

**GERMINAÇÃO, INDUÇÃO DE CALOS, MICROPROPAGAÇÃO E
ANATOMIA FOLIAR DA CANDEIA (*Eremanthus erythropappus*
(DC.) Mac Leish)**

LOUISE FERREIRA ROSAL

2004

LOUISE FERREIRA ROSAL

**GERMINAÇÃO, INDUÇÃO DE CALOS, MICROPROPAGAÇÃO E
ANATOMIA FOLIAR DA CANDEIA (*EREMANTHUS*
ERYTHROPAPPUS (DC.) MAC LEISH)**

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

Orientador

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

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

Rosal, Louise Ferreira

Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da
candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish) / Louise Ferreira
Rosal. -- Lavras : UFLA, 2004.

106 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Candeia. 2. Germinação. 3. Calos. 4. Micropropagação. 5. Anatomia
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973355

-633.88355

LOUISE FERREIRA ROSAL

**GERMINAÇÃO, INDUÇÃO DE CALOS, MICROPROPAGAÇÃO E
ANATOMIA FOLIAR DA CANDEIA (*EREMANTHUS*
ERYTHROPAPPUS (DC.) MAC LEISH)**

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

APROVADA em 17 de dezembro de 2004

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA

Prof. Dr. Leonardo Ferreira Dutra EMBRAPA/Florestas

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Ao meu irmão Luis,
por todo amor e apoio incondicionais;
às minhas irmãzinhas, Fernanda e Victória,
por, simplesmente, existirem...

OFEREÇO

Aos meus pais, Gracinha e Lula, à "vozinha" (Nilza), tia Margarida
e tio David, pelo amor, incentivo, dedicação e apoio em todas as
etapas dessa importante fase da minha vida,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda energia enviada diariamente e pelas oportunidades concedidas.

Aos meus pais, pela confiança e por todo amor, renovados a cada dia e reforçados pela distância. Seria muito difícil sem o apoio de vocês.

Ao meu irmão Luis, pela amizade, amor, carinho e, é claro, pelas boas risadas nas conversas ao telefone.

Às caçulinhas Fernanda e Victória, por tornarem a minha vida muito mais feliz.

À minha avó Nilza, tia Margarida e tio David, pelo cuidado e pela valiosa ajuda e confiança depositada.

Ao meu orientador, professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelos indispensáveis ensinamentos, pelas longas horas dedicadas às avaliações e conversas, pelo excelente convívio e pela grande amizade. Muito obrigada.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pela disponibilidade em ajudar nos trabalhos de anatomia e pela participação na banca examinadora.

Ao pesquisador Leonardo Ferreira Dutra, pela amizade e valiosas sugestões que enriqueceram meu trabalho.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira, pelos três anos de orientação e ensinamentos durante a iniciação científica.

Ao Gustavo, pelo carinho, companheirismo e dedicação, meus mais sinceros agradecimentos.

À amiga Suzan Kelly V. Bertolluci, pelas contribuições dadas na elaboração deste trabalho.

Ao grande amigo e laboratorista Evaldo Arantes de Souza, por estar sempre disponível a ajudar e grande auxílio.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais: Flávia, Renata, Érica, Ricardo, Sandra, Luciana, Elen, Rose, Renake, Vivian, Júlio, em especial às minhas “filhas”, Helen e Tatiane, pelo delicioso convívio nestes dois anos.

Aos amigos do Departamento de Agricultura, em especial à Marli e Marynei, pelo carinho e companheirismo.

A turma paraense que mora no meu coração: Mara, Mel, Beto, Daril, Lino, Alessandra, Deusi, Juninho, Marquinho e Ronaldo, pela amizade fiel e verdadeira e pelos inesquecíveis momentos.

Às minhas queridas amigas Ilma e Lúcia, pelas experiências compartilhadas. Adoro vocês.

Às companheiras de república Élide e Raírys, pela agradável convivência.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a finalização desta etapa fundamental da minha vida, embora não citados aqui, meus mais sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Louise Ferreira Rosal, filha de Maria das Graças Ferreira Rosal e Luis Rosal Elices Filho, nasceu em Belém, a porta de entrada da Amazônia, no dia 28 de abril de 1980. Coursou o ensino fundamental no Colégio Santa Rosa e médio no Colégio Ideal, concluindo o segundo grau em 1996. Em 1998, foi aprovada no vestibular para o curso de Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. De 1999 a 2002 foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental. Em outubro de 2002, graduou-se. Em março de 2003 iniciou o curso de mestrado em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em dezembro de 2004 com a presente dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 - Introdução geral.....	1
1 Introdução.....	1
2 Referencial teórico.....	3
3 Referências bibliográficas.....	19
CAPÍTULO 2 - Germinação <i>in vitro</i> de candeia em diferentes meios de cultura.....	25
1 Resumo	25
2 Abstract.....	26
3 Introdução.....	27
4 Material e métodos.....	29
5 Resultados e discussão.....	31
6 Conclusões.....	36
7 Referências bibliográficas.....	37
CAPÍTULO 3 - Indução de calos a partir de explantes foliares e <i>seedlings</i> de candeia sob diferentes balanços de fitorreguladores.....	39
1 Resumo.....	39
2 Abstract.....	40
3 Introdução.....	41
4 Material e métodos.....	43
5 Resultados e discussão.....	47
5.1 Efeito dos diferentes balanços hormonais nos explantes foliares e <i>seedlings</i> de candeia.....	47
5.2 Efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos	51
6 Conclusões.....	63

7 Referências bibliográficas.....	64
CAPÍTULO 4 - Indução de brotações em segmentos apicais e nodais de candeia sob diferentes condições de cultivo.....	68
1 Resumo.....	68
2 Abstract.....	69
3 Introdução.....	70
4 Material e métodos.....	73
5 Resultados e discussão.....	76
5.1 Indução de brotações em segmentos apicais de candeia.....	76
5.2 Indução de brotações em segmentos nodais de candeia.....	82
6 Conclusões.....	87
7 Referências bibliográficas.....	88
CAPÍTULO 5 - Anatomia foliar comparada de plantas de candeia provenientes do cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	91
1 Resumo.....	91
2 Abstract.....	92
3 Introdução.....	93
4 Material e métodos.....	95
5 Resultados e discussão.....	96
6 Conclusões.....	103
7 Referências bibliográficas.....	104

RESUMO

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

Entre as espécies arbóreas medicinais, destaca-se a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish), uma espécie de múltiplos usos. Atualmente seu principal produto de interesse é o óleo extraído de toda a planta e que contém alfa-bisabolol. Este princípio ativo é largamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmeceutica. O alfa-bisabolol purificado tem um valor no mercado de US\$ 60,00/kg. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolo para germinação de sementes, indução de calogênese e de brotações e comparações de estruturas anatômicas de folhas em ambiente *in vitro* e *in vivo*. O meio de cultura mais eficiente para germinação de sementes foi o WPM/4, com 93,75%. Houve diferenças entre os explantes utilizados para a variável porcentagem de cobertura dos explantes por calos, porém, em relação ao número de explantes formadores de calos, estes não diferiram estatisticamente entre si. O meio MS sem reguladores de crescimento não promoveu a indução de calos. O Picloram (isolado ou em combinação com as citocininas) foi mais eficiente que o 2,4-D no processo de calogênese. Nos segmentos apicais o BAP quebrou a dominância do ápice deste explante e induziu a formação de brotações axilares. A interação de BAP com ANA promoveu maior número de brotações, enquanto que o ANA isolado exibiu maior comprimento dos explantes. Em segmentos nodais, o maior comprimento das brotações foi verificado em meio suplementado apenas com ANA. As estruturas foliares de plantas provenientes do ambiente *in vivo* apresentam epiderme unisseriada e cutícula espessa. O mesofilo é constituído por duas camadas de parênquima paliçádico organizado e justaposto, e duas a três camadas de parênquima esponjoso. A nervura central apresenta três feixes vasculares colaterais. A folha é do tipo hipoestomática. Em plantas cultivadas *in vitro*, foi verificada uma camada de parênquima paliçádico e três a quatro camadas de parênquima esponjoso pouco diferenciado. As epidermes apresentaram-se menos espessas que as oriundas do cultivo *in vivo*. Na nervura central apenas um feixe vascular foi formado. A folha é do tipo anfiestomática.

* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador).

ABSTRACT

ROSAL, Louise Ferreira. **Germination, callus induction, micropropagation and foliar anatomy of candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish).** 2004. 106 p. Dissertation (Master Program in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Among medical arboreous species candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish) has many useful purposes. Nowadays its mainly product of interest is its oil extracted from the whole plant that and that contains alfa-bisabolol. This active principle is largely used in the pharmaceutical industry and cosmeceutica. The alfa-bisabolol purified has its market value of US\$ 60.00/kg. The purpose of this work was to stabelish a protocol for seeds germination, callusgenesis induction and shoots and anatomical structures of leaves in vivo and in vitro comparison. The most efficient culture medium for seeds germination was WPM/4, with 93.75%. There was no difference between the explants used for callus inductions. MS medium without growth regulators did not promote callus induction. Picloram (isolated or combined with citocinin) was more efficient than 2,4-D in the callusgenesis process. In apical segments, BAP broke the tip dormancy of this explant and induct axial shoots formation. BAP and NAA interaction promote a higher number of shoots while NAA itself showed higher explants length. In nodal segments, the highest shoots length was verified in a medium plus NAA only. The plant leaves structures from in vivo environment showed uniseriate epiderm and thick cuticle. The mesophyl is built by two layers of palisade parenchyma organized and overlayed, and two or three layers of spongeous parenchyma, central nervure shows three collateral vascular bundle. The leaf is from hipostomatic type. It was verified one layer of palisade parenchyma in plants growing in vitro and three to four layers of spongeous parenchyma a little differentiate. Epiderms showed to be less thick than ones from in vivo culture. In the central nervure only one vascular bundle was formed. The leaf is from anfistomatic type.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major professor).

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O acelerado processo de destruição dos recursos naturais, nos diversos biomas brasileiros, vem acontecendo por meio do desmatamento nas regiões Sul e Sudeste até as áreas Centro-Oeste e Norte, acarretando a redução ou mesmo a extinção de várias populações de espécies vegetais de importância medicinal (Cavalcanti, 1993).

As plantas medicinais e suas formas derivadas constituíram, durante séculos, a base da terapêutica. Com a evolução da química, a partir do século XIX, modificou-se a forma de utilização das plantas; do uso direto delas e de seus preparados, passou-se a utilizar as moléculas ativas nelas contidas, chegando-se a reproduzir artificialmente a substância ativa isolada. Em conseqüência, relegaram-se a segundo plano as plantas que originam estas substâncias (Neves, 1982).

A produção de herbáceas medicinais, com ciclo de vida curto, via de regra, não oferece maiores dificuldades. No entanto, a propagação de arbóreas cujas cascas ou raízes contenham substâncias bioativas, freqüentemente se constitui em um desafio com limitações devido à germinação irregular, desenvolvimento lento de propágulos e dificuldade de enraizamento. Usualmente esses compostos se acumulam em células fisiologicamente maduras ou tecidos especializados quando atingem sua fase estacionária de crescimento (França, 2003).

Dentre as espécies arbóreas medicinais, destaca-se a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish), pertencente à família Asteraceae e inserida no grupo ecológico das pioneiras, sendo precursora na invasão de campos. É uma espécie de múltiplos usos, cuja madeira é muito utilizada para

moirões de cerca, postes e esteios, por ser incorruptível, servindo ainda para barcos e navios. Atualmente, seu principal produto de interesse é o óleo extraído de toda a planta e que contém alfa-bisabolol. Este princípio ativo é largamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmecêutica devido às suas propriedades anflogísticas, antibacterianas, antimicóticas e dermatológicas. O alfa-bisabolol purificado tem um valor no mercado de US\$ 60,00/kg.

Diante da importância econômica e da grande heterogeneidade desta espécie, a utilização das técnicas de cultura de tecidos se faz importante como uma ferramenta altamente eficiente para a propagação de material de interesse, conservação deste, assim como a possibilidade de produção de metabólitos secundários por meio da cultura em suspensão celular.

Desse modo, o presente estudo objetivou o estabelecimento de um protocolo de germinação de sementes, indução de brotações e calogênese em *Eremanthus erythropappus* e estudar comparativamente as estruturas anatômicas foliares de plântulas desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados obtidos neste trabalho darão suporte para a continuidade dos estudos com base em técnicas de cultura de tecidos, dando ênfase à produção de metabólitos secundários *in vitro*, por meio de manipulação do meio de cultivo em suspensões celulares. Esta etapa permitirá o estudo de rotas metabólicas e dos precursores destas substâncias produzidas em quantidades tão pequenas nos vegetais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

A candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish) é uma espécie florestal de grandes potencialidades pertencente à família Asteraceae, que pode ser também chamada de pau-candeia ou pau-de-candeia (Corrêa, 1931). Essa espécie pertence ao grupo ecológico das pioneiras, sendo precursora na invasão de campos (Carvalho, 1994).

Segundo Pérez (2001), a candeia coloniza facilmente solos, dando preferência aos arenosos e adaptando-se também aos pedregosos. É muito comum encontrar grandes candeiais em locais em que seria difícil o desenvolvimento de outra espécie arbórea ou de uma cultura agrícola. Por revestir com rapidez os terrenos, é aconselhável para reflorestamento (Corrêa, 1931).

Trata-se de uma das poucas árvores de hábitat especial, pois, em estado nativo, é encontrada em altitudes em torno de 1.000 metros nas famosas “terras frias”, onde o solo se classifica como cambissolo e litossolo, com rochas afloradas, onde estão presentes arenito, xistos e outros minerais em decomposição (Pereira, 1998). No local de ocorrência natural, as chuvas são relativamente bem distribuídas e em quantidades que variam entre 1.200 e 1.600 mm por ano, com temperatura média anual baixa, porém, sem ocorrência de geadas (Cândido, 1991).

A ocorrência de candeia é verificada no nordeste da Argentina, norte e leste do Paraguai e no Brasil (Carvalho, 1994). Conforme Rizzini (1979), sua ocorrência no Brasil vai da Bahia a São Paulo, formando amplos agregados nos cerrados, campos e lugares devastados; é particularmente dispersa em Minas Gerais, onde é encontrada em Mariana, Ouro Preto, Juiz de Fora, Morro do Pilar, Carrancas, Caxambu e Airuoca (Pérez, 2001) (Figura 1). Carvalho (1994) cita

outras regiões de ocorrência, como Espírito Santo, sul de Goiás e Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e no Distrito Federal.

