

VESPASIANO BORGES DE PAIVA NETO

**COMPORTAMENTO "IN VITRO" DE TECIDO FOLIAR E SEGMENTO
NODAL DE MOREIRA (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**

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

Orientador

Prof. RENATO PAIVA, Ph.D.

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1996



Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca da UFLA

Paiva Neto, Vespasiano Borges de
Comportamento "in vitro" de tecido foliar e segmento nodal de moreira
(*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) / Vespasiano Borges de Paiva
Neto.-- Lavras : UFLA, 1996.
39 p.: il.

Orientador: Renato Paiva.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Moreira - Calogênese. 2. Meio de cultura. 3. Inoculação. 4.
Fisiologia vegetal. 5. Regulador de crescimento. 6. Bioquímica -
Alteração. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

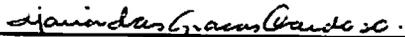
CDD-634.363

VESPASIANO BORGES DE PAIVA NETO

COMPORTAMENTO "IN VITRO" DE TECIDO FOLIAR E SEGMENTO
NODAL DE MOREIRA (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)

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

APROVADA em 23 de agosto de 1996



Prof. Dra. Maria das Graças Cardoso



Prof. Dr. Moacir Pasqual



Prof. Renato Paiva, PhD
(Presidente)

A minha tia Angelita Dias Borges

A minha mãe Ana Santiago Borges

pelos incansáveis esforços para propiciar-me

melhores condições de estudo, e sobretudo

pelos respectivos exemplos de condução de vida,

DEDICO

Ao meu pai Jurandir Oliveira Borges (*in memoriam*)

As minhas irmãs Claudia, Claudiana, Isabelita,

Erandir, e aos irmãos Jurandir e Alisson

Aos meus sobrinhos e sobrinhas

A minha filha Letícia Mayara

A minha avó Neném

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Biologia (DBI), pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Prof. Renato Paiva pela orientação e amizade.

Aos professores Moacir Pasqual, Custódio Donizete Santos, e à professora Maria das Graças Cardoso pelas sugestões e críticas ao trabalho.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal Luiz Edson Mota de Oliveira, Amauri Alves de Alvarenga, José Donizeti Alves e à professora Angela Maria Soares pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do DBI: Izonel, Dartagnan, Evaristo, Eustáquio, Zélia, Ester, Eduardo, Joel, Odorêncio, Helena, Erundina e Nazaré, pelo apoio e agradável convívio.

Aos amigos e amigas: Lucivane, Claudio, Luciene, Thales, Telma, Edgard, Jucleide, Leonardo, Patrícia, Maguinho, Oswaldo, Cristian, Gidelma, Gilma, Luís, Marcia, Vilma, Ilka, Leimi, Sônia, Jair, Adriana, Bárbara, Liliane, Carlos, Walter e Moemi pela paciência nos momentos de crise e pelas muitas risadas que compartilhamos nas constantes reuniões.

A minha maravilhosa turma (FAMÍLIA) de mestrado, sem a qual, esta etapa de vida teria menor brilho (Irmãos Marlos, Marcel e André, e irmãs Poliana e Josirley).

À Deborah E. Furtado pela força e carinho nos momentos difíceis.

Aos estudantes de graduação e amigo (as) Guilherme Gomes, Soami Deccetti, e Joema Póvoa pela imensurável ajuda.

A todos aqueles que fizeram parte dessa etapa de vida, e que por uma negação do consciente, não tenham sido citados (as).

BIOGRAFIA

Vespasiano Borges de Paiva Neto, filho de Ana Santiago Borges e Jurandir Oliveira Borges é natural de Guaraciaba do Norte-CE, onde em 1976 teve início seu processo de alfabetização. Em 1979, após o falecimento de seu pai, foi morar com sua avó paterna em Fortaleza, objetivando prosseguir seus estudos num centro mais desenvolvido, por indicação de sua primeira professora. Chegando em Fortaleza, prestou exame de seleção para cursar a segunda série do 1^o grau, pois a "escolinha" de única professora e sala de aula onde estudara anteriormente, não possuía registro. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica em 1989, período no qual **geminou** o interesse pela Fisiologia Vegetal, vindo a desempenhar atividades de monitor e bolsista de iniciação à pesquisa nesta área. Em Março de 1994 ingressou no curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal para buscar **maturidade** e solidez de conhecimentos. Em agosto de 1996, ao final de mais uma etapa de vida, leva a certeza de que seus conhecimentos chegaram em período de **frutificação**.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE MOREIRA (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) .	3
2.2 INDUÇÃO DE CALOS	4
2.3 MEIO DE CULTURA	7
2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 INDUÇÃO DE CALOS	11
3.1.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	11
3.1.2 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	11
3.1.3 PREPARO DOS EXPLANTES	12
3.1.4 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES	12
3.1.5 PRODUÇÃO DE MATERIAL "IN VITRO" PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA	12
3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	14
3.2.1 EXTRAÇÃO DE MICRO E MACROMOLÉCULAS	14
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS	15
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS	15

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1	FOLHA DE MOREIRA	16
4.1.1	INDUÇÃO DE CALOS	16
4.1.2	CURVA DE CRESCIMENTO MÉDIO EM MATÉRIA FRESCA (MF)	18
4.1.3	TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS E AMINOÁCIDOS	21
4.1.4	TEORES DE AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS ..	23
4.2	SEGMENTO NODAL DE MOREIRA	25
4.2.1	INDUÇÃO DE CALOS	25
4.2.2	CURVA DE CRESCIMENTO MÉDIO EM MATÉRIA FRESCA (MF)	27
4.2.3	TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS E AMINOÁCIDOS	30
4.2.4	TEORES DE AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS .	32
5	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 Aspectos gerais de planta jovem de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) mantida em casa de vegetação (LAVRAS - MG, 1996).....	4
02 Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes foliares de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) cultivados por 30 dias em meio WPM: T ₀ = controle; T ₁ = 28,8 µM de 2,4-D; T ₂ = 28,8 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BA; T ₃ = 28,8 µM de 2,4-D + 4,44 µM de BA (LAVRAS - MG, 1996)	17
03 Indução de calogênese em explantes foliares de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: T ₀ = controle; T ₁ = 28,8 µM de 2,4-D; T ₂ = 28,8 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BA; e T ₃ = 28,8 µM de 2,4-D + 4,44 µM de BA. Tratamentos seguidos da mesma letra a cada conjunto de barras, não diferem entre si (Tukey 5%) (LAVRAS - MG, 1996)	18
04 Curva de crescimento médio em matéria fresca de explantes foliares de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM na ausência de 2,4-D = Controle; ou na presença de 28,8 µM de 2,4-D = Tratamento (LAVRAS - MG, 1996).....	19
05 Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes foliares de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: (A) Controle = ausência de 2,4-D; (B) Tratamento = presença de 28,8 µM de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996)	20
06 Teores de proteínas solúveis totais (A) e aminoácidos (B) em explantes foliares de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 µM de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996)	21

- 07 Teores de açúcares redutores (A) e açúcares solúveis totais (B) em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996) 24
- 08 Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por 30 dias em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996) 25
- 09 Indução de calogênese em explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: T₀ = controle; T₁ = 28,8 μ M de 2,4-D; T₂ = 28,8 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BA; T₃ = 28,8 μ M de 2,4-D + 4,44 μ M de BA. Tratamentos seguidos da mesma letra a cada grupo de barras, não diferem entre si (Tukey 5%) (LAVRAS - MG, 1996) 26
- 10 Curva de crescimento médio em matéria fresca de explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996)..... 28
- 11 Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: (A) Controle = ausência de 2,4-D; (B) Tratamento = presença de 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996)29
- 12 Teores de proteínas solúveis totais (A) e aminoácidos (B) em explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996) 31
- 13 Teores de açúcares redutores (A) e açúcares solúveis totais (B) em explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* L. Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996) 32

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
1 Composição básica do meio Wood Plant Medium (Lloyd e McCown, 1980)	13
2 Reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura WPM, para indução de calos em explantes de moreira (<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaudichaud)	14

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido Indolil-3-Acético
AIB	Ácido Indolil-3-Butírico
ANA	Ácido α -Naftalenoacético
BA	N ⁶ -Benzilaminopurina
DAI	Dias Após Inoculação
2iP	N ⁶ -(3-metil-2-butilamino)purina
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
nm	Nanômetro
MF	Matéria Fresca
Min	Minuto
MS	Matéria Seca
"MS"	Murashige e Skoog
p/v	Peso por Volume
v/v	Volume por Volume
WPM	Wood Plant Medium

RESUMO

PAIVA NETO, Vespasiano Borges de. **Comportamento "in vitro" de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras, UFLA, 1996. 39p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

Objetivando estudar o comportamento "in vitro" de tecido foliar e segmento nodal de Moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud), explantes oriundos desses tecidos foram inoculados em meio WPM acrescido ou não de reguladores de crescimento. Em seguida, utilizou-se os explantes mantidos no tratamento controle e no tratamento com regulador de crescimento que resultou em maior formação de calogênese para obtenção de curva de ganho de matéria fresca e mudanças bioquímicas em diferentes períodos de cultivo (3, 6, 12, 20 e 30 dias após inoculação). Nossos resultados mostram que a presença de 28,8 μM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) induziu calogênese e rizogênese em tecido foliar, e apenas calogênese em segmentos nodais. A combinação de 2,4-D e benzilaminopurina (BA) inibiu a formação de rizogênese em tecido foliar. Explantes foliares cultivados na presença de 2,4-D apresentaram maiores teores de proteínas e açúcares redutores, e redução anterior nos teores de aminoácidos quando comparados aos explantes cultivados na ausência de 2,4-D. Explantes oriundos de segmentos nodais cultivados na presença de 2,4-D apresentaram teores superiores de açúcares redutores, e teores semelhantes de proteínas e aminoácidos quando

*Orientador: Prof. PhD. Renato Paiva. Membros da Banca: Prof. Dra. Maria das Graças Cardoso e Prof. Dr. Moacir Pasqual.

comparados aos explantes cultivados na ausência de 2,4-D. Esses fatores aliados ao maior acúmulo de matéria fresca, evidenciam uma maior atividade metabólica nos explantes cultivados na presença de 2,4-D, em relação aqueles cultivados na ausência deste regulador. Foram detectadas reduções nos teores de aminoácidos e açúcares nos períodos finais de cultivo dos explantes mantidos na presença de 2,4-D. Essas reduções podem estar relacionadas com o esgotamento das fontes reduzidas de nitrogênio e carbono do meio de cultivo. Com isso, a síntese protéica também foi comprometida neste período.

ABSTRACT

"IN VITRO" BEHAVIOR OF LEAF AND NODAL SEGMENT OF MOREIRA (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).

With the objective to studying the "in vitro" behavior of leaf tissues and nodal segments of moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud), explants were inoculated in WPM medium supplemented or not with growth regulators. Explants maintained in the absence and in the presence of growth regulator that resulted into an increased formation of callus were used for obtaining the gain curve of fresh matter as well as the biochemical changes that occurred during different periods of culture (0, 3, 6, 12, 20 and 30 days after inoculation). Our results show that the presence of 28,8 μM of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induced both calogenesis and rhizogenesis in leaf tissue, and only calogenesis in nodal segment explants. Rhizogenesis was not observed on callus formation from leaf tissue on medium containing both 2,4-D and benzylminopurine (BA). Leaf explants grown in the presence of 2,4-D showed increased levels of proteins and reducing sugars, and earlier reduction in amino acid levels as compared with the explants grown in the absence of 2,4-D. Nodal segment explants grown in the presence of 2,4-D showed higher levels of reducing sugars and similar levels of proteins and amino acids as compared with the explants raised in the absence of 2,4-D. These factors associated with the major fresh matter accumulation, suggest the presence of an enhanced metabolic activity in the explants cultivated in the presence of 2,4-D, relative to those cultivated in the absence of this growth regulator. Decreases in the contents of amino acids and sugars were detected late in the period of culture of explants. These decreases may be related to the depletion of the reduced

sources of nitrogen and carbon in the culture medium. Thus, protein synthesis also was affected in this period.

1 INTRODUÇÃO

Para obtenção de sucesso de programas de preservação ambiental, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que permitam produção contínua e numerosa de mudas das espécies nativas de cada região. A utilização prioritária destas espécies visa a recomposição da flora original do local, enfatizando a importância da utilização de espécies frutíferas que servem como atrativo para fauna nativa.

