



**MICROPROPAGAÇÃO, CALOGÊNESE E
ANATOMIA FOLIAR DE SANGRA D'ÁGUA
(*Croton urucurana* BAILL.)**

EDNABEL CARACAS LIMA

2004

58329
049864

EDNABEL CARACAS LIMA

**MICROPROPAGAÇÃO, CALOGÊNESE E ANATOMIA
FOLIAR DE SANGRA D'ÁGUA (*Croton urucurana* BAILL.)**

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. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

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

Lima, Ednabel Caracas

**Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água
(*Croton urucurana* Baill.) / Ednabel Caracas Lima. – Lavras : UFLA, 2004.
105 p. : il.**

**Orientador: Renato Paiva
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.**

**1. Anatomia foliar. 2. Calos. 3. Brotação. 4. Análise bioquímica. 5.
Micropropagação I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-583.95
-63497395**

EDNABEL CARACAS LIMA

**MICROPROPAGAÇÃO, CALOGÊNESE E ANATOMIA
FOLIAR DE SANGRA D'ÁGUA (*Croton urucurana* BAILL.)**

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 26 de março de 2004

Profª. Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro

UNILAVRAS .

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA



Prof. Renato Paiva, PhD.

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, pela concessão a tudo!

AGRADEÇO

Aos meus pais, Getúlio e Rosmari;

às minhas irmãs: Norma e Marta ; aos meus irmãos, Rene e Jairo.

Aos meus sobrinhos (a),

Gean, Luan, Macoy e Camilla

À minha família,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força enviada todos os dias.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade da realização deste curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Renato Paiva, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança que depositou em mim.

Aos professores Amauri Alvarenga, Luiz Edson, Donizete Alves e Ângela, do setor de Fisiologia Vegetal, que contribuíram para meu aprendizado durante o mestrado.

Ao Dr. Leonardo Ferreira Dutra, à Dra. Ana Hortência Fonseca Castro e à Dra. Patrícia Duarte, agradeço pelas imensuráveis contribuições ao trabalho, como também pela participação na banca avaliadora de minha dissertação.

Ao professor Evaristo Castro, pelos esclarecimentos em anatomia vegetal.

Aos professores da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelos ensinamentos ao longo do curso de graduação em Agronomia.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: Breno, Cristiano, Rairys, Gustavo, Cíntia, Solange, Kelceane, Fernanda, Diogo, Lenaldo, José Raniere, Cíntia, Leticia, Patrícia, Emmanuele, Eduardo, Mauro, Artiaga e Alvinho o meu muito obrigado por tudo, tanto pela grande auxílio como também pelas inúmeras brincadeiras e familiar convívio.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal: Patrícia (garrafinha), Marco Alencar, Paulo Cairo, Daniela Fries, Márcio (miudinho), Jorge Romero, Soami, Aurélio, Rupert, Alessandro, Tereza, Marquinho (Pará), Peterson, Cristina, Lílian, João Paulo, Kelson, Marcus José e Hyrandir.

Aos colegas/amigos (as) da turma de Mestrado: Anne Cybelle, Daniela Duarte, Érico Castro, Inês Angélica e Giandré Passeri, pelo companheirismo e cumplicidade em todos os momentos.

Ao grande amigo Érico, pela paciência, ajuda nos trabalhos, brincadeiras e pelas pizzas.

Ao amigo Leonardo Dutra, pelo apoio, amizade e pelos eventos sociais.

Ao Carlos Vinício (espetex), pela realização dos cortes anatômicos e pelos momentos de descontração.

Às amigas Anne Cybelle e Daniela Duarte, pelo companheirismo, amizade, festas, confidências, brincadeiras e muitas risadas nestes dois anos. À Anne, pelas violadas e pipocas. À Dani, pelas conversas, filmes e os deliciosos macarrões.

Ao Morbeck (pantaneiro do pé branco), pela ajuda em todos os momentos.

À amiga Sílvia, pelas inúmeras brincadeiras, amizade, bate-papo e risadas.

À amiga Cláudia Ferreira, pela grande amizade, paciência e apoio em todos os momentos.

À Raírys pela amizade, paciência e valiosa ajuda nos trabalhos.

À Carmô, Gerane, Nívia, Mônica e Fernanda, pelos papos e amizade construída.

Aos amigos que aqui encontrei: Lucia Albert, Geórgia, Karina, Loïuse, Ronan e Mariana.

Ao Marcelo Murad e à Daniela Fries, pela disposição nos momentos de sufoco no laboratório.

Aos funcionários e amigos, Izonel, Evaristinho, Dartanhan, Lena, Joel e Odorêncio.

Às minhas grandes amigas de Conquista: Jerusa, Cristina, Maura, Edlene, Edleusa, Eliane Marinho, Sinara, Nilma e Mariana.

Glice e Julinda, pelas orações.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes nessa etapa da minha vida, tornando este trabalho realizável, seja pelas ajudas prestadas ou ensinamentos e, principalmente, pela atenção, companheirismo e amizade.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução geral.....	01
2 Referencial teórico	03
3 Referências bibliográficas	16
CAPÍTULO 2: ANATOMIA FOLIAR DE PLÂNTULAS E ACLIMATIZAÇÃO DE Croton urucurana Baill. GERMINADAS <i>IN VITRO</i> E AMBIENTE NATURAL	
1 Resumo.....	22
2 Abstract	23
3 Introdução.....	24
4 Material e métodos	27
5 Resultados e discussão	31
6 Conclusões	39
7 Referências bibliográficas	40
CAPÍTULO 3: INDUÇÃO DE BROTAÇÕES E ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE SANGRA D'ÁGUA.....	
1 Resumo.....	43
2 Abstract	44
3 Introdução.....	45
4 Material e métodos	48
5 Resultados e discussão	51
6 Conclusões	58
7 Referências bibliográficas	59

CAPÍTULO 4: INDUÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE SANGRA D'ÁGUA.	62
1 Resumo	62
2 Abstract	63
3 Introdução.....	64
4 Material e métodos	66
5 Resultados e discussão	71
6 Conclusões	80
7 Referências bibliográficas	81
CAPÍTULO 5: CURVA DE CRESCIMENTO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE SANGRA D'ÁGUA	85
1 Resumo	85
2 Abstract	86
3 Introdução.....	87
4 Material e métodos	89
5 Resultados e discussão	93
6 Conclusões	100
7 Considerações finais.....	100
8 Referencias bibliográficas	101
ANEXOS	104

RESUMO

LIMA, Ednabel Caracas. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.)**. 2004. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

A sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.) é uma espécie arbórea, presente principalmente em floresta latifoliada semidecídua, indicada para reflorestamento de áreas ciliares degradadas e que apresenta um grande potencial medicinal no tratamento de reumatismo, câncer e outras doenças. Ocorre em zonas tropicais e subtropicais da América do Sul. As sementes apresentam baixa viabilidade e dormência. O presente estudo teve por objetivo propor metodologias para indução de brotações e formação de calos em explantes de sangra d'água, estudar a curva de crescimento desses calos, analisá-los bioquimicamente, e identificar alterações anatômicas em folhas de plântulas germinadas *in vitro* e ambiente natural. Para o estudo anatômico, fizeram-se cortes transversais do limbo foliar e paradérmicos na epiderme abaxial. Para a aclimatização, foram utilizadas plântulas com 45 dias de idade, sendo estas transferidas para garrafas plásticas. Fez-se o controle da umidade e utilizou-se sombrite 70%, 50% e 30%, respectivamente, durante sete dias. Para a indução de brotações, utilizaram-se segmentos nodais e inoculou-se em meio WPM acrescido com concentrações de BAP (0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹). Para o enraizamento, utilizaram-se brotações obtidas *in vitro*, inoculando-as em meio WPM acrescido com as concentrações de ANA (0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹). Para a indução de calos, utilizaram-se discos foliares com aproximadamente 1 cm², inoculados em meio WPM, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D, TDZ, ANA e BAP na presença de luz. Para a determinação da curva de crescimento e análises bioquímicas segmentos foliares foram inoculados em meio WPM acrescido de 3 mg L⁻¹ 2,4-D e mantidos à luz por um período de 105 dias. A coleta do material foi realizada a cada sete dias para posterior análise. Os cortes transversais revelaram que as estruturas foliares desenvolvidas nas plantas do hábitat natural apresentam epiderme uniestratificada e o mesófilo possui uma organização dorsiventral. A epiderme é denominada anfi-hipoestomática. Há presença de tricomas nas plântulas germinadas *in vitro* e plantas do hábitat natural. A aclimatização das plântulas germinadas *in vitro* é possível controlando-se a umidade e irradiância. A utilização do BAP não foi eficiente para a indução de

* Orientador: Renato Paiva – UFLA

múltiplas brotações. O maior número e comprimento de raízes ocorreu a uma concentração de 3 mg L⁻¹ de ANA. Para a indução de calogênese, as concentrações de 3 e 5 mg L⁻¹ de 2,4-D utilizadas isoladamente promoveram maior formação de matéria fresca. A combinação entre ANA e BAP promoveu oxidação na maioria dos explantes e, sob algumas concentrações, produziu rizogênese. A interação entre 2,4-D e BAP é capaz de induzir a formação de calos. A curva de crescimento dos calos apresentou uma curva padrão com cinco fases distintas. A repicagem dos calos deve ser feita entre o 84° e 91° dias de cultivo. Os teores máximos de proteína foram observados no dia da inoculação e ao 28° dia de cultivo. Os teores máximos de açúcares solúveis totais ocorreram no dia da inoculação e ao 28° dia de cultivo. Os teores máximos de açúcares redutores foram observados no dia da inoculação, aos 77° e 105° dias de cultivo.

ABSTRACT

LIMA, Ednabel Caracas. **Micropropagation, callogenesis and leaf anatomy of *Croton urucurana* Baill.** Lavras: UFLA, 2004. 97 p. Dissertation (Master of Science in Plant Physiology)* - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Croton urucurana Baill. is an arboreal species, present mainly in broad-leaved semideciduous forest, which is indicated for reforestation of degraded ciliary's areas and presents great medicinal potential in the treatment of rheumatism, cancer and other diseases. It occurs in tropical and subtropical areas of South America. The seeds present low viability and dormancy. The objectives of the present study were to propose methodologies for shoot induction and formation of callus, to study the callus growth curve and analyze it biochemically, and to identify anatomical alterations in leaves of plantlets germinated *in vitro* and *in vivo*. For the anatomical studies, transversal cuts of the blade leaves and cuts in the abaxial epidermis were performed. 45 days old plantlets were transferred to plastic bottles and used for acclimatization. A humidity control was performed and semi-shade was used for seven days each at 70%, 50% and 30%, respectively. For shoot induction, nodal segments were used inoculating them in WPM medium supplemented with different concentrations of BAP (0; 1; 2 and 3 mg L⁻¹). For the rooting, shoots obtained *in vitro* were inoculated in WPM medium supplemented with different concentrations of NAA (0; 1; 2 and 3 mg L⁻¹). Callus was induced inoculating leaf disks with approximately 1 cm² size in WPM medium, supplemented with different concentrations of 2,4-D, TDZ, NAA and BAP in the presence of light. For the determination of the callus growth curve and its biochemical analysis, leaf segments were inoculated in WPM medium supplemented with 3 mg L⁻¹ 2,4-D and maintained in the light for period of 105 days. Samples were collected at seven days intervals. The traverse cuts revealed that the leaf structures developed in plants cultivated *in vivo* present uniestratified epidermis and the mesophyl possesses an organization dorsiventral. The epidermis is denominated amphihypostomatic. Trichomes presence was observed in the plantlets germinated *in vitro* and *in vivo*. The acclimatization of plantlets germinated *in vitro* is possible by controlling humidity and irradiance. The use of BAP was not efficient to induce shoot formation. Higher number and root length was obtained using 3 mg L⁻¹ NAA.

* Adviser: Renato Paiva – UFLA

The use of 3 and 5 mg L⁻¹ 2,4-D promoted higher callus fresh matter. The combination between NAA and BAP promoted oxidation in most explants and some concentrations produced rooting. The interaction between 2,4-D and BAP is capable to induce formation of callus. The callus growth curve presented five distinct phases. Medium replacement should be performed between the 84° and 91° day of cultivation. Higher levels of protein were observed in the day of the inoculation and at 28° day of cultivation. Higher levels of total soluble sugars were observed at the inoculation day and at the 28° day of cultivation. Higher levels of reducing sugars were observed at the inoculation day as well as at the 77° and 105° days of cultivation.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

As florestas tropicais detêm a maior parte da biodiversidade do planeta e estão sendo degradadas rapidamente por ações antrópicas, como a exploração madeireira predatória e a substituição das florestas pela agricultura e pecuária. Particularmente no território brasileiro, grandes áreas contínuas de florestas tropicais foram tomadas para a construção de rodovias e por alagamentos, para a instalação de hidrelétricas, sem um planejamento sustentável para a conservação do meio ambiente.

As matas ciliares ou ripárias são porções de vegetação que ocorrem ao longo dos cursos d'água e são caracterizadas por combinações diferenciadas da ação de vários fatores bióticos e abióticos, proporcionando uma florística bastante variável e muito influenciada pelas formações vegetais adjacentes. As matas ciliares, apesar de serem consideradas áreas de preservação permanente pelo Código Florestal Brasileiro, estão sujeitas principalmente aos desmatamentos e alagamentos.

Desse modo, evidencia-se a necessidade de reverter o atual quadro de desmatamento promovendo o desafio de recuperar este ecossistema, principalmente aquelas áreas próximas a mananciais hídricos, garantindo, dessa forma, um maior abastecimento dos reservatórios. Nesse contexto, uma das espécies que compõem este ecossistema é a sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.), uma espécie arbórea, heliófita, de grupo ecológico pioneira, característica de terrenos muito úmidos e brejosos, principalmente da floresta latifoliada semidecídua. Em Minas Gerais, mostra-se freqüente na beira de todos

os cursos d'água; ocorre também em várzeas pouco drenadas e, menos freqüentemente, nas matas de encosta. Por apresentar adaptação à presença de um lençol freático superficial, torna-se de primordial importância o uso da sangra d'água em projetos de reflorestamento de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios.

Esta espécie produz, anualmente, grande quantidade de sementes, porém, logo após a abertura dos frutos, é comum a presença de um coleóptero do gênero *Apion* sp. (Curculionidae; Apioninae), responsável por danos ao embrião capazes de afetar drasticamente a germinação. Além disso, as sementes de *Croton urucurana* apresentam dormência e sua viabilidade é curta, não ultrapassando quatro meses (Lorenzi, 2000).

Esses aspectos apresentam-se como obstáculos na obtenção de mudas pela via sexuada, tornando a técnica de cultura de tecidos vegetais uma alternativa viável para superar as dificuldades na sua propagação.

O presente estudo teve por objetivo propor metodologias para indução de brotações e formação de calos em explantes de sangra d'água, estudar a curva de crescimento de calos e analisá-los bioquimicamente, e identificar alterações anatômicas em folhas de plântulas germinadas *in vitro*.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A espécie e descrição botânica

A *Croton urucurana* Baill. pertencente à família Euphorbiaceae, é também conhecida por sangra d'água, sangra-de-drago, sangue-da-água, sangue-de-drago, capixingui (SC), tapexingui, tapixingui, lucurana, licurana ou urucurana. É uma espécie arbórea, com altura de 7-12 m de altura (Brandão et al., 2002), tronco com 20 a 35 centímetros de diâmetro e casca pardacenta. Sua madeira é moderadamente pesada (0,83 g/cm³), resistente e dura, podendo ser utilizada para a construção de canoas, obras hidráulicas, obras externas, como dormentes e esteios, para carrocerias, carpintaria e marcenaria. A árvore pode ser também empregada na arborização em geral.

Suas folhas são simples, alternas, cordiformes, pubescentes na superfície adaxial e prateadas na superfície abaxial, possuindo de 9 a 18 centímetros de comprimento, enquanto o pecíolo pode chegar a até 10 centímetros. Suas inflorescências ocorrem em espigas de cor esbranquiçada, com aproximadamente 12 centímetros de comprimento. As flores femininas apresentam três pistilos e as masculinas são umbicadas na parte distal do eixo da inflorescência, com corola de cinco pétalas e estames numerosos e, ainda, são melíferas. Lorenzi (2000) e Brandão et al. (2002) descrevem que a floração inicia-se em dezembro e prolonga-se até junho e a frutificação ocorre nesse mesmo período.

Morfologia do fruto e da semente

Segundo Paoli et al. (1995), o fruto da sangra d'água é seco, capsular, com deiscência explosiva elástica, separa-se em três cocas, uniloculadas com uma semente por lóculo, dispostas longitudinalmente. O endocarpo seco e lignificado participa da ejeção das sementes, pelo secamento das paredes, não acompanhadas pela coluna central, que permanece rija. A coloração do fruto maduro é castanha, a superfície é rugosa, coberta de tricomas estrelados. Os frutos desta espécie medem, em geral, cinco milímetros de diâmetro por quatro milímetros de altura. Segundo Paoli et al. (1995), devido à deiscência explosiva dos frutos, evidencia-se também a dispersão hidrocória.