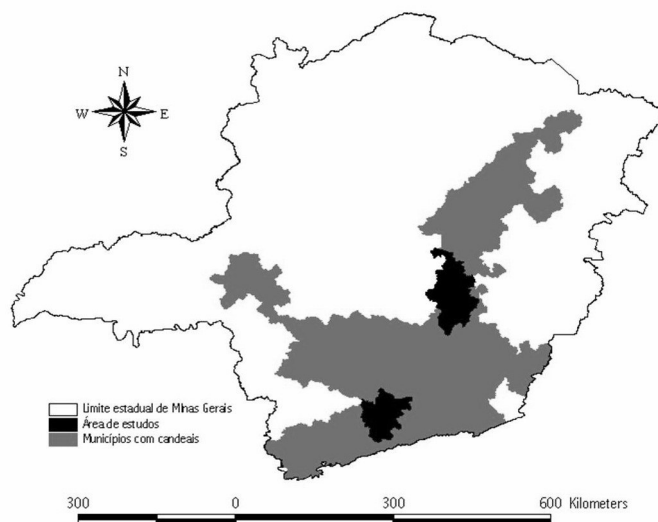


FIGURA 1. Área de estudo e ocorrência da candeia em Minas Gerais. UFLA, Lavras, MG, 2004.

A candeia desenvolve-se rapidamente em campos abertos, formando povoamentos mais ou menos puros. Dentro de florestas com alguma perturbação, apresenta um comportamento semelhante, já que é uma espécie heliófila, ou seja, beneficiada pela entrada de luz (Pérez, 2001).

Segundo Rizzini (1979), essa espécie é uma árvore pequena que alcança até 10 m de altura e 30 cm de diâmetro. Seu fuste é irregular e curto apresentando copa muito ampla.

De acordo com Araújo (1944), sua raiz é pivotante, formando um sistema radicular homogêneo e pouco desenvolvido e dessa forma, não explora uma camada de terra muito profunda. Suas folhas são simples, opostas e com pilosidade cinérea (Chaves & Ramalho, 1996). Tem característica marcante devido à dupla coloração, sendo verde na parte superior e na parte inferior

possui um tom branco, tomentoso e aveludado (Corrêa, 1931). As flores são hermafroditas, apresentando inflorescência de cor púrpura nas extremidades dos ramos (Araújo, 1944). A inflorescência, juntamente com as folhas duplamente coloridas, resulta em aspecto característico para a árvore, tornando possível identificá-la a distância (Rizzini, 1979). Seu fruto é do tipo aquênio, com superfície cilíndrica e com dez arestas, de cor pardo-escuro, com aproximadamente 2,0 mm de comprimento, contendo em seu fruto uma só semente (Figuras 2 e 3).



FIGURA 2. Aspecto visual de uma planta adulta de *Eremanthus erythropappus*. UFLA, Lavras, MG, 2004.

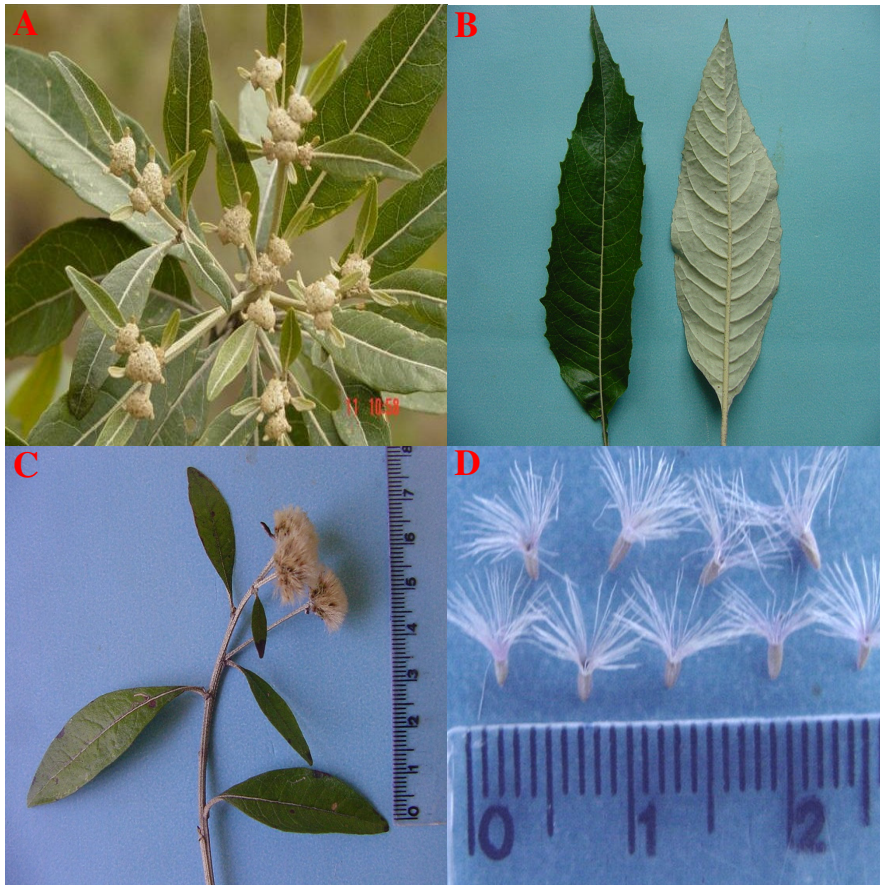


FIGURA 3. Detalhes da inflorescência (A), folhas (B), ramos com frutos na época de dispersão das sementes (C) e sementes (D) de *Eremanthus erythropappus*. UFLA, Lavras, MG, 2004.

A candeia se reproduz por sementes aladas que se desprendem de seus numerosos corimbos, não fugindo à regra geral das compostas, que sempre produzem sementes em protusão (Pedrosa, 1982). O formato de sua copa contribui para a dispersão das sementes que, por serem muito leves, são disseminadas pelo vento. Os indivíduos conseguem sobreviver em clareiras que, sem a competição de outros vegetais, formam agregados densos (Cândido,

1991). As sementes são fotoblásticas positivas e seu recrutamento via banco de sementes do solo ocorre, principalmente, nas camadas de solo de 0-10 cm, na presença de serrapilheira e nos tratamentos em plena luz, sendo este um fator imprescindível para a germinação e o estabelecimento de seus indivíduos. Por estas características, seu tempo de armazenamento é reduzido (CETEC, 1994).

Embora a época de floração varie em função do lugar e ano, esta começa quando a planta atinge os três anos de idade e ocorre entre os meses de agosto e setembro (Siqueira, 2002). A frutificação acontece dois a três anos após, sendo a colheita de outubro a novembro, quando os frutos começam a cair (Cândido, 1991).

Sua madeira é branco-acinzentada, com grã mais escura, dura, compacta, resistente à umidade e à putrefação, pesada e lisa. Os anéis de crescimento são perceptíveis, sendo o alburno e o cerne mal-distintos. A madeira da candeia é daquelas conhecidas no meio rural como “madeira branca”, mas sua resistência ao apodrecimento e ao ataque de cupins e bactérias do solo é algo extraordinário (Pereira, 1998). É muito utilizada para moirões de cerca, postes e esteios, por ser incorruptível, servindo ainda para barcos e navios (Rizzini, 1979). Embora a candeia produza moirões mais tarde que o eucalipto, eles duram quatro a cinco vezes mais (Cândido, 1991). Sua lenha é de alta qualidade, queimando mesmo verde e dando chama clara, porém a fumaça tem cheiro desagradável.

O odor da madeira é peculiar e intenso, lembrando a essência de valeriana e o ácido valeriânico. Este cheiro deve-se a uma substância oleosa, exsudada pelo lenho dos exemplares velhos a qual, em contato com o ar, se solidifica, formando algo semelhante ao cerume (Araújo, 1944).