Algumas destas espécies, no entanto, apresentam pouca ou nenhuma produção de sementes, ou ainda, produzem sementes dormentes. Nestes casos, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos que estabeleçam formas alternativas para produção de mudas, principalmente aquelas espécies que encontram-se em processo de extinção.

Nos últimos anos, a cultura de tecido tornou-se importante ferramenta na tentativa de estabelecimento de metodologias de propagação de várias espécies. A propagação de plantas pela via indireta, ou seja, através da indução de calos a partir de explantes retirados da planta matriz, para posterior regeneração, propicia a obtenção de grande número de mudas. Entretanto, a reprodução vegetativa de espécies lenhosas possui alguns fatores que dificultam sua utilização com pleno êxito. Entre estes, pode-se citar a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas, bem como, a presença de substâncias oxidantes no material usado como explante. Para superar esses obstáculos, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências da planta tornando o processo bastante específico.

Por ser uma técnica que possibilita resultados bastante práticos, a cultura de tecidos ainda necessita de informações básicas para seu perfeito entendimento. Estudos bioquímicos que possam caracterizar as possíveis mudanças que ocorram no

explante, culminando com indução de calogênese, ainda estão em fase inicial de exploração. Baseado neste contexto, o presente trabalho possui caráter pioneiro no que se refere às espécies lenhosas nativas da região do sul de Minas Gerais.

O conhecimento de mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento de tecidos vegetais de espécies lenhosas mantidos "in vitro", podem fornecer dados importantes relacionados ao processo de estabelecimento e conseqüentemente, propiciar a otimização das condições de cultivo destas espécies.

O presente trabalho possui como objetivo principal, estudar o comportamento "in vitro" de explantes foliares e segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)

Pertencente a família Moraceae, a moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) (Figura 1) pode ser encontrada em todas as regiões brasileiras recebendo diversos nomes vulgares, como por exemplo: pau-brasil e pau-de-cores (CE), amarelinho (GO), amora e amora-branca (SP, MG), Tajaúba (RS), amoreira (BA, DF, MG, MS, MT, PI, PR, PS), limãorana e tatajuba-de-espinho (AM), limorana (PA, AM, MT); e ainda, na Argentina e na Venezuela, mora amarilla; na Bolívia, muruva; na Colômbia, brasil; no Equador, moral fino e no Paraguai, tatajyva (Carvalho, 1994).

A moreira está na lista das espécies em extinção no sul de Minas Gerais, categoria vulnerável, sendo a sua conservação genética feita "ex situ"; a espécie já foi extinta no município do Rio de Janeiro (Vieira, 1990).

Trata-se de espécie secundária tardia, comum na vegetação de capoeirões, terrenos abandonados ou de pastagem, início de encostas e solos aluviais, bem drenados e com textura arenosa a argilosa. Rara em floresta primitiva, é árvore longeva. No norte de Minas Gerais, suporta período seco de até 6 meses. É uma espécie considerada como padrão de solos de alto nível de fertilidade química (Carvalho, 1994).

A moreira produz grandes quantidades de frutos suculentos, bastante apreciados pela fauna, seus principais dispersores. Suas sementes quando armazenadas, perdem rapidamente a viabilidade. Possuem faculdade germinativa entre 30 e 70% (Carvalho, 1994).

Esta espécie é recomendada para arborização de represas e reposição de mata ciliar, e também para plantio de áreas com solo permanentemente encharcados (Torres et al., 1992).



FIGURA 1 - Aspectos gerais de planta jovem de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) mantida em casa de vegetação. (LAVRAS - MG, 1996)

2.2 INDUÇÃO DE CALOS

Calos são tecidos não diferenciados, constituídos por massa de células diferenciadas e desorganizadas que se desenvolvem como resposta a lesão química ou física (Yeoman e Macleod, 1977). Em condições experimentais, a obtenção de calos está intimamente relacionada com utilização de reguladores de crescimento do grupo das auxinas. Abbott (1978) afirma que produção de calos ou de células em suspensão, para certas espécies mantidas "in vitro", só podem ser conseguidas no escuro.

Calos são de grande importância para estudo de fenômenos morfogenéticos "in vitro", bem como para obtenção de variações genéticas no explante inicial (Hildebrandt, Riker e Duggar, 1946; Evans, Sharp e Funk, 1981). Além disso, suspensões de células (oriundas de calos de consistência friável) têm sido utilizadas para obtenção de produtos secundários, incluindo vários fármacos, representando biotecnologia de grande interesse científico e comercial (Paula et al., 1990).

A desdiferenciação e indução de regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo de experimentação até obtenção de protocolos para multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1990).

Segundo Pierik (1987), espécies lenhosas são mais difíceis de clonar "in vitro" que espécies herbáceas, devido à maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, dificuldade, às vezes, de rejuvenescimento, menor taxa de multiplicação, dormência das gemas, maior concentração de fenóis, e dificuldade de se manter plantas matrizes em casa de vegetação.

Alguns autores relatam sobre riscos de ocorrência de variação somaclonal em plântulas obtidas a partir de calos, como por exemplo Von Arnold (1987). No entanto, para Ball (1987), Chalupa (1987) e Ahuja (1987), a constituição morfogenética de plântulas regeneradas a partir de calos tem sido idêntica à planta mãe, no caso de *Sequoia sempervirens*, *Betula pendula* e *Populus* sp, respectivamente.

Teoricamente, para indução de formação de calos, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar totipotência (Grattapaglia e Machado, 1990). Segundo estes autores, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica são mais adequados para estimular formação de calos, conferindo a estes maior facilidade para emitirem brotações novas e radículas, principalmente.

A época do ano em que é feita a coleta de material para inoculação tem sido considerado por Bonga (1987), como fator de grande importância para o sucesso do estabelecimento "in vitro". Lin, Wagner e Heidmann (1991) observaram que explantes

de *Pinus ponderosa* Dougl ex Laws coletados em outubro formaram gemas axilares, enquanto que coleta realizada em fevereiro resultou em grande produção de calos.

De acordo com Siqueira e Inoue (1992), em explantes de inflorescência de coqueiro, todos os tratamentos utilizados induziram iniciação de calos, o que ocorreu também com tecido de folha da planta adulta. Segundo estes autores, o sucesso foi obtido provavelmente devido à passagem prévia dos explantes em meio líquido e posterior transferência destes para meio sólido, ou pela concentração de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) utilizada neste último meio. O meio líquido predispõe mais fortemente o explante à formação de calos, pela maior concentração, como também pela melhor distribuição e penetração do 2,4-D nos tecidos. Estes autores afirmam, ainda, que apenas o 2,4-D é suficiente para iniciar a formação de calos.

Para Amin e Razzaque (1993) trabalhando com *Averroa carambola*, a regeneração completa de plantas é possível usando cultura de calos obtidos de tecidos de plântulas. Neste caso, apesar de explantes de hipocótilo responderem melhor do que explantes de cotilédones, a regeneração de calos provenientes de cotilédones é superior àquela de calos de hipocótilo. Esta diferença de resposta pode ser atribuída às diferenças no estágio fisiológico dos dois explantes. De acordo com Litz e Conover (1980), folículos de *Averrhoa carambola* em transição da coloração avermelhada para verde, são mais indicados como explantes para indução de calos.

Um problema frequentemente encontrado durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. Os produtos da oxidação são tóxicos ao resto do explante e se difundem no meio de cultura, escurecendo-o. Este problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, pois os tecidos destas espécies são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina (Grattapaglia e Machado, 1990).

Segundo Deschamps (1993), a utilização de brotações provenientes do campo para multiplicação "in vitro" de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. *Schottiana*), resultou em grande escurecimento do meio de cultura, devido à exsudação de fenóis e conseqüentemente oxidação. O autor sugere a utilização de brotações de plantas mantidas em casa de vegetação, para obtenção de explantes mais uniformes e com melhor estado sanitário para a propagação "in vitro".

2.3 MEIO DE CULTURA

O sucesso no estabelecimento e crescimento de células vegetais "in vitro" geralmente é determinado pela natureza do explante e composição dos nutrientes do meio. A alta concentração de sais no meio, pode favorecer o crescimento de calos e morfogênese, e torná-lo inapropriado para crescimento de raízes excisadas, anteras, e órgãos florais (Ozias-Akins e Vasil, 1985).

Estudos do efeito do meio de cultura na propagação "in vitro" de pistachio (*Pistachio vera* L. cv. Mateur) mostraram que formação de calos e multiplicação de ramos foram maiores em meio "MS" (100% de formação de calos e 88,9% de formação de ramos). Todavia, havia mais folhas cloróticas que nos outros meios testados: Knop, Woody Plant e Anderson (Abousalim, 1991).

A faixa de temperatura utilizada em cultura de diversas espécies florestais está entre 20 e 28 °C constantes, ou com alternâncias de 25-20 °C dia/noite (Chalupa, 1987a). Temperaturas acima de 30 °C são desfavoráveis não só às plantas, mas também porque aumentam a evaporação de água do meio de cultura, tornando-o mais concentrado, o que pode resultar em toxidez (Grattapaglia e Machado, 1990).

A adição de reguladores de crescimento 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. Simultaneamente, a adição de reguladores de crescimento estimula certas respostas, como: crescimento e alongamento ou multiplicação da parte aérea. Estas respostas dependem do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano e estado geral da planta-matriz.

Trabalhando com organogênese parcial de *Averrhoa carambola*, Litz e Conover (1980) concluíram que altas taxas de citocinina (2iP) e baixas taxas de auxina (2,4-D) induziram formação de calos de coloração verde claro; altas concentrações de 2,4-D resultavam em calos mais friáveis, porém inadequados; altos níveis de citocinina resultaram na inibição do crescimento de calos, mas foram essenciais à regeneração da planta. A formulação ótima de reguladores de crescimento para a indução de calos resultou da combinação de 1-2 mg/L de 2iP e 0,2 mg/L de 2,4-D. Ainda de acordo com

estes autores, em contraste às folhas jovens, explantes de folhas maduras foram insensíveis à indução de calos por 2iP, e a indução e crescimento dos calos foram claramente dependentes da auxina 2,4-D.

Todavia, no estudo realizado por Amin e Razzaque (1993) em plântulas de *Averrhoa carambola*, não foi necessário o uso de 2,4-D para a indução de calos, os quais foram obtidos em meio "MS" com metade da concentração dos principais sais, e contendo 0,5-2,0 mg/L de BA e 0,1-0,5 mg/L de ANA.

Para obter sucesso na calogênese de árvores de *Caesalpinia pulcherrima* com 20 anos de idade, Rahman et al. (1993), testaram diferentes combinações de auxinas (AIA; ANA; 2,4-D; AIB) e citocininas (BA e Cinetina) em meio "MS", e os melhores resultados foram obtidos em meio contendo ANA somente, e 2,4-D em combinação, exceto com BA. Neste caso, o uso do 2,4-D também foi dispensável para obtenção de calogênese.

A propagação "in vitro" de *Bauhinia purpurea* utilizando-se gemas axilares é considerada um sucesso, apesar de lenta. Na tentativa de estabelecer um método mais rápido de propagação, explantes foram preparados a partir de ramos jovens de árvores de 15 a 18 anos de idade e colocadas em meio "MS" contendo várias concentrações de auxinas e citocininas, ambas isoladas, ou em combinação. Após 45 dias, explantes cultivados em 10 μ M de 2,4-D foram inteiramente convertidos em calos, que após mudança de meio, resultou no restabelecimento da planta (Anjani-Kumar e Kumar, 1992).

Calos foram obtidos de explantes de folhas e cotilédones de *Anacardium occidentale* L. cultivados em meio Schenk & Hildebrandt com adição de ANA (3,0-6,0 mg/L) e BA (0,8-1,0 mg/L) (Leva e Falcone, 1990).

Kamenicka e Rypak (1989), relataram que o mais ativo crescimento de calos de *Aesculus hippocastanum* foi encontrado na presença de cinetina, 2,4-D e quelato de ferro, e que a ótima concentração de mio-inositol neste meio foi inferior a 150 mg/L.

2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Apesar de calos serem tecidos não diferenciados e crescerem como grupos de células desorganizadas (Yeoman e Macleod, 1977), estes podem apresentar composição bioquímica e exigências distintas em relação ao explante de origem (Phan, Do e Hegedus, 1987).