A semente de sangra d'água é ovada, albuminosa, coriácea, com carúncula castanha-clara pouco desenvolvida, hilo visível na base e rafe bem marcada longitudinalmente sobre a face plana da semente. A rafe é saliente, de coloração mais clara quando comparada com a coloração do tegumento. As sementes de sangra d'água medem, em média, 3,2 mm de comprimento por 2,7 mm de largura. A base dos cotilédones de sangra d'água é mais ou menos cordiforme. O endosperma é do tipo oleaginoso, envolve o embrião totalmente, sendo rico em óleos graxos e cristais do tipo drusa (Figura 1).

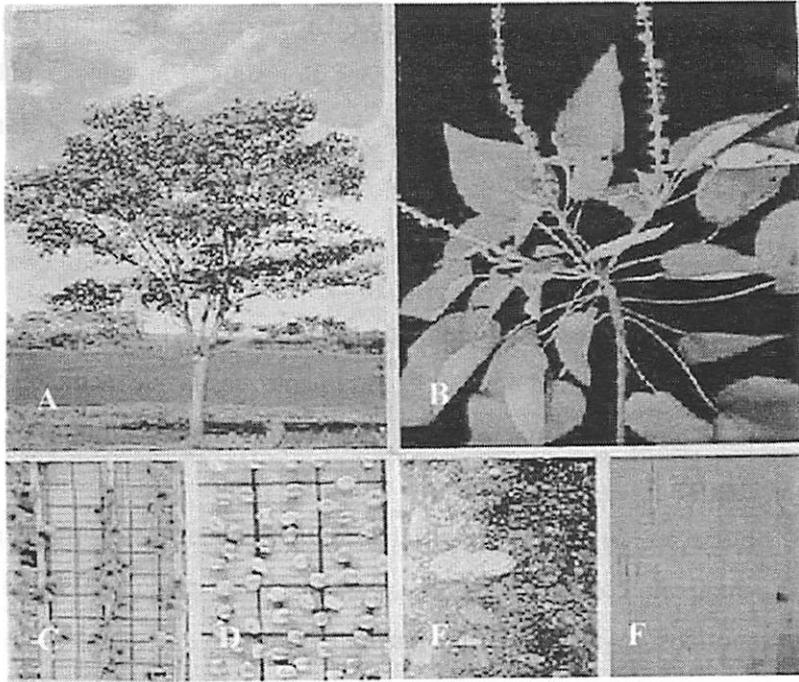


FIGURA 1. Aspecto visual de uma planta adulta de sangra d'água (A), da inflorescência (B), de frutos (C), de sementes (D), da casca (E) e da madeira (F). Fonte: Lorenzi (2000).

A família Euphorbiaceae apresenta mais de 8.000 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo (Wilson et al., 1979). É constituída de vegetais extraordinariamente diferentes como ervas, arbustos e árvores (Joly, 2002). Em geral, o caule e as folhas contêm látex, que é uma das características da família. O gênero *Croton* é um dos gêneros nativos do Brasil, tendo representantes tanto medicinais quanto tóxicos. Este gênero pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae e é um dos mais numerosos desta família.

As áreas de dispersão dessa espécie são em zonas tropicais e subtropicais da América do Sul. No Brasil, a sangra d'água ocorre nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul e,

ultrapassando suas fronteiras, até o Uruguai e a Argentina (Cordeiro, 1985), em matas ciliares de várias formações florestais. Em relação à luz, é heliófita a mesófito e seletiva hidrófita, ocorrendo, principalmente, ao longo das margens dos rios e matas semidevastadas situadas em solos úmidos (Klein, 1977).

2.2 Propriedades medicinais da espécie

A sangra d'água é extensamente usada na medicina tradicional como cicatrizante, no tratamento de reumatismo, câncer e outras doenças (Bettolo e Scarpati, 1979). É também utilizada como adstringente e anestésico para obturação de dentes (Delfino, 2000). Em espécies do gênero *Croton*, os principais componentes ativos são os diterpenos, alcalóides e compostos fenólicos. A taspina é um alcalóide extraído da sangra d'água que apresenta propriedade cicatrizante e atua sobre as células relacionadas ao processo de cicatrização.

O extrato metanólico é retirado da casca do tronco desta espécie, estando presente o ácido acetil aleuritólico, que proporciona ação contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (Peres et al., 1997). A utilização desta espécie, pelas pessoas da área rural, é feita de duas maneiras: corta-se a casca da árvore e aplica-se o látex sobre o ferimento ou pode-se cortar a casca, fervê-la e usar a água para banhos (Silva, 2003). O estudo farmacológico deste vegetal, realizado em ratos, mostrou que o látex é altamente tóxico quando ingerido. Seu uso, portanto, fica restrito à epiderme para tratar cortes superficiais.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

A biotecnologia oferece várias possibilidades para as pesquisas e a propagação clonal tem sido considerada uma alternativa atualmente (Toribio e Pardos, 1989).

A técnica de cultura de tecidos vegetais é uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e micropropagação de plantas em larga escala e obtenção de plantas livres de doenças.

Nos tecidos submetidos ao cultivo *in vitro*, o controle da organogênese é feito pela introdução exógena de fitorreguladores em substratos diversos. A retirada de um fragmento de tecido de um organismo íntegro e a sua colocação num meio de cultura contendo nutrientes e fitorreguladores, tem como consequência a liberação das células do controle a que estão submetidas nesse organismo, submetendo-se a uma nova condição, na qual a capacidade de divisão pode ser readquirida e o genoma expressar-se de novas formas, conduzindo-as a novos padrões de diferenciação (Handro, 1989). Esses eventos podem, de diversas maneiras, levar à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético que ocorre “de novo”.

A morfogênese é, fundamentalmente, o resultado da divisão e da diferenciação celular organizadas, com padrões definidos e que dependem basicamente da atividade e expressão de certos genes (Handro, 1989).

Os fenômenos morfogenéticos observados *in vitro* resultam da diferenciação, desdiferenciação ou rediferenciação do explante inicial e podem ser agrupados, conforme a sua natureza, de duas formas diferentes: morfogênese por via direta ou por via indireta (Gomes, 1999).

A micropropagação, também denominada de propagação *in vitro*, em função do tamanho dos propágulos utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos vegetais. Sua metodologia é baseada em um conjunto de técnicas nas quais um explante, que

pode ser constituído de uma célula, um tecido ou um órgão, é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial (Gomes et al., 2002).

É conhecida pelos pesquisadores da área vegetal a totipotência das células das plantas. Isto significa que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (Kerbaux, 1999). A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* está associada não somente ao genótipo da planta matriz, mas também à atividade fisiológica, sob controle de diversos fatores endógenos.

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

Atualmente, a micropropagação é praticada com êxito em espécies ornamentais, hortícolas e, mais recentemente, em espécies lenhosas. As espécies lenhosas constituem um grupo de plantas extremamente importantes do ponto de vista econômico e social em âmbito mundial. No entanto alguns fatores dificultam a micropropagação de espécies lenhosas, como a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas e a maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro* (Coelho, 1999).

Segundo George (1996), a propagação vegetativa *in vitro* é comumente dividida em cinco estágios: estágio 0 (seleção e preparo da planta matriz), estágio 1 (estabelecimento de uma cultura asséptica), estágio 2 (produção de propágulos adequados), estágio 3 (preparação para o crescimento em meio natural) e estágio 4 (aclimatização). Conforme o explante utilizado, sua multiplicação pode ser de três modos: proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e embriogênese somática direta ou indireta.

2.4 Meio nutritivo

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas et al., 1998). Para algumas espécies lenhosas, por apresentar maior diluição em macronutrientes, o meio Wood Plant Medium (WPM) (Lloyd e McCown, 1980) tem fornecido melhores resultados do que o meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

Alguns pesquisadores têm argumentado que a classificação como macro e micronutrientes é difícil de ser justificada do ponto de vista fisiológico. Neste contexto, de acordo com Taiz e Zeiger (2002), os elementos essenciais devem ser classificados em quatro grupos, de acordo com o seu papel bioquímico e sua função fisiológica: 1. nutrientes que fazem parte de compostos de carbono (nitrogênio e enxofre); 2. nutrientes que são importantes na armazenagem de energia e na integridade estrutural (fósforo, silício e boro); 3. nutrientes que permanecem na forma iônica (potássio, cálcio, magnésio, cloro, manganês, sódio) e 4. nutrientes que estão envolvidos em reações de redox (ferro, zinco, cobre, níquel, molibdênio). Além destes elementos, são adicionados ao meio nutritivo água, vitaminas, mio-inositol e uma fonte de carboidrato (geralmente a sacarose).

As substâncias orgânicas vegetais naturais denominadas de fitormônios são responsáveis pelo crescimento e o desenvolvimento das plantas. Como os explantes encontram-se isolados das regiões produtoras na planta-matriz, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos desses hormônios.

Os principais grupos destas substâncias são auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Das citocininas disponíveis no mercado, o

6-benzilaminopurina (BAP) é o mais utilizado para promover a multiplicação de diversas espécies. Sua utilização nos meios de cultura chega a 68%, seguida pela cinetina (KIN), com aproximadamente 23% e pela zeatina (ZiP) com 9%. Entre as auxinas mais utilizadas encontram-se o ácido indol-butírico (AIB) e o ácido naftaleno-acético (ANA), que são empregados na fase de enraizamento e o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), para indução de calos e embriogênese somática (Grattapaglia e Machado, 1998).

De acordo com George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotações axilares. Frequentemente, as brotações são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas e, subseqüentemente, estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina.

O enraizamento *in vitro* é caracterizado pela formação de raízes adventícias das partes aéreas oriundas da micropropagação, permitindo o posterior transplântio da plântula para condições *ex vitro*. Portanto, esta etapa é de fundamental importância e, muitas vezes, limitante para a obtenção da muda completa (Haissig et al., 1992).

O sistema radicular formado *in vitro*, segundo alguns autores, é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares, dificultando a absorção de água e nutrientes durante a aclimatização, reduzindo a taxa de sobrevivência das mudas (Leite, 1995; Zimmerman, 1981; Grout e Aston, 1978). No entanto, outros autores comprovaram a eficiência do sistema radicular formado *in vitro* e o aumento da sobrevivência após transferência para condições *ex vitro* (Sutter e Luza, 1993; Diaz-Pérez et al., 1995).

2.5 Calogênese e curva de crescimento

A cultura de calos consiste na indução e manutenção de células não diferenciadas do parênquima, constituindo uma massa de células com baixo

nível de organização, obtida pela inoculação de partes da planta para um meio de cultura adequado, freqüentemente contendo combinações apropriadas de fitorreguladores (Collin e Dix, 1990).

Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante. Entretanto, procura-se utilizar aqueles que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. No entanto, explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a indução de calogênese por possuírem alta capacidade de regeneração (Pierik, 1990).

A importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases distintas de crescimento. A partir desse estudo, pôde-se estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um meio novo meio de cultura ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando à produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (Smith, 1992).

Segundo George (1996), o crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela sua curva de crescimento, que normalmente exhibe cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag se caracteriza como a de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para a divisão, visando a sua expansão. Ocorre o início da mobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento dos calos; a fase exponencial é biossintética. Observa-se o maior crescimento dos calos, devido à máxima taxa de divisão celular e ao aumento do número de células. A fase linear caracteriza-se por diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução

do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (Smith, 1992; Shimizu, 1977).

Vários autores estabeleceram curvas de crescimento para espécies vegetais medicinais lenhosas, evidenciando que o padrão da curva é influenciado pela espécie vegetal (Bonilla, 2002).

Vietez e San-José (1996) relatam que, muitas vezes, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. O balanço hormonal obtido entre citocininas e auxinas, exógenas e endógenas, pode estimular a proliferação celular. Porém, Ozias-Akins e Vasil (1985) mencionam que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas. Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a citocinina que apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies. Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos, destacam-se o 2,4-D, ANA e, mais recentemente, o TDZ.

2.6 Aspectos bioquímicos

O entendimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento e o desenvolvimento em calos pode fornecer subsídios ao processo de estabelecimento *in vitro*, propiciando a otimização das condições de seu cultivo.

Os tecidos vegetais são constituídos por substâncias químicas que podem ser classificadas em duas categorias: macro e micromoléculas, de acordo com o peso molecular dos compostos.

As análises dos níveis de proteínas e aminoácidos em tecidos vegetais são comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Elas são constituídas de

aminoácidos, unidos por um tipo específico de ligação covalente. Estas biomoléculas podem apresentar funções estruturais, de transporte, controle do crescimento, diferenciação ou função enzimática (Lehninger et al., 1995).

Os carboidratos são poliidroxialdeídos (aldoses) ou poliidroxicetonas (cetoses), ou substâncias que liberam esses compostos por hidrólise. Eles atuam fornecendo energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas et al., 1998). Podem ser classificados como açúcares redutores, como a glicose e a frutose, enquanto que a sacarose é um açúcar não-redutor, com função de armazenamento e transporte. Os redutores apresentam grupos aldeído ou cetona livres em sua molécula, capazes de reagir com agentes oxidantes (Conn e Stumpf, 1980). A determinação dos níveis de açúcares tem aplicação em vários estudos fisiológicos, já que revela a reserva prontamente disponível para o crescimento (Passos, 1996).

A determinação dos tipos e dos níveis de carboidratos é de importância fundamental em calos considerados de alta capacidade de regeneração, indicando potencialidades industriais na produção de plantas clonadas. As alterações mais acentuadas nos níveis de carboidratos estruturais ocorrem na fase de crescimento ativo exponencial, durante a formação de paredes celulares (McKee et al., 1955).

Durante o desenvolvimento dos calos, os produtos do metabolismo secundário têm sua origem no final da fase exponencial e predominam durante a fase estacionária, sendo estruturalmente, derivados dos produtos do metabolismo primário (Ward, 1991; Demain, 2000).

2.7 Aclimatização

De acordo com Brainerd e Fuchigami (1981), a aclimatização é o processo pelo qual as plântulas produzidas em condições climáticas controladas são transferidas para um ambiente em condições climáticas naturais ou de transição. 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.

Segundo Preece e Sutter (1991), a alta umidade relativa no interior do recipiente e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecidos, podendo levar incapacidade às mudas no sentido de controlar as perdas de água, quando submetidas às condições adversas do ambiente natural, como o aumento da demanda evapotranspiratória.

2.8 Aspectos anatômicos

Para se obter conhecimento das estruturas internas dos vegetais é necessário o entendimento das funções peculiares em cada órgão da planta, visto que diferentes condições ambientais influenciam diretamente as suas estruturas anatômicas.

Plantas lenhosas micropropagadas são frequentemente afetadas por excessiva presença de fatores de meio de cultura, que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. 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). As desordens anatômicas são menos extensas nos caules e raízes. Essas modificações impedem o estabelecimento *ex vitro* de plantas produzidas *in vitro* (Deberg e Maene, 1984).

A influência da luz sobre a anatomia foliar pode ser avaliada com base na sua intensidade, qualidade e quantidade (Castro, 2002; Santo e Pugialli, 1998) tanto para plantas micropropagadas como para plantas em hábitat natural. Estas modificações se manifestam principalmente nas folhas, afetando os principais processos executados por estas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas (Deberg e Maene, 1984). Vários estudos têm constatado que alta irradiância aumenta a frequência dos estômatos por unidade de área superficial de folha (Castro et al., 1998, Ashton e Berlyn, 1992; Boardman, 1977).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHTON, P. M. S.; BERLYN, G. P. Leaf adaptations of some *Shorea* species to sun and shade. **New Phytology**, Cambridge, v. 121, p. 587-596, 1992.
- BETTOLO, R. M.; SCARPATI, M. L. Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**, Palo Alto, v. 18, p. 520, 1979.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 355-377, 1977.
- BONILLA, M. G. O. Propagação *in vivo*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth, 2002. 162p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.
- BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. 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. 87-132.
- CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, D. M.; GAVILANES, T. O. T. Aspectos da anatomia foliares de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, out. 1998.
- CASTRO, E. M de. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel. (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. 221 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

COLLIN, H. A.; DIX, P. J. **Culture system and selection procedures**. In: DIX, J. P. *Plant cell line selection: procedures and applications*. New York, 1990. p. 6.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. 525 p.

CORDEIRO, I. **A família Euphorbiaceae na Serra Cipó, MG, Brasil**. IB/USP, São Paulo, 261 p. 1985. (Dissertação de Mestrado).

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.

DELFINO, L. Uruguay. Disponível em <http://www.horizontefarmaceutico.com/hierbas> Acesso: 24 Nov. 2003.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology*, London, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan., 2000.

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

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

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: The Technology**. 2a Ed. Edington: Exegetics, 1996, 786 p.