Atualmente, um dos principais usos desta espécie é a extração de óleo, o qual tem alto valor no mercado (Pérez, 2001). Este óleo, cujo componente majoritário é o alfa-bisabolol (Figura 4), tem sido muito utilizado na fabricação

de medicamentos e produtos cosméticos. Já é introduzido em farmácias como veículo para certos medicamentos; aplicado à pele, impede a penetração de cercárias do *Schistosoma* (Rizzini, 1979). Além disso, exibe propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e anti-espasmódicas (Teixeira et al., 1996). Este princípio ativo vem sendo empregado, em substituição ao azuleno (substância ativa da *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), em produtos cosméticos como fixador. De acordo com Pérez (2001), o alfa-bisabolol purificado tem um valor no mercado de US\$ 60,00/kg.

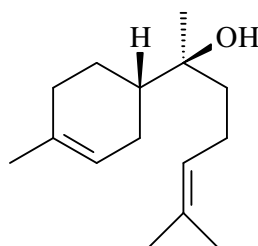


FIGURA 4. Estrutura química do alfa-bisabolol. UFLA, Lavras, MG, 2004.

2.2 Cultura de tecidos

A grande diversidade de produtos de origem vegetal faz desses uma fonte importante e ainda pouco explorada de recursos naturais. Estima-se que somente 5% a 15% das 250.000 a 500.000 espécies de plantas superiores têm sido objeto de estudos quanto à sua composição química e à atividade biológica dos seus produtos metabólicos (Spjut, 1985). Os produtos naturais e os seus derivados representam, ainda aproximadamente 50% das drogas de uso clínico, sendo 25% do total originários de plantas superiores (Echeverrigaray et al., 2001).

Neste contexto, a cultura de tecidos se destaca como uma importante ferramenta de estudo dessas espécies. De maneira simplificada, pode-se dizer que este ramo da biotecnologia é um conjunto de técnicas em que pequenos

fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indeterminados, em um meio nutritivo semidefinido ou definido e incubado em condições ambientais controladas. Para o caso de tecidos vegetais, esta definição original deve ser ampliada, de modo a incluir toda uma gama de explantes que vai desde plântulas e órgãos a células isoladas e protoplastos (Mroginski & Roca, 1993; Torres & Caldas, 1990). Por meio desta técnica, praticamente qualquer espécie vegetal pode ser regenerada *in vitro*, utilizando-se vários processos (Dixon, 1985; Tisserat, 1985).

As técnicas de cultura de tecidos têm incrementado as pesquisas, básica e aplicada, em plantas superiores, possibilitando sua utilização nas diversas áreas, como a farmacologia, a fisiologia vegetal, a genética, o melhoramento de plantas, a fitossanidade e a preservação de germoplasmas. Durante os últimos anos esta técnica tornou-se de grande interesse, uma vez que diversas espécies encontram-se em vias de extinção (Costa, 1995).

As plantas medicinais são de grande interesse na cultura de tecidos, sendo o aumento na produção e a diminuição no preço de alguns metabólitos secundários os principais objetivos das pesquisas (Bajaj et al., 1988). A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido incrementada nos últimos anos devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação, exploração irracional resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente, dificultando, assim, a coleta de plantas saudáveis (Kajiki, 1996). Esta técnica contribui também para a obtenção de um grande número de plantas mais uniformes, em tempo e espaço físico reduzidos, restringindo assim a heterogeneidade verificada em algumas espécies.

2.3 Meios nutritivos

Os meios nutritivos utilizados em cultura de tecidos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão do desenvolvimento (Caldas et al., 1998). Estes afirmam que as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas *in vitro*, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser reduzidos pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações, para atender às necessidades de cada espécie no cultivo *in vitro*.

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das principais características da cultura de tecidos vegetais. Todos esses fenômenos ocorrem mantendo-se os explantes em um meio de cultura que, por consistirem em uma parte essencial da técnica, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. Vale ressaltar que, para cada situação (tipo de explante, espécie, cultivar e objetivo), o meio adequado e eficiente é variável (Pasqual, 2001).

O crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de uma planta estão determinados por uma série de fatores complexos: constituição genética, presença de nutrientes (macro e micronutrientes e açúcar), fatores físicos que influenciam o crescimento (luz, temperatura, pH e concentrações de O₂ e CO₂) e, por fim, adição de algumas substâncias orgânicas (reguladores, vitaminas, etc.).

Em relação à água e aos nutrientes minerais, uma planta não pode viver na ausência destes, *in vitro* ou *in vivo*. Já a adição de açúcar ao meio de cultivo, em alguns casos, é muito importante, já que as plantas (ou seus fragmentos) não são completamente autotróficas quando se desenvolvem nestas condições (Pierik, 1990).

Quanto aos meios nutritivos, deve-se ter como base as exigências de uma planta inteira (Caldas et al., 1998). Os fitorreguladores são comumente adicionados ao meio para suprir possíveis carências endógenas, já que o explante encontra-se isolado das regiões produtoras de hormônios de sua planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1990).

Dentre os principais meios de cultura, destaca-se o proposto por Murashige & Skoog (1962), o qual apresenta, de modo geral, melhor crescimento de células e tecidos, em grande parte devido à alta concentração de amônia e nitrato. Ganhos significativos no crescimento de tecidos e células em diversas espécies de plantas são proporcionados pela alta concentração de sais encontrada no MS, fato que o destaca como mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos vegetais (Pasqual, 2001). No caso de plantas lenhosas, o meio básico WPM (Lloyd & McCown, 1980), do inglês “Wood Plant Medium”, é bastante utilizado. Uma das diferenças marcantes entre estes dois meios de cultura está na concentração de nitrogênio (N_2). O WPM apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS. Esta diferença é importante quando se procura um meio adequado para as diferentes espécies de plantas e tipos de cultura, pois o conteúdo total de N_2 no meio constitui fator determinante para o crescimento e morfogênese (George, 1996).

Segundo Pierik (1990), no cultivo *in vitro* de plantas superiores, os fitorreguladores, especialmente auxinas e citocininas, apresentam papel muito importante. Pode-se dizer que o cultivo *in vitro* é praticamente impossível sem reguladores. São adicionados ao meio e têm a função de suprir as possíveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998).

As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes

de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957, citados por Caldas et al., 1998). As auxinas sintéticas mais usadas são ácido naftaleno-acético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram). A maior atividade destas auxinas é evidenciada quando são adicionadas ao meio em concentrações entre 0,001 a 10 mg L⁻¹ (Beyl, 2000). O Picloram é um exemplo de auxina usada na indução e ou manutenção de calos ou suspensões celulares. Geralmente, a quantidade requerida no meio é menor que as demais. Em altas concentrações, o Picloram é utilizado comercialmente como herbicida seletivo, devido ao efeito fitotóxico que esta auxina sintética promove (George, 1996).

Os efeitos das citocininas são mais visíveis na cultura de tecidos quando são usadas juntamente com as auxinas, estimulando a divisão celular e controlando a morfogênese. Em relação às citocininas disponíveis no mercado, o 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais utilizada para promover a multiplicação de diversas espécies. Sua utilização nos meios de cultura chega a 68%, seguida pela cinetina (KIN) com, aproximadamente, 23% (Lima, 2004).

Outra classe de reguladores de crescimento, as giberelinas, geralmente são utilizadas para induzir alongamento das brotações durante a multiplicação ou antes do enraizamento. O principal representante desta classe é o ácido giberélico (GA₃). Quando o GA₃ é adicionado ao meio de cultura, ele frequentemente, produz efeitos de natureza similares aos das auxinas (Pasqual, 2001).

2.4 Germinação *in vitro*

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do embrião, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula (Labouriau, 1983). Germinação pode também ser definida como o início do desenvolvimento de um novo indivíduo

vegetal a partir de uma semente colocada sob condições favoráveis (Larousse, 1998), dando origem a uma plântula normal (Filho et al., 1987).

