA + 0,04 µM de BAP, induzindo, respectivamente, a formação de 3,6 brotos/explante, com 3,5 raízes/explante com 25 mm de comprimento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de cinetina na organogênese direta a partir de segmentos nodais de barbatimão e

de ANA no enraizamento *in vitro* das brotações obtidas. Dessa forma, espera-se oferecer uma contribuição para o desenvolvimento da cultura do barbatimão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito da cinetina na indução de brotações em segmentos caulinares

Plântulas provenientes de germinação *in vitro* (Capítulo II) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos caulinares contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de cinetina (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹) e 30,0 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C de temperatura, irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliados os números de brotações, o comprimento e o número de gemas da maior brotação, aos 60 dias de cultivo.

4.2 Efeito do ANA no enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS com 50% de sua concentração original e com diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e 30,0 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C de temperatura e na ausência de luz, por 15 dias. Decorrido esse período, foram transferidos para meio de cultura MS com 50% de sua concentração original, sem reguladores de crescimento e com 0,1% de carvão

ativado, permanecendo por mais 30 dias em ambiente escuro. As avaliações foram feitas 30 dias após a segunda inoculação, sendo avaliados o número e o comprimento da maior raiz. Após as avaliações, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, por mais 30 dias, até a total recuperação de sua parte aérea, pois ocorreu queda de todas as suas folhas durante o período de permanência no escuro.

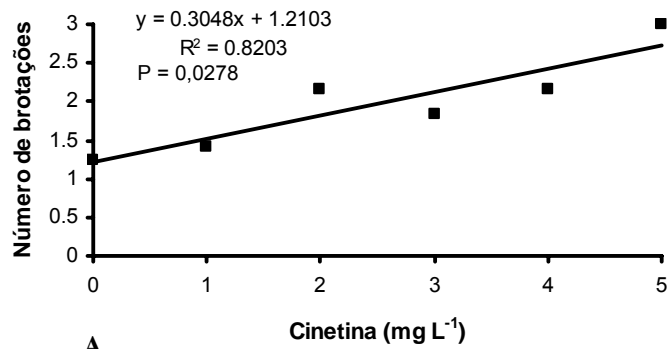
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento, para o experimento de indução de brotações e com 10 repetições por tratamento para o experimento de enraizamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados das variáveis avaliadas foram analisados por meio de regressão polinomial e pelo teste de médias Tukey, a 5% de probabilidade.

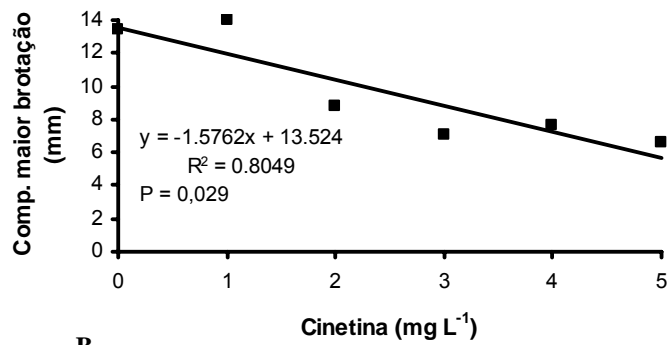
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da cinetina na indução de brotações em segmentos caulinares

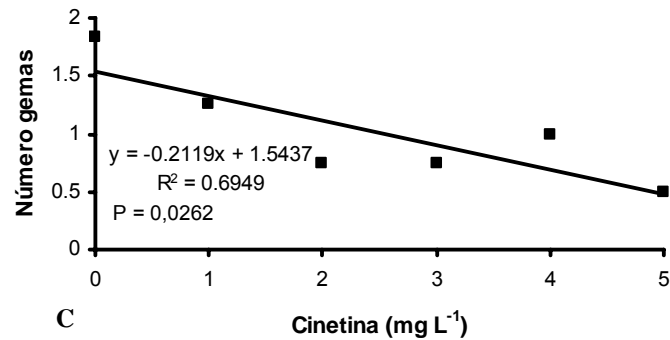
Em todas as variáveis analisadas (número de brotações, comprimento e número de gemas da maior brotação) foram encontradas diferenças significativas para as diferentes concentrações de cinetina ($p < 0,05$) (Figura 1).



A



B



C

FIGURA 1. Número médio de brotações (A), comprimento da maior brotação (B) e número de gemas (C) nos explantes caulinares de barbatimão para cada concentração de cinetina acrescentada ao meio de cultura MS. UFLA, Lavras, 2005.

Para o número de brotações (Figura 1A), conforme se aumentou a concentração de cinetina acrescida ao meio de cultura, aumentou-se o número de brotações formadas. Na concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina ocorreu, em média, a formação de três brotos por explante.

Além disso, em todos os tratamentos em que se empregou cinetina, verificou-se a formação de calos na base do explante (Figura 2).



FIGURA 2. Aspecto visual de brotações de barbatimão obtidas de segmentos nodais inoculados em meio MS contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ cinetina. UFLA, Lavras, 2005.

A menor taxa de proliferação de brotos ocorreu no meio sem adição de cinetina (1,25 brotos por explante). No entanto, à medida que se aumentou a concentração de cinetina, aumentou o número de brotos formados (Figura 1A).

Para comprimento da maior brotação, destaca-se o resultado encontrado quando utilizou-se dose baixa (1 mg L^{-1}) ou a ausência de cinetina, que promoveu crescimento médio de 14 e 13,4 mm, respectivamente (Figura 1B). Pasqual (2001) cita que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações, estimular a ocorrência de hiperidricidade e a formação de folhas anormais.

Para a variável número de gemas na maior brotação, o tratamento em que não foi utilizada cinetina diferiu dos demais, formando, em média, 1,83 gemas por brotação (Figura 1C).

Os resultados obtidos indicam que concentrações mais elevadas de cinetina são eficientes para aumentar o número de brotações, enquanto que, a ausência deste regulador no meio é fundamental para promover alongamento e aumento no número de gemas no explante. Assim, os resultados demonstram a eficiência da cinetina para a indução de brotações e, posteriormente, a transferências destas para meio sem regulador de crescimento, visando seu alongamento e aumento no número de gemas.

Segundo Gomes (1999), Gomes (2003), para desencadear um processo morfogênético, é necessário, na maioria dos casos, adicionar reguladores de crescimento ao meio nutritivo. No barbatimão não foi diferente, mostrando a importância da adição destes reguladores ao meio de cultura visando à proliferação de novos brotos.

Outros reguladores de crescimento já se mostraram eficientes também para a proliferação de gemas do barbatimão. Pasqual & Barros (1992) relataram que o melhor resultado para a proliferação de gemas em segmentos nodais de barbatimão foi obtida com a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP.

Em relação a trabalhos com outras espécies, os resultados obtidos neste experimento divergem dos de Dzazio et al. (2002) e Gray & Benton (1991), que observaram que o uso de cinetina não foi efetivo na indução de brotos em videira.

Da mesma forma, Barboza et al. (2004), trabalhando com diferentes concentrações de cinetina, interagidas ou não com ANA ou AIA, não observaram aumento substancial na taxa de multiplicação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. Estes resultados são semelhantes aos de Hirimburegama & Wijeshinghe (1992), que conseguiram maior

proliferação de gemas em meio de cultura contendo BAP a 2,25 mg L⁻¹ do que com cinetina a 2,15 mg L⁻¹.

Já Sabá et al. (2002) mostrou que a combinação de cinetina e zeatina foi eficiente para a proliferação de brotos de jaborandi a partir de segmento apical, produzindo, em média, 3,0 brotos por explante, com 7,2 mm de comprimento. Entretanto, quando se utilizou segmento nodal como explante inicial, este apresentou 1,0 broto por explante, com tamanho médio de 1,3 mm.

Contudo, em barbatimão, a cinetina mostrou-se indispensável para a proliferação de novos brotos, pois, na medida em que aumentou a sua concentração no meio de cultura, aumentou o número de novos brotos formados até a concentração de 5,0 mg L⁻¹. Desse modo, esses resultados indicam a necessidade de novos testes com outras citocininas e com doses superiores de cinetina para verificar até quanto o balanço hormonal interno da espécie não será afetado a ponto de reduzir o número de brotações formadas.

Ao contrário, para o alongamento das brotações e indução de novas gemas, não há necessidade de se adicionar cinetina ao meio de cultura. Os resultados demonstram, ainda, alta sensibilidade do barbatimão à adição de cinetina ao meio de cultura, afetando, sobretudo, o comprimento das brotações.

4.2 Efeito do ANA no enraizamento *in vitro* de brotações

As diferentes concentrações de ANA utilizadas influenciaram significativamente o número e o comprimento da maior raiz nas brotações de barbatimão ($p < 0,05$) (Figura 3).

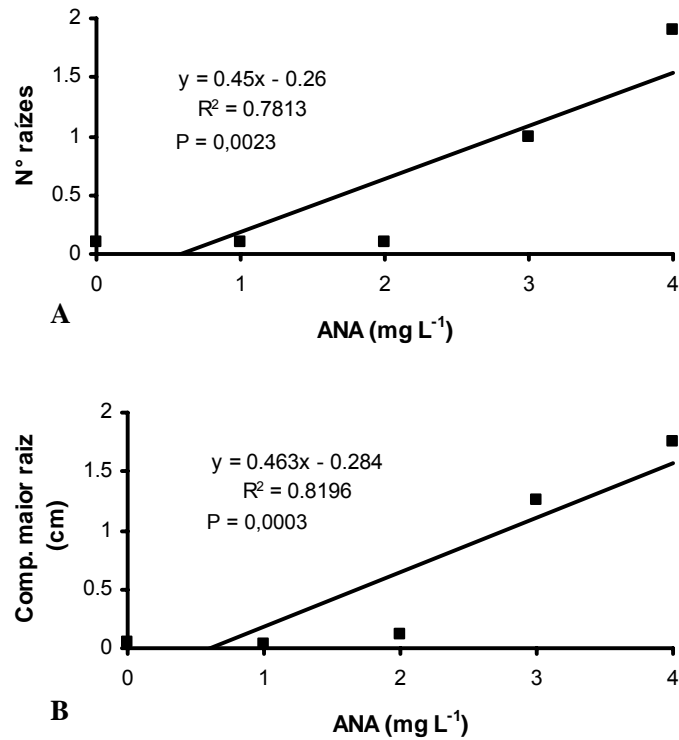


FIGURA 3. Número médio de raízes (A), comprimento da maior raiz (B) nas brotações de barbatimão para cada concentração de ANA acrescentada ao meio de cultura MS. UFLA, Lavras, 2006.

As concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de ANA promoveram os melhores resultados para ambos os parâmetros, formando 1,0 e 1,9 raiz por brotação, com 1,25 e 1,76 cm de comprimento, respectivamente.

Nos tratamentos sem o regulador de crescimento e com 1 e 2 mg L⁻¹ de ANA observou-se formação muito baixa de raízes (em média, 0,1 raiz por brotação, nos três tratamentos) e estas apresentavam-se mais curtas (em média, 0,05, 0,04 e 0,11 cm, respectivamente) quando comparadas com os valores

obtidos nos demais tratamentos (Figuras 3A e 3B). Este resultado sugere que os teores endógenos de auxinas, presentes no explante de barbatimão, não foram suficientes para promover a rizogênese em níveis satisfatórios para a aclimatização. Segundo Kulescha (1988), o nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz à formação de raízes.

Os resultados deste experimento estão de acordo com os encontrados por Lima (2004), que constatou melhor eficiência do ANA a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ sobre o número e comprimentos de raízes em sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). Já Soares (2005) relatou que a auxina ANA, em todas as concentrações testadas, não proporcionou a formação de raízes nas brotações de mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES).

Araújo et al. (2002) verificaram que a utilização de $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, acrescidos ao meio de cultura MS, viabilizou o início do processo de rizogênese *in vitro* de babosa (*Aloe vera*). Também Moura et al. (2001) estudaram o efeito de 1 mg L^{-1} de ANA no enraizamento de *Citrus* e obtiveram um índice de 80% de enraizamento dos brotos.

A utilização do ANA, em concentrações variando de $0,5$ a 5 mg L^{-1} , também foi fundamental para enraizar brotos de laranja-doce 'Pineapple', com índice de 85% (Duran-Vila et al., 1989); de lima ácida 'Galego', com 70% (Peres-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997) e citrange 'Troyer', com 86% (Moreira-Dias et al., 2000).

Vale ressaltar que, durante o período de permanência dos explantes na presença de luz (depois de enraizados), o número e o comprimento da maior raiz aumentaram consideravelmente em todos aqueles tratamentos em que o processo de rizogênese já tinha iniciado, atingindo 10 raízes com 9,0 cm, em média, por brotação. O aspecto do enraizamento do barbatimão pode ser visto na Figura 4.



FIGURA 4. Aspecto do enraizamento *in vitro* de brotações de barbatimão obtidas de segmentos caulinares após 30 dias de permanência em presença de luz. UFLA, Lavras, 2006.

Outras auxinas também têm sido utilizadas com a finalidade de promover maior eficiência no processo de formação de raízes. Erig & Schuch (2004), trabalhando com marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), verificaram que o AIB, ANA e AIA apresentaram o mesmo efeito sobre a percentagem de enraizamento *in vitro*, obtendo-se o melhor resultado com $2,03 \text{ mg L}^{-1}$, $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,75 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Para algumas espécies, a adição de auxinas ao meio de cultura visando o enraizamento não é necessária, pois a síntese deste hormônio pela espécie já é suficiente para que este processo ocorra. No entanto, para o barbatimão, isso não foi verificado. Segundo Coll et al. (1988), as partes aéreas são fontes de intensa produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimularia a rizogênese.

Cuzzuol et al. (1996) testaram os efeitos de ANA, AIA e AIB no enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Esses autores verificaram que as três auxinas, em todas as concentrações testadas, promoveram satisfatoriamente a rizogênese do cravo *in vitro*, porém sem diferença significativa tanto para concentração quanto para os tipos de reguladores de crescimento. Isso permitiu concluir que o enraizamento desta espécie pode ser obtido sem a suplementação do meio de cultivo com auxina. Da mesma maneira,

Barboza et al. (2004) obtiveram 100% de brotos de abacaxi PexSC52 enraizados quando cultivados em meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de ANA, 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de cinetina e na ausência de qualquer fitorregulador.

Estudos sobre o enraizamento *in vitro* são de fundamental importância para a micropropagação de uma espécie, pois a formação de raízes bem desenvolvidas é de grande importância para a sobrevivência e a adaptação das plântulas cultivadas *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

- A concentração de 5,0 mg L⁻¹ de cinetina é a mais eficiente na indução de multibrotações a partir de segmentos nodais.
- A ausência de cinetina favorece o aumento no número de gemas e o alongamento das brotações.
- A concentração de 4,0 mg L⁻¹ de ANA induz maior número e comprimento de raízes nesta espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, M.R. **Micropropagation of woody plants**. London: Kluwer Academic, 1992. v.41, 507p.

ARAÚJO, P.S. et al. Micropropagação de babosa (*Aloe Vera-Liliaceae*). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.25, p.54-57, mar./abr. 2002.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.261-296.

BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.725-733, ago. 2004.

COLL, J.B. et al. **Fisiologia vegetal**. 6.ed. Madri: Pirâmide, 1988. Cap.8, p.569-570. (Morfogêneses).

CUZZUOL, G.R.F; GALLO, L.A; CROCOMO, O.J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agricola**, v.53, n.1, p.60-66, jan./abr. 1996.

DECCETTI, S.F.C. et al. La micropropagation d' *Annona glabra* L. à partir de segments nodaux.. **Fruits**, v.60, p.319-325, 2005.

DURAN-VILA, N.; ORTEGA, N.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of three citrus species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.16, p.123-133, 1989.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.759-764. dez. 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1443-1449, set./out. 2004.

FRANÇA, S.C. et al. Micropropagation of *Stryphnodendrons polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.291-293, 1995.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 - the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574p.

GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GOMES, G.A.C. et al. Plant regeneration from callus culture of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. ***In vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Wallingford, UK, v.39, n.3, p.293-295, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

GRAY, D.J.; BENTON, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.27, n.1, p.7-14, 1991.

HIRIMBUREGAMA, K.; WIJESINGHE, L.P.J. *In vitro* growth of *Ananas comosus* L. Merr. (pineapple) shoot apices on different media. **Acta Horticulturae**, n.319, p.203-208, 1992.

KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.63-71, 1988.

LIMA, E.C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Cróton urucurana* BAILL.)**. 2004. 105p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v.1, 370p.

MOREIRA-DIAS, J.M. et al. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Trayer citrange differ in hormone requirements and their response to light. **Annals of Botany**, London, v.85, p.103-110, 2000.

MOURA, T.L. de et al. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento de explantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.23, n.2, p.240-245, ago. 2001.

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

PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito do ácido naftaleno acético e da 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.7, p.1017-1019, jul. 1992.

PERES-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Mandarin by direct organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.5, p.931-934, 1997.

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

PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, n.1, v.1, p.26-37, 1995.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Foresty Research**, Ottawa, v.17, n.5, p.418-420, May 1987.

SABÁ, R.T. et al. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.106-109, mar. 2002.

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

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes.)**. 2005. 121p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, G.de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* WILLD. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. PENN.]**. 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO IV

INDUÇÃO DE CALOS E AVALIAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E TANINOS TOTAIS EM SEGMENTOS NODAIS DE BARBATIMÃO

1 RESUMO

NICIOLI, Patrícia Matile. Indução de calos em segmentos nodais de barbatimão e avaliação dos teores de fenóis e taninos totais. In: _____. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap.4, p.50-71. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Nos últimos anos, tem crescido o interesse por substâncias químicas, como os taninos, extraídas de plantas, para a utilização na fabricação de medicamentos, inseticidas, entre outros. O barbatimão apresenta casca rica em taninos, no entanto, com o extrativismo predatório, as populações naturais desta espécie vem diminuindo. Neste contexto, o crescimento contínuo de culturas de tecidos organizados resulta em um sistema biológico bastante eficiente para a produção de metabólitos secundários. O objetivo deste trabalho foi obter calos a partir de segmentos nodais da espécie e avaliar os teores de fenóis e taninos totais nos calos produzidos. Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais de barbatimão medindo 1cm de comprimento. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar e diferentes combinações de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Utilizaram-se diferentes combinações de picloram (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e cinetina (0,0 e 0,1 mg L⁻¹). Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento à temperatura média de 25 ± 2°C no escuro, por 60 dias. Após, avaliaram-se a matéria fresca dos calos e os teores de fenóis e taninos totais. Os fenóis totais foram determinados por meio do método de Folin-Dennis, segundo as normas da AOAC (1970) e, para a quantificação dos taninos totais, empregou-se o “Método da Difusão Radial”, proposto por Hagerman (1987). Os resultados demonstraram que calos induzidos na presença de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de picloram apresentaram maiores valores de matéria fresca, com 0,120 e 0,116 g, respectivamente. Maiores teores de fenóis totais foram verificados em calos crescidos na ausência de reguladores de crescimento (9,58%) e na presença de 0,1mg L⁻¹ de cinetina (9,23%). Em relação aos taninos totais, maiores rendimentos foram observados em calos induzidos na ausência de reguladores de crescimento (2,36%) e na presença de 2,0 mg L⁻¹ de picloram (1,71%).