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F. de.; PAIVA, P. D. de O.; CHALFUN, N. N. J. Propagação de espécies lenhosas. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, v. 23. n. 216. p. 12-15, 2002.

- GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GROUT, B. W. W.; ASTON, M.J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture, **Annal Botany**, London, v. 42, n. 180, p. 993-995, 1978.
- HAISSIG, B. E.; DAVIS, T. D.; RIEMENSCHNEIDER, D. E. Researching the controls of adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, n. 2, p. 310-317, Feb. 1992.
- HANDRO, W. Bases fisiológicas do controle da morfogênese *in vitro*. In: II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal. **Anais...**1989. p. 3-7.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p.
- KERBAUY, B. G. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.
- KERBAUY, B. G. Competência e determinação celular em cultura de tecidos e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1999. v. 2, p. 519-531.
- KLEIN, R. M. Dados morfológicos e ecológicos das espécies de *Croton* do estado de Santa Catarina e sua dispersão geográfica. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26., **Trabalhos**. Rio de Janeiro, p. 289-306, 1977.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica**. Traduzido. SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. (2 ed). São Paulo: SARVIER, 1995.
- 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 97**. 1995. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible Micropropagation of mountain laures, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings of annual meeting**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 1. (3 ed). Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, 2000. 386 p.

McKEE, H. S.; ROBERTSON, R. N.; LEE, J. B. Physiology of pea fruits. I. Developing fruit. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v. 82, n. 2, p. 137-163, Feb. 1955.

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.

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, 1985. v. 2, p. 128-147.

PAOLI, A. A. S.; FREITAS, L.; BARBOSA, J. M. Caracterização morfológica dos frutos, sementes e plântulas de *Croton floribundus* Spreng e de *Croton urucurana* Baill. (Euphobiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1995.

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

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B. PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R.A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 223-226, Clare 1997.

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

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

SILVA, G. A da. **Estudo confirma ação cicatrizante de planta brasileira**. Brasília, 24 (Agência Brasil - ABr) - Laboratório de Biofarmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). Disponível em: <<http://www.radiobra.gov.br>> Acesso: 24 Nov. 2003.

SHIMIZU, T.; CLITTON, 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, n. 2, p. 125-129, 1977.

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

SUTTER, E. G.; LUZA, J. Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* 'M-26' shoots grown *in vitro*. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 154, n. 1, p. 59-67, Mar. 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer, 2002. 690 p.

TORIBIO, M.; PARDOS, J. A Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 5: trees II**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v. 5, cap. 2, p. 479-506.

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

WARD, O. P. **Biocnologia de la fermentação: princípios, processo e productos**. Tradução de Miguel Calvo Rebollar e Emilia Sevillano Calvo. Zaragoza: Acribia. Canadá: Open University Press, 1991. 265 p. Tradução de Fermentation Biotechnology.

WILSON, S. R.; NEUBERT, L. A.; HUFFMAN, J. C. Chemistry of euphorbiaceae – new diterpene from croton-californicus. **Journal of the America. Chemistry Society**, Washibgton, v. 98, n. 12, p. 369, 1979.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 120, p. 217-222, 1981.

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.

CAPÍTULO 2

LIMA, Ednabel Caracas. **Anatomia foliar e aclimatização de plântulas de *Croton urucurana* Baill. germinadas *in vitro* e de plantas provenientes de ambiente natural.** 2004. 22-42 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

1 RESUMO

Para que se compreenda o processo de plasticidade adaptativa de uma espécie sob diferentes condições ambientais é de grande importância que seja feito um estudo sobre a sua anatomia foliar. O objetivo deste trabalho foi caracterizar alguns aspectos da anatomia foliar de *Croton urucurana* Baill., de plântulas obtidas através da germinação *in vitro* e de plantas provenientes do ambiente natural. Para o estudo anatômico fizeram-se cortes transversais e paradérmicos do limbo foliar na epiderme abaxial. Para a aclimatização utilizaram-se plântulas com 45 dias após a germinação, estas foram transferidas para garrafas contendo vermiculita, e fez-se o controle da umidade. Utilizou-se sombrites para controlar a irradiância. Os cortes das laminas foliares nas plantas provenientes do hábitat natural apresentaram epidermes uniestratificada com cutícula espessa e mesofilo com uma organização dorsiventral. A folha é do tipo anfi-hipoestomática contendo em média 366 estômatos/mm², com diâmetros polar e equatorial em torno de 35 e 26µm. A epiderme abaxial apresentou-se com grande quantidade de tricomas. As seções de laminas foliares de plântulas cultivadas *in vitro* mostraram epidermes adaxial e abaxial uniestratificada, sem cutícula, com 186,40 estômatos/mm², com diâmetro polar e equatorial em torno de 5,1 e 3,5 µm, respectivamente. Notou-se a menor quantidade de tricomas. A aclimatização das plântulas de sangra d'água germinadas *in vitro* é possível desde que simultaneamente seja feito o controle da umidade e se utilize sombrite 70%, 50% e 30%, respectivamente, durante sete dias, obtendo um percentual de sobrevivência de 90%.

* Orientador: Renato Paiva - UFLA

CHAPTER 2

LIMA, Ednabel Caracas. **Leaf anatomy and acclimatization of plantlets of *Croton urucurana* Baill. germinated *in vitro* and of *in vivo*.** Lavras: UFLA, 2004. 20-39p. Dissertation (Master of Science in Plant Physiology)* - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

2 ABSTRACT

In order to understand the process of adaptive plasticity of a species under different environmental conditions it is important to study its leaf anatomy. The objective of this work was to characterize some aspects of the leaf anatomy of *Croton urucurana* Baill. plantlets obtained through *in vitro* germination and of plants of the natural environment. For the anatomical studies, transversal cuts of the blade leaves and cuts in the abaxial epidermis were performed. 45 days old plantlets were transferred to plastic bottles containing vermiculite and used for acclimatization. A humidity control was performed and semi-shade was used to control the irradiance. Leaves of plants of the natural environment presented unistratified epidermis with thicker cuticle and mesophyl with a dorsiventral organization. The leaf is an amphihypostomatic type containing in average 366 stomas/mm², with polar and equatorial diameters around 35 and 26µm, respectively. The adaxial epidermis showed with great amount of trichomes. Leaves of *in vitro* plantlets showed unistratified adaxial and abaxial epidermis, without cuticle, 186,40 stomas/mm², and polar and equatorial diameters of 5.1 and 3.5 µm, respectively. Smaller amount of trichomes was observed. By controlling the humidity and using semi-shade 70%, 50% and 30%, respectively, for seven days each, 90% of survival is obtained during the acclimatization of plantlets germinated *in vitro*.

*Adviser: Renato Paiva - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm-se intensificado os estudos para desenvolver metodologias eficientes de produção de mudas, visando oferecer suporte necessário para a implementação de projetos de recuperação de áreas degradadas, principalmente em margens de reservatórios hidrelétricos, reabilitação de ecossistemas florestais e para conservação de germoplasma.

A sangra d'água é uma espécie pioneira, lenhosa, de interesse em projetos de reflorestamento e enriquecimento de áreas perturbadas ou degradadas. Segundo Lorenzi (2000), suas flores são melíferas e sua madeira é própria para fabricação de canoas, para obras hidráulicas, carpintaria, marcenaria e pode ser também empregada na arborização em geral.

De acordo com Lee et al. (2000), a estrutura foliar, função e ecologia são geralmente correlacionadas com a característica individual de cada espécie. Alvarenga et al. (2002), concluíram que embora a sangra d'água seja uma espécie pioneira, apresenta melhor desempenho quando submetida a 70% de sombreamento. Estes autores ainda recomendam a utilização desta planta para plantios mixtos em áreas degradadas marginais a reservatórios hidrelétricos, em margens de curso d'água e áreas de proteção de nascentes.

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

A anatomia foliar é muito influenciada pelo nível de luz durante o crescimento, pois sendo a folha um órgão plástico, sua estrutura interna adapta-se às condições de luz do ambiente. Esta plasticidade adaptativa é característica das espécies que possuem potencial de aclimatação (Björkman, 1981). O aumento no nível de luz proporciona maior espessura do limbo foliar, especialmente pelo alongamento ou adição de células do parênquima paliçádico, que está relacionado com a redução na resistência do mesofilo ao dióxido de carbono (Nobel, 1977). A compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento adaptativo do vegetal (Castro, 2002).

Para as plantas, os estômatos são estruturas fundamentais porque através deles ocorrem os processos de trocas gasosas entre a planta e o meio. Portanto, qualquer variação em número e/ou tamanho destes, pode acarretar maior ou menor eficiência da planta quanto à taxa fotossintética (Sun et al., 1995). Algumas pesquisas mostram que o número de estômatos varia entre espécies e sua densidade depende do meio em que as folhas se desenvolvem.

Dentre os problemas apresentados pelas espécies nativas, os mais importantes são os relacionados com a propagação, visto que as espécies nativas produzem sementes em apenas determinadas épocas. Como intuito de reduzir o tempo de germinação e do aparecimento da radícula, certas sementes podem ser submetidas à embebição em soluções contendo compostos com baixo peso molecular, como o nitrato de potássio (KNO_3) (Bewley e Black, 1984). O papel fisiológico dos compostos nitrogenados na promoção da germinação ainda não está esclarecido. Tem sido proposto que formas oxidadas do nitrogênio promovem a germinação, causando uma mudança no metabolismo da respiração na rota da pentose fosfato (Pandey et al., 2000). Segundo Bewley e Black (1984), o nitrato de potássio é um composto utilizado com o objetivo de promover a germinação, através da indução do estresse osmótico.

De maneira geral, durante a formação da semente, observa-se inicialmente, um acúmulo de açúcares, aminoácidos e amidas (Mendes, 1999). No cultivo *in vitro*, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação com sacarose ao meio de cultivo (Souza, 2003). Entretanto, para manter a plântula por um período maior, pode ser que a sua adição seja necessária.

Segundo Brainerd e Fuchigami (1981), a aclimatização é o processo pelo qual as plântulas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com condições climáticas naturais. Essas novas condições devem ser possibilitadas às plântulas, progressivamente, de forma que elas sofram menores estresses, evitando injúrias, ou até mesmo a morte.

A aclimatização é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido. Em muitas espécies, esse estágio é considerado crítico, sendo que, 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 (Decchetti, 2000).

Considerando a importância econômica da espécie e a ausência de relatos na literatura sobre a sua anatomia foliar e aclimatização, o presente estudo teve como objetivos comparar a estrutura interna de folhas de plântulas de *Croton urucurana* germinadas *in vitro* e em hábitat natural e também estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas micropropagadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência do material vegetal

Sementes de sangra d'água foram coletadas de populações naturais localizadas na represa de Ijaci – MG, situada na região sul do Estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

4.2 Germinação *in vitro*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG.

Frutos de sangra d'água foram coletados no período de setembro a outubro de 2003, e trazidos ao laboratório para completar a deiscência.

Após a deiscência dos frutos, as sementes foram retiradas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar, através da imersão em Benomyl 1% por quinze minutos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 2 minutos e lavadas em água destilada e autoclavada, para eliminação do excesso das soluções desinfestantes.

As sementes foram submetidas a estudos preliminares de germinação, sendo colocadas na ausência e na presença de KNO_3 (0,5% e 1%) embebidas por 12 h e 24 h, a temperatura ambiente. A seguir foram inoculadas em meio WPM – Wood Plant Medium (Lloyd e McCown, 1980), solidificado com 7 g L^{-1} de ágar, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e com pH ajustado para 5,8, sendo o meio autoclavado a 121°C, por 20 minutos.

Cada tratamento foi constituído de 4 repetições composta por 25 sementes cada. A avaliação foi realizada 45 dias após inoculação, onde se

observou o maior percentual de germinação. A germinação foi avaliada adotando-se critérios fisiológicos, considerando germinadas todas as sementes com protusão de radícula.

Como o maior percentual de germinação (35%) foi obtido sob concentração de KNO_3 a 1%, por 12 h, a temperatura de ambiente, as sementes foram colocadas nestas condições para promoção da germinação. Posteriormente as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio WPM (Wood Plant Medium), solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e com pH ajustado para 5,8, sendo o meio autoclavado a 121° C por 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob irradiância de $\pm 55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{ C}$.

4.3 Aclimatização das plântulas germinadas *in vitro*

Decorridos 45 dias da germinação, 20 plântulas de sangra d'água foram transferidas para garrafas contendo vermiculita autoclavada e envoltas com filme PVC para manutenção da umidade relativa no ambiente de aclimatização e mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ \text{ C}$.

Concomitantemente ao controle da umidade relativa e da temperatura, foi realizado o controle da intensidade luminosa, submetendo-se as plântulas a diferentes níveis de irradiância. Com esse objetivo, nos primeiros sete dias, após a retirada das plântulas dos tubos de ensaio, estas foram mantidas sob sombrite 70% ($14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sendo substituído por sombrite 50% ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e posteriormente 30% ($47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a cada sete dias. Durante a utilização do sombrite 70%, as tampas das garrafas foram desapertadas e removidas completamente no período de 14-21 dias para redução gradual da umidade

relativa. Após os 21 dias, o sombrite e as tampas foram totalmente retirados e adicionou-se à vermiculita, solução nutritiva completa de WPM.

4.4 Anatomia de folhas de sangra d'água

Folhas completamente expandidas foram coletadas ao acaso do terço superior das plantas adultas de sangra d'água cultivadas em pleno sol, em habitat natural e de plântulas provenientes da germinação *in vitro*, com aproximadamente 60 dias após a germinação, sem passarem pelo processo de aclimatização. As folhas foram fixadas em álcool etílico 70% (v/v).

Cortes transversais do limbo foram efetuados à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear, no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras.

Em seguida, sucedeu-se a 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. Posteriormente, o material foi neutralizado com solução de ácido acético 1% (v/v) por um minuto, repetindo-se as lavagens com água destilada. A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada utilizando-se uma mistura azul de astra e safranina, segundo Bukatsch (1972). A seguir, foram preparadas lâminas semipermanentes em água glicerinada (1:1), com posterior lutagem das lâminas, empregando-se esmalte sintético.

As seções transversais foram utilizadas para realização de medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas paliádico e esponjoso, com auxílio de ocular micrométrica OSM. Posteriormente, os cortes foram fotomicrografados em microscópio Olympus BX 60, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Para caracterização dos estômatos e demais anexos epidérmicos foram realizados cortes paradérmicos na região mediana das lâminas foliares, na face

abaxial e adaxial os quais foram colocados em uma lâmina contendo safranina glicerinada a 1%. As medições do diâmetro polar e equatorial e a contagem dos estômatos foram realizadas com auxílio de câmara clara, em microscópio Olympus CBB, segundo técnica de Laboriau et al. (1961).

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 60, no Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia da UFLA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Anatomia foliar de plantas cultivadas em ambiente natural

Seções transversais das lâminas foliares de sangra d'água mostraram que as epidermes abaxial e adaxial apresentam cutícula espessa e ambas são uniestratificadas, sendo a epiderme adaxial muito mais desenvolvida, em relação a epiderme abaxial (Figura 2, Tabela 1). O mesofilo possui uma organização dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico voltado para a superfície adaxial e parênquima esponjoso voltado para a superfície abaxial (Figura 2), sendo esta organização semelhante ao descrito para *Hevea brasiliensis*, também da família Euphorbiaceae (Medri e Lleras, 1980).

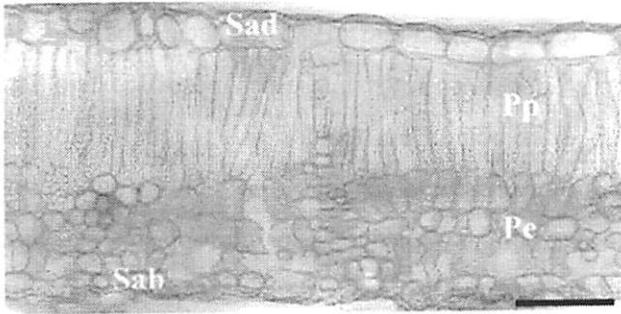


FIGURA 2. Seção transversal de lâminas foliares de sangra d'água proveniente de habitat natural, evidenciando o parênquima paliçádico (Pp), o parênquima esponjoso (Pe), a superfície adaxial (Sad) e a superfície abaxial (Sab). A barra na figura corresponde a 40 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Através da Figura 2 verifica-se que o parênquima esponjoso apresenta-se constituído por três camadas de células e o parênquima paliçádico por uma a duas camadas de células, sendo, entretanto, um pouco mais espesso que o parênquima esponjoso (Tabela 1). As células do parênquima esponjoso apresentam formas irregulares e são delimitadas por amplos espaços de ar e servem a dispersão luminosa, determinando uma absorção luminosa mais uniforme através da folha (Taiz e Zeiger, 2002).

TABELA 1. Espessura média em micrometro (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima paliçádico e esponjoso de lâminas foliares de sangra d'água. UFLA, MG, 2003.