Para os tecnólogos de semente, o processo é reconhecido desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência (Labouriau, 1983). Já para Borges & Rena (1993), para que ocorra a retomada do crescimento das estruturas essenciais do embrião (germinação), a semente deve estar madura, ser bem constituída e ter conservado o poder germinativo e, ao mesmo tempo, deve receber, do meio exterior, água e oxigênio em quantidade suficiente para assegurar um intenso metabolismo.

Basicamente, a germinação é composta por três fases: embebição (quando acontece a reativação do metabolismo), indução de crescimento e protusão da radícula. A embebição é um conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides e sua dimensão varia com a permeabilidade do tegumento, composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente (Bewley & Black, 1994).

Do ponto de vista puramente fisiológico, a germinação compreende quatro fases: embebição de água, alongamento das células, divisão celular e diferenciação das células em tecidos. Sob o ângulo fisio-bioquímico consideram-se fases do processo germinativo: reidratação (embebição), aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática das reservas, mobilização e transporte das reservas, assimilação metabólica e crescimento e diferenciação dos tecidos (Popinigis, 1977).

Para que a germinação ocorra, a semente precisa estar com os mecanismos internos (físico, fisiológico e bioquímico) e com as condições externas (água, oxigênio, temperatura e luz) apropriadas. Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1989), o processo de germinação é controlado por fatores

intrínsecos e extrínsecos, os quais podem ser representados pela composição química da semente, seu balanço hormonal e fatores ambientais.

Temperatura, disponibilidade de água e luz são fatores ambientais que influenciam consideravelmente no processo de germinação e a quantidade desses fatores varia de acordo com as espécies e cultivares. Conforme Carvalho & Nakagawa (1988), quando a temperatura é elevada, ocorre maior absorção de água, afetando significativamente a germinação. Por outro lado, Evenari (1965) considera o elemento luz essencial ao processo, visto ser este um indicador de classificação de espécies (fotobláticas positivas ou negativas). Sendo assim, Gomes (1999) afirma que condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser obtidas em laboratórios por meio da multiplicação *in vitro*.

A germinação de sementes *in vitro* tem sido utilizada para a obtenção de plântulas assépticas como fonte de explantes, dentre outras aplicações, dispensando os procedimentos de assepsia (Danieli & Glória, 1998). Outra grande vantagem do uso de sementes é a obtenção de explantes jovens favorecendo a multiplicação e formação de calos para o cultivo em meios nutritivos contendo reguladores de crescimento.

2.5 Micropropagação

A cultura de tecidos e de células de plantas tem sido considerada uma grande realidade para a agricultura. A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, em função do tamanho dos explantes utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos. Essa técnica é adequada a programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma, contribuindo para prevenir perda de variabilidade genética (Grattapaglia & Machado, 1998).

Além de propiciar rápida multiplicação, a micropropagação pode ser realizada durante o ano todo, em grande quantidade, sem problemas de sazonalidade (Crocomo, 1989). Tal fato pode ser exemplificado pela micropropagação obtida a partir de um segmento nodal de *Rosmarinus officinalis* L. var. *genuina*, onde se obtêm 5.000 plantas no período de um ano (Chatuverdi et al., 1984).

Outro aspecto importante da micropropagação é a possibilidade de conservação de genótipos importantes de espécies florestais. França (2003) cita a regeneração *in vitro* por meio da cultura de brotos, como uma ferramenta especialmente vantajosa para a obtenção de clones que mantenham todas as características da planta-mãe a qual permite a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais. De acordo com Ajuha & Libby (1993), a conservação da biodiversidade natural dos ecossistemas se apresenta como a melhor maneira de permitir a continuidade da existência de muitos ecossistemas com o mínimo de impacto humano. A cultura de tecidos pode contribuir indiretamente para isso, incrementando a produtividade de plantações, objetivando a redução na demanda de exploração das reservas de florestas naturais.

A micropropagação tem sido aplicada para multiplicar e propagar numerosas plantas lenhosas nos últimos anos. Historicamente, a aplicação comercial desta tecnologia era restrita às espécies herbáceas. No entanto, nas últimas duas décadas, tem-se obtido considerável sucesso na obtenção de espécies florestais. Economicamente, estas espécies são extremamente importantes na obtenção de produtos e subprodutos da madeira, além dos projetos de reflorestamento, muito discutidos recentemente (Harry & Thorpe, 1999).

Os tipos de cultivo *in vitro* utilizados para a propagação de plantas lenhosas não diferem muito dos utilizados para outras espécies de plantas. A

principal diferença, na maioria dos casos, é que somente tecidos jovens têm sido utilizados ou dado resultados satisfatórios; é raro o sucesso com tecidos maduros (Santiago, 2003).

2.6 Cultura de calos

Calo é um grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000). O calo é uma resposta comum quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos. Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante. Entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em regiões meristemáticas, são mais adequados (Handro & Floh, 1990).

Diversas características inerentes aos explantes interferem na calogênese, como o seu tamanho, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento e a idade da planta mãe. A frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionadas com seu tamanho inicial (Murashige, 1974).

Para que a cultura de calos obtenha sucesso, quase sempre é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, para suprir possíveis deficiências dos teores de fito-hormônios nos explantes. Segundo Caldas et al. (1998), a composição e a concentração dos fitorreguladores no meio nutritivo são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e citocinina no meio de cultura promovem a formação de calos, mas este efeito varia em função do balanço hormonal endógeno de cada espécie (Pierik, 1990).

Para Yeoman (1970), o crescimento de calos em diferentes espécies pode ser definido: (1) independente de auxina e citocinina, (2) dependente de auxina, (3) dependente de citocinina ou (4) dependente de ambas, auxina e citocinina. Assim, certos tecidos apresentam uma dependência total da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

A concentração dos reguladores de crescimento pode variar para cada espécie de planta e pode ainda depender da fonte do explante ou da planta individual. As condições de cultura (temperatura, luz, etc.) são também fatores importantes na formação e desenvolvimento de calos. Uma vez estabelecida, a cultura deve ser usada para uma variedade de experimentos, como, por exemplo, produção de metabólitos secundários, isolamento de protoplastos, tipos de células, seleção celular, embriogênese somática e organogênese.

O desenvolvimento dos calos partindo de um fragmento de tecido pode ser dividido em três estágios: indução, divisão e diferenciação. Na fase de indução, durante a qual as células preparam-se para se dividir, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante. Nesta fase ocorre síntese de proteínas e DNA. Durante a fase de divisão celular, ocorre a desdiferenciação das células para características parenquimáticas. O último estágio, de diferenciação, resulta na formação de um calo com crescimento padrão (Aitchison et al., 1977).

2.7 Aspectos anatômicos

A compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento preciso de um vegetal (Castro, 2002).

As condições ambientais sob as quais ocorre o cultivo *in vitro*, no que se refere à composição do meio de cultura e do ar no interior dos recipientes, bem

como quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que a planta proveniente da micropropagação apresente algumas características peculiares. Ainda que haja variação entre espécies, algumas características em comum são encontradas em praticamente todas as plantas. A descrição destas características pode ser feita em relação às folhas, às raízes e ao mecanismo de nutrição da plântula (Pasqual, 2001).

Dessa forma, plantas lenhosas propagadas *in vitro* são frequentemente afetadas pela presença de fatores do 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, hiper-hidratação, suculência e transparência. As modificações manifestadas principalmente nas folhas afetam dois dos seus principais processos: a fotossíntese e as trocas gasosas. As desordens anatômicas são menos extensas no caule e nas raízes. Essas modificações impedem o estabelecimento *ex vitro* de plantas micropropagadas, ocasionando uma baixa taxa de sobrevivência depois de transferidas (Fidelis, 1998).