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

NICIOLI, Patrícia Matile. Callus induction in barbatimão's nodals segments and the evaluation of total phenols and tannins level. In: _____. **Micropropagation and phytochemical aspects of callus of barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap.4, p.50-71. Dissertation (Master in Agronomy. Plant Physiology)-Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

In recent years, the needs for chemical substances such as tannins, extracted from plants for preparation of medicines, insecticide among others has increased. Barbatimão presents a bark rich in tannins; however its predatory use has decreased the natural population of the species. In this context, the increased use of tissue culture has provided an efficient biological system for the production of secondary metabolites. The objective of this work was to obtain callus from nodal segments and to evaluate their levels of total phenol and tannin. Nodal segments with approximately 1cm length were used as explants. The explants were inoculated in MS medium, supplemented with 30.0 g L⁻¹ sucrose, 6.0 g L⁻¹ agar and different combinations of growth regulators. The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. Different combinations of picloram (0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) and kinetin (0.0 and 0.1 mg L⁻¹) were tested. After the inoculation, the explants were maintained in a growth room at 25 ± 2° C temperature in the dark, for 60 days after which, callus fresh matter and total phenols and tannins levels were evaluated. Total phenol was obtained using the Folin-Dennin method, following the AOAC (1970) rules and for total tannin determination, the "Radial Difusion Method" proposed by Hagerman (1987) was used. The results demonstrated that callus induced in the presence of 0.5 and 2.0 mg L⁻¹ picloram showed higher values of fresh matter, 0.120 and 0.116 g, respectively. The higher levels of total phenols were found in growing callus in the absence of growth regulators (9.58%) and in the presence of 0.1 mg L⁻¹ kinetin (9.23%). In relation of total tannins, higher yield were observed in callus induced in the absence of growth regulators (2.36%) and in the presence of 2.0 mg L⁻¹ picloram (1.71%).

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co- Adviser).

3 INTRODUÇÃO

A cultura de calos tem tido grande importância para a propagação *in vitro* em larga escala de diversas espécies vegetais. O calo é uma massa de células que se proliferam desordenadamente, formando um tecido mais ou menos organizado que, geralmente, surge sobre feridas de órgãos e tecidos diferenciados. Os calos se desenvolvem a partir de um pequeno pedaço de órgão de determinada planta e têm a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras (Paiva & Paiva, 2001; Pierik, 1990; Torres & Caldas, 1990).

De acordo com França (1999), um considerável esforço tem sido feito com o intuito de produzir fitoterápicos a partir de plantas com substâncias ativas, que tenham sido acumuladas em cultura de células ou tecidos de plantas.

A curva de crescimento do calo segue uma curva padrão sigmoideal com cinco fases: lag, exponencial ou log, linear, desaceleração e estacionária. Segundo Smith (1992), a fase lag é o período em que as células do explante acumulam mais matéria fresca e seca; a log é o momento de máxima divisão celular; na fase de crescimento linear, ocorre uma diminuição nas divisões celulares e as células crescem, aumentando a área; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, devido à redução de nutrientes, à produção de produtos tóxicos, à secagem do ágar e à redução do oxigênio no interior das células e na fase estacionária é quando ocorre o menor crescimento celular e, geralmente, o maior acúmulo de metabólitos secundários (Lameira, 1997).

Vietz & San-José (1996) relatam que o balanço de fitorreguladores provenientes dos níveis de auxinas e citocininas, exógenas e endógenas à planta, é capaz de estimular a proliferação celular. Os efeitos dos reguladores de crescimento de plantas sobre a produção de metabólitos secundários são

complexos e um pouco contraditórios (Kinnersley & Dougall, 1980 e Ozeki & Komamine, 1981).

Segundo Huetteman & Preece (1993), o crescimento de calos é desejável para estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular.

Dentre as espécies utilizadas na extração de taninos, destaca-se o barbatimão, que apresenta casca rica em taninos (20% a 30% de taninos totais). Os taninos são metabólitos secundários de natureza fenólica, em geral polifenóis de alto peso molecular e estrutura química variável. Possuem atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória (Pinto & Bertolucci, 2002).

O extrativismo predatório vem destruindo as populações naturais de barbatimão, havendo a necessidade de pesquisar novos métodos de produção destes compostos sem que haja a necessidade de destruir as plantas.

O crescimento contínuo de culturas de tecidos organizados resulta em um sistema biológico bastante eficiente para a produção de metabólitos secundários, que são sintetizados nos diversos órgãos da planta intacta. Entretanto, as chances da cultura de órgãos serem usadas industrialmente são reduzidas, devido ao crescimento lento e à relativa dificuldade de manipulação. De acordo com Barrueto Cid (1998), uma das vantagens da utilização de técnicas da cultura de tecidos na produção de metabólitos secundários é a facilidade de extração e isolamento, comparada a plantas inteiras, pois cultura de calos e células permite a obtenção de material uniforme, com menor teor de clorofila e lignificação.

Considerando a variabilidade de biossíntese e o acúmulo de determinados princípios ativos quando a planta interage com o meio, somados à utilização da flora medicinal pela indústria farmacêutica, tornam-se fundamentais o estudo e o estabelecimento de protocolos de cultivos que permitam uma maximização de

produção de metabólitos secundários, bem como o aumento da utilização racional das plantas medicinais.

Devido à existência de poucas informações relacionadas à produção *in vitro* de metabólitos secundários, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de picloram e cinetina na calogênese em segmentos nodais de barbatimão e, posteriormente, averiguar os teores de fenóis e de taninos totais nos calos formados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito do picloram e da cinetina na indução de calos em segmentos nodais

As plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* (Capítulo II) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de picloram e cinetina (Tabela 1), além de 30,0 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar e o pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem.

A incubação foi realizada no escuro, à temperatura de 25 ± 2^oC.

A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação, verificando-se a matéria fresca dos calos nos diferentes tratamentos.

TABELA 1. Tratamentos utilizados para a indução de calos em segmentos nodais de barbatimão, em função da combinação de picloram + cinetina, no meio de cultura MS. Lavras, UFLA, 2005.

Tratamentos	Picloram (mg L ⁻¹)	Cinetina (mg L ⁻¹)
T0	0,0	0,0
T1	0,0	0,1
T2	0,5	0,0
T3	0,5	0,1
T4	1,0	0,0
T5	1,0	0,1
T6	2,0	0,0
T7	2,0	0,1

4.2 Avaliação dos teores de fenóis e taninos totais

O estudo fitoquímico foi baseado na determinação dos teores de fenóis e de taninos totais em calos de barbatimão, obtidos conforme descrito no item 4.1. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS).

4.2.1 Preparo dos extratos

Amostras com pesos variáveis de calos liofilizados e do explante inicial (EI - segmentos nodais oriundos de germinação *in vitro*) foram triturados em graal, com 10 mL de uma mistura de metanol:água (1:1). Posteriormente, o material foi deixado em maceração por quatro horas, à temperatura ambiente e sob agitação por 30 minutos, em agitador magnético. Após, o extrato foi filtrado para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol:água (1:1).

a) Fenóis totais

Uma alíquota de 300 µL do extrato foi utilizada para a determinação dos teores de fenóis totais, pelo método de Folin-Dennis, segundo as normas da

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1970). As determinações foram realizadas em triplicata e o resultado foi expresso em percentagem de ácido tânico, por grama de calo liofilizado.

b) Taninos totais

A determinação dos teores de taninos totais foi realizada por meio do “Método de Difusão Radial”, segundo Hagerman (1987).

Um volume de 2 mL do extrato, previamente preparado para a determinação dos fenóis totais, foi concentrado a 50°C e, posteriormente, retomado com 0,2 mL de uma mistura metanol:água (1:1). Uma alíquota de 15 µL foi utilizada para o doseamento. Todas as determinações foram feitas em duplicata. O resultado foi expresso em percentagem de tanino por grama de calo liofilizado.

4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, constituído de quinze repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, contendo um explante cada.

Para a comparação dos contrastes entre médias dos tratamentos utilizou-se o teste Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do picloram e da cinetina na indução de calos em segmentos nodais

A calogênese iniciou-se ao longo da segunda semana de cultivo, em todos os tratamentos utilizados. Os valores referentes à matéria fresca dos calos encontram-se expressos na Tabela 2.

TABELA 2. Matéria fresca de calos de barbatimão obtidos de segmentos nodais na presença de picloram e cinetina. UFLA, Lavras, 2005.

Tratamentos	Matéria fresca dos calos (g)
Picloram (0,5mg L ⁻¹)	0,120 a
Picloram (2,0,mg L ⁻¹)	0,116 a
Picloram (0,5 mg L ⁻¹) + cinetina (0,1 mg L ⁻¹)	0,095 a
Picloram (1,0 mg L ⁻¹) + cinetina (0,1 mg L ⁻¹)	0,088 a
Picloram (2,0 mg L ⁻¹) + cinetina (0,1 mg L ⁻¹)	0,077 b
Picloram (1,0 mg L ⁻¹)	0,076 b
Cinetina (0,1 mg L ⁻¹)	0,055 b
Controle	0,033 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

Verifica-se que meios suplementados com picloram nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ e com picloram (0,5 e 1,0 mg L⁻¹) associado com 0,1 mg L⁻¹ de cinetina induziram a formação de calos com maiores valores de matéria fresca, quando comparados aos demais tratamentos testados. Meios contendo alta concentração de picloram (2,0 mg L⁻¹), associado com cinetina (0,1 mg L⁻¹) ou com concentração intermediária de picloram (1,0 mg L⁻¹) e aqueles suplementados apenas com 0,1 mg L⁻¹ de cinetina, induziram calos com valores de matéria fresca semelhantes àqueles obtidos na ausência dos reguladores testados (p<0,05).