Tipo de cultivo	Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Epiderme abaxial
Hábitat natural	1515,05	82,57	65,98	13,40

De acordo com Fahn (1985), o tecido paliçádico é especializado em aumentar a eficiência da fotossíntese nos mesófilos cujo parênquima clorofiliano se encontra diferenciado em tecidos paliçádicos e esponjosos, uma vez que a maioria dos cloroplastos se encontra nas células paliçádicas. Dada a forma e a disposição das células paliçádicas, os cloroplastos se colocam de maneira que permitam uma máxima utilização de luz. Outro fator importante para o aumento da eficiência fotossintética é a presença de um sistema de espaços intercelulares bem desenvolvido que se encontra, no mesófilo, o que facilita um rápido intercâmbio gasoso.

O estudo das seções paradérmicas revelou a presença de células epidérmicas com o contorno sinuoso e parede bem espessada pela deposição de cutina (Figura 3), em ambas as faces adaxial e abaxial. As folhas são do tipo

anfi-hipoestomáticas, fato este, segundo Morretes (1969), muito comum em plantas do Cerrado.

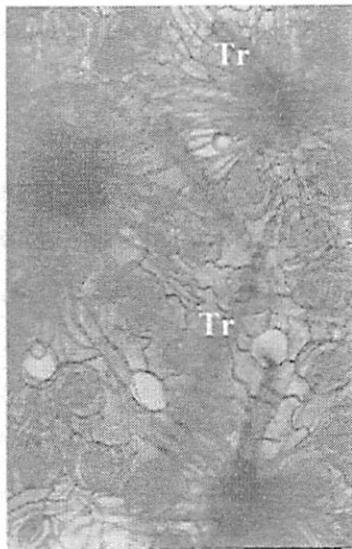


FIGURA 3. Seção paradérmica da face abaxial da folha de sangra d'água cultivada em hábitat natural mostrando a presença de tricomas (Tr). As barras nas figuras correspondem a 40 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Devido ao fato dos estômatos presentes na superfície adaxial encontrarem-se em pequeno número, não foi possível efetuar a contagem e medição dos mesmos nos campos observados. As avaliações realizadas na superfície abaxial demonstraram que, em média, esta epiderme apresentou 366 estômatos/mm², com diâmetros polar e equatorial em torno de 35 e 26 μ m, respectivamente. Observou-se ainda na epiderme abaxial, a presença de grande quantidade de tricomas, estruturas estas importantes no processo de adaptação, pois mantêm uma atmosfera saturada em vapor de água em torno da folha. Chaves e Rodrigues (1987) relatam que um aumento no número de estômatos resulta em uma maior condutância estomática e transpiração nas folhas e, conseqüentemente, em menor resistência às trocas gasosas.

5.2 Anatomia foliar de plântulas cultivadas *in vitro*

Seções transversais de folhas de plântulas de sangra d'água obtidas do cultivo *in vitro* mostraram que em ambas as epidermes são uniestratificadas e apresentam a mesma espessura, com a ausência total de cutícula (Figura 4, Tabela 2). Segundo Fráguas (2003), a ausência de formação de ceras epicuticulares, aliada à alteração na composição química das mesmas é uma das características que possivelmente pode ser induzida pela condição *in vitro*, contribuindo para a dessecação das mudas após a transferência para a casa-de-vegetação devido à excessiva perda de água.

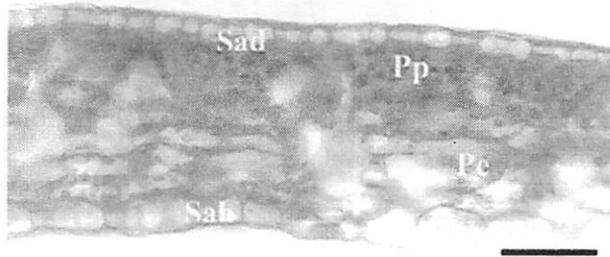


FIGURA 4. Seção transversal de lâminas foliares obtidas de sangra d'água germinadas *in vitro*, evidenciando o parênquima paliçádico (Pp), o parênquima esponjoso (Pe), a superfície adaxial (Sad) e a superfície abaxial (Sab). A barra na figura corresponde a 40 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2003.

O mesofilo é do tipo dorsiventral com um parênquima paliçádico pouco diferenciado, constituído somente por uma camada de células e com inúmeros espaços intercelulares do tipo lacunas (Figura 4). Esta alta proporção de espaços intercelulares causados, possivelmente, pelas condições *in vitro*, indica que é necessário um período de aclimatização para corrigir essas anomalias, sendo um dos fatores que pode contribuir para a dessecação das mudas em um processo de aclimatização. O parênquima esponjoso apresenta-se constituído por quatro

camadas de células, sendo mais difuso, isto é, com espaços intercelulares mais acentuados. Este fato é comum em folhas de plantas submetidas a baixas intensidades luminosas, como ocorre no cultivo *in vitro*. Não se observou diferença em relação à espessura dos parênquimas paliçádicos e esponjoso. (Tabela 3).

TABELA 3. Espessura média em micrômetros (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima paliçádico e esponjoso de lâminas foliares de sangra d'água germinadas *in vitro*. UFLA, MG, 2003.

Tipo de cultivo	Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso
<i>In vitro</i>	12,00	11,00	37,63	40,87

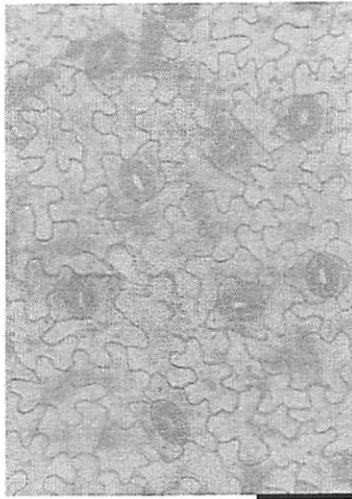


FIGURA 5. Seção paradérmica da epiderme da face abaxial da folha da planta de sangra d'água cultivada *in vitro*. As barras nas figuras correspondem a $40\mu\text{m}$. UFLA, Lavras, MG, 2003.

O estudo de seções paradérmicas da face adaxial revelou a presença de células epidérmicas com contorno mais sinuoso e com parede fina, demonstrando a ausência de cutícula (Figura 5). Esta característica de maior sinuosidade da parede celular pode estar relacionada às condições *in vitro* de que estas plântulas ainda não apresentam características adaptativas contra a perda excessiva de água, necessitando assim de um período de aclimatização. As folhas são do tipo anti-hipoestomática. Avaliações realizadas na epiderme abaxial demonstram que esta epiderme apresentou em média 186,40 estômatos/mm² com diâmetros polar e equatorial em torno de 5,1 e 3,5 µm, respectivamente.

Embora não seja possível visualizar através da Figura 5, verificou-se a presença de pequena quantidade de tricomas nas folhas das plantas micropropagadas. Segundo Erlinger (1984), o valor adaptativo dos tricomas está relacionado à economia de água pela planta, através de um aumento na reflexão da radiação solar, que reduz a temperatura foliar e, conseqüentemente, a transpiração, ou através do aumento da espessura da camada de ar, pela qual o vapor d'água deve difundir.

O número de estômatos observado em plântulas *in vitro* pode ser induzido pelo ambiente existente nos recipientes. Como o nível de luz e as trocas gasosas são baixos em relação ao do hábitat natural, os numerosos estômatos abertos provavelmente facilitam as trocas e aumentam a eficiência fotossintética.

De acordo com a diferenciação entre os tecidos de *Croton urucurana* cultivadas *in vitro*, percebe-se que a técnica de cultura de tecidos é perfeitamente aplicável para a obtenção de plântulas aptas a serem levadas ao campo; observa-se que estes tecidos são semelhantes à das plantas provenientes do hábitat natural, necessitando de um período de aclimatização para corrigir algumas anomalias provocadas pelas condições *in vitro*.

5.3 Aclimatização das plântulas germinadas *in vitro*

A redução gradual do sombrite e abertura parcial das tampas caracterizam um processo viável para promoção da aclimatização de plântulas sangra d'água. As plântulas germinadas *in vitro* apresentaram 90% de sobrevivência após um período de 21 dias de aclimatização em sala de crescimento (Figura 6A e 6B).

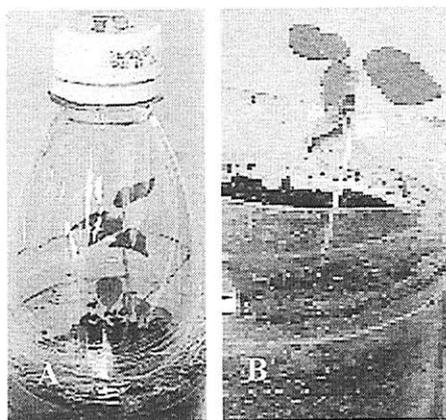


FIGURA 6. Aspecto geral da aclimatização de plântulas germinadas *in vitro* de sangra d'água, mantidas em sala de crescimento (6A) e plântulas aclimatizadas após um período de 21 dias em sala de crescimento (6B). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Em decorrência dessas observações, verifica-se que o controle ambiental, no local de aclimatização favoreceu o crescimento e o desenvolvimento das plântulas de sangra d'água. Portanto, é possível a aclimatização das plantas de sangra d'água, fazendo o controle da umidade relativa e utilizando sombrite 70, 50 e 30%, por um período de sete dias cada.

Os resultados corroboram com Deccetti (2000), que constatou que é possível a aclimatização de mudas de *Annona glabra*, obtidas por

micropropagação, fazendo-se o controle da umidade relativa, durante 21 dias aliada ao controle da irradiância.

Do mesmo modo, Santos (2001), concluiu que foi possível a aclimatização por um período de 21 dias de plântulas de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, através do controle ambiental.

6 CONCLUSÕES

As estruturas foliares de plantas provenientes do ambiente natural apresentam epiderme uniestratificada, com cutícula espessa e o mesofilo possui uma organização dorsiventral. A folha é do tipo anfi-hipoestomática com 366 estômatos/mm², com diâmetro polar e equatorial 35 e 26 µm na epiderme adaxial.

As estruturas foliares de plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam epiderme uniestratificada, com ausência de cutícula e o mesofilo possui uma organização dorsiventral. A folha é do tipo anfi-hipoestomática com 186 estômatos/mm², com diâmetro polar e equatorial 5,21 e 3,5 µm na epiderme adaxial.

É possível a aclimatização das plantas de sangra d'água, fazendo o controle da umidade relativa e utilizando sombrite 70, 50 e 30%, por um período de sete dias cada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, A. de.; CASTRO, E. M. de.; LIMA JÚNIOR, E. C. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 27, n. 1, Jan/Feb. 2003.

BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (eds). **Physiological plant ecology I – responses to the physical environment**. Encyclopedia of plant physiology, New York: Springer-Verlag, 1981. 652 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1984. 445 p.

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

BUKATSH, F. Benerkungem zur doppelfarbung astrablau-safranina. *Microkosmos*, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.

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

CHAVES, M. M.; RODRIGUES, M. L. Photosynthesis and water relations of grapevines growing in Portugal – responses to environmental factors. In: TENHUNEN, J. D.; CATARINO, F. M.; LANGE, O.L. et al. (Eds.). **Plant response to stress**, Berlim: Nato Asi, 1987, p. 379-390. (Nato Asi, series. G15).

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

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.

EHLERINGER, J. Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. In: RODRIGUES, E.; HEALEY, P. L.; MEHTA, I. **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum Press, 1984. p. 113-133.

FAHN, A. **Anatomia vegetal**. Madrid: A. Fahn pergamon press, 1985. 599 p.

FRAGUÁS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 237-257, 1961.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and functions in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2000. v. 1, 386 p.

MARTINS, B. G.; ZIERI, R. Anatomia foliar de clones de seringueira. *Science Agricultural*, Piracicaba, v.60 n.4. Out./dez. 2003.

MEDRI, M. E.; LLERAS, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 10, n. 3, p. 389-409, 1980.

MENDES, R. G. **Fisiologia de sementes**. – Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 129 p. – Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distancia: Produção e Tecnologia de Sementes.

MORRETES, B. L. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do Cerrado III. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP**. 16:7-70. 1969

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

PANDEY, H.; NANDI, M; PALNI, L. M. S. Chemical stimulation of seed germination in *Aconitum heterophyllum* Wall. And *A. balfourii* Stapf.: Important Himalayan species of medicinal value. **Seed Science & Technology**. Indian, v. 28, p. 39-48, 2000.

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

SOUZA, A. V. de. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica [*Lychnophora pinaster* (Mart.)]**. 2003. 126 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUN, O. J.; SWEET, G. B.; WHITEHEAD, D.; BUCHAN, G. D. Physiological responses to water stress and waterlogging in nothofagus species. **Tree Physiology**, Victoria, v.15, n.10, p. 629-638, oct, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer, 2002. 690 p.

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.

CAPÍTULO 3

LIMA, Ednabel Caracas. **Indução e enraizamento de brotações *in vitro* em segmentos nodais de sangra d'água.** 2004. 43-61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

1 RESUMO

A sangra d'água é uma espécie pertencente à família Euphobiaceae que apresenta potencial na recuperação de matas ciliares degradadas. As suas sementes apresentam baixa viabilidade. Portanto, a propagação *in vitro* permite a determinação de vias alternativas de reprodução por meio da organogênese direta ou embriogênese somática. Objetivou-se estabelecer uma metodologia para a micropropagação da sangra d'água, induzindo a proliferação de brotações axilares, pela inoculação de segmentos nodais em meio WPM, acrescido com diferentes concentrações de BAP (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹). Para o enraizamento, foram utilizadas brotações obtidas de segmentos nodais sendo estas inoculadas em meio WPM com 0,1% de carvão ativado e acrescido com diferentes concentrações de ANA (0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura 27° ± 2°C. A avaliação do número e comprimento das brotações, e número de folhas foi realizada 40 dias após a inoculação. O regulador de crescimento BAP não foi eficiente para a indução de múltiplas brotações, comprimento e número de folhas em segmentos nodais na espécie sangra d'água. Para o enraizamento, a avaliação foi realizada 35 dias após a inoculação. O maior número de raízes e o maior comprimento foi observado em 3 mg L⁻¹ de ANA.

* Orientador: Renato Paiva - UFLA

CHAPTER 3

LIMA, Ednabel Caracas. *In vitro* shoot induction and rooting of nodal segments of *Croton urucurana* Baill. Lavras: UFLA, 2004. 40-56 p. Dissertation (Master of Science in Plant Physiology)* - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

2 ABSTRACT

Croton urucurana Baill is a species of the family Euphobiaceae that presents potential in the recovery of degraded ciliary forests. Their seeds present low viability. The *in vitro* propagation allows the determination of reproductive alternatives through direct organogenesis or somatic embryogenesis. The objective this work was to establish a methodology for the micropropagation of *Croton urucurana* Baill, by inducing the proliferation of axillary shoots, through the inoculation of nodal segments in WPM medium, supplemented with different concentrations of BAP (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹). For rooting, shoots were inoculated in WPM medium containing 0,1% activated charcoal and different concentrations of NAA (0; 1; 2 and 3 mg L⁻¹). After the inoculation, the explants were maintained in a growth room, with photoperiod of 16 hours and temperature of 27±2° C. The evaluation of number and shoot length and number of leaves was accomplished 40 days after inoculation. The growth regulator BAP was not efficient for the induction of multiple shoots, length and number of leaves. For rooting, the evaluation was accomplished 35 days after inoculation. Larger number of roots and highest length was observed using 3 mg L⁻¹ NAA.

* Adviser: Prof. Renato Paiva – UFLA

3 INTRODUÇÃO

A sangra d'água é uma espécie arbórea característica de terrenos muito úmidos e brejosos, pertencente à família Euphorbiaceae. Sua distribuição estende-se desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul em formações idênticas (Brandão et al., 2002). Como apresenta adaptação à presença de lençol freático superficial é de primordial importância sua utilização em projetos de reflorestamento de áreas ciliares degradadas e de depleção de reservatórios.

A obtenção de mudas de sangra d'água durante todo ano é comprometida devido à baixa viabilidade das sementes, não ultrapassando quatro meses, além da presença do coleóptero pertencente ao gênero *Apion* sp que provoca dano ao embrião, dificultando sua propagação pela via sexuada.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação. A micropropagação é a técnica alternativa mais utilizada com a finalidade de obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano (Borthakur et al., 1999). Por essa razão, a definição de uma metodologia para a micropropagação da sangra d'água pode apresentar uma contribuição efetiva no desenvolvimento da cultura.

Um dos explantes mais usados para a micropropagação são os segmentos nodais e seu cultivo consiste na inoculação de uma gema, juntamente com uma porção do caule, para obter brotos a partir desta. Diversas espécies lenhosas são regeneradas por meio de segmentos nodais, podendo, a juvenildade destes explantes ser um fator importante na capacidade de brotação e desenvolvimento da cultura *in vitro* (Braga et al., 1997).