Sendo assim, o conhecimento dos vários fatores inerentes ao meio de cultura e das estruturas internas dos vegetais são de grande importância no entendimento das funções específicas desencadeadas em cada órgão da planta, visto que diferentes condições ambientais influenciam diretamente a sua estrutura anatômica.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. California: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 267-306.

AJUHA, M. R.; LIBBY, W. J. Micropropagation and clonal options in forestry. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of Woody Plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. v. 41, p. 425-442.

ARAÚJO, L. C. **Vanillosmopsis erythropappa (DC.) Sch. Bip: sua exploração florestal**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1944. 54 p.

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Vergas, 1988. v. 4, 540 p.

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

BEYL, C. A. Getting started with tissue culture – media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2. ed. 2000. p. 21-38.

BORGES, E. E. de L.; RENA, A. B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR, I. B. de; PINA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES/Comitê Técnico de Sementes Florestais, 1993. c. 3, p. 83-135.

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.

CÂNDIDO, J. F. **Cultura da candeia (Vanillosmopsis erythropappa Sch. Bip.)**. Viçosa: UFV, 1991. (Boletim de Extensão, n. 35).

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 429 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640 p.

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 (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAVALCANTI, G. O pólo de plantas medicinais do D. F. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 33., 1993, Brasília. **Ciclo de palestras...** Brasília: Sociedade Brasileira de Olericultura, 1993. 25 p. (Apostila datilografada).

CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Ecofisiologia da candeia**. Belo Horizonte: SAT/CETEC, 1994. 104 p. (Relatório Técnico)

CHATUVERDI, H. C.; MISRA, P.; SHARMA, M. In vitro multiplication of *Rosmarinus officinalis* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie Bd.**, Stuttgart, v. 113, p. 301-304, 1984.

CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. e *Vernonia discolor* (Spreng-Less)). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 431-433, jan./mar. 1996.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v. 1, p. 431-433.

COSTA, M. P. da. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. 1995. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CROCOMO, O. J. Biotechnological approaches for the control of plant morphogenesis and their applications in agriculture. **Genome**, Ottawa, v. 31, n. 2, p. 1034-1041, Apr. 1989.

DANIELI, R.; GLÓRIA, M. **Giberelinas**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1998. s. p. (Apostila da disciplina de crescimento e desenvolvimento do curso de pós-graduação em fisiologia vegetal da UFPEL).

DIXON, R. A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p. 1-20.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A, L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

EVENARI, M. Light and seed dormancy. In: RUHLAND, W. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Spriger-Verlaag, 1965. v. 15, t. 2, p. 844-847.

FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FILHO, M. J.; CÍCERO, M. S.; SILVA, W. R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 320 p.

FRANÇA, S. C. de. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS ; Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. p. 105-124.

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) – 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-CNPH, 1990. v. 1, p. 183-260.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 203-212.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. Clonal Propagation of Woody Species. In: HALL, R. D. (Ed.). **Methods in molecular biology: plant cell culture protocols**. 1999. v. 111, p. 149-157.

KAJIKI, F. O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. 1996. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174 p.

LAROUSSE, **Grande Enciclopédia Delta**. Nova Cultural, 1998. vol. 11, p. 2701.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* BAILL.)**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 210 p.

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

MURASHIGE, T. Plant regeneration through organogenesis. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

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.

NEVES, E. S. Plantas medicinais na saúde pública. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 6-A, p. 181-186, 1982.

- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.
- PEDROSA, J. B. **A candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* (DC.)).** In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1., 1982, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1982.
- PEREIRA, A. A. S. **Nutrição e adubação da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*).** Lavras: UFLA, 1998. 22 p. (Monografia – Graduação em Engenharia Florestal).
- PÉREZ, J. F. M. **Sistema de manejo para candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish).** 2001. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Martins Nijoff publishers, 1990. 326 p.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes.** Brasília, AGIPLAN, 1977. 289 p.
- RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira.** São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1979. 296 p.
- SANTIAGO, E. J. A. de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle).** 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SIQUEIRA, D. **Caracterização química da casca e madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*).** Lavras: UFLA, 2002. 21 p. (Monografia – Graduação em Engenharia Florestal).
- SPJUT, R. W. Limitations of a random screen: search for new anticancer drugs in higher plants. **Economic Botany**, Bronx, v. 39, n. 3, p. 266-288, 1985.
- TEIXEIRA, M. C. B.; NUNES, Y. R. F.; MAIA, K. M. P; RIBEIRO, R. N. **Influência da luz na germinação de sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schuht. Bip).** In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICA, 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBB. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1996. p. 35-41.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis on plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p. 79-105.

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

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; SÁ, M. F. G. de; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M; PINHO, E. R. C. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128 p.

YEOMAN, M. M. Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 29, p. 383-409, 1970.

CAPÍTULO 2

Germinação *in vitro* de candeia em diferentes meios de cultura

1 RESUMO

ROSAL, Louise Ferreira. Germinação *in vitro* de candeia em diferentes meios de cultura. In: _____. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 25-39. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Uma possibilidade para a obtenção de plantas matrizes, para serem utilizadas como fonte de explante em experimentos em cultura de tecidos, é a germinação *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a porcentagem de germinação de sementes de candeia *in vitro*, pela utilização dos meios MS e WPM completos ou diluídos. As sementes foram coletadas em Baependi e região da Serra do Cipó, MG. Para otimizar a qualidade das sementes, elas foram passadas em um soprador para a separação dos aquênios com e sem embrião. Posteriormente, foi realizada a assepsia e, em câmara de fluxo laminar, a inoculação das sementes nos meios MS, MS/2, MS/4, WPM, WPM/2 e WPM/4. Após 30 dias de incubação, foi possível observar que o meio mais eficiente para germinação de sementes de candeia foi o WPM/4 com 93,75%, seguido do WPM com 92%.

* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador).

2 ABSTRACT

ROSAL, Louise Ferreira. Germinação *in vitro* de candeia sob diferentes condições de cultivo. In: _____. **Germination, callus induction, micropropagation and foliar anatomy of candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 25-39. Dissertation (Master Program in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The possibility to have plant mother to be used as explant source in tissue culture experiments, is *in vitro* germination. The main purpose of this work was to evaluate candeia's seed germination percentage *in vitro* using MS and WPM culture media complete or diluted. The seeds were collected in Baependi and Serra do Cipó, MG. To get better seeds quality, they had to go through a blowing to be separated from aquenios with or without embryo. Later on an aseptic condition was made in a laminar air-flow cabinet and the seeds were inoculated in MS, MS/2, MS/4, WPM, WPM/2 and WPM/4. After 30 days, it was possible to observe that the most efficient medium for candeia's seed germination was WPM/4 with 93.75% followed by WPM with 92%.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major professor).

3 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre germinação das espécies nativas do cerrado ainda são incipientes se comparados aos de espécies de outros biomas brasileiros. O crescente interesse, por parte dos pesquisadores, nesse tipo de vegetação está revelando, aos poucos, seu potencial (Coelho, 1999). A candeia (*Eremanthus erythropappus*), pertencente à família Asteraceae, está inserida no grupo ecológico das espécies pioneiras e é considerada precursora na invasão de campos (Carvalho, 1994). Segundo Tonetti (2004), estudos mostram que sementes de candeia apresentam baixa porcentagem de germinação mas as causas disso não estão esclarecidas. Para *Eremanthus erythropappus*, a germinação tem início oito dias após a sementeira, atingindo de 6% (Chaves & Ramalho, 1996) a 47,75% de germinação em laboratório (CETEC, 1994). Chaves & Ramalho (1996) sugeriram que estes baixos valores de porcentagem de germinação podem ser consequência de um grande número de aquênios (frutos) sem embrião.