A escolha dos explantes utilizados neste experimento partiu do pressuposto de que os tecidos jovens, não lignificados, geralmente, são mais apropriados para a cultura de tecidos. Conforme envelhece o órgão do qual se retira o explante, o número de divisões celulares e a capacidade de regeneração diminuem (Pierik, 1990). Além disso, um explante com células jovens (meristemáticas) apresenta um grande potencial para iniciar a proliferação

celular rapidamente, quando comparado com tecidos em que há presença de células diferenciadas (Soares, 2003). Diante disso, os segmentos nodais jovens de barbatimão mostraram-se eficientes na formação e na proliferação de calos.

Apesar dos tratamentos 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de picloram, 0,5 mg L⁻¹ de picloram + 0,1 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 mg L⁻¹ de picloram + 0,1 mg L⁻¹ de cinetina induzirem calos com os mesmos valores de matéria fresca (p<0,05), observou-se que, na prática, o mais viável economicamente, para a produção de calos com maiores valores de matéria fresca (0,120 g) é a utilização de meio de cultivo MS suplementado com a auxina picloram, na concentração de 0,5 mg L⁻¹. O aspecto visual desse calo formado pode ser observado na Figura 1.



FIGURA 1. Aspecto visual do calo formado em segmentos nodais de barbatimão na presença de 0,5 mg L⁻¹ de picloram. UFLA, Lavras, 2005.

Pesquisas realizadas por Hagen et al. (1990) também evidenciaram a eficiência do picloram, na concentração de 2,4 mg L⁻¹, na indução de calos em batata.

As auxinas são muito utilizadas em trabalhos de micropropagação, sendo incorporadas ao meio de cultura para promover formação de calos, crescimento de células em suspensão, órgãos e regulação da morfogênese, especialmente quando associada à citocinina. A escolha dos compostos e a concentração necessária dependem do tipo de crescimento ou desenvolvimento necessário, do nível da auxina endógena do explante, da capacidade do tecido cultivado de

sintetizar auxina naturalmente e da interação entre a auxina sintética aplicada e da auxina endógena (George, 1993).

Diante do resultado exposto, foi constatado que, para o barbatimão, a quantidade endógena de hormônios proporcionou suporte suficiente para a indução de calo, pois, na ausência dos reguladores, houve formação de calos, mesmo que com menores valores de matéria fresca. Entretanto, é imprescindível a suplementação do meio nutritivo com reguladores de crescimento visando otimizar a produção de matéria fresca do mesmo. Esta constatação é relatada por Vietz & San-José (1996), os quais mencionaram que, em muitos casos, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a calogênese.

A interação entre auxinas e citocininas também tem sido responsável por bons resultados em relação à indução e à elevação nos valores da matéria fresca dos calos formados. Em *Rudgea jasminoides*, Stella & Braga (2002) verificaram que meios MS, suplementados com 0,48 mg L⁻¹ de cinetina, associados à mesma concentração de picloram, induziram maior ocorrência de calos. Vários trabalhos têm demonstrado também, que certos grupos de plantas respondem mais facilmente em culturas *in vitro* que outros. Estas diferenças mostram que as condições ideais para o cultivo *in vitro* variam com o genótipo em estudo (Ammirato, 1986).

Rosal (2004), utilizou segmentos foliares jovens, oriundos de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro* e *seedlings* como explantes em um trabalho de indução de calos em candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish). Esta autora chegou à conclusão de que os *seedlings* foram os mais responsivos à porcentagem de cobertura dos explantes por calos na presença de 1,0 mg L⁻¹ de picloram + 0,5 mg L⁻¹ de cinetina, que não diferiu estatisticamente do tratamento que continha 1,0 mg L⁻¹ de picloram + 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Para os explantes foliares, a maior formação de calos foi verificada no meio contendo 1,0 mg L⁻¹

de picloram + 0,5 mg L⁻¹ BAP, com 40%, em média. A autora também estudou o efeito de outra auxina (2,4-D), em combinação ou não com as citocininas BAP e cinetina, para a mesma variável analisada anteriormente. Concluiu que o picloram, em geral, apresenta melhores respostas para a formação de calos em comparação ao 2,4-D. Resultados semelhantes foram obtidos por Kaur & Kothari (2004), que testaram o 2,4-D e o picloram, isolados ou em combinação com cinetina, para avaliar a influência deste regulador na indução e na regeneração de calos em *Paspalum scrobiculatum* L.. Estes autores demonstraram superioridade do picloram em comparação ao 2,4-D na indução e na regeneração de calos de *Paspalum scrobiculatum* L..

Flores et al. (1998) testaram seis concentrações (0; 0,66; 1,33; 2,0; 2,65 e 3,31 mg L⁻¹) de 2,4-D ou (0; 0,72; 1,45; 2,17; 2,90 e 3,62 mg L⁻¹) de picloram na indução de calogênese em duas cultivares de morangueiro (Konvoy-Cascata e Chandler). Eles observaram a formação de calos em todos os tratamentos, exceto naqueles isento de auxinas. Ambas as auxinas mostraram o mesmo efeito no crescimento dos calos da referida cultivar, sendo que a maior intensidade de calo foi obtida com 10,5 µM (de 2,4-D ou picloram), decrescendo em concentrações superiores. Figueiredo et al. (2000) trabalharam com explantes foliares de *Rollinia mucosa* para a indução de calos em regime de ausência de luz. Estes autores testaram diversos reguladores de crescimento (2,4-D, BAP, ANA e GA₃) e quatro níveis de picloram e concluíram que o meio acrescido de 5,1 mg L⁻¹ de picloram foi o que respondeu melhor ao acúmulo de massa fresca e seca.

Segundo Pierik (1990), no processo de calogênese, o incremento exógeno de reguladores é, frequentemente, indispensável na indução de calos em qualquer explante. Este requerimento exógeno de fitorreguladores (tipo, concentração e razão auxina/citocinina) depende do genótipo e do conteúdo endógeno de hormônios.

5.2 Avaliação dos teores de fenóis e taninos totais em calos induzidos *in vitro*

Conforme pode ser observado na tabela 3, os calos apresentaram teores variáveis do fitoconstituente analisado, nos diferentes tratamentos empregados. Em todos os calos, detectou-se a presença de fenóis totais, independente do tipo e da concentração dos reguladores utilizados na indução dos mesmos.

TABELA 3. Teores médios de fenóis totais obtidos em calos de barbatimão cultivados na presença de picloram e cinetina. UFLA, Lavras, 2006.

Trat.	Picloram (mg L ⁻¹)	Cinetina (mg L ⁻¹)	Fenóis totais (%)
EI	-	-	25,90a
T0	0,0	0,0	9,58b
T1	0,0	0,1	9,23b
T7	2,0	0,1	5,93c
T4	1,0	0,0	5,25d
T3	0,5	0,1	4,96d
T6	2,0	0,0	4,24e
T5	1,0	0,1	3,52f
T2	0,5	0,0	3,01g

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

Verifica-se que o explante inicial apresentou elevados teores de fenóis totais, os quais reduziram consideravelmente conforme o tratamento empregado.

Calos induzidos na ausência de reguladores de crescimento e na presença de 0,1 mg L⁻¹ de cinetina apresentaram os maiores teores de fenóis totais (9,58% e 9,23%, respectivamente), seguidos pelos demais tratamentos.

Baixos teores de fenóis totais foram observados em calos induzidos na presença da auxina picloram (3,01%), na concentração de 0,5mg L⁻¹, sendo estes

68% inferiores, em média, em relação àqueles observados nos tratamentos controle e 0,1 mg L⁻¹ de cinetina.

A redução nas concentrações de fenóis totais em calos induzidos pela associação de picloram com cinetina não descarta a possibilidade do emprego concomitante desses dois reguladores, e, sim, sugere a necessidade de mais estudos empregando-se novas concentrações e associações entre esses reguladores.

Os rendimentos de taninos totais em calos submetidos aos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4. Teores médios de taninos totais em calos de barbatimão nos diferentes tratamentos. UFLA, Lavras, 2006.

Trat.	Picloram (mg L ⁻¹)	Cinetina (mg L ⁻¹)	% Taninos totais
EI	-	-	4,94 a
T0	0,0	0,0	2,36 b
T6	2,0	0,0	1,71 c
T2	0,5	0,0	0,0 d
T1	0,0	0,1	0,0 d
T5	1,0	0,1	0,0 d
T7	2,0	0,1	0,0 d
T3	0,5	0,1	0,0 d
T4	1,0	0,0	0,0 d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott.

Verifica-se, que somente o explante inicial, o tratamento controle e os calos induzidos na presença de 2,0 mg L⁻¹ picloram, apresentaram níveis consideráveis desse metabólito (4,94%, 2,36% e 1,71%, respectivamente). Nos demais tratamentos não se detectou a presença de taninos totais. Segundo

Almeida et al. (1998), a casca de uma planta adulta de barbatimão apresenta de 20% a 30% de taninos totais, valor este muito superior ao encontrado no explante inicial. Entretanto, esta comparação não é possível, levando-se em consideração o estágio de desenvolvimento do explante inicial.

Calos induzidos na ausência de reguladores de crescimento apresentaram, em média, 27,5% de taninos a mais do que aqueles cultivados na presença de 2,0 mg L⁻¹ de picloram.

Na figura 2 encontram-se representados os teores de fenóis totais presentes em calos de barbatimão e a matéria fresca destes calos cultivados sob diferentes concentrações de picloram e cinetina.