A composição do meio de cultura é outra importante variável que determina o sucesso nas diversas fases da micropropagação. Os nutrientes

presentes no meio de cultura são necessários ao metabolismo das células e aos fatores de crescimento, responsáveis pela diferenciação em brotos e raízes (Schuch e Peters, 1993). O meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980) é bastante utilizado para a indução de brotações em plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais.

Os tecidos caulinares isolados exibem muito pouco crescimento em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. Embora a adição de auxinas não seja necessária no cultivo *in vitro* para algumas espécies, as citocininas são indispensáveis para a quebra da dormência apical e indução de proliferação de gemas axilares. Estas substâncias promovem também a divisão, alongamento e diferenciação celular (Taiz e Zeiger, 2002).

Dentre as citocininas, o 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais utilizada, devido à sua eficiência na multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias em várias espécies lenhosas, em concentrações que variam entre 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ (Pasqual et al., 2001).

Na formação de raízes adventícias em espécies lenhosas, o uso de carvão ativado no meio tem favorecido o enraizamento. Por apresentar 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 ágar, 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 e Teixeira, 1998).

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento. A auxina ANA é uma das auxinas mais estáveis e, de modo geral, mais indicadas para aplicação exógena, visando o enraizamento.

Como a obtenção de mudas pela da via sexuada é dependente da sazonalidade, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia de micropropagação via organogênese direta a partir de segmentos nodais de sangra d'água.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizadas folhas de plantas matrizes de sangra d' água com aproximadamente seis meses de idade, obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizada na Represa de Camargos, município de Itutinga, Minas Gerais. Estas plantas foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Desinfestação e inoculação do material vegetal

Os explantes foram constituídos de segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, contendo apenas uma gema lateral. Estes foram lavados em água corrente com gotas de detergente por duas horas, seguidos de imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto e submersos em hipoclorito de sódio (1%) durante 20 minutos e lavados em água destilada e autoclavada por cinco vezes.

4.1 Indução de brotações em segmentos nodais de sangra d'água

Os segmentos nodais foram inoculados em meio WPM acrescidos de BAP nas concentrações de 0, 1, 2 e 3 mg L^{-1} e suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose. O meio foi solidificado com ágar 7 g L^{-1} e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121°C , por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $55 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

Quarenta dias após a inoculação, avaliaram-se o número e o comprimento de brotações e o número de folhas produzidas.

Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. As análises de variância e de regressão foram realizadas utilizando-se o programa computacional SISVAR, versão 4.3 (Ferreira, 2000).

4.2 Enraizamento *in vitro* de brotações obtidas de segmentos nodais

Brotações obtidas de segmentos nodais cultivados *in vitro* em meio WPM acrescidos de 1 mg L^{-1} foram inoculadas em meio WPM acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose e as seguintes concentrações de ANA, 0, 1, 2 e 3 mg L^{-1} e 0,1% de carvão ativado. O meio foi solidificado com 7 g L^{-1} de ágar e tiveram o seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C , por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $55 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 35 dias, foram avaliados a porcentagem, o número e o comprimento das raízes.

Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo

um explante. As análises de variância e de regressão foram realizadas utilizando-se o programa computacional SISVAR, versão 4.3 (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de brotações em segmentos nodais de sangra d'água

O regulador de crescimento BAP não foi eficiente para a indução de múltiplas brotações, comprimento e número de folhas em segmentos nodais na espécie sangra d'água.

Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que o tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Afirmam também que o BAP tem se mostrado muito eficaz, sendo a citocinina mais indicada para a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. Um fator que deve ser ressaltado é a espécie que está sendo multiplicada, pois o resultado será influenciado pela concentração e fitorregulador utilizado. A utilização de outras concentrações de BAP, ou o uso de outro tipo de citocinina como TDZ, pode estimular a indução de múltiplas brotações em sangra d'água.

Resultados semelhantes foram obtidos com segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), em que foi constatado que o BAP não é eficiente na indução de brotação para esta espécie (Nogueira, 2003). Também foi verificada por Deccetti (2000) que esta citocinina não foi adequada para a proliferação de brotações em segmentos nodais de *Annona glabra*. Esta autora obteve, em média, 1,5 broto por segmento nodal, não sendo necessária a adição de BAP, ANA, com ou sem GA₃.

Resultados divergentes foram encontrados por Cerqueira (1999) em segmentos nodais de erva-de-touro (*Tridax procumbens*), em que o BAP foi mais eficiente do que o TDZ em todas as variáveis avaliadas (altura e número das brotações).

Observou-se, ainda, um princípio de formação de calos nos segmentos nodais em todas as concentrações de BAP testadas, sendo mais visível na concentração de 3 mg L⁻¹. Estas observações estão de acordo com as verificadas por Nogueira (2003) em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) em que, a ocorrência de calos apresentou-se diretamente proporcional aos níveis deste regulador de crescimento. Efeitos equivalentes foram constatados por Bonilla (2002) em *Rudgea viburnoides* ocorrendo a formação de calos proporcionalmente ao incremento das concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultura.

Souza (2003) observou que, em *Lychnophora pinaster*, o maior número de brotos foi obtido na concentração de 0,62 mg L⁻¹ de BAP. Verificou também que, no meio com 1 mg L⁻¹ de BAP, tanto o número quanto o comprimento dos brotos foram menores do que em relação a dosagens inferiores.

Em copaíba (*Copaifera langsdorffii*), Azevedo (2003), verificou que os efeitos das concentrações de BAP no meio de cultura WPM aumentaram o tamanho das brotações até a concentração de 1,18 mg L⁻¹ de BAP e que nas concentrações superiores a esta, houve uma tendência da queda no comprimento das brotações. Em *Eucalyptus grandis*, as maiores taxas de multiplicação a partir de segmentos nodais foram atingidas quando se utilizou BAP nas concentrações de 0,5 a 1 mg L⁻¹ (Carvalho, 1988).

Em segmentos nodais de sucupira-branca (*Pterodon pubescens*) inoculados em meio MS e WPM, Coelho (1999) verificou maior número de brotações em meio WPM com a adição de 3 mg L⁻¹ de BAP. Bonilla (2002), trabalhando com *Rudgea viburnoides*, constatou que o maior número de brotos foi obtido com 4 mg L⁻¹ de BAP no meio WPM.

Soares (2002), objetivando estimular a brotação de gemas laterais em segmentos nodais de Ingá (*Inga vera* subsp. *affinis*), observou que as concentrações de 0, 3 e 12 mg L⁻¹ de BAP adicionado ao meio WPM foram as

que apresentaram melhores resultados para estimular a brotação de gemas laterais. No entanto, estes brotos tiveram uma média de crescimento significativamente maior na ausência deste regulador.

Mesquita (1999) obteve desenvolvimento de gemas nos segmentos nodais de lechieira (*Litchi chinensis*), independente das concentrações utilizadas dos reguladores BAP ou ANA. Porém, houve formação de calos na base dos segmentos.

De acordo com Gomes (1999) o desencadeamento do processo morfogenético, na maioria dos casos, acontece quando são adicionados reguladores de crescimento ao meio nutritivo. Santos (2001) mostrou que, em *Salyx humboldtiana*, a indução de brotações a partir de segmentos nodais pode ser obtida na ausência de BAP ou GA₃, mas o uso destes reguladores favorece o surgimento de mais de um broto por explante.

De acordo com George (1996), o crescimento e a morfogênese são fatores controlados pela interação entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e os hormônios presentes no explante.

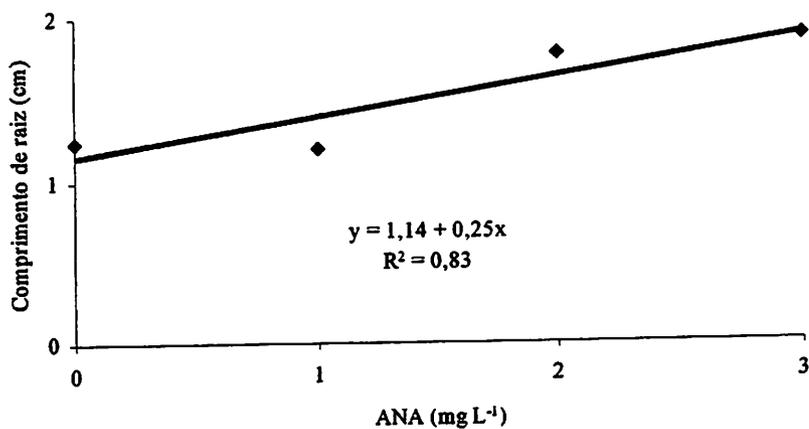
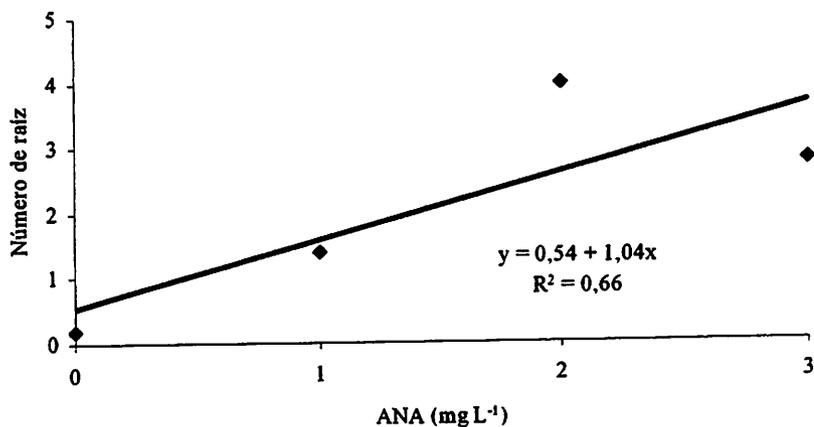
5.2 Enraizamento *in vitro* em brotações de sangra d'água

A concentração de 3 mg L⁻¹ de ANA foi a mais eficiente para a obtenção de um maior número e comprimento de raízes em sangra d'água (Figura 7A). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Lopes et al. (2002). Andrade et al. (2000), trabalhando com brotações de aroeira (*Myracrodrum urundeuva*), constataram que o uso de ANA também promoveu um maior enraizamento nestes explantes. Na espécie *Lychnophora pinaster*, um maior número de raízes foi obtido em meio suplementado com 2 mg L⁻¹ de ANA (Souza, 2003).

Na ausência de ANA, observou-se formação de raízes, embora o seu número e comprimento tenham sido inferiores quando comparadas com as

concentrações de 1, 2 e 3 mg L⁻¹ de ANA. A rizogênese promovida na ausência de ANA pode ter sido promovida pelos teores endógenos de auxinas presentes no explante.

A



B

FIGURA 7. Número de raízes (A) e comprimento de raízes (B) em brotações obtidas a partir de segmentos nodais de sangra d'água inoculados em meio WPM contendo diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2003.

O comprimento das raízes de brotações de sangra d'água aumentou com o incremento das concentrações de ANA, tendo sido a concentração de 3 mg L^{-1} a que promoveu maior comprimento das raízes (2,57 cm). A concentração de 2 mg L^{-1} também apresentou eficiência no comprimento das raízes (2,44 cm) (Figura 7).

De acordo com Gill et al. (1994), o número de raízes é mais importante que o comprimento das raízes durante a fase de aclimatização. Para a obtenção de maior comprimento das raízes das brotações, a concentração de 3 mg L^{-1} de ANA é a mais indicada.

Na Figura 8 é mostrado o percentual de enraizamento das brotações.

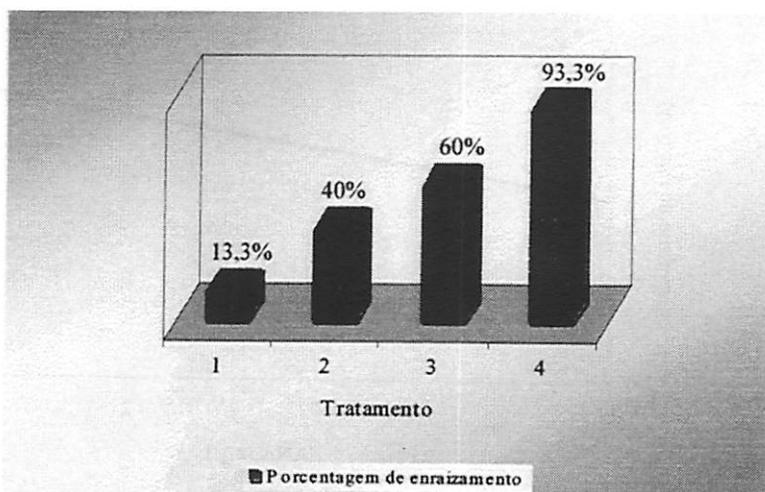


FIGURA 8. Porcentagem de enraizamento das brotações *in vitro* obtidas por meio de segmentos nodais de sangra d'água inoculados em meio WPM acrescido com diferentes concentrações de ANA (0; 1; 2 e 3 mg L^{-1}). UFLA, Lavras, MG. 2003.

De acordo com a Figura 8, observa-se que a maior porcentagem de enraizamento foi obtida com a concentração de 3 mg L^{-1} de ANA, atingindo 93,3%, seguida de 2 mg L^{-1} de ANA (60%). O controle foi o que obteve a menor

porcentagem de enraizamento (13,3%), podendo ser atribuída esta formação aos teores endógenos de auxinas presentes no explante. Verifica-se que é necessária a utilização exógena de auxina para promover rizogênese em brotações de sangra d'água.

Na Figura 9 é mostrado aspecto do enraizamento das brotações de sangra d'água.

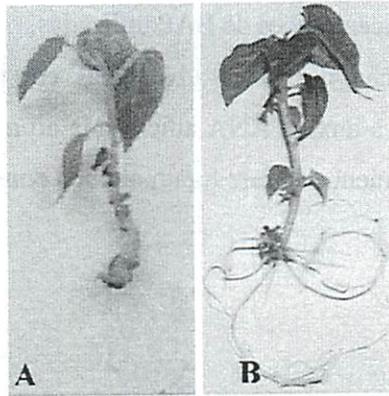


FIGURA 9. Aspecto do enraizamento *in vitro* de brotações de sangra d'água obtidas de segmentos nodais após 35 dias de inoculação em meio WPM. Controle (A) e acrescido com 3 mg L^{-1} de ANA (B). UFLA, Lavras, MG, 2003.

No caso de Lopes (2001) e Andrade et al. (2000), estes autores observaram que o ANA foi mais eficiente no enraizamento de brotos de mogno (*Swietenia macrophylla*) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) obtidos *in vitro*, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

O uso da citocinina BAP não foi eficaz na indução de brotações em segmentos nodais de sangra d'água.

Não houve diferença para o número de folhas e comprimento das brotações nas concentrações de BAP utilizadas.

A formação de raízes adventícias em brotações de sangra d'água é obtida utilizando a auxina ANA adicionada ao meio de cultura WPM. O maior número e comprimento de raiz foram obtidos com a concentração de 3 mg L^{-1} de ANA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.

BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 231-233, 1999.

BRAGA, M. F.; CALDAS, L. S.; HABE, M. H. Estabelecimento de acerola (*Malpighia glabra* L.) *in vitro*: efeito do clone e do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 19, n. 3, p. 335-346, 1997.

CARVALHO, D. de. **Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura *in vitro* de segmentos nodais**. 1988. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CERQUEIRA, E. S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal.** 1999. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0.** In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DA BIOMETRIA, 45. 2000, São Carlos. **Resumos.** São Carlos: UFSCar, 2000.

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

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

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.

GILL, M. I. S.; SING, Z.; DHILLON, B. S. GOSAL, S. S. **Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on callus derived from seedling explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* x *Citrus delectiosa* Tenore).** **Journal of Horticultural Science, Ashford,** v. 69, n. 2, p. 231-236, Mar. 1994.

LOPES, S. da C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. **P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King).** **Cerne, Lavras,** v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MESQUITA, A. C. Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos. 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- NOGUEIRA, R. C. Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. Aplicações na propagação de plantas. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 66-69.
- SANTOS, B. R. Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Willd). 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, May, V. 17, n. 5, p. 418-420, May 1987.
- SCHUCH, M. W. PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Xilld, Borkh) e Meggumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433-437, abr, 1993.
- SOARES, G. de A. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn]. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SOUZA, A.V. de. Micropropagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) MART. 2003. 126 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer, 2002. 690 p.