Para que o processo de germinação ocorra, é necessário que as sementes estejam viáveis, que as condições ambientais sejam favoráveis e que as sementes não estejam dormentes. A germinação *senso strictu* começa com a embebição de água pela semente e se completa com o início da elongação do eixo embrionário; este processo é caracterizado, normalmente, pela emissão da radícula (Bewley & Black, 1994). Sob o ponto de vista tecnológico, a germinação só se completa quando há o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade para dar origem a uma plântula normal, sob condições ambientais favoráveis (Nassif et al., 1998).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não possuem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 1996). De acordo com Preece et al. (1995), as vantagens do

cultivo *in vitro* de sementes são a alta porcentagem de germinação, a uniformidade das condições *in vitro* para a germinação e a uniformidade inicial das plântulas.

Para o cultivo *in vitro*, várias formulações de meios básicos têm sido utilizadas. Dentre estas formulações estão os meios MS e WPM, utilizados completos, modificados ou diluídos, dependendo do objetivo do estudo ou da espécie em questão. A diferença básica entre estes dois meios está na concentração de íons nitrato e amônia que, no WPM, é 25% das concentrações utilizadas no MS. Em espécies lenhosas, o meio WPM tem sido amplamente utilizado no cultivo *in vitro* devido à composição dos macronutrientes se apresentar mais diluída em relação ao MS (Pasqual, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a porcentagem de germinação das sementes de candeia *in vitro* por meio da utilização dos meios MS e WPM completos ou diluídos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Germinação *in vitro* de candeia em diferentes meios de cultivo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras – MG.

Procedência das sementes de candeia

Os frutos de candeia foram coletados no município de Baependi e região da Serra do Cipó, estado de Minas Gerais, no mês de outubro de 2003, época em que se inicia a dispersão dos aquênios desta espécie. A coleta foi realizada pela equipe do Projeto de Manejo Sustentado das Candeias, do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras (DEF/UFLA).

Beneficiamento

Após a colheita, os frutos foram submetidos a um processo de secagem que consistiu em espalhá-los em bandejas metálicas, cobertas com sombrite e deixadas ao sol por 15 dias. Após este período, os frutos foram peneirados, para a eliminação do excesso de material indesejável.

Para finalizar o processo de limpeza e deixar as sementes em condições de serem utilizadas, elas foram passadas em um soprador do tipo General marca DeLeo regulado na abertura 4 por 2 minutos, para a separação de sementes vazias e outros materiais das sementes cheias, através do fluxo de ar promovido pelo aparelho. Esta etapa do beneficiamento foi realizada no Laboratório de Sementes Florestais do DEF/UFLA.

Desinfestação das sementes

Antes da inoculação, as sementes foram lavadas por 10 minutos em água corrente e, logo após, foram imersas em solução de álcool etílico 70% (v/v), por

um minuto. Posteriormente, foram imersas sob agitação em solução de água sanitária 50% (v/v), durante 15 minutos e lavadas por três vezes com água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Após a lavagem das sementes em placa de petri, adicionaram-se 0,006 g de benomil (100 kg sementes/200 g benomil) acrescidos de uma gota de água destilada e autoclavada. As sementes foram colocadas sobre esta solução e friccionadas para melhor distribuição do produto. Seguidamente, foram inoculadas horizontalmente sobre os meios de cultivo.

Efeito dos diferentes meios de cultura sobre a porcentagem de germinação das sementes

Os meios de cultura utilizados foram MS (Murashige & Skoog, 1962), MS/2, MS/4, WPM (Lloyd & McCown, 1980), WPM/2 e WPM/4. Destes, os que não foram utilizados em sua composição completa tiveram apenas as concentrações de sais (macro e micronutrientes) diluídas. Os meios foram solidificados com ágar 0,6%, acrescidos de 3% de açúcar e o pH foi aferido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio, cada um contendo uma semente, foram colocados em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $25 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

As avaliações foram realizadas em intervalos de 5 dias, a partir da inoculação, durante 30 dias. Foram consideradas sementes germinadas as que realizaram o processo de protusão da radícula. O experimento foi constituído por 6 tratamentos (meios de cultura), com 5 repetições de 20 tubos cada uma. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de germinação de sementes de candeia *in vitro* possibilitou um estudo mais detalhado do comportamento destas sob diferentes condições nutricionais proporcionadas por cada meio de cultivo. A germinação *in vitro* objetiva a produção de explantes juvenis e assépticos, disponibilizando-os para trabalhos em cultura de tecidos. Este método alternativo de obtenção de material, destaca-se quando o estabelecimento de culturas via materiais oriundos do campo ou de casa de vegetação traz os problemas da oxidação e da contaminação endógena severa.

Conforme a análise de variância apresentada na Tabela 1, é possível verificar que houve diferenças altamente significativas entre os meios de cultura utilizados neste experimento, para porcentagem de germinação de sementes de candeia. Estes resultados são um indicativo de que a concentração de macro e micronutrientes influenciam o processo de embebição da semente e, conseqüentemente, emissão da radícula. Ao contrário do ocorrido com as sementes de candeia, Conceição (2000) não verificou diferenças entre os tratamentos em seus estudos com germinação de sementes de timbó (*Derris urucu*) inoculadas em meio básico de MS e suas variações de concentrações dos sais em 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16. Para o timbó, as variações dos sais não interferiram na porcentagem de germinação, que variou de 70 a 85%.

TABELA 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de candeia aos 30 dias de inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fonte de variação	GL	QM	% germinação
Tratamento	5	833,28	8,76**
Resíduo	23	95,16	
CV (%)	12,44		

** significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Aos 5 dias de incubação, durante a primeira avaliação, o meio nutritivo WPM/4 destacou-se dos demais, com 83,75% de germinação (Tabela 2), entretanto sem diferença significativa dos meios WPM completo e WPM/2. De acordo com o comportamento das sementes de candeia diante dos tratamentos, pode-se corroborar as observações de Grattapaglia & Machado (1990), os quais afirmam que o meio MS completo não tem se mostrado satisfatório, em alguns casos para espécies lenhosas, em que composições mais diluídas, como as do meio WPM, podem apresentar melhores resultados.

TABELA 2. Valores médios para porcentagem de germinação de sementes de candeia *in vitro* aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de incubação em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamento	Germinação %					
	5	10	15	20	25	30
	dias					
MS	44,00 bc	58,00 bc	71,00 bc	73,00 bc	78,00 ab	80,00 ab
MS/2	37,00 c	49,00 c	55,00 c	55,00 d	57,00 c	58,00 c
MS/4	43,00 bc	58,00 bc	66,00 c	69,00 cd	72,00 bc	72,00 bc
WPM	73,00 a	80,00 ab	86,00 ab	88,00 ab	92,00 a	92,00 a
WPM/2	63,00 ab	70,00 abc	73,00 bc	77,00 abc	78,00 ab	78,00 ab
WPM/4	83,75 a	86,25 a	92,50 a	92,50 a	93,75 a	93,75 a

A diluição dos meios nutritivos tem sido utilizada em vários experimentos de germinação *in vitro*, apresentando bons resultados. Neste contexto, respostas semelhantes às observadas em candeia foram verificadas em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), para o qual foram testados dois tipos de explantes (embriões e sementes) e diferentes meios de cultura (WPM, WPM/2, MS e MS/2, acrescidos ou não de 3% de sacarose). Para embriões e sementes, o melhor meio foi WPM/2, na ausência de sacarose com 100% e 60% de germinação, respectivamente. Foi possível observar que, para a espécie em questão, no geral, os meios WPM e MS com a concentração de sais reduzida à metade, acrescidos ou não de sacarose, ofereceram melhores resultados na porcentagem de germinação para ambos os explantes (Nogueira, 2003).