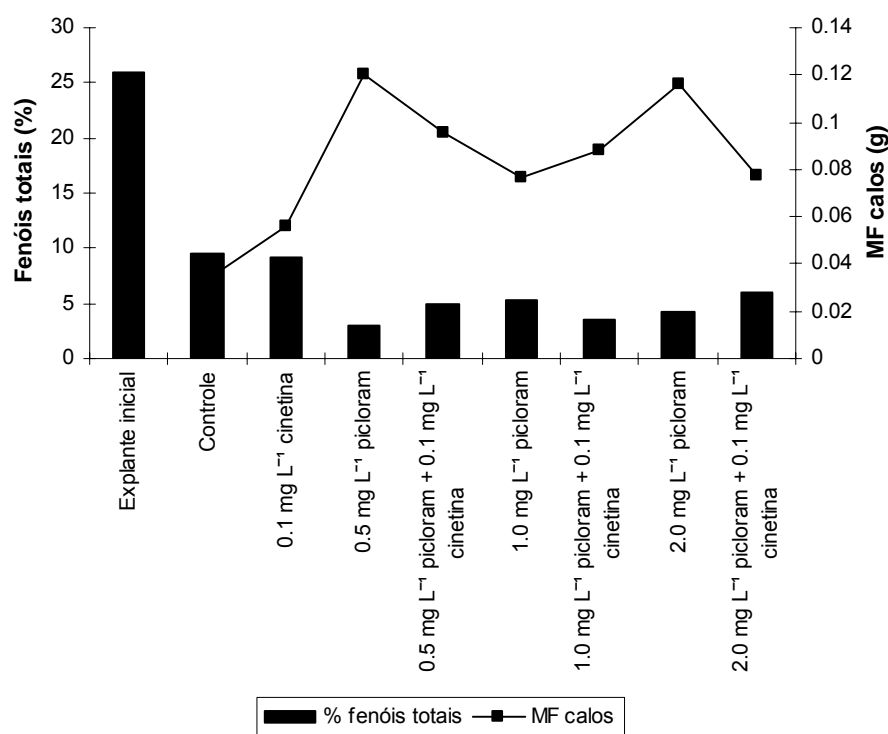


FIGURA 2. Teores médios de fenóis totais e matéria fresca obtidos em calos de barbatimão, cultivados na presença de picloram e cinetina. UFLA, Lavras, 2006.

Na Figura 3 encontram-se representados os teores de taninos totais presentes em calos de barbatimão e a matéria fresca destes calos cultivados sob diferentes concentrações de picloram e cinentina.

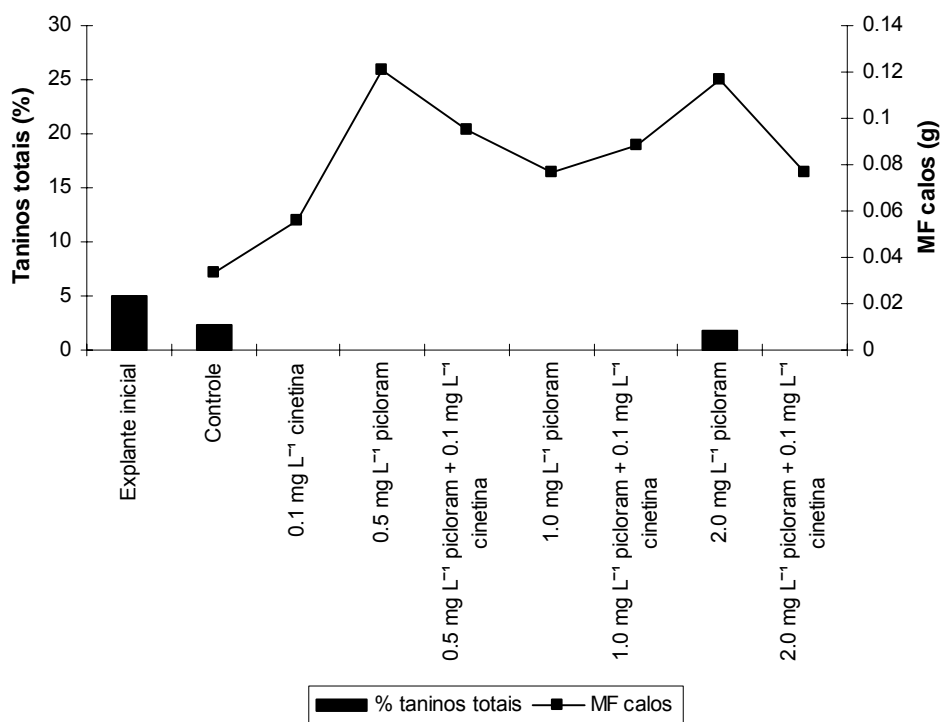


FIGURA 3. Teores médios de taninos totais e matéria fresca obtidos em calos de barbatimão, cultivados na presença de picloram e cinentina. UFLA, Lavras, 2006.

Os elevados teores de fenóis e taninos totais detectados no explante inicial (tabelas 3 e 4) se devem, provavelmente, ao maior grau de diferenciação dessas células, o que propicia atividade metabólica primária mais regular e constante, favorecendo as rotas de biossíntese secundária.

Avaliando-se, simultaneamente, a produção de matéria fresca de calos e os teores de fenóis e taninos totais, nos diferentes tratamentos (Figuras 2 e 3),

verifica-se que os calos com maiores teores de matéria fresca apresentaram os menores teores de fenóis e ausência de taninos totais, com exceção do tratamento 2,0 mg L⁻¹ de picloram. Estes resultados sugerem um maior investimento das células na produção de biomassa dos calos e a disponibilização de menores quantidades de precursores para a produção de fenóis e taninos totais.

Observações semelhantes são relatadas por Bahorum et al. (1994), que avaliaram a produção de polifenóis em calos de *Crataegus monogyna* e verificaram que, no período de produção inicial dos calos (do quarto ao décimo sexto dia), havia intensa síntese de fenóis totais, associada a uma baixa produção de biomassa.

Os baixos teores de taninos totais verificados neste experimento indicam a necessidade de se otimizar um protocolo para a indução de calos, com maiores teores de fenóis e taninos totais.

Segundo Lameira (1997), a maior produção de metabólitos secundários no cultivo de calos, geralmente, ocorre quando este atinge a fase estacionária da curva de crescimento. Esta fase varia de espécie para espécie, sendo este período, em algumas espécies, superior a 60 dias, como é o caso do ingá (Soares, 2003) e do murici-pequeno (Nogueira, 2003).

As auxinas e as citocininas têm sido amplamente utilizadas na indução de calos e na produção de metabólitos secundários *in vitro*. Bernardi et al. (2002) mostraram que a quantidade de taninos em *Hypericum ternum* A. ST. Hill *in natura* é superior à de um material micropropagado (brotações), em meio MS, na presença ou não de 0,4 mg L⁻¹ de BAP. Tanaka et al. (1995), visando averiguar a produção de taninos em segmentos foliares de *Quercus acutissima* cultivados em 3mg L⁻¹ de AIA + 0,1mg L⁻¹ de BAP, verificaram que 3,73% da matéria seca (130 mg) do material era composto por taninos. Vitor et al. (2005) testaram o efeito do 2,4-D e BAP na indução de calogênese e nos teores de

fenóis e taninos totais em barbatimão. Os autores verificaram que os calos crescidos em meio com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentaram, em média, teor de 1% de fenóis totais e não detectaram a presença de taninos totais em nenhuma concentração do 2,4-D testado. Com relação ao BAP, os maiores teores de fenóis totais (1,3%, em média) foram encontrados em calos crescidos em meios com 1 e 4 mg L⁻¹. Também não se verificou a produção de taninos totais independente do tratamento com BAP.

Entre as vantagens da produção de compostos secundários *in vitro*, pode-se citar a maior facilidade na purificação dos extratos, em virtude da ausência de quantidades significativas dos pigmentos, resultando em redução dos custos de produção (Baladrin & Klocke, 1988). Entretanto, tem-se observado que as culturas de tecidos produzem quantidades muito pequenas do composto desejado (Bonilla, 2002). Assim, mais estudos são necessários para ajustar um protocolo para o barbatimão, visando otimizar a produção de fenóis e taninos totais *in vitro*, sendo este processo considerado difícil, uma vez que os estudos nesta área e com a referida espécie ainda são muito incipientes.

6 CONCLUSÕES

- Meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de picloram induz calos com maiores valores de matéria fresca (0,120 g).
- Calos induzidos na ausência de reguladores de crescimento apresentam maiores teores de fenóis e taninos totais, com valores médios de 9,58% e 2,36%, respectivamente.
- Calos com maiores valores de matéria fresca apresentam menores teores de fenóis e ausência ou baixas concentrações de taninos totais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P. de et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

AMMIRATO, P.V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterwoths, 1986. Cap.2, p.23-45.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the association of official analytical chemists**. 11.ed. Washington, 1970. 1015p.

BAHORUN, T.; TROTIN, F.; VASSEUR, T. Comparative polyphenolic production in *Crataegus monogyna* callus cultures. **Phytochemistry**, v.37, n.5, p.1273-1276, 1994.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plant. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Medicinal and aromatic plant 1**. Berlin: Springer Verlag, 1988. p.3-33. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4).

BARRUETO CID, L.P. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.1, 864p.

BERNARDI, A.P.M. et al. **Propagação *in vitro* de *Hypericum ternum* A. ST. Hill e análise química das plântulas produzidas**. 2002. Disponível em: <<http://seberi.proprsq.ufrgs.br/cdsalao2002/salao02/cs02.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2006.

BONILLA, M.G.O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH**. 2002. 162p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FIGUEIREDO, S.F.L. et al. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: establishment and growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.63, n.2, p.85-92, 2000.