CAPÍTULO 4

LIMA, Ednabel Caracas. **Indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água.** 2004. 62-84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

1 RESUMO

A formação de calos é desejável para induzir morfogênese indireta, variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular. Com o objetivo de estabelecer uma via alternativa para propagação *in vitro* da sangra d'água, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de auxinas e citocininas na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água. Discos foliares com aproximadamente 1 cm² foram retirados de plantas matrizes com 6 meses de idade, e inoculados em meio WPM, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D, TDZ, ANA e BAP na presença de luz. O 2,4-D e o TDZ induziram formação de calos, porém o 2,4-D apresentou o maior peso fresco de calos nas concentrações de 3 e 5 mg L⁻¹ quando utilizado isoladamente. Observou-se que tanto o 2,4-D quanto o BAP foram eficientes na indução de calos, porém, na presença de 2,4-D obteve-se maior peso fresco de calos, tendo este máximo sido obtido a uma concentração de 4 mg L⁻¹. A combinação entre ANA e BAP promoveu oxidação. O ANA induziu rizogênese nos explantes foliares quando utilizado isoladamente.

* Orientador: Renato Paiva - UFLA

CHAPTER 4

LIMA, Ednabel Caracas. **Induction of callus in leaf segments of bleeds of water (*Croton urucurana* Baill.)**. Lavras: UFLA, 2004. 62-84 p. Dissertation (Master Program in Plant Physiology)* - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

2 ABSTRACT

The formation of callus is desirable to induce indirect morphogenesis; somaclonal variation and physiologic studies, mainly when one wants to relate the presence of secondary metabolites with the cellular growth. With the objective to establish an alternative for the *in vitro* propagation of *Croton urucurana* Baill, the effect of different auxin and cytokinin concentrations on the induction of callus in leaf and segments explants were studied. Leaf explants of approximately 1 cm² size obtained from 6 months old plants were inoculated in WPM medium, supplemented with different concentrations of 2,4-D, TDZ, NAA and BAP in the presence of light. The use of 2,4-D and TDZ induced formation of callus. However, higher fresh weight of callus was obtained in the concentrations of 3 and 5 mg L⁻¹ when used isolated. The use of both 2,4-D and BAP were efficient in the callus induction, however, in the presence of 4 mg L⁻¹ 2,4-D higher fresh weight of callus was obtained. The combination between NAA and BAP promoted oxidation. NAA induced root formation in leaf explants when used isolated.

* Adviser: Renato Paiva – UFLA

3 INTRODUÇÃO

A sangra d'água é uma árvore do Cerrado que apresenta um grande valor na medicina tradicional e na recomposição de áreas degradadas. As áreas de dispersão dessa espécie são nas zonas tropicais e subtropicais da América do Sul. No Brasil, a sangra d'água ocorre nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul e ultrapassa suas fronteiras, até o Uruguai e a Argentina (Cordeiro, 1985).

Na cultura de tecidos, a cultura dos calos é desejável, podendo ser utilizada no isolamento de protoplastos, estudo de tipos celulares, seleção celular, embriogênese somática, organogênese e produção de metabólitos secundários (Pinto e Lameira, 2001).

Calos são definidos como tecidos constituídos por células dediferenciadas, que se desenvolvem como resposta a uma lesão química ou física sob determinadas condições hormonais (Mantell et al., 1994). Os calos podem ser obtidos a partir de um fragmento de tecido de determinada planta e possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras (Paiva e Paiva, 2001; Pierik, 1990; Torres e Caldas, 1990).

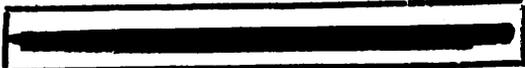
Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. No entanto, explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de tecidos, por possuírem alta capacidade de regeneração (Pierik, 1990). Outros fatores que influenciam a formação de calos são a composição do meio nutritivo, tamanho do explante, condições físicas do ambiente (luz e temperatura), genótipo e estágio fisiológico

da planta-mãe. Estes fatores interagem, podendo promover ou inibir a formação dos calos.

Na calogênese, muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de fitorreguladores (Viêtez e San-José, 1996), necessidade que se refere ao tipo, concentração, relação auxina/citocinina, genótipo da planta doadora e conteúdo endógeno de hormônios.

As auxinas e citocininas são as principais classes de fitorreguladores utilizados para indução e crescimento de calos. Segundo George e Sherrington (1984), a combinação de auxinas e citocininas promove diferenciação celular e também a organogênese. Dentre os fitorreguladores utilizados na indução de calos, destacam-se: o ácido 2,4-diclorofeno-oxiacético (2,4-D), o ácido naftaleno acético (ANA), o ácido 6-benzilaminopurina (BAP) e o thidiazuron (TDZ).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a interação de diferentes concentrações de auxinas e citocininas na indução de calos, em explantes foliares de sangra d'água.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Plantas matrizes de sangra d'água, com aproximadamente 6 meses de idade, foram obtidas do viveiro de mudas da Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizada na Represa de Camargos, município de Itutinga, Minas Gerais. Estas plantas foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, com irradiância de $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, sendo utilizadas como fonte de explantes.

4.2 Desinfestação e inoculação do material vegetal

Folhas jovens retiradas das plantas matrizes foram lavadas por 12 h em água corrente e detergente e desinfestadas em câmara de fluxo laminar com álcool 70% (v/v) por um minuto, hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) a 50%, durante 15 minutos e lavadas cinco vezes com água destilada e autoclavada. Destas, foram retirados discos foliares com aproximadamente 1 cm^2 que foram inoculados com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo. Após a inoculação, os explantes foram mantidos sob irradiância de $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em sala de crescimento, à temperatura de $27^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.

4.3 Efeito de 2,4-D e TDZ na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água

Os explantes foram inoculados em meio de cultivo WPM (Lloyd e McCown, 1980) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 7 g L^{-1} de ágar e seu

pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem e acrescido de diferentes combinações entre 2,4-D (0; 1; 2; 3; 4 e 5 mg L⁻¹) e TDZ (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹), conforme Tabela 4.

TABELA 4. Combinação entre diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ, adicionados ao meio WPM, na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água. UFLA, Lavras, MG, 2003.

(T1) Controle	(T13) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D
(T2) 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ	(T14) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ
(T3) 1 mg L ⁻¹ de TDZ	(T15) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de TDZ
(T4) 2 mg L ⁻¹ de TDZ	(T16) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de TDZ
(T5) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(T17) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D
(T6) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ	(T18) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ
(T7) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de TDZ	(T19) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de TDZ
(T8) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de TDZ	(T20) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de TDZ
(T9) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(T21) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D
(T10) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ	(T22) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de TDZ
(T11) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de TDZ	(T23) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de TDZ
(T12) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de TDZ	(T24) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de TDZ

A avaliação foi realizada 45 dias após a inoculação, utilizando como parâmetro o peso da biomassa fresca de calos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante por tubo de ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.4 Efeito de 2,4-D e BAP na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água

Os explantes foram inoculados em meio de cultivo WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem e com diferentes concentrações de 2,4-D (0; 1; 2; 3; 4 e 5 mg L⁻¹) e BAP (0; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹), conforme Tabela 5.

TABELA 5. Combinação entre diferentes concentrações entre 2,4-D e BAP, adicionados ao meio WPM, na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água. UFLA, Lavras, MG, 2003.

(T1) Controle	(T13) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D
(T2) 0,5 mg L ⁻¹ de BAP	(T14) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de BAP
(T3) 1 mg L ⁻¹ de BAP	(T15) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de BAP
(T4) 2 mg L ⁻¹ de BAP	(T16) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP
(T5) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(T17) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D
(T6) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de BAP	(T18) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de BAP
(T7) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de BAP	(T19) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de BAP
(T8) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP	(T20) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP
(T9) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(T21) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D
(T10) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de BAP	(T22) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ de BAP
(T11) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de BAP	(T23) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ de BAP
(T12) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP	(T24) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ de BAP

A avaliação foi realizada 45 dias após a inoculação, utilizando como parâmetro o peso da biomassa fresca de calos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante por tubo de ensaio. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.5 Efeito de ANA e BAP na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água

Os segmentos foliares foram inoculados em meio de cultivo WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, e acrescido de diferentes combinações entre ANA (0; 1; 2; 3; 4 e 5 mg L⁻¹) e BAP (0; 1; 2; 3; 4 e 5 mg L⁻¹), conforme Tabela 6.

TABELA 6. Combinação entre diferentes concentrações de ANA e BAP, adicionados ao meio WPM, na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água. UFLA, Lavras, MG, 2003.

(T1) Controle	(T19) 3 mg L ⁻¹ de ANA
(T2) 1 mg L ⁻¹ de BAP	(T20) 3 mg L ⁻¹ de ANA + 1 mg L ⁻¹ de BAP
(T3) 2 mg L ⁻¹ de BAP	(T21) 3 mg L ⁻¹ de ANA + 2 mg L ⁻¹ de BAP
(T4) 3 mg L ⁻¹ de BAP	(T22) 3 mg L ⁻¹ de ANA + 3 mg L ⁻¹ de BAP
(T5) 4 mg L ⁻¹ de BAP	(T23) 3 mg L ⁻¹ de ANA + 4 mg L ⁻¹ de BAP
(T6) 5 mg L ⁻¹ de BAP	(T24) 3 mg L ⁻¹ de ANA + 5 mg L ⁻¹ de BAP
(T7) 1 mg L ⁻¹ de ANA	(T25) 4 mg L ⁻¹ de ANA
(T8) 1 mg L ⁻¹ de ANA + 1 mg L ⁻¹ de BAP	(T26) 4 mg L ⁻¹ de ANA + 1 mg L ⁻¹ de BAP
(T9) 1 mg L ⁻¹ de ANA + 2 mg L ⁻¹ de BAP	(T27) 4 mg L ⁻¹ de ANA + 2 mg L ⁻¹ de BAP
(T10) 1 mg L ⁻¹ de ANA + 3 mg L ⁻¹ de BAP	(T28) 4 mg L ⁻¹ de ANA + 3 mg L ⁻¹ de BAP
(T11) 1 mg L ⁻¹ de ANA + 4 mg L ⁻¹ de BAP	(T29) 4 mg L ⁻¹ de ANA + 4 mg L ⁻¹ de BAP
(T12) 1 mg L ⁻¹ de ANA + 5 mg L ⁻¹ de BAP	(T30) 4 mg L ⁻¹ de ANA + 5 mg L ⁻¹ de BAP
(T13) 2 mg L ⁻¹ de ANA	(T31) 5 mg L ⁻¹ de ANA
(T14) 2 mg L ⁻¹ de ANA + 1 mg L ⁻¹ de BAP	(T32) 5 mg L ⁻¹ de ANA + 1 mg L ⁻¹ de BAP
(T15) 2 mg L ⁻¹ de ANA + 2 mg L ⁻¹ de BAP	(T33) 5 mg L ⁻¹ de ANA + 2 mg L ⁻¹ de BAP
(T16) 2 mg L ⁻¹ de ANA + 3 mg L ⁻¹ de BAP	(T34) 5 mg L ⁻¹ de ANA + 3 mg L ⁻¹ de BAP
(T17) 2 mg L ⁻¹ de ANA + 4 mg L ⁻¹ de BAP	(T35) 5 mg L ⁻¹ de ANA + 4 mg L ⁻¹ de BAP
(T18) 2 mg L ⁻¹ de ANA + 5 mg L ⁻¹ de BAP	(T36) 5 mg L ⁻¹ de ANA + 5 mg L ⁻¹ de BAP

A avaliação foi realizada 45 dias após a inoculação, utilizando como parâmetro o peso da biomassa fresca de calos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição

composta por um explante por tubo de ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de 2,4-D e TDZ na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água

Maior formação de calos foi obtida com a adição isolada de 2,4-D ao meio e cultura, após 45 dias de cultivo. No tratamento controle e quando se adicionou TDZ ao meio de cultura, não houve formação de calos, com exceção do tratamento 6 (1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ) (Figura 10).

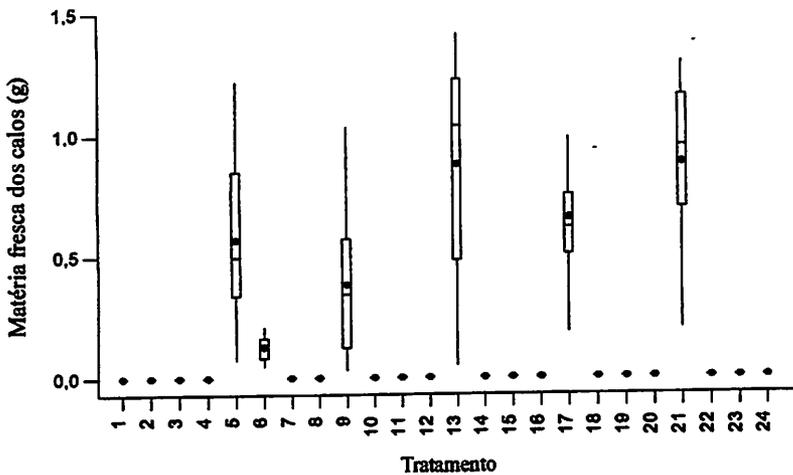


FIGURA 10. Matéria fresca de calos obtidos de segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM adicionado de 2,4-D e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Resultados divergentes foram encontrados em *Prunus persica* Bastsch cv. Elberta, em que onde Declerk e Korban (1995) constataram que o uso de

TDZ em combinação com o 2,4-D induziu calos, porém, o incremento foi muito inferior quando comparado à ausência de TDZ.

Na Tabela 7, verifica-se que as concentrações de 3 e 5 mg L⁻¹ de 2,4-D foram as que promoveram maior peso fresco de calos, seguidas pelas concentrações de 4 e 1 mg L⁻¹ de 2,4-D acrescidas ao meio de cultivo. Entretanto, o menor peso fresco de calos foi obtido com a concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de TDZ.

TABELA 7. Matéria fresca de calos obtidos de segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM adicionado de 2,4-D e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Tratamentos	Média do peso fresco dos calos (g)
(T21) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,8815 a
(T13) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,8756 a
(T17) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,6537 b
(T5) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,5706 b
(T9) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,3833 c
(T6) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L de TDZ	0,1274 d

Letras iguais na coluna não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Como as concentrações de 3 e 5 mg L⁻¹ de 2,4-D não diferiram entre si, dessa forma, para a indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água, recomenda-se a concentração de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, visando economia na utilização desse fitoregulador (Figura 11).



FIGURA 11. Aspecto visual dos calos formados em segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM suplementado com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o 2,4-D tende a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações. Este fitorregulador apresenta efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas requisitadas para o crescimento, e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, a formação de calos (George, 1996).

No presente trabalho, os resultados obtidos diferiram daqueles apresentados por Deccetti (2000) em *Annona glabra*. Para esta espécie, foi necessária a interação entre os reguladores de crescimento TDZ e 2,4-D para a máxima produção de calos. Gomes (1999), em estudos realizados com moreira (*Maclura tinctoria*), relatou também necessidade da combinação entre auxinas e citocininas para uma expressiva formação de calos.

De acordo com Mesquita (1999), apenas 35% dos explantes foliares de lechieira (*Litchi chinensis*) inoculados na ausência de 2,4-D apresentaram formação de calos. Nogueira (2003) constatou que as maiores porcentagens de área coberta por calos em murici-pequeno foram obtidas em explantes foliares inoculados na presença de 2,4-D.

Na espécie *Inga vera* subsp. *affinis* a concentração mais eficiente de 2,4-D foi de 3 mg L⁻¹ para a obtenção da maior área coberta em discos foliares por calos (80%) (Soares, 2003). Quando não acrescentou 2,4-D ao meio de cultura, Fortes (1992) obteve menor porcentagem de formação de calos em folhas nas culturas de macieira (*Malus* spp), sendo a concentração de 2 mg L⁻¹ mais eficiente, dependendo da cultivar.

Concentrações entre 0,5 a 4 mg L⁻¹ de 2,4-D não foram eficientes para formação de calos em folhas de amoreira (*Morus indica*) (Sahoo et al.,1997). Em tecidos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* ,) verificou-se a formação de calos e raízes quando se acrescentou 2,4-D ao meio de cultura (Paiva-Neto, 1996).

Conceição (2000), trabalhando com explantes foliares em *Derris urucu* obteve o estímulo máximo de produção de peso fresco dos calos na concentração de 1,6 mg L⁻¹ de 2,4-D, resultados estes divergentes dos obtidos para sangra d'água.

Em meio WPM, não foi constatada a presença de calos em explantes foliares de *Caryocar brasiliense* na ausência de fitorregulador (Landa, 1999). Santos (2001) também fez a mesma constatação em explantes foliares de *Salix humboldtiana*.

Possivelmente o fornecimento exógeno apenas da auxina 2,4-D foi suficiente para que ocorresse o balanço com o teor endógeno de citocinina do explante. Infere-se, portanto que a citocinina endógena presente no segmento foliar juntamente com a auxina presente no meio de cultura, promoveu maior matéria fresca de calos.

5.2 Efeito de 2,4-D e BAP na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água

Os resultados desses experimentos indicam que apenas as concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultivo apresentaram alta variabilidade de peso, enquanto que as demais foram similares (Figura 12).