Pesquisas têm sido realizadas em alguns países com o intuito de estudar o requerimento de diferentes tecidos de plantas mantidos "in vitro", visto que estes tecidos e até órgãos isolados perdem ou diminuem a capacidade de sintetizar seu próprio suprimento de carboidratos, muitas vitaminas, e substâncias de crescimento (Ozias-Akins e Vasil, 1985).

Análises realizadas por Mezzetti, Rosati e Casalicchio (1991) com relação à absorção de K, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn, Cu e carboidratos por explantes nodais de *Actinidia deliciosa* demonstram que quase todos estes elementos e os carboidratos foram absorvidos durante os primeiros 30 dias de cultura. Calos foram os principais sítios de acúmulo de todos minerais e também carboidratos.

Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al. (1995), também trabalhando com subcultura de calos de *A. deliciosa*, constataram que ocorrem importantes alterações metabólicas durante o período de cultivo, sendo que, estas alterações parecem não ser severas o suficiente para inibir o crescimento do calos.

As análises de aminoácidos, açúcares redutores, açúcares solúveis totais realizados em material vegetal mantidos "in vitro" (Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al., 1995); e sacarose, glicose, frutose e íons inorgânicos realizadas no meio de cultivo (Mezzetti et al., 1991a; Kozai et al. 1991), forneceram valores bastante uniformes, resultando em variações mínimas de desvio padrão, seja no material vegetal ou no meio de cultivo.

Wann et al. (1987) conseguiram diferenciar bioquimicamente calos embriogênicos de calos não-embriogênicos de *Picea abies*. Trabalho semelhante foi realizado por Rajyalakshmi et al. (1991), demonstrando a existência de polipeptídeos especificamente associados com calos embriogênicos e não-embriogênicos de folhas de trigo (*Triticum aestivum*). Estes últimos autores mostraram, ainda, que o conteúdo de

proteína solúvel na base de peso fresco, também difere entre os tipos de calos. Já Coleman e Ernst (1991) conseguiram detectar diferentes proteínas envolvidas com o processo de calogênese e com o processo de regeneração de parte aérea, a partir de explantes de ramos internodais de *Populus deltoides*.

Segundo Phan, Do e Hegedus (1987), de forma geral, em plântulas obtidas "in vitro", os açúcares solúveis e compostos fenólicos diminuem, enquanto os ácidos orgânicos e proteínas solúveis tendem a aumentar. Porém, calos obtidos desses explantes apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos e açúcares não-redutores. Essas características bioquímicas e metabólicas dos calos podem ter sido modificadas durante seu crescimento, influenciando conseqüentemente, as suspensões de células obtidas nas condições de meios de cultivo e incubação adotadas.

Ao estudarem a presença de substâncias esteróides em células intactas e cultura de células de *Yucca gloriosa*, Gogoberidze, Mamaladze e Zambakhidze (1992) detectaram algumas mudanças epigenéticas durante o processo de diferenciação. Ambas composições quantitativa e qualitativa de esteróides glicosídeos e saponinas foram sujeitas a alterações. A atividade da β -glicosidase não foi observada em suspensão de células de *Yucca gloriosa*. No entanto, a composição de esteróides glicosídeos e saponinas é restaurada em plantas regeneradas.

A ação da invertase na absorção dos açúcares do meio tem recebido atenção especial nos estudos de nutrição de tecidos vegetais mantidos "in vitro". Segundo Kozai et al. (1991), o decréscimo nos teores de sacarose no meio é acompanhado pelo aumento nas concentrações de glicose e frutose. Por outro lado, Mezzetti, Conte e Rosati (1991) afirmam que a absorção de sacarose pelos explantes não possui correlação com o decréscimo no meio. Isso ocorreria devido a fatores como hidrólise da sacarose nos monossacarídeos glicose e frutose durante o processo de autoclavagem.

Avaliando parâmetros de crescimento de suspensão celular de *Picea glauca-engelmannii* e *P. mariana* Mill, Lulsdorf et al. (1991) encontraram correlação positiva (0,98) nos parâmetros de crescimento em ganho de MF e MS. Estes autores afirmam ainda que na maioria dos casos, a limitação do crescimento "in vitro" está relacionado com suprimento de carboidratos, e não com fornecimento de amônio, nitrato e potássio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INDUÇÃO DE CALOS

3.1.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material foliar (1ª e 2ª folhas totalmente expandidas) e o segmento nodal (parte terminal dos ramos) foram obtidos de plantas matrizes de aproximadamente 18 meses de idade, mantidas em sombrite (30% de sombreamento). Após retirados, os materiais foram colocados em recipientes contendo água destilada e autoclavada até a chegada no laboratório. Em seguida, as folhas foram separadas dos segmentos nodais, e posteriormente, ambos foram seccionados em segmentos menores para realização do processo de desinfestação.

3.1.2 DESINFESTAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi desinfestado superficialmente em câmara de fluxo laminar, utilizando-se primeiramente imersão em etanol 50% (v/v) por 30 segundos para folha e etanol 70% (v/v) por 60 segundos para segmento nodal. Em seguida, utilizou-se imersão em água sanitária 50% (v/v) por 5 minutos para folha e 15 minutos para segmento nodal. Após realização do processo de desinfestação, os materiais vegetais foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada para remoção do excesso das soluções desinfestantes.

3.1.3 PREPARO DOS EXPLANTES

Após a realização do processo de desinfestação, o material vegetal foi transferido para placas de Petri esterilizadas contendo papel de filtro, onde sofreram cortes longitudinais e transversais para eliminação da nervura central e bordas laterais do terço médio das folhas; e extremidades e pontos de inserção das folhas nos segmentos nodais. Ao final do preparo, obtiveram-se explantes foliares com 1 cm² e segmentos nodais com 1.5 cm de comprimento, aproximadamente.

3.1.4 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Após o preparo dos explantes, ainda em câmara de fluxo laminar, estes foram inoculados em tubos de ensaio 15,0 x 2,5 cm contendo **Wood Plant Medium** (Llyod e McCown, 1980) (Tabela 1), acrescido ou não dos reguladores de crescimento (Tabela 2). O meio foi previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos, e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Foi inoculado 01 explante/tubo. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, a temperatura de 26 ± 2 °C por um período de 30 dias, sendo avaliada a indução de calogênese nos seguintes períodos: 3, 6, 12, 20 e 30 dias após a inoculação. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento, sendo que cada repetição era composta por 6 tubos. Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 1 a 5% para o teste de F. As médias foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5%.

3.1.5 PRODUÇÃO DE MATERIAL "IN VITRO" PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA

Foram escolhidos o tratamento controle e o melhor tratamento com uso de reguladores para a realização das análises bioquímicas. Desta forma, foi feita a inoculação dos explantes, seguindo a metodologia descrita no item 3.1.4. Nos

períodos 0, 3, 6, 12, 20 e 30 dias após inoculação, foram realizadas pesagens, seguidas de congelamento dos explantes em nitrogênio líquido e manutenção em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração das macro e micromoléculas. Cada pesagem foi composta de três repetições, com seis explantes por repetição. Os dados obtidos com as pesagens foram utilizados para acompanhar o crescimento médio dos explantes ao longo do experimento.

TABELA 1 - Composição básica do meio Wood Plant Medium (Lloyd e McCown, 1980)

Compostos	Concentração final (mg/L)
NH_4NO_3	400,00
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556,00
K_2SO_4	990,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96,00
KH_2PO_4	170,00
H_3BO_3	6,20
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,00
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80
Na_2EDTA	37,20
Tiamina.HCl	1,00
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina.HCl	0,50
Glicina	2,00
Inositol	100,00
Sacarose	20.000,00
Agar	6.000,00

TABELA 2 - Reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura WPM, para indução de calos em explantes de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) (LAVRAS, 1996).

Tratamento	Composição
0 (controle)	sem reguladores de crescimento
1	28,8 μ M de 2,4-D
2	28,8 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BA
3	28,8 μ M de 2,4-D + 4,44 μ M de BA

3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

3.2.1 EXTRAÇÃO DE MICRO E MACROMOLÉCULAS

Anteriormente ao processo de extração, foi realizada homogeneização do material vegetal, para retirada da amostra. Esse processo foi necessário, em função da obtenção limitada de material vegetal. A extração foi realizada através de maceração das amostras em almofariz à temperatura de aproximadamente 4 °C , utilizando-se etanol 80% (v/v) como extrator de açúcares redutores, açúcares solúveis totais e aminoácidos. A relação de extração foi 1:10 (p/v). Em seguida, foi realizada centrifugação à temperatura de 4 °C (10 min; 3000.g), sendo o sobrenadante recolhido. O processo foi repetido com a re-suspensão e recentrifugação do precipitado, e o sobrenadante foi adicionado ao conteúdo da primeira extração, seguida de homogeneização e quantificação. O precipitado da segunda extração foi re-suspenso em NaOH 0,1 N, seguindo a relação 1:4 (p/v), e centrifugado à temperatura de 4 °C (10 min; 3000.g), para extração de proteínas solúveis totais. O processo foi repetido e o sobrenadante das duas extrações foi recolhido e homogeneizado para realização das quantificações das amostras.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

As determinações dos teores de aminoácidos, açúcares redutores (AR) e açúcares solúveis totais (AST) nos extratos obtidos com a extração em etanol 80%, foram feitas através de reações colorimétricas pelo método da ninhidrina (Cocking e Yemm, 1954), método do dinitrosalicilato (Miller, 1959) e método da antrona (Hodge e Hofreiter, 1962), respectivamente. Para quantificação dos aminoácidos livres adicionou-se em tubo de ensaio, uma alíquota do extrato, juntamente com 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0), 0,2 mL do reagente de ninhidrina e 1,0 mL de KCN 2%. O conteúdo do tubo foi, então, agitado e colocado em banho-maria a 100 °C por 20 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 1,3 mL de etanol 60% e realizou-se leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda 570 nm. Para quantificação dos açúcares redutores utilizou-se uma alíquota do extrato e 1,0 mL de Dinitrosalicilato, seguido de banho-maria a 100 °C por cinco minutos. Após resfriamento, realizou-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm. A quantificação de açúcares consistiu na adição de 2,0 mL do reagente de antrona e alíquota do extrato, seguido banho-maria por três minutos. Após resfriamento, realizou-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 620 nm. Na determinação de ambos açúcares e de aminoácidos, utilizou-se glicose e glicina como padrão, respectivamente. Foram realizadas três leituras por amostra.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

Os teores de proteínas resultaram da quantificação de alíquotas das extrações com etanol 80% e NaOH 0,1 N. Para tal, utilizou-se o método de Bradford (1976), que consiste na reação colorimétrica entre as proteínas de uma alíquota do extrato e o reagente de comassie blue G-250. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm, usando a SoroAlbuminaBovina (BSA) para determinação da curva padrão. Foram realizadas três leituras por amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FOLHA DE MOREIRA

4.1.1 INDUÇÃO DE CALOS

Explantos foliares de moreira inoculados em meio WPM contendo de 28,8 μM de 2,4-D acrescido ou não de BA em baixas concentrações (2,22 μM e 4,44 μM) e mantidos no escuro, resultaram na produção de calos de aspecto friável e coloração amarelada (Figura 2). Resultados obtidos por Litz e Conover (1980), trabalhando com explantes foliares de plantas jovens e adultas de *Averroa carambola*, demonstram que a indução de calos friáveis somente foi possível com a utilização de 2,4-D em altas concentrações. Em *Piper longum*, a utilização de baixas e elevadas concentrações de BA resultou na indução de brotações e calos friáveis, respectivamente (Bhat, Chandel e Malik, 1995).

A presença de calos foi detectada somente 20 dias após inoculação (DAI) (Figura 3), sendo que, nenhuma formação de calos foi detectada nos explantes do tratamento controle (Figuras 2 e 3). Esses resultados demonstram a necessidade do uso de regulador de crescimento para indução de calogênese em tecidos foliares de *Chlorophora tinctoria*.

O uso de 2,4-D isoladamente ($T_1 = 28,8 \mu\text{M}$), induziu calogênese e rizogênese (Figura 2). A indução de rizogênese com utilização de 2,4-D também foi relatada por Rita e Floh (1995), trabalhando com calos obtido a partir de folhas de *Cuphea ericoides*.