FLORES, R. et al. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (Fragaria x ananassa) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.1, p.09-14, jan./abr. 1998.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC, 1999. p.101-121.

GEORGE, E.F. The components of culture media. In: _____. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Great Britain: Exegetics, 1993. Cap.9, p.273-343.

HAGEN, S.R. et al. Initiation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. **Plant Growth Regulation**, v.9, p.341-345, 1990.

HAGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n.3, p.437-449, Mar. 1987.

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

KAUR, P.; KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.77, n.1, p.73-79, Apr. 2004.

KINNERSLEY, A.M.; DOUGALL, D.K. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. **Planta**, New York, v.149, n.2, p.200-204, July 1980.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia***

verbenacea L.). 1997. 88p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NOGUEIRA, R.C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).** 2003. 88p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OZEKI, Y.; KOMAMINE, A. Induction of anthocianin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.53, n.3, p.570-577, 1981.

PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. **Textos acadêmicos: cultura de tecidos.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.

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

PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 169p. (Textos Acadêmicos).

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

SCOTT, A.J.; KNOTT, A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.

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

SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* WILLD. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. PENN.].** 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STELLA, G.A.; BRAGA, M.R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.69, n.3, p.271-276, Mar. 2002.

TANAKA, N.; SHIMOMURAT, K.; ISHIMARU, K. Tannin production in callus cultures of *Quercus acutissima*, **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1151-1154, 1995.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1990. 433p.

VIETEZ, A.M.; SAN-JOSÉ, M.C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v.32, n.3, p.140-147, July/Sept. 1996.

VITOR, S.M.M. et al. **Germinação *in vitro* e efeito do 2,4-D e BAP na indução de calogênese e nos teores de fenóis e taninos totais em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville**. 2005. Disponível em: <<http://www.fevale.edu.br/seminario/cd/files/pdf/1884.pdf>>. Acesso em: 16 maio 2006.

CAPÍTULO V

ACLIMATIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO TECIDO FOLIAR DE PLANTAS DE BARBATIMÃO OBTIDAS VIA CULTIVO *IN VITRO* E APÓS TRANSFERÊNCIA PARA AMBIENTE *EX VITRO*

1 RESUMO

NICIOLI, Patrícia Matile. Aclimatização e caracterização anatômica do tecido foliar de plântulas de barbatimão obtidas via cultivo *in vitro* e após transferência para ambiente *ex vitro*. In: _____. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap.5, p.72-89. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Plantas lenhosas micropropagadas são, frequentemente, afetadas por vários fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e morfológica, dentre elas, as alterações anatômicas, que comprometem o estabelecimento *ex vitro* das plântulas. O presente estudo teve como objetivos estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas de barbatimão cultivadas *in vitro* e comparar a estrutura interna de folhas de plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. Para a aclimatização, plantas pré-aclimatizadas durante 7 dias em sala de crescimento foram transferidas para tubetes contendo vermiculita + Plantmax [na proporção de 1:1 (v/v)] e Plantmax. Fez-se o controle da umidade e utilizaram-se sombrites para controlar a irradiância. Para o estudo anatômico, cortes transversais e paradérmicos foram realizados nas lâminas foliares de plantas provenientes do cultivo *in vitro* e de plantas já aclimatizadas. As plantas aclimatizadas em substrato Plantmax apresentaram 50% de sobrevivência e as aclimatizadas em substrato vermiculita + Plantmax, 41%. Nas seções transversais e paradérmicas das lâminas foliares, observou-se diferenças anatômicas entre as plantas retiradas do ambiente *in vitro* e as já aclimatizadas. A epiderme adaxial das plantas cultivadas *in vitro* apresentou-se mais espessa que as das plantas aclimatizadas, ao passo que a epiderme abaxial não apresentou diferenças significativas entre as plantas, mostrando-se composta por apenas uma camada de células revestida pela cutícula. A medida das espessuras do parênquima paliçádico e esponjoso diferiu de forma significativa nas plantas cultivadas *in vitro* e nas já aclimatizadas. Ambos apresentaram-se mais espessos nas lâminas foliares coletadas de plantas cultivadas *in vitro*. Não houve diferenças significativas para densidade estomática. Os estômatos das folhas de plantas em ambiente *in vitro* apresentaram com maior diâmetro polar, enquanto que para o diâmetro equatorial, não foram encontradas diferenças significativas entre as plantas de ambiente *in vitro* e as aclimatizadas.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

NICIOLI, Patrícia Matile. Acclimatization and anatomical characterization of plants leaf tissue of barbatimão obtained through *in vitro* culture and after transference to *ex vitro* environment. In: _____. **Micropropagation and phytochemical aspects of callus of barbatimão** [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] - **Fabaceae**. 2006. Cap. 5, p.72-89. Dissertation (Master in Agronomy. Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Woody plants micropropagated are frequently affected by several factors of the culture medium that led to metabolic and morphological degeneration, such as anatomical alterations that compromises the *ex vitro* plants establishment. The objective of the present was to establish an acclimatization methodology for barbatimão's plants cultivated *in vitro* and to compare the internal leaf structure of *in vitro* cultivated plants and those acclimatized. For the acclimatization, plants pre-acclimatized during 7 days in the growth room were transferred to plastic tubes with vermiculite + Plantmax[®] [in the proportion of 1:1 (v/v)] and Plantmax[®]. Humidity control was performed and light screens were used to control the irradiance. For the anatomic study, transversal and paradermic cuts were performed on leaves of plants cultivated *in vitro* and plants already acclimatized. Acclimatized plants in Plantmax[®] substrate showed 50% survival and the acclimatized in vermiculite + Plantmax[®] substrate, 41%. In the transversal and paradermic leaf section, anatomic difference between the plants from *in vitro* environment and those acclimatized were observed. The adaxial epidermis from *in vitro* cultured plants were thicker than the acclimatized plants, although the abaxial epidermis showed no significant difference between the plants, with only one layer of cells covered with cuticle. Palisade and spongy parenchyma's thickness differed significantly from *in vitro* cultured plants and those already acclimatized. Both were thicker on leaf sections of *in vitro* cultured plants. There was no significant difference regarding stomata density. While there was no significant difference on stomata equatorial diameter between plants cultivated *in vitro* and those acclimatized, leaf stomata from plants cultivated *in vitro* showed higher polar diameter.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser), Luciano Vilela Paiva – UFLA (Co- Adviser).

3 INTRODUÇÃO

A aclimatização é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido. Em muitas espécies, esse estágio é considerado crítico, e o sucesso da transferência de plantas para a casa de vegetação depende da interação e do manejo adequado dos diversos fatores envolvidos na adaptação da planta à mudança ambiental (Deccetti, 2000; Deccetti et al., 2005).

Segundo Torres et al. (1998), a aclimatização é o processo que envolve o transplântio da planta cultivada *in vitro* para a casa de vegetação. De acordo com Brainerd e Fuchigami (1981), esta fase é de grande importância, sendo considerada um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos, por afetar diretamente a sobrevivência e a qualidade final das mudas produzidas.

Diversos fatores físicos influenciam culturas *in vitro*, interferindo em seus processos organogênicos, como o estado físico do meio, o pH, a temperatura e a luz (Handro & Floh, 1990). A luz é o fator que maiores efeitos exerce nos processos morfogênicos que ocorrem *in vitro*. Sua intensidade, qualidade e duração afetam, particularmente, os processos mediados pelo fitocromo (Handro & Floh, 1990), bem como os processos naturais de fotossíntese.

Dessa maneira, de acordo com George (1996), o controle da luz durante o processo de aclimatização tem sido essencial para a sobrevivência da planta e um decréscimo gradual da umidade relativa deve ser acompanhado pelo incremento progressivo na irradiância.

De acordo com Preece & Sutter (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando submetidos a condições adversas, como o ambiente natural.

Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, a fotossíntese e às trocas gasosas (Deberg & Maene, 1984). Especula-se que o ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta. Algumas respostas, comumente, assemelham-se a plantas cultivadas sob condições de estresse (Soares, 2003).

Para plantas lenhosas micropropagadas, vários fatores do meio de cultura conduzem a degeneração metabólica e morfológica. Essas desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas, nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*, têm sido descritas sob diversas terminologias: vitrificação, translucidez, hiperidratação, suculência e transparência (Ziv, 1991), que se manifestam, principalmente, nas folhas, sendo menos extensas nos caules e raízes (Deberg & Maene, 1984).

Segundo George (1993), plantas oriundas do cultivo *in vitro* podem apresentar uma epiderme com cutícula reduzida, o que contribui para a rápida desidratação quando transferida para o ambiente normal, comprometendo, assim, seu estabelecimento *ex vitro*.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plantas de barbatimão cultivadas *in vitro*, assim como comparar os aspectos da estrutura interna de folhas de plantas cultivadas *in vitro* e de plantas em estágio de aclimatização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aclimatização de plantas cultivadas *in vitro*

Plantas enraizadas (Capítulo III) foram transferidas, após passarem por um período de sete dias de pré-aclimatização (abertura do recipiente de cultivo) na sala de crescimento, para tubetes com volume de 250 mL, contendo Plantmax[®]

+ vermiculita na proporção de 1:1 (v/v) e somente Plantmax[®] e envoltas com sacos plásticos transparentes, para manutenção da umidade relativa no ambiente. Estes sacos foram perfurados semanalmente, até a sua remoção total, aos 21 dias do processo de aclimatização. Uma bandeja com água foi colocada em contato com a base dos tubetes, visando à manutenção da umidade nos substratos. A bandeja com os tubetes foi mantida em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Concomitantemente ao controle da umidade relativa e da temperatura, foi realizado o controle da intensidade luminosa, submetendo as plantas a diferentes níveis de irradiância. Com esse objetivo, nos primeiros 7 dias de aclimatização, as plantas foram mantidas sob sombrite 70% (irradiância de fótons de $10,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o qual foi substituído por sombrite 50% (irradiância de fótons de $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), posteriormente 30% (irradiância de fótons de $25,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e, por último, na ausência de qualquer sombrite ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a cada sete dias. Nesse mesmo período, o saco envoltório do tubete foi sendo perfurado até a remoção completa, visando a redução gradual da umidade relativa.