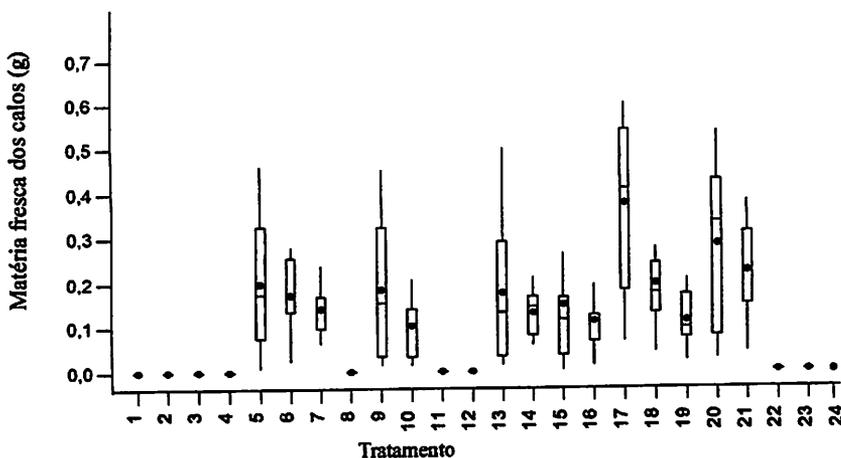


FIGURA 12. Matéria fresca de calos formados em segmentos foliares de sangra d'água inoculados com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Nos tratamentos 8 (1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP), 11 (2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L⁻¹ de BAP), 12 (2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP), 22 (5 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ de BAP), 23 (5 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L⁻¹ de BAP) e 24 (5 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP) não houve formação de calos. No tratamento controle (1) e nos que continham somente BAP (2, 3 e 4), também não houve formação de calos.

A combinação entre 2,4-D e BAP promoveu a formação de calos. No entanto, à medida que se aumentou a concentração de BAP, houve redução no

peso fresco dos calos. Resultados semelhantes foram constatados por Paiva-Neto (1996), nos quais a interação destes reguladores de crescimento resultou numa redução na porcentagem de explantes com calos em moreira (*Chlorophora tinctoria*). Resultados divergentes foram encontrados em explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), por Azevedo (2003), que concluiu que a máxima produção de calos foi obtida utilizando-se 2 mg L^{-1} de 2,4 D + 1 mg L^{-1} de BAP.

Não foi observada calogênese em segmentos foliares de sangra d'água nos tratamentos com BAP em condições isoladas. Estes resultados corroboram com os encontrados por Vietez e San-José (1996) em explantes foliares de *Fagus sylvatica*, nos quais, na presença de BAP, não houve indução de calos. Resultados opostos foram encontrados em explantes foliares de *Coffea arabica*, nos quais Cordeiro (1999) obteve maior formação de calos com a adição de BAP ao meio de cultura.

Na Tabela 8 constam as médias dos tratamentos em que houve formação de calos em segmentos foliares de sangra d'água.

TABELA 8. Matéria fresca de calos obtidos de segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM adicionado de 2,4-D e BAP. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Tratamentos	Matéria fresca de calos (g)
(T17) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,3740 a
(T20) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L de BAP	0,2825 b
(T21) 5 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,2229 c
(T5) 1mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,1976 c
(T18) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L de BAP	0,1955 c
(T9) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,1834 c
(T13) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,1768 c
(T6) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L de BAP	0,1728 c
(T5) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L de BAP	0,1498 d
(T7) 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L de BAP	0,1416 d
(T14) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L de BAP	0,1311 d
(T16) 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L de BAP	0,1123 d
(T19) 4 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L de BAP	0,1116 d
(T10) 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L de BAP	0,1017 e

Letras iguais na coluna não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Verifica-se que a concentração de 4 mg L⁻¹ 2,4-D, foi a mais eficiente para a indução de calos com maior formação de matéria fresca (0,374 g). Resultados similares foram encontrados por Santos (2001), o qual recomenda essa concentração para a obtenção de maior formação de matéria fresca de calos em *Salix humboldtiana*.

Em pimenta longa (*Piper hispidinervum*), o 2,4-D, combinado com BAP, foi eficiente na formação de calos (Santiago, 2003).

Santos (2001) observou, em explantes foliares de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que a presença de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP apresentou maior produção de calos.

A concentração de 4 mg L^{-1} de 2,4-D (17) apresentou a maior formação de matéria fresca de calos ($0,3740 \text{ g}$), seguida por 4 mg L^{-1} de 2,4-D + 2 mg L^{-1} de BAP ($0,2825 \text{ g}$) (20). Os tratamentos 21, 15, 5, 18, 19, 13 e 6, seguidos de 15, 7, 14, 16 e 19 apresentaram formação de calos, porém, sua matéria foi menor em relação ao tratamentos 17 e 20. A concentração de 2 mg L^{-1} de 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi a que apresentou a menor formação de matéria fresca de calos.

De maneira geral, os menores pesos frescos de calos foram obtidos quando se utilizou 2,4-D e BAP, com exceção dos tratamentos 20 e 18 (4 mg L^{-1} de 2,4-D + 2 mg L^{-1} de BAP, 4 mg L^{-1} de 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, respectivamente).

Pierik (1987) afirma que, na cultura de calos, um suprimento exógeno de reguladores de crescimento é freqüentemente necessário na indução de calos em qualquer explante. Esse requerimento exógeno do regulador (tipo, concentração e razão auxina/citocinina) depende do genótipo e conteúdo endógeno de hormônios.

5.3 Efeito de ANA e BAP na indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água

A interação da auxina ANA e citocinina BAP nas concentrações testadas não foi eficiente para a obtenção de calos em explantes foliares de sangra d'água.

Na presença de 1, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹ de ANA e ausência de BAP, foi observada a emissão de raízes nos explantes, o que também ocorreu quando se inocularam os explantes na presença de 4 e 5 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Nos demais tratamentos não houve outro tipo de gênese, sendo observada apenas oxidação dos explantes.

Esta tendência à oxidação possivelmente está relacionada com a presença de compostos fenólicos nos tecidos foliares de sangra d'água e, ausência de 2,4-D no meio de cultura que, segundo Liu et al. (1994), reduz drasticamente a produção de compostos fenólicos na cultura. A oxidação do meio de cultura não foi observada nos demais experimentos contendo 2,4-D.

Santos (2001) verificou que sem a combinação de ANA e BAP, não há produção satisfatória de calos em explantes foliares de *Salix humboldtiana*. Este autor observou, ainda, que as concentrações individuais de ANA ou BAP são capazes de induzir a formação de calos, seguida de rizogênese.

Sansberro et al. (1999), ao estudarem a propagação *in vitro* de *Ilex paraguariensis*, verificaram que a interação entre os reguladores ANA e BAP promoveu formação de raízes.

Bertolucci (2000) estudou a indução de calos de *Tournefortia cf paniculata* em explantes foliares e constatou que o melhor tratamento na indução de calos foi a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

Cerqueira (1999) obteve maior formação de calos em segmentos foliares de erva-de-touro utilizando 2 mg L⁻¹ de ANA combinados com 2 mg L⁻¹ de BAP, obtendo 100% da área coberta por calos. Landa (1999) observou rizogênese ao combinar ANA e BAP em pequizeiro (*Caryocar brasiliense*). Mesquita (1999) sugere o uso de 4 a 6 mg L⁻¹ de ANA para calogênese em segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis*), porém, com formação de raízes.

6 CONCLUSÕES

Não foi observada formação de calos em explante foliar de sangra d'água na ausência de 2,4-D e na presença de isolada de TDZ.

A máxima produção de calos ocorreu quando se utilizou 2,4-D isoladamente nas concentrações de 5 e 3 mg L⁻¹.

A interação entre 2,4-D e BAP induziu a formação de calos.

O uso de BAP isoladamente e a combinação entre ANA e BAP não promoveram calogênese em segmentos foliares de sangra d'água.

A combinação entre ANA e BAP promoveu rizogênese nos explantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.).** 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BERTOLUCCI, S. K. V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* (Cham).** 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CERQUEIRA, E. S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal.** 1999. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CONCEIÇÃO, H. E. O.da; **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de retenóides em timbós (*Derris* sp).** 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplasto em *Coffea*.** 1999. 111 p. (Tese – Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- CORDEIRO, I. **A família Euphorbiaceae na Serra do Cipó, MG, Brasil.** IB/USP, São Paulo, (Dissertação de Mestrado), 1985. 261 p.
- DECCEITI, S. F .C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DECLERCK, V.; KORBAN, S. S. **Shoot regeneration from leaf tissues of *Phloy paniculata* L.** *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v. 147, n.3/4, p. 441-446, Dec. 1995.
- FORTES, G. R. L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos.** 1992. 163 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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.

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

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagations by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. (Grande-Bretane): Exegetics, 1984. 709 p.

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

LANDA, F. de S. L. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)** 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laures, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LIU, Z.; ULMASOV, T.; SHI, X.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. **Plant Cell**, Rockeville, v. 6, n. 5, p. 645-657, May 1994.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética**, 1994. 344p.

MESQUITA, A. C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos**. 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

PAIVA-NETO, V. B. **Comportamento *in vitro* de tecidos foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).** 1996. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Martins Nijoff, 1990. 329 p.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345 p.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 102 p. (Curso de Pós-graduação “Lato Sensu” Especialização a Distância: Plantas Medicinais: Manejo, Uso e Manipulação).

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

SAHOO, Y.; PATTNAIK, S. K.; CHAND, P. K. **Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants.** *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 69, n. 1/2, p. 85-98, Mar. 1997.

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Wiild).** 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, lavras, MG.

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

SANTIAGO, E. J. A. de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle).** 2003. 183 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANSBERRRO, P.; REY, H.; MROGINSKI, L.; COLLAVINO, M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *In vitro Cellular Developmental Biology Plant*, Largo, v. 35, n. 5, p. 401-402, Sept./Oct. 1999.

SARGOOL, P.D.; NGO, T.T. **Current topics in plant molecular biology – biotechnological applications of plants cultures.** Florida: CRC, 1994. 214 p.

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

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

CAPÍTULO 5

LIMA, Ednabel Caracas. **Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos formados em segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.).** 2004. 85-103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

1 RESUMO

O entendimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento e o desenvolvimento dos calos pode fornecer subsídios ao processo de estabelecimento *in vitro*, além de poder envolver a determinação de substâncias presentes nestas estruturas, como metabólitos secundários. Com o objetivo de determinar a curva de crescimento de calos e analisá-los bioquimicamente, por meio da determinação dos teores de proteínas, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, segmentos foliares foram inoculados em meio WPM, acrescido de 2,4-D e mantidos à luz por um período de 105 dias. A coleta do material foi feita a cada 7 dias para posterior análise. A curva de crescimento dos calos seguiu um padrão sigmóide, com cinco fases distintas. Os teores máximos de proteínas foram obtidos no dia da inoculação. Os teores máximos de açúcares solúveis totais ocorreram no dia da inoculação e aos 28 dias de cultivo. Os teores máximos de açúcares redutores foram observados entre 98 e 105 dias de cultivo.

* Orientador: Renato Paiva – UFLA

CHAPTER 5

LIMA, Ednabel Caracas. **Curve of growth and biochemical analysis of callus formed in leaf segments of *Croton urucurana* Baill.** 2004. 78-95 p. Dissertation (Master of Science in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

2 ABSTRACT

The understanding of the biochemical changes that occurs during growth and development of callus can supply subsidies to the process of *in vitro* establishment, as well as to determine the presence of secondary metabolites. The objective of the present work was to determine the curve of growth of callus and biochemically it analyze, through the determination of total proteins and total soluble and reducing sugars. Leaf explants were inoculated in WPM medium, supplemented with 2,4-D and maintained in the presence of light during 105 days. Samples were collected at 7 days intervals. The curve of growth of the callus followed a shape sigmoid, with five different phases. The maximum levels of proteins were obtained at the inoculation day. Higher levels of total soluble sugars were observed during inoculation and at 28 days of cultivation. Higher levels of reducing sugars were observed between the 98 and 105 day of cultivation.

* Adviser: Renato Paiva – UFLA

3 INTRODUÇÃO

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

Vários autores estabeleceram curvas de crescimento para espécies vegetais medicinais lenhosas, evidenciando que o padrão da curva é influenciado pela espécie vegetal (Bonilla, 2002).

De acordo com George (1993), o crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela curva de crescimento que, normalmente, exibe cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag se caracteriza como fase de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para a divisão, visando a sua expansão. Ocorre o início da mobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento de calos. A fase exponencial é biossintética. Observa-se o maior crescimento dos calos e o número de células aumenta, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. A fase linear caracteriza-se pela diminuição da divisão celular, com aumento de volume celular; e a fase de desaceleração é o momento em que os explantes devem ser transferidos para outro meio, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (Smith, 1992; Shimizu, 1977).

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Estas são constituídas de aminoácidos, unidos por um tipo específico de ligação covalente. Estas biomoléculas podem apresentar funções estruturais, de transporte, controle do crescimento, diferenciação ou função enzimática (Lehninger et al., 2000).

Os carboidratos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou substâncias que liberam esses compostos (Lehninger et al, 2000). Eles constituem um grupo de compostos que incluem açúcares simples e moléculas mais complexas constituídas por subunidades de açúcares mais simples, cuja função principal é o fornecimento de energia química aos processos do ciclo de vida da célula (Brum et al., 1994). Os carboidratos podem ser classificados como açúcares redutores, como a glicose e a frutose, enquanto que a sacarose é um açúcar não-redutor, com função de armazenamento e transporte. Os redutores apresentam grupos aldeído ou cetona livres em sua molécula, capazes de reagir com agentes redutores (Conn e Stumpf, 1980). A determinação dos níveis de carboidratos é de importância fundamental em calos considerados de alta capacidade de regeneração, indicando potencialidades industriais na produção de plantas clonadas (Santiago, 2003).

O entendimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento e o desenvolvimento dos calos pode fornecer subsídios ao processo de estabelecimento *in vitro*, além de poder envolver a determinação de substâncias presentes nestas estruturas, como metabólitos secundários. Dessa forma, este estudo pode propiciar a otimização das condições de seu cultivo, além do estudo dos metabólitos secundários.

O presente trabalho teve por objetivo determinar a curva de crescimento de calos em segmentos foliares de sangra d'água e analisá-los bioquimicamente, por meio da quantificação dos teores de proteínas, açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Curva de crescimento dos calos

Plantas matrizes com aproximadamente 6 meses de idade foram obtidas do viveiro de mudas da Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, Minas Gerais. As plantas foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Dessas plantas foram retiradas discos foliares de aproximadamente 1cm^2 para serem utilizados como explantes.

Após a desinfestação, os explantes foram lavados em água corrente por 12 h, com detergente. Posteriormente, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, em hipoclorito de sódio 2-2,5% (v/v) por 15 minutos e cinco lavagens em água destilada e autoclavada.

Discos foliares foram inoculados com a superfície abaxial voltada para o meio de cultura WPM (Wood Medium Plant) acrescidos de 3mg L^{-1} de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) e 30g L^{-1} de sacarose. O meio foi solidificado com 7g L^{-1} de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C . A incubação foi realizada na presença de luz e à temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para a determinação da curva de crescimento dos calos, foram feitas pesagens do material inoculado a partir do dia da inoculação (tempo 0) até 105 dias de cultivo em intervalos de 7 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo cada pesagem composta por duas repetições e cada repetição pela média de 10 tubos, cada tubo contendo apenas um explante.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo a equação utilizada por Lameira (1997):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{Pf - Pi}{Pf} \times 100,$$

em que:

Pf: peso final

Pi: peso inicial

4.2 Análises bioquímicas dos calos

Para a realização das análises bioquímicas, duas amostras de 1g de calos foram coletadas em intervalos de sete dias e armazenadas em freezer a -80°C. Estas foram submetidas à extração e quantificação dos teores de proteína, açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

O procedimento para a obtenção do extrato bruto dos calos foi baseado na metodologia descrita por Lemos (1996). As amostras de 1 g de calos foram homogeneizadas em graal, com 8 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,5. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000g, durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado do “pellet” e armazenado a -4° C para ser utilizado na quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores. O “pellet” foi ressuspensionado em 5,0 mL de tampão fosfato de potássio, pH 5,5 e, posteriormente, centrifugado a 10.000g, durante 30 minutos. Novamente foi ressuspensionado com 3 mL do tampão, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C para posterior quantificação de proteínas.

4.2.1 Análise de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), que se baseia no princípio da associação entre proteína e corante. Às alíquotas do extrato vegetal foram adicionados água destilada e reagente Comassie Blue, constituído de 0,01% de Comassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em agitador, para o procedimento da leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores foram expressos em miligramas de proteínas por grama de matéria fresca (mg de proteína g⁻¹ de MF), com base na curva padrão, obtida a partir de diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA).