A combinação de auxina com citocinina ($T_2 = 28,8 \mu\text{M}$ de 2,4-D + 2,22 μM de BA e $T_3 = 28,8 \mu\text{M}$ de 2,4-D + 4,44 μM de BA) reduziu a percentagem de explantes

com calos (Figura 3), e parece ter inibido a rizogênese (Figura 2). Segundo Ozias-Akins e Vasil (1985), citocininas exógenas nem sempre são necessárias, e muitos tecidos desenvolvem indefinidamente "in vitro" apenas com suprimento de auxinas. Ainda segundo esses autores, o uso de citocininas em altas concentrações (1-10 mg/L) pode induzir a formação de brotações adventícias, mas a formação de raízes é geralmente inibida. As citocininas BA e Zeatina em concentrações de 8 μM foram citadas por Meyer e Van-Staden (1995) como responsáveis pela inibição do crescimento de calos obtidos de folhas de *Oxalis linearis*.

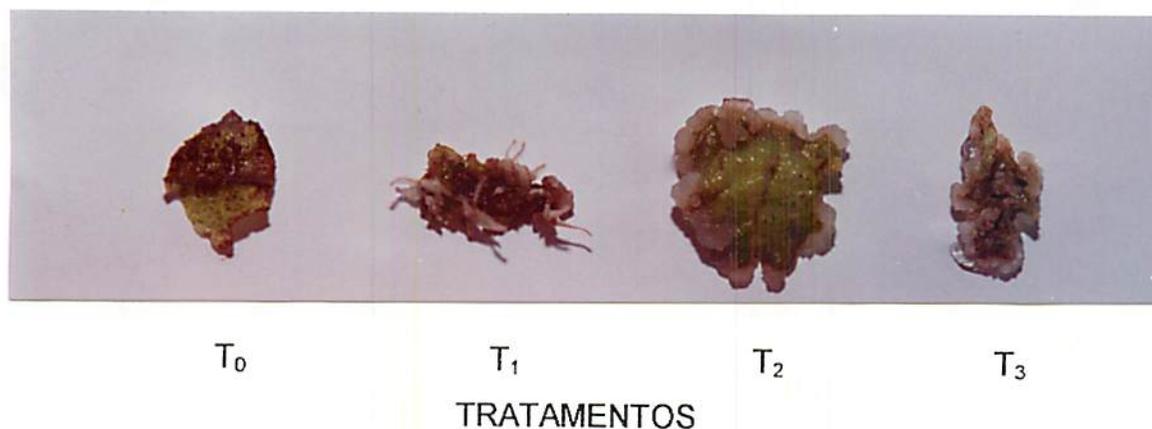


FIGURA 2 - Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por 30 dias em meio WPM: T₀ = controle; T₁ = 28,8 μM de 2,4-D; T₂ = 28,8 μM de 2,4-D + 2,22 μM de BA; T₃ = 28,8 μM de 2,4-D + 4,44 μM de BA. (LAVRAS - MG, 1996)

Ao contrário do aparente aumento em área apresentado por explantes foliares cultivados nos tratamentos controle e 28,8 μM de 2,4-D, observa-se pela Figura 2, que explantes cultivados nos tratamentos contendo 28,8 μM de 2,4-D e 28,8 μM de 2,4-D + 4,44 μM de BA apresentaram aspecto enrugado. Isto pode ser atribuído a um maior crescimento na face abaxial em relação à face adaxial do explante foliar.

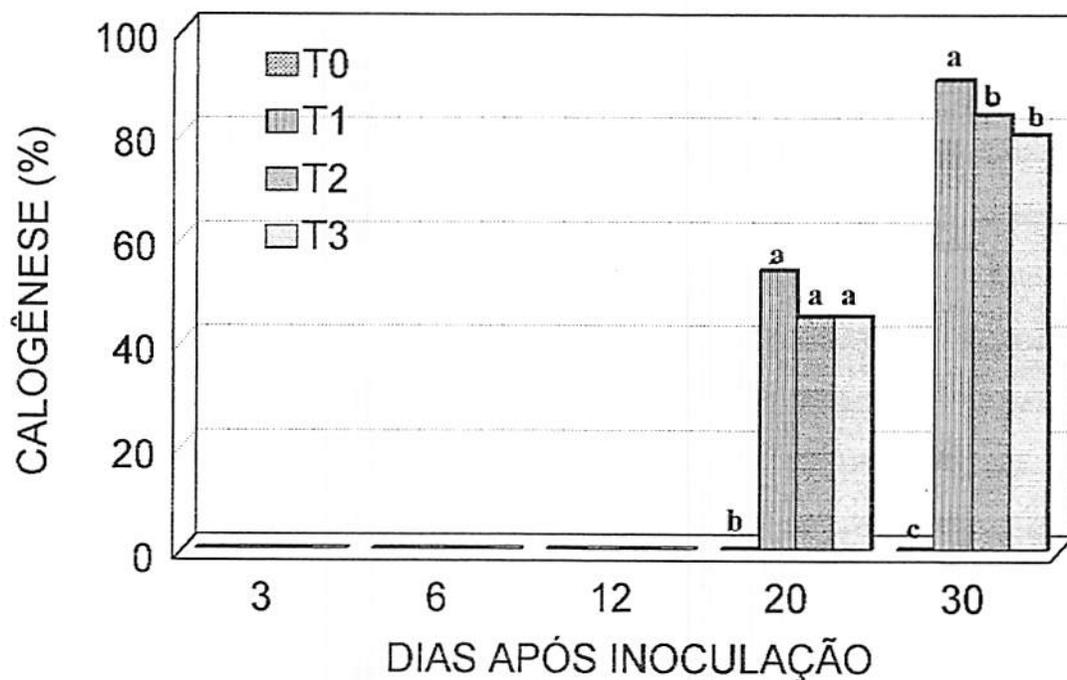


FIGURA 3 - Indução de calogênese em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: T₀ = controle; T₁ = 28,8 μ M de 2,4-D; T₂ = 28,8 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BA; e T₃ = 28,8 μ M de 2,4-D + 4,44 μ M de BA. Tratamentos seguidos da mesma letra a cada conjunto de barras, não diferem entre si (Tukey 5%). (LAVRAS - MG, 1996)

4.1.2 CURVA DE CRESCIMENTO MÉDIO EM MATÉRIA FRESCA (MF)

Para determinação da curva de crescimento médio em Matéria Fresca (MF) de explantes foliares de moreira "in vitro", tecidos foliares foram inoculados em meio WPM na ausência ou presença de 28,8 μ M de 2,4-D, realizando-se pesagens nos períodos previamente determinados. A escolha dos explantes cultivados na presença de 28,8 μ M de 2,4-D, foi devido à elevada porcentagem de calogênese induzida por este tratamento (Figura 3).

Os resultados indicaram que, embora os explantes cultivados sem regulador de crescimento tenham apresentado tendência de ganho de peso em MF após a inoculação, comparativamente, os explantes cultivados na presença de 28,8 μ M de 2,4-

D obtiveram maior acréscimo de peso em MF, a partir do 3^o DAI (Figura 4). Após 30 dias de inoculação, explantes cultivados na presença de 2,4-D apresentaram peso médio em MF 87,5% superior aos explantes cultivados em meio isento de regulador (Figura 4).

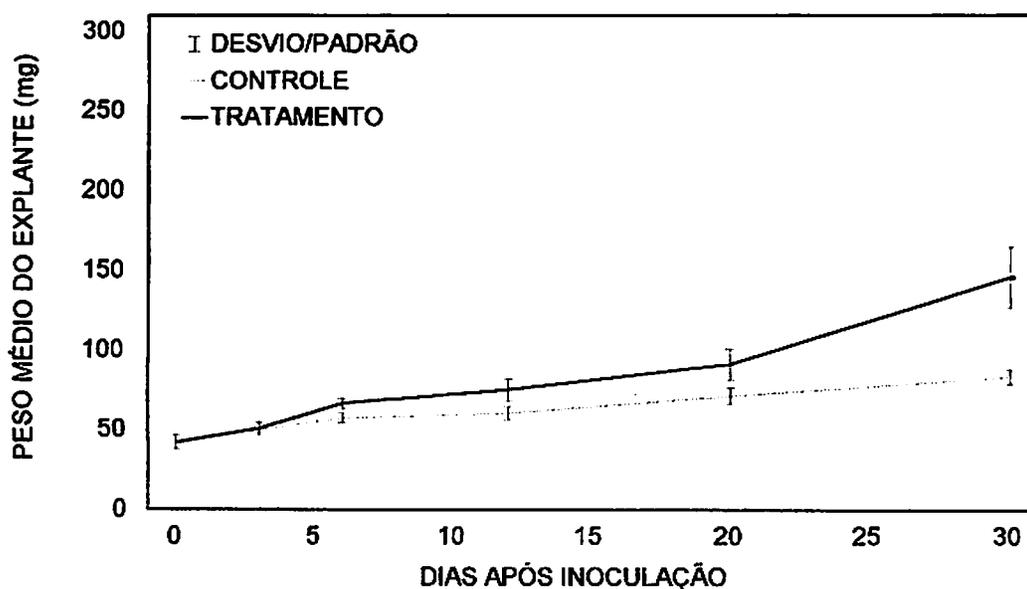


FIGURA 4 - Curva de crescimento médio em matéria fresca de explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM na ausência de 2,4-D = Controle; ou na presença de 28,8 μ M de 2,4-D = Tratamento. (LAVRAS - MG, 1996)

Estes resultados sugerem que o ganho de peso em MF dos explantes cultivados na ausência de regulador seja atribuído à expansão em área ocorrida após a inoculação (Figura 5A). No caso dos explantes submetidos ao tratamento com 2,4-D, os resultados indicam que o ganho de peso em MF foi maior no período final (20-30 DAI).

O crescimento inicial pode ser atribuído à expansão em área, semelhante ao que ocorreu com os explantes cultivados na ausência de 2,4-D (Figura 5A). O crescimento durante o período final, no entanto, pode ser atribuído à indução de calos e raízes (Figura 5B). Resultados obtidos por Mezzetti et al. (1991) indicam que ocorreu acúmulo tanto em termos de matéria fresca quanto de matéria seca em calos de

Actinidia deliciosa até o 30^o DAI. Estudos com repicagem de calos desta mesma espécie realizados por Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al. (1995), determinaram um acúmulo em MF até o 45^o dia após a repicagem dos calos.

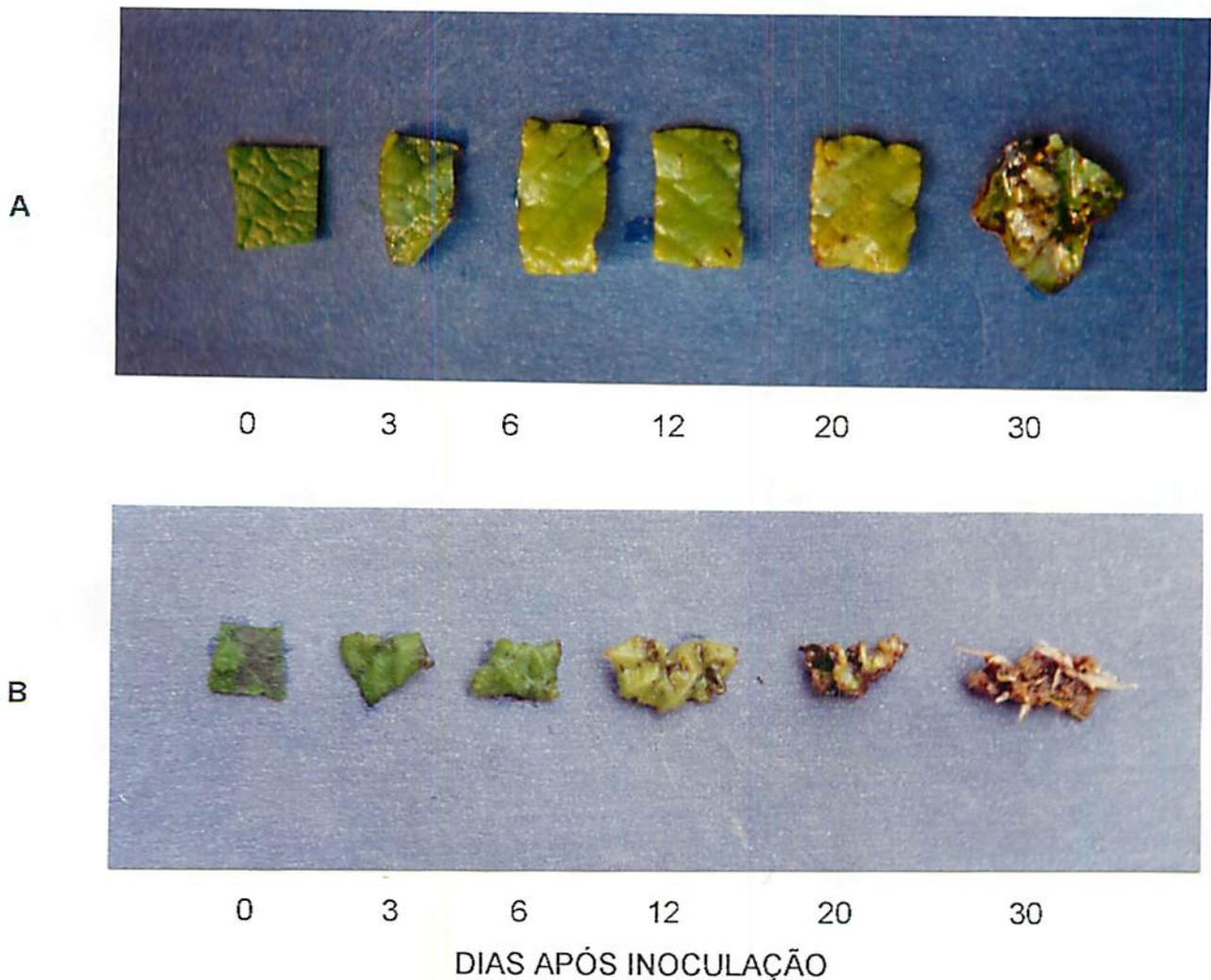


FIGURA 5 - Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: (A) Controle = ausência de 2,4-D; (B) Tratamento = presença de 28,8 μM de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996).