Aos 30 dias, a avaliação de sobrevivência das plantas foi realizada.

4.2 Anatomia foliar *in vitro* e *ex vitro*

Folhas completamente expandidas foram coletadas ao acaso do terço superior de plantas provenientes do cultivo *in vitro* e com 30 dias de aclimatização em substrato vermiculita + Plantmax e Plantmax. As folhas foram fixadas em álcool etílico 70% (v/v).

Os procedimentos para a obtenção das lâminas com os cortes anatômicos das folhas coletadas foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para as avaliações de caracterização dos estômatos (densidade estomática e diâmetros polar e equatorial), foram efetuados cortes paradérmicos nas

superfícies abaxial e adaxial das lâminas foliares. As seções paradérmicas foram montadas entre lâmina e lamínula, diretamente com a solução corante (safranina glicerinada 0,1%) e observadas em microscópio Olympus CBB, com auxílio de câmara clara, segundo a técnica de Laboriau et al. (1961).

Os cortes anatômicos transversais foram efetuados a mão livre. Em seguida, procedeu-se à clarificação dos cortes em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de três a cinco minutos e três lavagens em água destilada. A coloração foi efetuada utilizando-se uma mistura de azul de astra e safranina, segundo os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997). As seções transversais foram utilizadas para a realização de medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas paliádico e esponjoso, com auxílio de ocular micrométrica OSM.

No Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, foram feitas as fotomicrografias, em microscópio Olympus BX 60, com filme ASA 100 colorido.

4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os resultados de aclimatização foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubete contendo uma planta. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste F.

As medições de espessura, densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram realizadas utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por três medidas para espessura e quatro para densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de médias Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aclimatização de plantas cultivadas *in vitro*

A proporção de plantas sobreviventes nos dois tratamentos (somente Plantmax[®] e vermiculita + Plantmax[®]) foi similar, não diferindo significativamente. As plantas de barbatimão aclimatizadas em Plantmax[®] apresentaram 50% de sobrevivência e as aclimatizadas em vermiculita + Plantmax[®], 41%, após um período de 30 dias em sala de crescimento com redução gradual do sombrite e a abertura parcial do saco plástico envoltório dos tubetes (Tabela 1). Mesmo apresentando a mesma taxa de sobrevivência, não houve diferenças em tamanho e aspecto visual das plantas ao final do período de avaliação, nos dois tipos de substratos.

TABELA 1. Proporção de plantas de barbatimão sobreviventes aclimatizadas em vermiculita + Plantmax[®] (T1) e em Plantmax[®] (T2). Lavras, UFLA, 2006.

Tratamentos	Nº plantas sobreviventes	Total de repetições	Sobrevivência (%)
1	5	12	41
2	6	12	50

Resultados diferentes foram encontrados por Dzazio et al. (2002), que estudaram o efeito de três substratos (Vermiculita, Plantmax[®] e casca de arroz carbonizada) na aclimatização do porta-enxerto de videira '420-A', obtendo-se 95,83% e 87,50% de sobrevivência para os substratos vermiculita e Plantmax, respectivamente. O menor índice de sobrevivência das brotações foi obtido no substrato com casca de arroz, no qual apenas 45,83% das brotações sobreviveram.

Erig & Schuch (2004) avaliaram o efeito do substrato mistura solo + substrato comercial Plantmax[®], na proporção de 1:1, na aclimatização de microestacas de marmeleiro enraizadas *in vitro*. Trinta dias após o início da aclimatização, depois das plantas terem permanecido durante 10 dias em bandeja tampada (com vidro) na sala de crescimento, 10 dias em bandeja tampada (com vidro) no telado e 10 dias em bandeja destampada no telado, obteve-se 65,12% de sobrevivência.

Vale ressaltar que a redução no número de plantas sobreviventes ocorreu após a retirada total do saco plástico envoltório dos tubetes, aos 21 dias (a sobrevivência decresceu de 90% e 80% para 50% e 41% nos tratamentos Plantmax[®] e vermiculita + Plantmax[®], respectivamente). Este fato se deve, em grande parte, à mudança das condições ambientais às quais as plântulas estavam submetidas, principalmente a umidade relativa, que era maior no interior do saco plástico e mais próxima daquela encontrada no interior do tubo de ensaio.

Esses resultados sugerem que o tipo de substrato utilizado no processo de aclimatização de plantas de barbatimão tem pouca relevância. Por outro lado, o controle da umidade do ar durante a aclimatização parece ser preponderante, devendo ser pesquisado novas metodologias.

5.2 Anatomia foliar *in vitro* e *ex vitro*

Nas seções transversais das lâminas foliares, observaram-se diferenças anatômicas entre as plantas oriundas do cultivo *in vitro* e as aclimatizadas nos dois tipos de substratos (vermiculita + Plantmax[®] e somente Plantmax[®]).

A espessura da epiderme adaxial das lâminas foliares apresentou diferenças estatísticas, tendo as plantas oriundas do cultivo *in vitro* apresentado maior espessura média da epiderme, com 13,35 µm, seguida dos tratamentos aclimatizadas em vermiculita + Plantmax[®] e somente Plantmax[®], com valores médios de 11,7 e 10,2 µm respectivamente. Já para a espessura da epiderme

abaxial não foram detectadas diferenças significativas, com espessuras médias de 11,40 μm para o cultivo *in vitro* e aclimatizadas em vermiculita + Plantmax[®], e 10,65 μm para aclimatizadas somente em Plantmax[®] (Tabela 2).

TABELA 2. Espessura das epidermes abaxial e adaxial de folhas de barbatimão cultivadas *in vitro* e aclimatizadas nos dois tipos de substratos. UFLA, Lavras, 2006.

Tratamentos	Espessura média (μm)	
	Ep. Adaxial	Ep. Abaxial
Cultivo <i>in vitro</i>	13,35a	11,40a
Aclimatizadas vermiculita + Plantmax [®]	11,70a	11,40a
Aclimatizadas em Plantmax [®]	10,20a	10,65a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Nota-se, ainda, que em todas as condições de cultivo, as epidermes abaxial e adaxial são compostas por apenas uma camada de células (epiderme uniestratificada) revestidas pela cutícula. O mesofilo, nos três tratamentos, é dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial). Nas plantas cultivadas *in vitro* foram verificados bastante espaços intercelulares no parênquima esponjoso, com células de formatos diferentes e que estão pouco diferenciadas em relação às plantas aclimatizadas. Nestas últimas, observaram-se células com formatos arredondados e redução nos espaços intercelulares, evidenciando a correção de algumas anomalias conseqüentes do cultivo *in vitro*. Em relação ao parênquima paliçádico, no cultivo *in vitro*, as células encontram-se mais alongadas que nas plântulas aclimatizadas, no entanto, nestas, as células estão mais justapostas que nas primeiras (Figura 1).

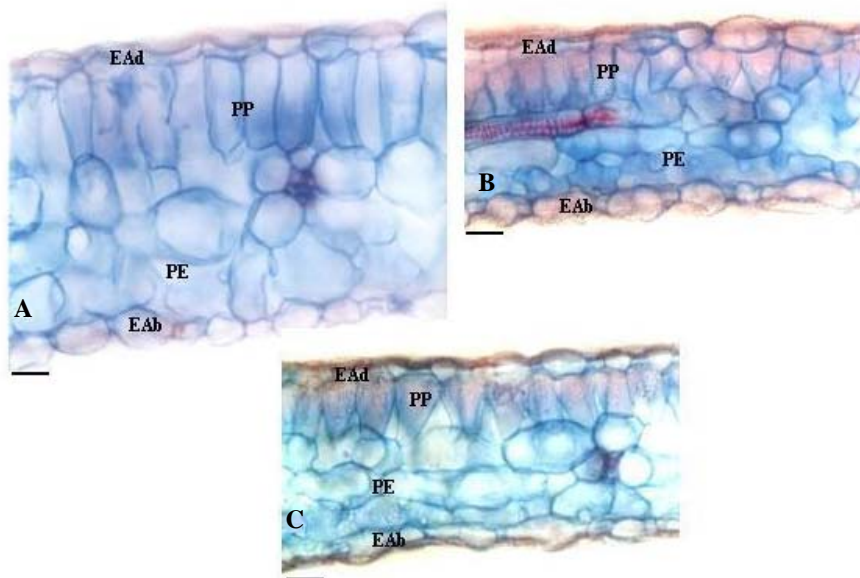


FIGURA 1. Seções transversais do limbo foliar de barbatimão em condições de cultivo *in vitro* (A) e aclimatizadas em vermiculita + Plantmax (B) e plantmax (C): Ead – epiderme adaxial; PP – parênquima paliçádico; PE – parênquima esponjoso; Eab – Epiderme abaxial. UFLA, Lavras, 2006. Barra = 19 μ m.

Nas plantas cultivadas *in vitro*, a presença de muitos espaços intercelulares no parênquima esponjoso e a pouca diferenciação destas células podem explicar a dificuldade para aclimatização das plantas de barbatimão, passando apenas por um curto período de tempo pelo processo de pré-aclimatização utilizado no trabalho. Tal fato sugere a necessidade de tratamentos pré-aclimatizadores mais eficientes, aliados ao maior controle da umidade relativa durante o processo de aclimatização, visando elevar a taxa de sobrevivências das plantas.

A espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso diferiu de forma significativa nos tratamentos utilizados, com espessuras respectivas de 37,35 e

70,90 μm no cultivo *in vitro*, 36,60 e 58,80 μm nas folhas de plântulas aclimatizadas em vermiculita + Plantmax[®] e de 30,90 e 40,35 μm nas folhas de plântulas aclimatizadas em Plantmax[®] (Tabela 3).

TABELA 3. Espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso de folhas de barbatimão cultivadas *in vitro* e aclimatizadas nos dois tipos de substratos. UFLA, Lavras, 2006.

Tratamentos	Espessura média (μm)	
	P. paliçádico	P. esponjoso
Cultivo <i>in vitro</i>	37,35a	70,95a
Aclimatizadas vermiculita + Plantmax [®]	36,60a	58,80a
Aclimatizadas em Plantmax [®]	30,90b	40,35b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Como é possível verificar, ambos os parênquimas foram mais espessos nas lâminas foliares coletadas de plantas oriundas do cultivo *in vitro*. Contudo, tanto nas plantas oriundas do cultivo *in vitro* quanto naquelas aclimatizadas nos dois tipos de substratos, o mesofilo apresentou parênquima paliçádico constituído de uma única camada de células.

Segundo Pierik (1990), plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam células paliçádicas menores e em menor quantidade. No entanto, isso não foi verificado no barbatimão, possivelmente porque os 30 dias de aclimatização não constituíram tempo suficiente para ocorrer maior diferenciação destes tecidos. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2003) que, trabalhando com arnica (*Lychnophora pinaster*), verificaram que folhas oriundas do cultivo *in vivo* apresentaram-se menos espessas que as cultivadas *in vitro*. Por outro lado, Fidelis et al. (2000) revelaram que as folhas de *Brosimum gaudichaudii* TREC. de plantas crescidas *in vitro* apresentavam-se menos espessadas que aquelas desenvolvidas *in vivo*. Da mesma forma, Santos (2001) e Santos et al. (2005), trabalhando com lâminas foliares de cafeeiro (*Coffea arabica* ‘Rubi’ e *Coffea canephora* ‘Apoatã’), obtidas por cultivo *in*

vivo e *in vitro*, observaram que, nos dois tratamentos, o parênquima paliçádico das folhas era constituído por apenas uma camada de células na cultivar Rubi e estratificado na cultivar Apoatã. Entretanto, o parênquima paliçádico das folhas obtidas *in vivo* possuía sempre células maiores que o das folhas obtidas *in vitro*.

Donnelly & Vidaver (1984) relataram que as folhas *in vitro* de framboesa vermelha (*Rubus idaeus*) apresentavam uma camada de células paliçádicas, enquanto as folhas *in vivo*, duas ou mais camadas.

A presença de estômatos nas três condições de cultivo somente foi verificada na epiderme abaxial das lâminas foliares, o que caracteriza o barbatimão como uma espécie com folhas do tipo hipostomática (Figura 2).

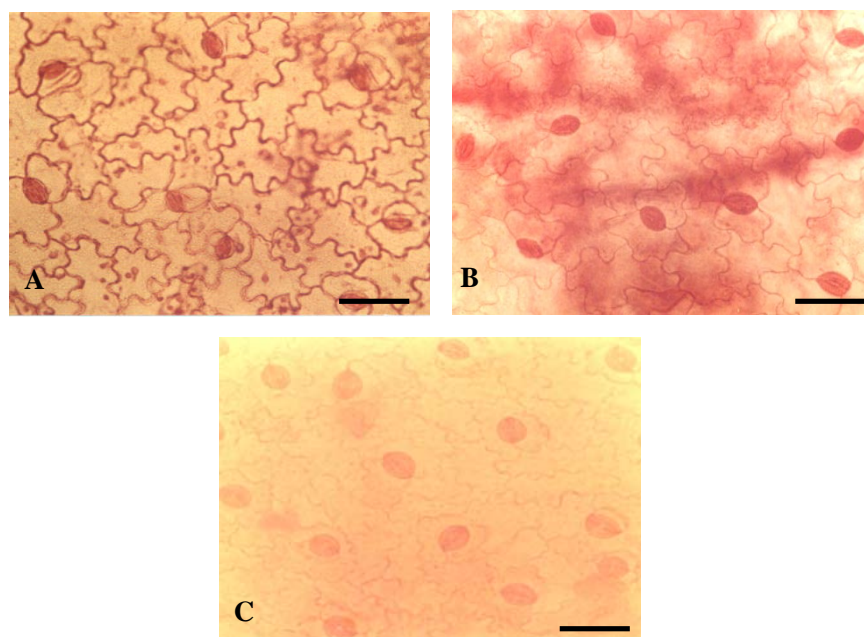


FIGURA 2. Epiderme abaxial de folhas de barbatimão *in vitro* (A) e aclimatizadas em vermiculita + Plantmax (B) e Plantmax (C). UFLA, Lavras, 2006. Barra = 37 μ m.

Não houve diferença estatística para a densidade estomática nas três condições de cultivo estudadas (Tabela 4 e Figura 2).

TABELA 4. Densidade estomática (DE), diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) de folhas de barbatimão cultivadas *in vitro* e aclimatizadas nos dois tipos de substratos. UFLA, Lavras, 2006.

Tratamentos	Densidade estomática média (mm ²)
Aclimatizadas em Plantmax [®]	208,12a
Cultivo <i>in vitro</i>	201,46a
Aclimatizadas vermiculita + Plantmax [®]	196,47a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Brainerd et al. (1981) relataram que, nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, há um aumento no número de estômatos/mm², quando comparado às plantas da mesma espécie que crescem em outros ambientes, devido, principalmente, à elevada umidade relativa do ar no interior do recipiente.

No entanto, de acordo com Donnelly & Vidaver (1984), as primeiras novas folhas das plantas transplantadas são transitórias em suas características anatômicas. O nível de mudança pode depender do estágio das folhas formadas no meio de cultura. Assim, com o passar do tempo e o aumento de exposição das plântulas às condições ambientais, possivelmente, a densidade estomática tende a diminuir.

Wetztenin & Sommer (1983) também verificaram densidades estomáticas significativamente maiores em cultivo *in vitro* do que em plantas de campo ou nas folhas de plantas em fase final de aclimatização.

Para o diâmetro polar dos estômatos, houve diferenças significativas entre os tratamentos, tendo sido maior no cultivo *in vitro*. Com relação ao diâmetro equatorial, não foram encontrados diferenças estatísticas (Tabela 5).

TABELA 5. Diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos de folhas de barbatimão cultivadas *in vitro* e aclimatizadas nos dois tipos de substratos. UFLA, Lavras, 2006.

Tratamentos	DP (μm)	DE (μm)
Cultivo <i>in vitro</i>	20,13a	13,61a
Aclimatizadas vermiculita + Plantmax [®]	18,90b	13,27a
Aclimatizadas em Plantmax [®]	18,67b	14,06a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Soares (2005), trabalhando com mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), demonstrou que houve diferença estatística para diâmetros polar e equatorial dos estômatos nos dois ambientes de cultivo (*in vivo* e *in vitro*), tendo ambos apresentado-se maiores nas folhas das plântulas de ambiente *in vitro*.

Não foi verificada diferença no formato dos estômatos em nenhum dos tratamentos utilizados, sendo estes de formato elíptico. Entretanto, diversos estudos mencionam que a estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas apresenta grandes diferenças em relação à observada nas plantas que se desenvolveram em ambiente natural (Fráguas, 2003). Porém, diferenças no formato das células epidérmicas foram verificadas. As células da superfície da epiderme abaxial das plântulas mantidas *in vitro* apresentaram-se mais sinuosas e com paredes menos espessas, o que revela a incapacidade destas plântulas de controlarem, de forma efetiva, a perda excessiva de água.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento de pré-aclimatização utilizado não é eficiente para a referida espécie.
- As estruturas foliares desenvolvidas pelas plantas aclimatizadas em vermiculita + Plantmax apresentam os parênquimas paliçádico e

esponjoso e as epidermes adaxial e abaxial mais espessos que nas plantas aclimatizadas em Palntmax.

- As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* apresentam os parênquimas paliçádico e esponjoso e a epiderme adaxial mais espessos que nas plantas aclimatizadas nos dois tipos de substratos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAINERD, K.E. et al. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, v.16, p.173-175, 1981.

DEBERG, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to "in vivo" culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v.40, n.1. p.69-75, 1984.

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

DECETTI, S.F.C. et al. La micropropagation d' *Annona glabra* L. à partir de segments nodaux. **Fruits**, v.60, p.319-325, 2005.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the the American Society for Horticultural Science**, v.109, n.2, p.172-176, 1984.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.759-764, dez. 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciencia Rural**, v.34, n.5, p.1443-1449. set./out. 2004.

FIDELIS, I. et al. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.327-336, abr./jun. 2000.

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

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 - the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 - the technology**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.

HANDRO, W.; FLOH, E.E.S. A organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas** Brasília: EMBRAPA CNPH, 1990. 433p. 1990.

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

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. 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.237-252, 1961.

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

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.

SANTOS, C.G. **Micropropagação e caracterização bioquímica anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, C.G. dos et al. Propagation of *Coffea arabica* cv. acaia cerrado through *in vitro* embryo culture. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, MG, v.1, n.1, p.19-23, 2005.

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 121p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, G.A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Ingá Vera* WILLD. Subsp. *Affinis* (DC.) T.D. PENN.]**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, A.V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.** 2003. 127p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.11-20.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.108, p.475-480, 1983.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERG, P.C.; ANDERSON, P.G. (Ed.). **Micropropagation - Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.45-79.