4.2.2 Análise de açúcares solúveis totais

A metodologia utilizada para a quantificação de açúcares solúveis totais foi a descrita por Yemm e Willis (1954). Às alíquotas do extrato vegetal foram adicionados água destilada e o reagente antrona. Após a agitação, os tubos foram aquecidos a 100°C, por cinco minutos. As amostras foram levadas para leitura no espectrofotômetro a 620 nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão de glicose. Os valores foram expressos em miligramas de açúcares solúveis totais por grama de matéria fresca (mg de AST g⁻¹ MF).

4.2.3 Análise de açúcares redutores

A determinação dos teores de açúcares redutores foi feita por meio da metodologia descrita por Miller (1959), que utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Às alíquotas do extrato vegetal foram adicionados água destilada e o reagente DNS. A homogeneização dessa mistura foi feita em agitador e levada ao banho-maria a 100°C, por cinco minutos. Depois de resfriadas à temperatura ambiente, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro 540 nm. A

quantificação dos açúcares foi baseada na curva padrão da glicose. Os valores foram expressos em miligramas de glicose (mg glicose g^{-1} de MF).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento dos calos

A curva padrão de crescimento dos calos formados a partir de segmentos foliares de sangra d'água segue uma curva sigmoidal padrão com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (Figura 13).

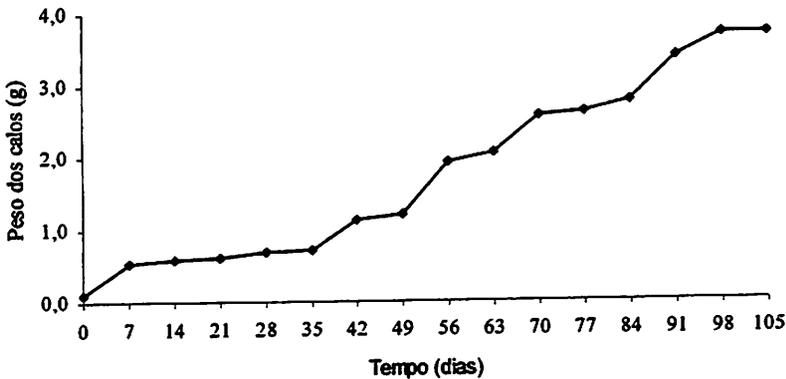


FIGURA 13. Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de sangra d'água, inoculados em meio WPM acrescido com 3 mg L^{-1} de 2,4-D, por um período de 105 dias. UFLA, Lavras, MG, 2003.

A fase lag, na qual as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia, ocorreu até o 35º dias após a inoculação. Santos observou que, em explantes foliares de cafeeiro, esta fase ocorreu até 28 dias após a inoculação, enquanto Mezzetti et al. (1991) verificaram acúmulo de matéria fresca e seca até o 30º dia após a inoculação de explantes foliares de *Actinidia deliciosa*.

A fase exponencial ocorreu entre o 35º até 70º dia, período em que ocorre a máxima divisão celular. De acordo com Shimizu et al. (1977), Scragg e

Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia e a fase exponencial como fase biossintética.

A fase linear, período em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área foliar, foi observada entre o 70° e 84° dia de cultivo.

Entre o 84° a 91° dia de inoculação, foi observada a fase de desaceleração. Nesse período, as culturas devem ser transferidas para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (Smith, 1992).

A partir do 98° dia, a cultura entrou na fase estacionária. Mesquita et al. (2002) observaram a ocorrência desta fase a partir dos 70° dia após a inoculação, para calos obtidos de explantes foliares de *Licthi chinensis*.

A curva de sangra d'água pode ser comparada às curvas de crescimento de outras espécies lenhosas: *Byrsonima intermedia* (Nogueira, 2003), *C. canephora* (Santos, 2001), *L. chinensis* (Mesquita, 1999), *B. excelsa* (Serra et al., 2000), *C. brasiliense* (Landa et al., 2000) e *I. vera* subsp. *affinis* (Soares, 2003) (Figura 14).

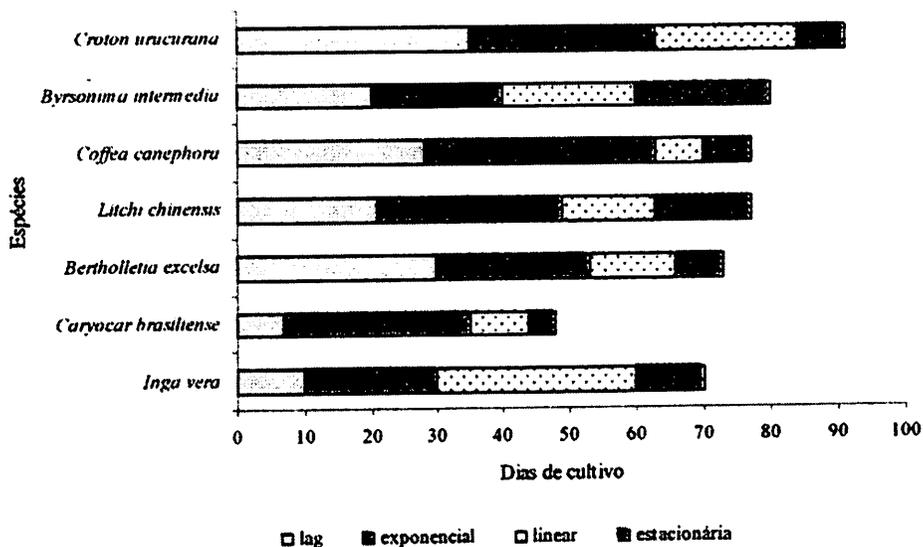


FIGURA 14. Duração das fases das curvas de crescimento de calos em espécies lenhosas. UFLA, Lavras, MG, 2003.
Fonte: Nogueira (2003), modificado pela autora.

De acordo com os resultados da curva de crescimento, a repicagem dos calos, formados a partir de explantes foliares de plantas de sangra d'água, deve ser efetuada no início do período de desaceleração, ou seja, 70 dias após a inoculação. O protocolo descrito para cultura de calos de sangra d'água poderá ajudar em estudos associados à produção *in vitro* de metabólitos secundários e também na regeneração de plântulas a partir de calos.

5.2 Análises bioquímicas dos calos

Por meio da Figura 13, observa-se que os teores máximos de proteínas foram observados no início do período de cultivo, seguidos de uma redução a partir do 7º dia de inoculação. Este decréscimo sugere que os calos possivelmente utilizaram a reserva de proteínas dos explantes no dia da

inoculação, originada da planta matriz. A partir do 14º dia de inoculação, observou-se um aumento nos teores de proteína, permanecendo até o 42º dia de cultivo e posterior queda. Resultados divergentes foram verificados em explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), nos quais os teores de proteínas apresentaram redução no período de 84º dia de inoculação.

Entre o 49º a 63º dia de cultivo, houve pequeno aumento nos teores de proteínas, com posterior queda. Este aumento coincide com a fase exponencial de crescimento, indicando que houve consumo dessas proteínas, uma vez que nesta fase, ocorrem as maiores taxas de divisão celular. No período entre o 91º e o 98º dias de cultivo, estes teores sofreram pequeno aumento em sua síntese e, a partir do 98º, ocorreu nova queda destas biomoléculas (Figura 15).

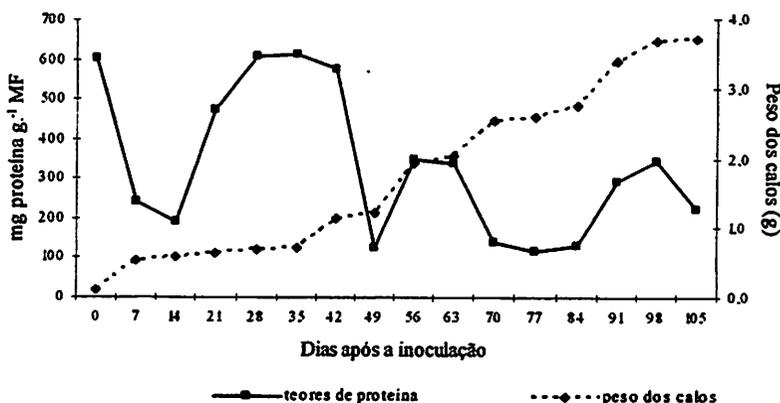


FIGURA 15. Teores de proteínas dos calos formados a partir de segmentos foliares inoculados em meio WPM, acrescidos com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante o cultivo de 105 dias. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Mesquita et al. (2002), estudando calos de lechieira (*Licthi chinensis*) oriundos de explantes foliares, observaram teor máximo de proteínas no 42º dia após a inoculação com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e, no 70º dia de cultivo, para explantes inoculados com 6 mg L⁻¹ de 2,4-D. Paiva-Neto (1996) obteve aumento nos

teores de proteínas, em calos formados de explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*), até o 20º dia após a inoculação.

Os teores de proteínas apresentaram acúmulo, principalmente nas fases lag e exponencial.

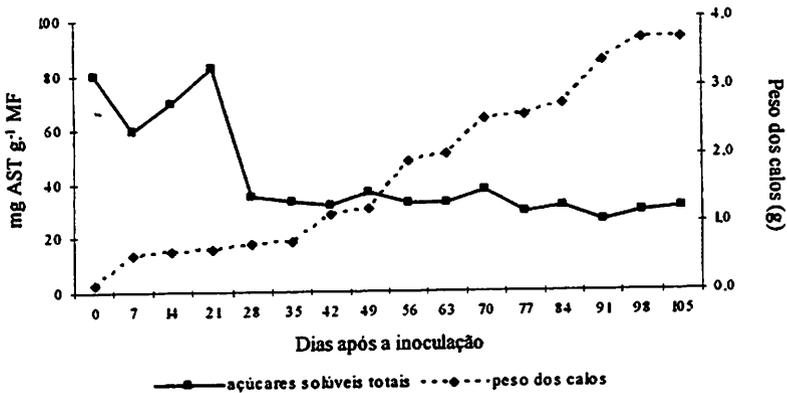


FIGURA 16. Teores de açúcares solúveis totais (AST) dos explantes formados a partir de segmentos foliares inoculados em meio WPM, acrescidos com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 105 dias. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Os teores de açúcares solúveis totais (AST) apresentam maiores níveis no dia da inoculação e no 21º de cultivo. Durante este período, houve redução e nova síntese nestes teores. A partir do 21º dia de cultivo, ocorreu redução nestes teores, mantendo-se relativamente estáveis nos dias subseqüentes. A redução na fase estacionária indica que este incremento está relacionado com a energia utilizada, assim como o esgotamento no meio de cultura (Figura 16).

Soares (2003) observou, em explantes foliares de ingá (*Inga vera* subsp. *affinis*), que os teores de AST permaneceram relativamente constantes, ocorrendo um leve acréscimo no 80º dia após a inoculação. Para sangra d'água, o máximo de AST obtido foi observado no 21º dia de cultivo. Serra et al. (2000) obtiveram resultados diferentes com calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira-do-Brasil. Os teores de AST apresentaram constante

redução durante todo o período de avaliação. Azevedo (2003) observou acúmulo máximo de AST no 84º dia após a inoculação em explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e o mínimo no dia da inoculação. Já Nogueira (2003) observou teores máximos de AST aos 70 dias de cultivo, coincidindo com o período indicado para repicagem dos calos.

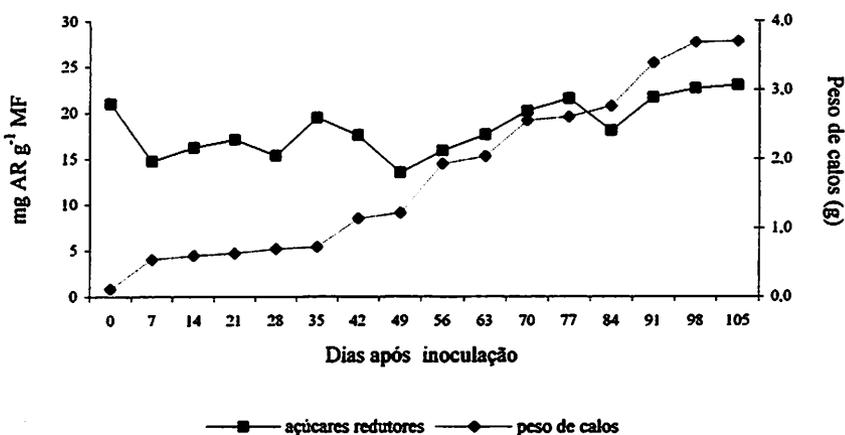
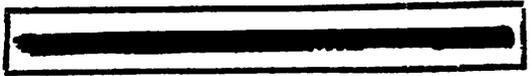


FIGURA 17. Teores de açúcares redutores dos explantes formados a partir de segmentos foliares inoculados em meio WPM, acrescidos com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 105 dias. UFLA, Lavras, MG, 2002.

No dia da inoculação, aos 35º e 77º dias de cultivo, foram observados os maiores níveis de açúcares redutores (AR) (Figura 17). Relacionando-se os teores de AR com a curva de crescimento, percebe-se que esses teores se mantiveram crescentes na fase exponencial.

Para os teores de açúcares redutores houve grande variação em relação ao período de cultivo, sugerindo que sua utilização e síntese ocorriam simultaneamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Soares (2003) com explantes foliares de ingazeiro (*Inga vera* subsp. *affinis*). Este autor verificou grande variação nos teores de AR ao longo de 110 dias de cultivo. Resultados contrários foram verificados por Nogueira (2003) constatou



decrécimo constante dos teores de AR ao longo de todo o período de cultivo de explantes foliares de murici-pequeno (*Bysrsonima intermedia*).

6 CONCLUSÕES

A curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de *Croton urucurana* apresenta padrão sigmóide, com cinco fases distintas.

A repicagem dos calos para um novo meio de cultura deve ser realizada entre 84° e o 91° dias de cultivo.

Teores máximos de proteínas foram observados no dia da inoculação e no 28° dia de cultivo.

Teores máximos de açúcares solúveis totais foram observados no dia inoculação e no 28° dia de cultivo.

Teores máximos de açúcares redutores foram observados no dia da inoculação, aos 77 e aos 105 dias de cultivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma opção de pesquisa seria, a partir da curva de crescimento e análises bioquímicas dos calos, estabelecer a possibilidade de sua utilização em suspensões celulares, visando à produção de metabólitos secundários, ou ainda, a identificação de calos embriogênicos na tentativa de obtenção da organogênese indireta. Argumenta-se que os calos que apresentam maiores níveis de açúcares podem responder mais favoravelmente à indução de um processo embriogênico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vitro*, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea virburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- 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. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BRUM, G.; MCKANE, L.; KARP, G. **Biology: exploring. Life**. 2. ed. New York: John Wiley, 1994, 1030 p.
- CONN, E. E.; STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. 525 p.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: parte I – the technology**. 2.ed. Edington: Exergetics, 1993. 574 p.
- LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LANDA, F. S. L. et al. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. Edição Especial.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 2. ed. São Paulo, 2000. 839 p.

LEMOS, G. B. **Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio.** 1996. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MESQUITA, A. C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos.** 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MESQUITA, A. C. et al. **Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de Lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.).** *Magistra*, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2002.

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*, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 153-160, Sept. 1991.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Biochemistry*, New York, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

PAIVA-NETO, V. B. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).** 1996. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

SANTIAGO, E. J. A. de. Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle). 2003. 183 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quasia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**, Berlin:Springer-Verlag, 1993. v. 21, p. 249-268.

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

SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M. W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplanatus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 125-129, 1977.

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

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesday, v. 176, n. 3, p. 367-372, 1948.

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

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

ANEXOS

- QUADRO 1** **Resumo da análise de variância para os tratamentos que apresentaram formação de calos em segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM acrescidos de 2,4-D e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 2003.**
- QUADRO 2** **Resumo da análise de variância para os tratamentos que apresentaram formação de calos em segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM acrescidos de 2,4-D e BAP. UFLA, Lavras, MG, 2003.**
- QUADRO 3** **Resumo da análise de variância para número de raízes e comprimento em brotações de sangra d'água inoculados em meio acrescidos de ANA. UFLA, MG, 2003.**

QUADRO 1. Resumo da análise de variância para os tratamentos que apresentaram formação de calos em segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM acrescidos de 2,4-D e TDZ. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fonte de variação	GL	QM
Trat.	5	1,2845*
Erro	95	0,0968
CV(%)		51,3

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

QUADRO 2. Resumo da análise de variância para os tratamentos que apresentaram formação de calos em segmentos foliares de sangra d'água inoculados em meio WPM acrescidos de 2,4-D e BAP. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fonte de variação	GL	QM
Trat.	13	0,962*
Erro	202	0,172
CV (%)		71,75

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

QUADRO 3. Resumo da análise de variância para número e comprimento de raízes em brotações de sangra d'água inoculados em meio WPM acrescidos de ANA. UFLA, MG, 2003.

Fonte de variação	GL	QM	
		Nº de raiz	Comprimento de raiz
Trat.	13	13,66*	6,13*
Erro	16	0,800	2,58
CV (%)		42,59	28,90