4.1.3 TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS E AMINOÁCIDOS

Os explantes foliares de moreira cultivados em meio WPM na presença ou ausência de 2,4-D foram coletados em diferentes DAI e analisados quanto ao teor de proteínas solúveis totais e aminoácidos. Os resultados indicam que no período de 0-3 DAI, houve tendência de redução no teor de proteínas, independente do tratamento (Figura 6A). Essa redução pode ter sido influenciada pelo fato da folha ser um tecido de considerável sensibilidade. Segundo Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al. (1995), para manter a taxa de crescimento, calos de *Actinidia deliciosa* mantidos "in vitro" adaptaram seu metabolismo, em relação às mudanças do meio, principalmente quanto à disponibilidade de nutrientes e acúmulo de produtos catabólitos.

A absorção do aminoácido glicina e do íon amônio adicionados ao meio de cultivo como fontes reduzidas de nitrogênio (Tabela 1), proporcionou aumento no teor interno de aminoácidos (Figura 6B), restabelecendo a síntese protéica nos períodos subsequentes, independente do tratamento (Figura 6A). Segundo George, Puttock e George (1988), a presença de amônio no meio resulta no aumento da síntese de aminoácidos (e proteínas), os quais são produtos do metabolismo dos carboidratos.

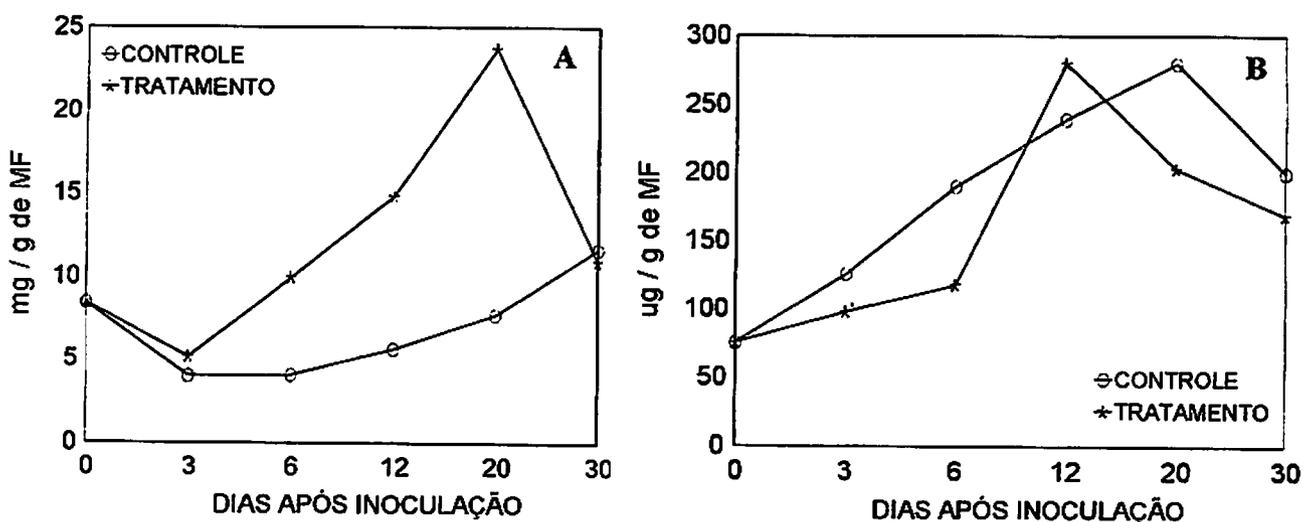


FIGURA 6 - Teores de proteínas solúveis totais (A) e aminoácidos (B) em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996).

Após o aumento nos teores de aminoácidos, os explantes cultivados na presença de 28,8 μM de 2,4-D apresentaram o máximo acúmulo de proteínas solúveis totais (23,6 mg/g de MF) no 20^o DAI. A tendência de redução dos teores de proteínas possivelmente ocorreu em função da diminuição do teor de aminoácidos nestes explantes a partir do 12^o DAI quando foi detectado o máximo de acúmulo desta micromolécula (280 $\mu\text{g/g}$ de MF) (Figura 6B). Este aumento inicial e posterior redução no teor de aminoácidos também foi detectada por Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al. (1995), trabalhando com subcultivo de calos de *Actinidia deliciosa*.

Embora o teor máximo de aminoácidos em explantes cultivados na ausência de 2,4-D tenha sido o mesmo dos explantes cultivados na presença de 2,4-D (280 $\mu\text{g/g}$ de MF), este valor só foi alcançado no 20^o DAI nos explantes cultivados na ausência de 2,4-D, quando registrou-se redução no teor desta micromolécula (Figura 6B).

Os explantes cultivados na ausência de 2,4-D continuaram acumulando proteína até o final das análises (30^o DAI) (Figura 6A). A ausência de redução nos teores de proteínas solúveis totais em explantes cultivados em meio isento de regulador de crescimento (Figura 6A), pode ser atribuído ao fato da redução no teor de aminoácidos nestes explantes ter ocorrido na fase final das análises (Figura 6B).

O maior teor de proteínas, aliado à antecipação na redução do teor de aminoácidos, indicam maior atividade nos explantes cultivados na presença de 2,4-D (Figura 6A). Quando os teores de proteínas são comparados com a curva de crescimento dos explantes cultivados na presença de 2,4-D, observa-se que mesmo com a redução no teor de proteínas, o explante continuou acumulando MF no período 20-30 DAI, coincidindo com o período de indução de rizogênese (Figura 5B). Possivelmente, a elevada atividade metabólica deste período (indução de calogênese seguida de rizogênese), aliada à diminuição das reservas fornecidas pelo meio de cultivo, tenham levado o explante a utilizar parte das reservas protéicas para investir em crescimento.

Lal et al. (1993), detectaram aumento no conteúdo de proteínas durante a fase de crescimento de calos de cana-de-açúcar, e decréscimo nestes teores durante a fase de diferenciação dos calos.

4.1.4 TEORES DE AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Os explantes foliares de moreira cultivados em meio WPM na presença ou ausência de 2,4-D foram coletados em diferentes tempos de inoculação e analisados quanto aos teores de açúcares redutores (AR) e açúcares solúveis totais (AST). Os explantes inoculados na presença de 2,4-D apresentaram uma tendência de aumento no teor de AR até o 20^o DAI, quando houve uma tendência de redução até o 30^o DAI (Figura 7A).

No caso dos explantes cultivados em meio isento de reguladores, houve uma tendência de redução no teor de AR no período de 0-3 DAI. Após esse período, o comportamento foi semelhante aos explantes cultivados na presença de 2,4-D. Resultados semelhantes foram encontrados por Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al. (1995), quantificando AR e sacarose em calos de *Actinidia deliciosa* mantidos na presença de reguladores de crescimento. No entanto, estes autores detectaram um período de estabilidade nos teores desses açúcares entre os períodos de acréscimo e decréscimo dos respectivos teores.

Os resultados das análises de AST nos explantes foliares apresentaram um comportamento bastante semelhante, independente da presença ou ausência de regulador de crescimento no meio de cultivo (Figura 7B). Foram detectados dois períodos apresentando tendência de redução nos teores de AST: entre 3-6 DAI e 20-30 DAI. A redução de AST no período 3-6 DAI, pode ser resultado de uma possível síntese de açúcares insolúveis, como detectado por Mezzetti, Conte e Rosati (1991) e Lefebvre et al. (1992). A redução nos teores de açúcares nos explantes no período final (20-30 DAI), pode estar relacionado com um possível esgotamento do meio de cultivo (Figura 7B). Mezzetti et al. (1991) relatam que os teores de sacarose presentes no meio de cultivo após 15 e 30 dias de inoculação dos explantes estavam reduzidos a 32 e 4% do total inicial, respectivamente.

Comparando os valores de AR e AST (Figuras 7A e 7B), verificou-se que os explantes cultivados em meio com 2,4-D apresentaram valores superiores de AR e inferiores de AST quando comparados com explantes cultivados na ausência deste regulador. Isso evidencia que, proporcionalmente, os explantes cultivados na presença

da auxina 2,4-D apresentam um menor teor de açúcares não-redutores, sugerindo maior atividade metabólica. Mezzetti, Conte e Rosati (1991), no entanto, afirmam que a absorção de sacarose pelos explantes não está correlacionada com o decréscimo no meio, como observado para sais minerais. Isso é devido, entre outros fatores, à hidrólise de sacarose em glicose e frutose durante o processo de autoclavagem. Hisajima e

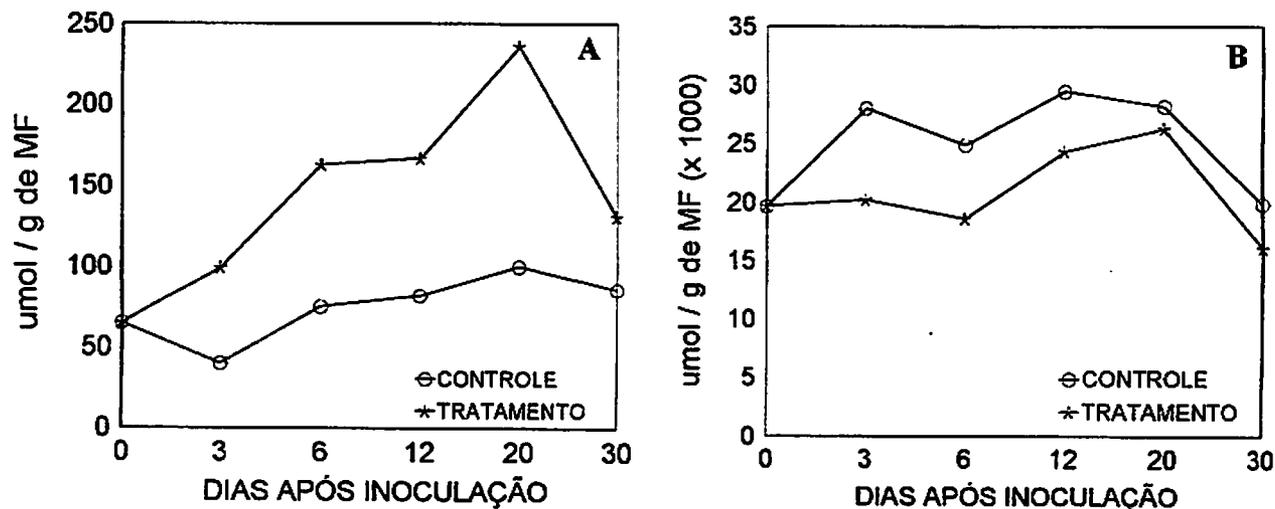


FIGURA 7 - Teores de açúcares redutores (A) e açúcares solúveis totais (B) em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle (ausência 2,4-D); Tratamento (28,8 μ M de 2,4-D) (LAVRAS - MG, 1996).

Ito (1983) sugerem que a sacarose é hidrolizada pela invertase de parede das células, e que a glicose e frutose obtidas são incorporadas pelas células. Estudos têm demonstrado que esses dois monossacarídeos são degradados dentro das células pela ação de enzimas citoplasmáticas para produção de energia (Sahulka e Lysa, 1980), formação de esqueleto protéico (Radin, Parker e Sell, 1978), e biossíntese de sacarose e amido. Baseado nestas evidências, sugere-se que as várias possibilidades metabólicas existentes podem, em parte, explicar a inexistência de uma correlação positiva entre as tendências das curvas de AR e AST em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).

4.2 SEGMENTO NODAL DE MOREIRA

4.2.1 INDUÇÃO DE CALOS

Explantos oriundos de segmentos nodais jovens de moreira inoculados em meio WPM acrescido de reguladores de crescimento e mantidos no escuro, resultaram na produção de calos de aspecto friável e coloração amarelada (Figura 8). Rout, Debata e Das (1991); Rahman et al. (1993); e Chen e Jonard (1994) também relatam a obtenção de calos friáveis a partir de segmentos nodais de *Rosa hybrida* L. Cv. Landora, *Caesalpinia pulcherrima*, e *Prunus americana*, respectivamente, utilizando a auxina 2,4-D no meio de cultivo.

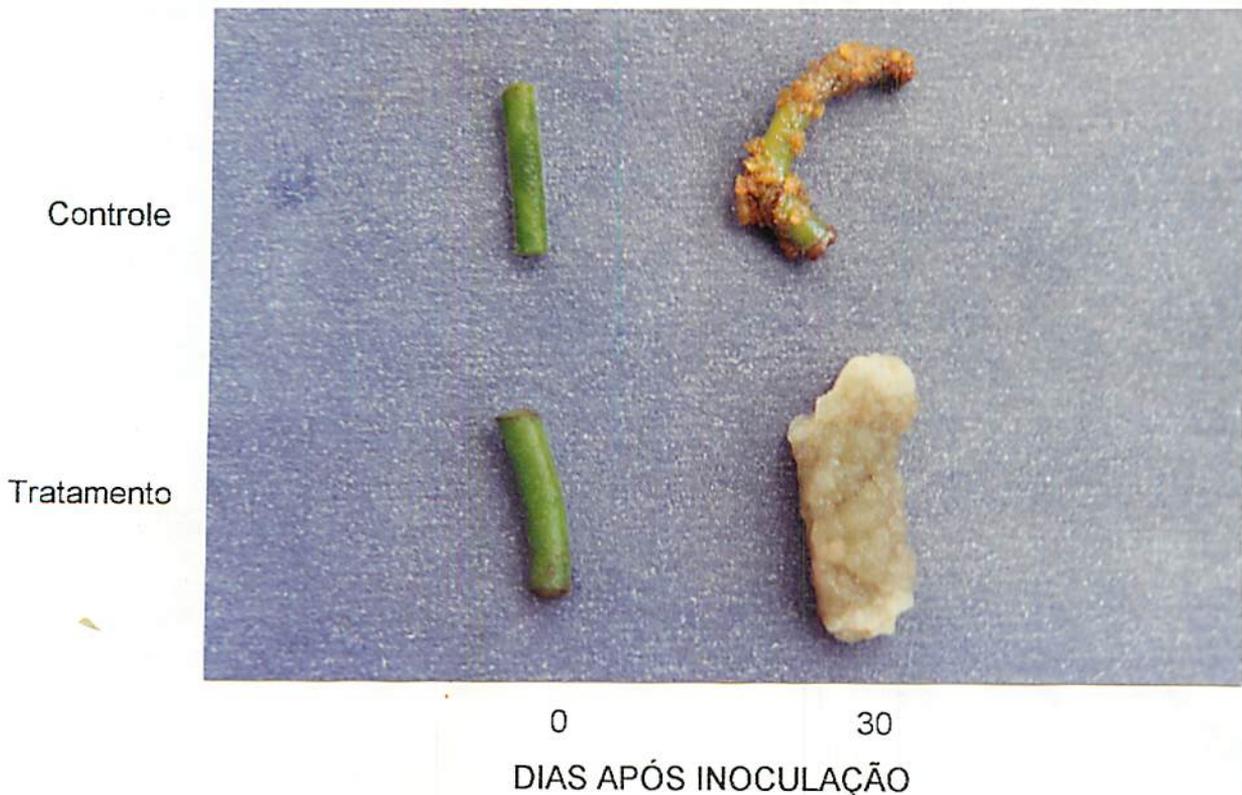


FIGURA 8 - Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes oriundos de segmento de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por 30 dias em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D. (LAVRAS - MG, 1996)

No caso dos explantes cultivados em meio isento de regulador de crescimento, os calos apresentaram aspecto friável, porém com coloração escura, evidenciando a ocorrência de processos oxidativos no tecido (Figura 8). Grattapaglia e Machado (1990), afirmam que a ocorrência de processos oxidativos é particularmente sério em tecidos de espécies lenhosas, devido a elevada presença de compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. Neste caso, a adição de reguladores de crescimento ao meio, além de aumentar a indução e crescimento de calos, parece determinar redução nos processos oxidativos. Segundo Sakuta e Komamine (1987), diferentes tipos de reguladores de crescimento, tais como, auxina e citocinina, são conhecidos por mostrar diferentes efeitos no crescimento e metabolismo secundário. Vários efeitos de auxinas no metabolismo secundário tem sido reportado; em muitos casos, auxinas sintéticas, especialmente 2,4-D, inibem a produção de metabólitos secundários.

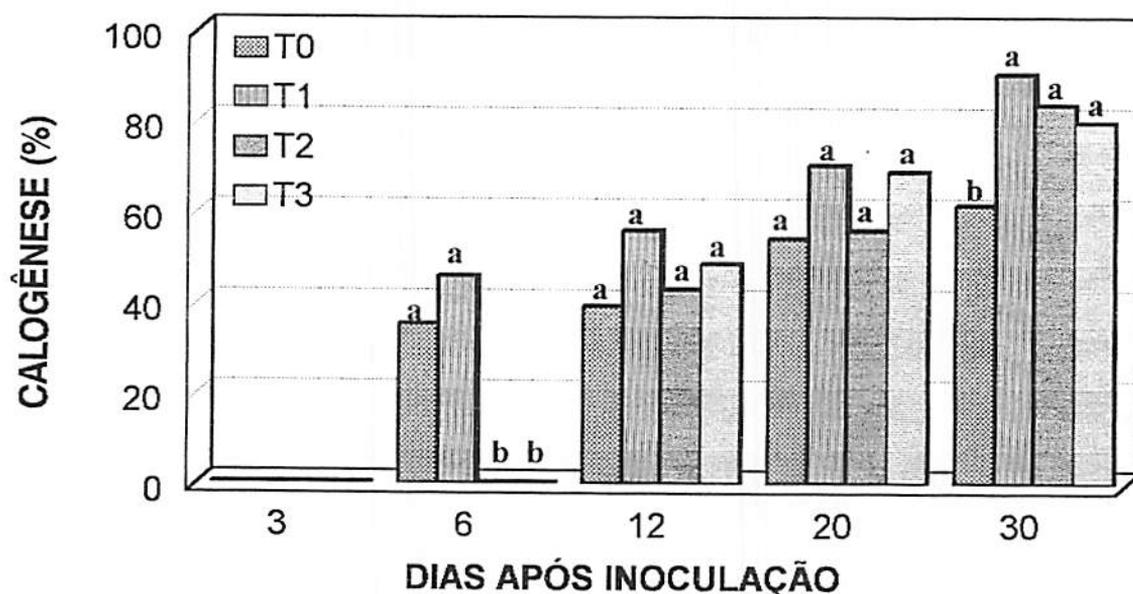


FIGURA 9 - Indução de calogênese em explantes de segmento de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: T₀ = controle; T₁ = 28,8 µM de 2,4-D; T₂ = 28,8 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BA; T₃ = 28,8 µM de 2,4-D + 4,44 µM de BA. Tratamentos seguidos da mesma letra a cada grupo de barras, não diferem entre si (Tukey 5%) (LAVRAS - MG, 1996).

Os primeiros indícios de indução de calogênese ocorreram por volta do 6^o DAI, nos explantes do tratamento controle e do tratamento contendo 28,8 μM de 2,4-D. A combinação entre 28,8 μM 2,4-D e BA (22,2 μM ou 4,44 μM) só foi capaz de induzir calogênese por volta do 12^o DAI (Figura 9). Essa diferença temporal de resposta pode estar relacionada à presença de BA no meio de cultivo.

A quantidade de calos produzido nos explantes tratados com reguladores de crescimento foi bastante superior às aquelas encontradas nos explantes cultivados na ausência de reguladores (Figura 8). Dentre os tratamentos utilizados, o uso de 28,8 μM de 2,4-D apresentou melhores resultados em termos de porcentagem de explantes com indução de calogênese, embora não tenham sido detectadas diferenças significativas deste tratamento em relação às combinações de 2,4-D e BA (Figura 9). Rahman et al. (1993), afirmam que calogênese em explantes nodais de *Caesalpinia pulcherrima* é obtido com o acréscimo de ANA, isoladamente, ou 2,4-D em alguma combinação, exceto com BA. Em explantes nodais de *Coccinia indica*, no entanto, o aumento de BA no meio de cultivo de 0,5 para 2,0 mg/L resultou em maior porcentagem de explantes com calos (Josekutty et al., 1993).

As concentrações de BA utilizadas para *C. tinctoria* parecem ter exercido um retardamento no efeito da auxina 2,4-D (Figura 9). Salisbury e Ross (1991) afirmam que a aplicação de citocininas endógenas podem inibir o crescimento "in vitro" por acarretar um excesso nos níveis endógenos deste regulador de crescimento.

4.2.2 CURVA DE CRESCIMENTO MÉDIO EM MATÉRIA FRESCA (MF)

Para determinação da curva de crescimento médio em Matéria Fresca (MF) de segmentos nodais de moreira "in vitro", explantes destes tecidos foram inoculados em meio WPM na ausência ou presença de 28,8 μM de 2,4-D. A escolha do tratamento com 2,4-D, deve-se à elevada porcentagem de indução de calogênese detectada no experimento de indução de calos (Figura 9).

Os resultados da análise de crescimento indicam a necessidade do uso de regulador de crescimento para indução expressiva de calogênese em segmento de moreira (Figuras 11A e 11B).

O aumento em MF dos explantes coincidiu com o surgimento de calos nestes tecidos, fato que ocorreu a partir do 6^o DAI e se estendeu até o 30^o DAI (Figura 10). Mezzetti et al. (1991; 1991a), estudaram o crescimento "in vitro" e utilização de carboidratos e minerais do meio por explantes oriundos de segmentos nodais de *A. deliciosa*. Segundo esses autores, nos primeiros 30 dias de cultivo, o decréscimo da disponibilidade de alguns minerais no meio provavelmente diminuiu o crescimento do explante, mas continuou a absorção de glicose e frutose, resultando no acúmulo destes dois monossacarídeos preferencialmente no calos e nas folhas induzidos a partir do explante. No segundo mês de cultivo, a deficiência de elementos minerais essenciais e sacarose restringiram o crescimento do calos, que embora continuasse absorvendo glicose e frutose do meio, não resultou em acúmulo no tecido. Durante o período de observação, os citados autores observaram pouco ganho de peso pelo segmento nodal isoladamente.

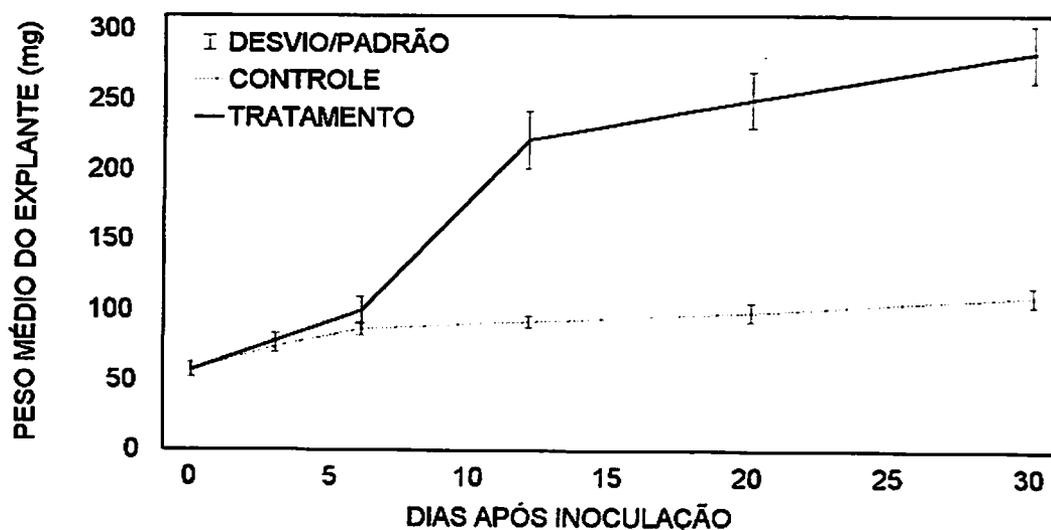


FIGURA 10 - Curva de crescimento médio em matéria fresca de explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D: Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996)

Após 30 dias de inoculação, o peso médio em MF dos explantes cultivados na presença de 28,8 μM de 2,4-D foi 147% superior ao peso médio em MF dos explantes cultivados na ausência de regulador (Figura 10).

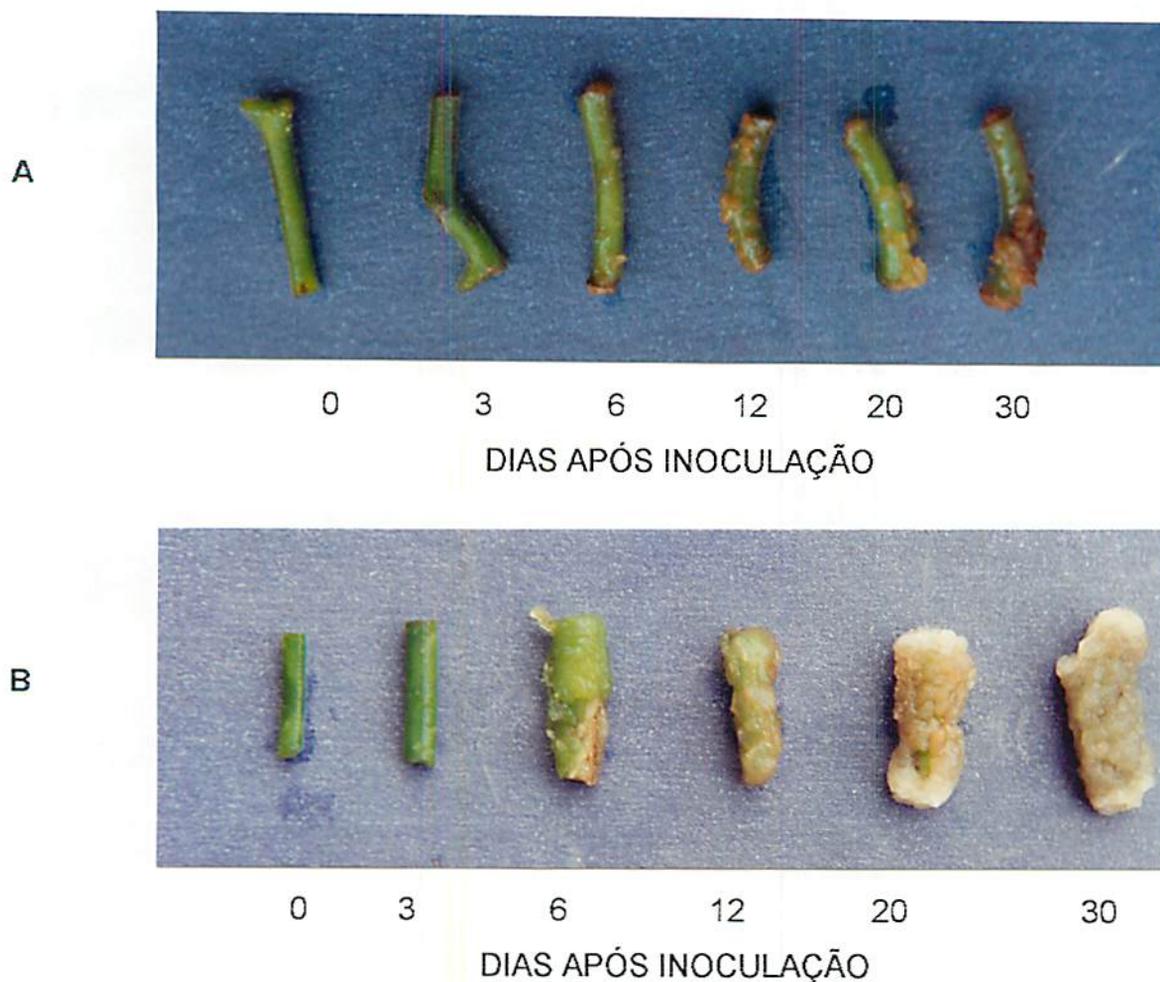


FIGURA 11 - Aspectos visuais do comportamento "in vitro" de explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: (A) Controle = ausência de 2,4-D; (B) Tratamento = presença de 28,8 μM de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996).

4.2.3 - TEORES DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS E AMINOÁCIDOS

Os explantes nodais de moreira cultivados em meio WPM na presença ou ausência de 2,4-D foram coletados em diferentes DAI e analisados quanto ao teor de proteínas solúveis totais e aminoácidos. Os resultados indicam que este tecido apresenta tendências de curva de proteínas solúveis totais bastante semelhante, independente da presença ou ausência de 2,4-D no meio de cultivo (Figura 12A).

Ao contrário do que ocorreu com os explantes foliares, não houve uma diminuição no teor de proteínas solúveis totais no intervalo de 0-3 DAI nos explantes de segmentos nodais. Isso provavelmente ocorreu em função de tratar-se de um tecido menos sensível que o tecido foliar. A tendência de aumento no teor de proteínas solúveis totais nos explantes mantidos na presença de 2,4-D permaneceu até o 20^o DAI (9,3 mg/g MF), quando foi detectada uma redução no teor desta macromolécula (Figura 12A). Essa redução pode ser atribuída à redução ocorrida no teor de aminoácidos, após o máximo acúmulo dessa micromolécula (626 µg/g de MF), fato que ocorreu no 12^o DAI nos explantes cultivados na presença de 2,4-D (Figura 12B). Esses resultados coincidem com aqueles encontrados para folha, onde a diminuição do teor de aminoácidos antecedeu à diminuição do teor de proteínas solúveis totais (Figura 6).

Trabalhando com suspensão de células de *Acer pseudoplatanus*, Shimizu et al. (1977) afirmam que o conteúdo de proteína por célula alcançou o máximo durante a fase logarítmica do crescimento.

Para explantes cultivados em meio isento de regulador de crescimento, o teor de proteínas solúveis totais apresentou comportamento semelhante aos explantes do tratamento com regulador (Figura 12A), sendo que o período de redução dessas macromoléculas coincidiu com o período de máximo acúmulo de aminoácidos (708 µg/g de MF) e posterior redução neste teor, fato que ocorreu no 20^o DAI (Figura 12B).

Os explantes foliares e de segmentos nodais cultivados na presença de 2,4-D apresentaram padrões de comportamento das curvas de proteínas e aminoácidos bastante semelhantes (Figuras 6A e 12A, 6B e 12B). A padronização no metabolismo destas moléculas pode ser atribuída à ação do regulador de crescimento 2,4-D, visto que os explantes cultivados na ausência de 2,4-D apresentaram comportamentos

distintos quando comparam-se as curvas das referidas moléculas (Figuras 6A e 12A, 6B e 12B). Por outro lado, observa-se que, proporcionalmente, os explantes foliares possuem teores superiores de proteínas (Figuras 6A e 12A) e inferiores de aminoácidos (Figuras 6B e 12B) em relação aos explantes de segmentos nodais.

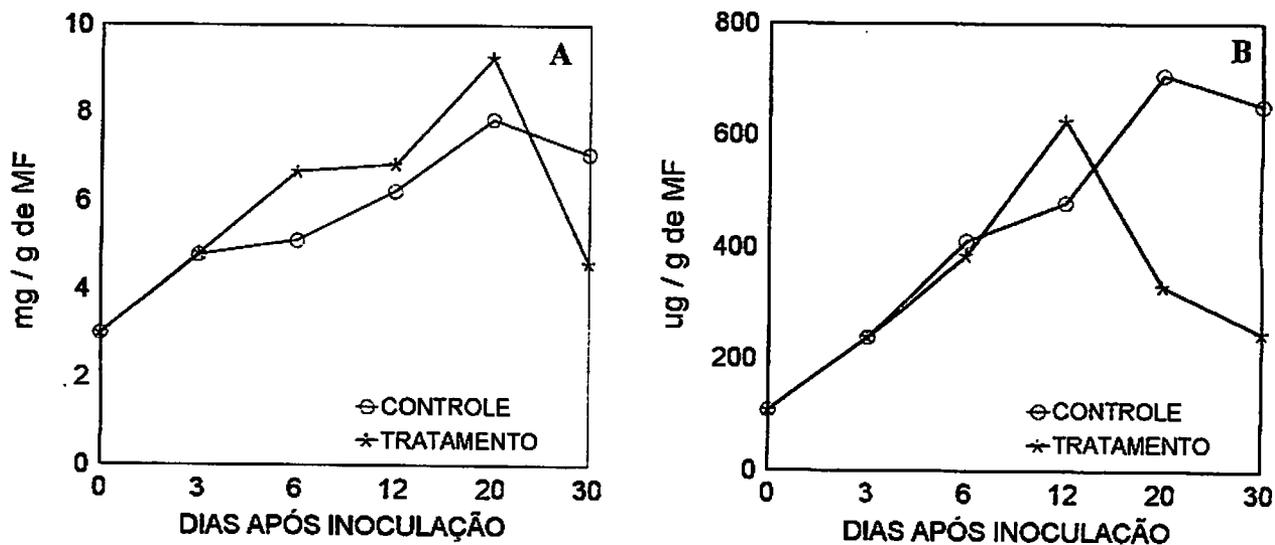


FIGURA 12 - Teores de proteínas solúveis totais (A) e aminoácidos (B) em explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996).

Contrariamente ao que ocorreu nos explantes foliares (Figura 6A), explantes de segmentos nodais cultivados na presença e ausência de 2,4-D apresentaram valores e padrões de curvas de proteínas solúveis totais bastante semelhantes (Figura 12A). Este fato pode ser atribuído à melhor resposta dos explantes de segmentos nodais mantidos na ausência de 2,4-D, quando comparados aos explantes foliares, no aspecto de calogênese.

4.2.4 TEORES DE AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

O teor de açúcares redutores (AR) para explantes cultivados em meio com regulador de crescimento apresentou uma redução no período que sucedeu a inoculação (0-3 DAI). Após esse período inicial, houve uma tendência de aumento até 12^o DAI, quando apresentou nova tendência de redução até o 30^o DAI (Figura 13A). Esta redução inicial do teor de AR pode ser atribuído a um desequilíbrio entre absorção e consumo de carboidratos durante o período inicial de adaptação. Sacchi, Morgutti e Abruzzese et al. (1995) analisando o comportamento bioquímico de subculturas calos de *A. deliciosa*, detectaram uma redução no teor de açúcares redutores durante a primeira subcultura (40 dias).

A curva de açúcares solúveis totais (AST) para esses explantes apresentou teores constantes até o 6^o DAI, quando houve uma tendência de aumento nos teores desses açúcares até o 12^o DAI. Nos períodos subsequentes, foi registrada uma tendência de redução no teor de AST para explantes cultivados na presença de 2,4-D (Figura 13B).

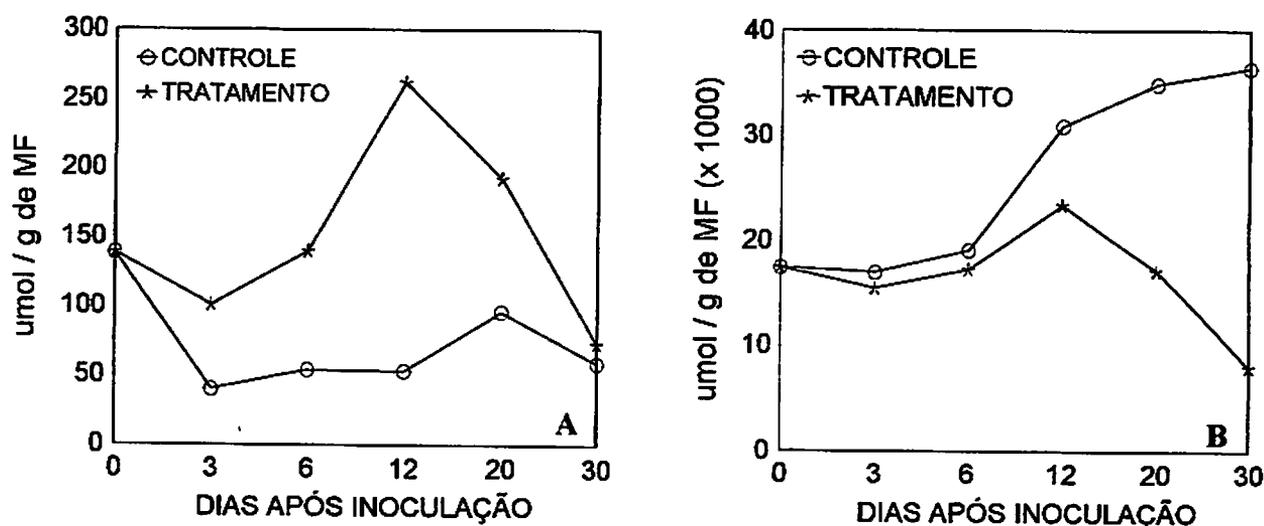


FIGURA 13 - Teores de açúcares redutores (A) e açúcares solúveis totais (B) em explantes oriundos de segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) cultivados por diferentes períodos em meio WPM: Controle = ausência de 2,4-D; Tratamento = 28,8 μ M de 2,4-D (LAVRAS - MG, 1996).

Os teores de AR e AST em explantes cultivados na presença de 2,4-D foram, respectivamente, superiores e inferiores aqueles apresentados pelos explantes cultivados na ausência de regulador de crescimento (Figura 13A e 13B). Essa inversão nos valores nas curvas de AR e AST, obedecem o mesmo padrão de comportamento apresentado pelos explantes foliares (Figura 7A e 7B). Acredita-se que essa inversão seja indicação que nos explantes mantidos na ausência de reguladores de crescimento, o nível de açúcares não-redutores seja maior que nos explantes cultivados na presença de 28,8 μ M de 2,4-D, evidenciando uma maior atividade metabólica nestes últimos.

5 CONCLUSÕES

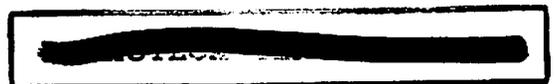
A obtenção de calos em explantes oriundos de folhas e segmentos nodais jovens de moreira, depende da presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo. Nos explantes foliares nenhuma formação de calos foi obtida na ausência de reguladores.

O uso de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) induziu a formação de calos e raízes em tecidos foliares, enquanto que a combinação deste regulador de crescimento com Benzilaminopurina induziu, apenas, a formação de calos. No caso de segmentos nodais, todos os tratamentos induziram apenas a formação de calos.

Explantes foliares cultivados na presença de 2,4-D apresentaram teores superiores de proteínas solúveis totais e açúcares redutores, semelhantes de aminoácidos, e inferiores de açúcares solúveis totais, quando comparados com explantes cultivados na ausência deste regulador de crescimento. Esses fatores aliados ao maior ganho de matéria fresca, evidenciaram maior atividade metabólica nos explantes cultivados na presença de 2,4-D.

Explantes oriundos de segmentos nodais cultivados na presença de 2,4-D apresentaram teores superiores de açúcares redutores, semelhantes de proteínas solúveis totais e aminoácidos, e inferiores de açúcares solúveis totais quando comparados com explantes cultivados na ausência deste regulador de crescimento. Esses fatores aliados ao maior ganho de matéria fresca, evidenciaram maior atividade metabólica nos explantes cultivados na presença de 2,4-D.

Foram detectadas reduções nos teores de aminoácidos, açúcares, e proteínas no período final de cultivo dos explantes foliares e de segmentos nodais cultivados na ausência ou presença de 2,4-D.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A.J. Practice and promise of micropropagation of woody species. **Acta Horticulturae**, Hague, v.79, p.113-127, 1978.
- ABOUSALIM, A. "In vitro" propagation of pistachio (*Pistachio vera* L. cv. Mateur): effects of culture media. **1^o Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II, Morocco**, v.11, n.3, p.23-26, 1991.
- AHUJA, M.R. "In vitro" propagation of poplar and aspen. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.207-223.
- AMIN, M.N.; RAZZAQUE, M.A. Regeneration of *Averroa carambola* plants from callus cultures of seedling explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.68, n.4, p.551-556, July 1993.
- ANJANI-KUMAR; KUMAR, A. Micropropagation of a mature leguminous tree - *Bauhinia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.31, n.3, p.257-259, 1992.
- BALL, E.A. Tissue culture multiplication of *Sequoia*. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.146-157.
- BHAT, S.R.; CHANDEL, K.P.S.; MALIK, S.K. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. **Plant Cell Reports**, New York, v.14, n.6, p.398-402, 1995.
- BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry - specific principles and methods: growths and developments. **Forestry Sciences**, Washington, v.2, p.202-215, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1, p.248-254, 1976.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMBRAPA/ CNPF/SPI, 1994, 639p.

- CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.3, p.224-246.
- CHALUPA, V. Temperature. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. V.1. **General principles and biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987a. v.3, p.142-151.
- CHEN, C.S.; JONARD, R. Acquisition of friable calli from stems and establishment of the cell suspension cultures of *Prunus armeniaca* L. Cv. Canino and Luizet. **Journal of Plant Resources and Environment**, v.3, n.3, p.22-26, 1994.
- COCKING, E.C.; YEMM, E.W. Estimation of amino acids by ninhydrin. **The Biochemical Journal**, London, v.58, p.12-13, 1954.
- COLEMAN, G.D.; ERNST, S.G. Protein differences among *Populus deltoides* internodal stem explants determined for shoot regeneration or callus growth. **Plant Science**, Berkeley, v.75, n.1, p.83-92, 1991.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa "in vivo" e "in vitro" de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar**. Lavras: UFLA, 1993. 122p. (Dissertação - mestrado em Fisiologia Vegetal)
- EVANS, D.A.; SHARP, D.R.; FUCK, C.E. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T.A. ed. **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981, p.45-114.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, J.M.; GEORGE, H.J. **Plant Culture Media: Commentary and Analysis**. Exegetics Limited, 1988, v.2, 420p.
- GOGOBERIDZE, M.K.; MAMALADZE, M.N.; ZAMBAKHIDZE, N.E. Steroid substances in the *Yucca gloriosa* L. cell and tissue culture and their formation during morphogenesis. **Plant Science**, Berkeley, v.84, n.2, p.201-207, 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., editores. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-169.
- HISAJIMA, S.; ITO, T. Activity and cellular distribution of disaccharidases in cultured cells of Japanese Morning-glory. **Agricultural and Biological Chemistry**, Japan, v.47, n.1, p.107-109, Jan. 1983.
- HILDEBRANDT, A.C.; RIKER, A.J.; DUGGAR, B.M. The influence of composition of the medium on growth "in vitro" of excised tobacco and sunflower tissue cultures. **American Journal of Botany**, Columbia, v.33, n.5, p.591-597, May 1946.

- HODGE, J.E.; HOFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v.1, p.380-384.
- JOSEKUTTY, P.C.; SHAH, S.; PRATHAPASENAN, G. Direct and indirect organogenesis in *Coccinia indica*. **Journal of Horticultural Science**, London, v.68, n.1, p.31-35, Jan. 1993.
- KAMENICKA, A.; RYPAK, M. Explants in the propagation of woody plants. **Acta Dendrobiologica**, n.18, 159 pp., 1989.
- KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, K. Photoautotrophic and photomixotropic growth of strawberry plantlets "in vitro" and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.25, p.107-115, 1991.
- LAL, N.; CHANDRA, P.; SINGH, J. SINGH, H.N. Changes in nucleic acid and protein contents during plant regeneration from callus in sugarcane. **Indian Journal of Plant Physiology**, Indian, v.35, n.4, p.389-392, 1992.
- LEFEBVRE, R.; VASSEUR, J.; BACKOULA, E.; COUILLEROT, J.P. Participation of carbohydrate metabolism in the organogenic orientation of *Cichorium intybus* tissues cultivated "in vitro". **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, n.9, p.1897-1902, Sept. 1992.
- LEVA, A.R.; FALCONE, A.M. Micropropagation and organogenesis "in vitro" of *Anacardium occidentale* L. **Acta Horticulturae**, Poland, n.280, p.143-146, 1990.
- LIN, Y.; WAGNER, M.R.; HEIDMANN, L.J. "In vitro" formation of axillary buds by immature shoots of *Ponderosa pine*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.26, p.161-166, 1991.
- LITZ, R.L.; CONOVER, R.A. Partial organogenesis in tissue cultures of *Averroa carambola*. **Hort Science**, Virginia, v.15, n.6, p.735-738, dec. 1980.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**. v.30, p.421-427, 1980.
- LULSDORF, M.M.; TAUTORUS, T.E.; KIKCIO, S.I.; DUNSTAN D.I. Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Science**, Berkeley, v.82, p.227-234, 1992.

- MEZZETTI, B.; CONTE, L.S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa* "in vitro": II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.26, p.153-160, 1991.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C. F. Liang "in vitro": I. Growth and mineral uptake by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.25, p.91-98, 1991.
- MEYER, H.J.; VAN-STADEN, J. The "in vitro" production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.40, n.1, p.55-58, 1995.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants: Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation, and Cryopreservation**. Florida: Academic Press, 1985. v.2, Cap. 4, p. 129-147.
- PAULA, M.A.; PEREIRA PINTO, J.E.; SIQUEIRA, J.O.; PASQUAL, M. Obtenção de calos e suspensão de células de diferentes tecidos vegetais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.6, p.889-895, jun. 1990.
- PHAN, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of "in vitro" culture of plants; problems and applications comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. **Experimental Biological**, v.46, n.3, p.58, 1987.
- PIERIK, R.L.M. "In vitro" culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345p.
- RADIN, J.W.; PARKER, L.L.; SELL, S.R. Partitioning of sugar between growth of nitrate reduction in cotton roots. **Plant Physiology**, Washington, v.62, n.4, p.550-553, Oct. 1978.
- RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; BISWAS, B.K.; JOARDER, O.I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.32, n.3, p.363-365, 1993.
- RAJYALAKSHMI, K.; GROVER, A.; MAHESHWARI, N.; MAHESHWARI, S.C.; TYAGI, A.K. High frequency regeneration of plantlets from the leaf-bases via somatic embryogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v.82, n.4, p.617-623, Aug. 1991.
- RITA, I.; FLOH, E.I.S. Tissue culture and micropropagation of *Cuphea ericoides*, a potential source of medium-chain fatty acids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.40, n.2, p.187-189, 1995.

- ROUT, G.R.; DEBATA, B.K.; DAS, P. Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.27, p.65-69, 1991.
- SACCHI, G.A.; MORGUTTI, S.; ABRUZZESE, A. et al. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Berkeley, v.106, n.1, p.107-113, Mar. 1995.
- SAHULKA, J.; LISA, L. Effect of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.50, n.1, p.32-36, Jan. 1980.
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. v.2, **Cell Culture in Phytochemistry**. Florida: Academic Press, 1987. Cap.5, p.597-614.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Califórnia: Wardsworth Publishing Company, 1991. 682p.
- SHIMIZU, T.; CLIFTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, p.125-129, 1977.
- SIQUEIRA, E.R. de; INOUE, M.T. Propagação vegetativa do coqueiro através cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.639-646, abr. 1992.
- TORRES, R.B.; MATTHES, L.A.F.; RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H. de F. Espécies florestais nativas para plantio em áreas de brejo. **O Agrônomo**, Campinas, v.44, n.1/2/3, p.13-16, jan./dez. 1992.
- VIEIRA, M.C.W. **Fitogeografia e conservação em florestas em Monte Belo, Minas Gerais - Estudo de caso: Fazenda Lagoa**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1990. 129p. (Dissertação - Mestrado em Ciências Biológicas)
- VON ARNOLD, S. Tissue culture methods for clonal propagation of forest tree. **Newsletter**, Kansas City, v.5, p.2-13, 1989
- WANN, S.R.; JONSON, M.A.; NOLAND, T.L.; CARLSON, J.A. Biochemical differences between embryogenic and non-embryogenic cells of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Reports**, New York, v.6, p.39-42, 1987.
- YEOMAN, M.M.; MACLEOD, A.J. Tissue (callus) cultures techniques. In: STREET, H.E. (ed). **Plant Tissue and Cell Culture**. Berkeley: University of California, 1977. p.31-59.