Já Souza (2003), em estudo com germinação de sementes de arnica (*Lychnophora pinaster*), ao testar os meios MS, MS/2 e MS/4, verificou a superioridade do MS/4 (68% de germinação) e a necessidade da utilização de meios de cultura menos concentrados para o estabelecimento de plântulas. Posteriormente, a autora partiu para a utilização dos meios MS/4, WPM e WPM/2 (menos concentrados), na presença ou ausência de açúcar e reportou que os tratamentos influenciaram significativamente a germinação de embriões de arnica. Ao final de 30 dias, o MS/4 sem açúcar apresentou 79% de germinação; o MS/4 com açúcar e o WPM/2 sem açúcar atingiram 70%, enquanto que o WPM, com ou sem açúcar, não foi eficaz, com menos de 50% de germinação.

De acordo com George (1996), os meios de cultura são compostos por soluções de sais inorgânicos que, além do efeito nutritivo, possuem propriedades osmóticas que influenciam o crescimento celular e a morfogênese. Neste contexto, pode-se afirmar que os minerais são o grupo de nutrientes mais importantes, após a fonte de carboidratos, para o desenvolvimento *in vitro*.

Da primeira avaliação (5 dias) à última (30 dias), o WPM/4 destacou-se com os melhores resultados, apresentando 93,75% de sementes germinadas ao final do experimento, não diferindo estatisticamente do meio WPM com 92%. Bertoni et al. (2002) confirmam a eficiência do meio WPM na germinação de sementes de *Zeyheria montana* Mart., uma espécie medicinal do cerrado. Os autores reportam que a utilização desse meio menos concentrado promoveu um bom desenvolvimento das plântulas e favoreceu o estabelecimento do protocolo de propagação *in vitro* desta espécie.

Em contrapartida, respostas inferiores para a variável analisada foram verificadas no meio MS/2 até a última avaliação. Aos 30 dias de incubação, o MS/2 apresentou 58% de germinação das sementes de candeia. Resultados contrários foram obtidos por Coelho (2001), em cujo trabalho sementes de sucupira branca (*Pterodon pubescens*) sem tegumento, escarificadas e seccionadas foram inoculadas em meio MS/2 líquido e MS/2 com ágar. A autora observou que a maior porcentagem de germinação (96,66%) foi obtida quando utilizaram-se sementes sem tegumento em MS/2 líquido. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), meios geleificados são mais freqüentes na fase de isolamento, embora, em alguns casos, resultados superiores possam ocorrer em meios líquidos.

Contudo, Gomes (1999) estudou germinação de sementes de Moreira (*Maclura tinctoria*) em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0,0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 g L⁻¹). Neste caso, o meio MS mostrou-se eficaz para germinação, porém, nas concentrações de sacarose entre 1,0% e 1,5%. Nestas condições, verificou-se 100% de germinação. Estes resultados indicam que o processo de germinação está diretamente relacionado ao balanço osmótico, proporcionado pela combinação entre sacarose (ausência ou presença) e concentrações dos sais.

Já Santana (2003) estudou o efeito de diferentes substratos na germinação *in vitro* de *Annona cauliflora*. Nesse experimento foram utilizados quatro tipos de substratos para germinação: WPM/2, MS/2, Plantmax e areia lavada. O autor reportou que o substrato Plantmax promoveu maior porcentagem de germinação (65%) bem superior à da areia lavada (22%). E os meios WPM e MS, com 50% da concentração dos sais, apresentaram germinação baixa ou nula.

6 CONCLUSÕES

Os meios de cultura mais eficientes para a germinação de sementes de can-deia *in vitro* são WPM/4 e WPM.

O meio MS com sua composição reduzida à metade apresentou a menor porcentagem de germinação, com 58%.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTONI, B. W.; PINA, E. S.; FRANÇA, S. C. de. Micropropagação de *Zeyheria montana* Mart. – uma planta medicinal do cerrado. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD-ROM.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-DNP, 1994. 640 p.
- CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Ecofisiologia da candeia**. Belo Horizonte: SAT/CETEC, 1994. 104 p. (Relatório Técnico)
- CHAVES, M. M. F.; RAMALHO, R. S. Estudos morfológicos em sementes, plântulas e mudas de duas espécies arbóreas pioneiras da família Asteraceae (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. e *Vernonia discolor* (Spreng-Less)). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 431-433, jan./mar. 1996.
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- COELHO, M. C. F. Germinação de sementes de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 38-48, jan./fev. 2001.
- CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo in vitro, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.)**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- 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) – 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, 1990. v. 1, p. 183-260.

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

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.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. Germinação de sementes – Fatores externos (ambientais) que influenciam a germinação. **Informativo Sementes IPEF**. abr, 1998.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

PREECE, J. E.; BATES, S. A.; VAN SAMBEEK, J. W. Germination of cut seeds and seedling growth of ash (*Fraxinus* spp.) in vitro. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 25, n. 8, p. 1368-1374, Aug. 1995.

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

SOUZA, A. V. de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. p. 1532-1538, dez. 2003. Edição Especial.

TONETTI, O. A. O. **Melhoria da qualidade física e estudo da germinação de sementes de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less e *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish)**. 2004. 81 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO 3

Indução de calos a partir de explantes foliares e *seedlings* de candeia sob diferentes balanços de fitorreguladores

1 RESUMO

ROSAL, Louise Ferreira. Indução de calos a partir de explantes foliares e *seedlings* de candeia sob diferentes balanços de fitorreguladores. In: _____. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 39-67. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

A cultura de calos tem sido utilizada para estudar o crescimento e desenvolvimento de plantas, para a exploração de estudos do metabolismo secundário e para a propagação *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo para calogênese em candeia a partir de explantes foliares e *seedlings*, submetidos a diferentes balanços hormonais. Ambos os explantes foram inoculados em meio MS contendo várias combinações de 2,4-D e PIC, isolados ou em interação com KIN e BAP. Foram avaliadas a porcentagem de cobertura dos explantes por calos e a produção de biomassa fresca e seca. Após a inoculação, todos os tratamentos foram mantidos no escuro sob condições controladas de temperatura. Os resultados indicaram que houveram diferenças entre os explantes utilizados para a variável porcentagem de cobertura dos explantes por calos, porém, em relação ao número de explantes formadores de calos, estes não diferiram estatisticamente entre si. O meio sem reguladores de crescimento não promoveu calogênese. O PIC apresentou melhores respostas para todas as variáveis estudadas, em comparação com o 2,4-D. Nas folhas, a maior porcentagem de cobertura dos explantes por calos foi obtida a partir de 1.0 mg L⁻¹ PIC + 0.5 mg L⁻¹ KIN e nos *seedlings* em 1.0 mg L⁻¹ PIC + 0.5 mg L⁻¹ BAP. A maior produção de biomassa foi verificada em 1.0 mg L⁻¹ PIC + 0.5 mg L⁻¹ BAP e 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ BAP, nas folhas e *seedlings*, respectivamente.

* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador).

2 ABSTRACT

ROSAL, Louise Ferreira. Indução de calos a partir de explantes foliares e seedlings de candeia sob diferentes balanços hormonais. In: _____. **Germination, callus induction, micropropagation and foliar anatomy of candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 39-67. Dissertation (Master Program in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Callus culture has been used to study plants growth and development, to explore the studying of secondary metabolism and for the in vitro propagation. The purpose of this work was to develop a protocol for callusgenesis in candeia from their foliar explants and seedlings, under different hormone concentration. Both explants were inoculated in MS medium with several 2,4-D and PIC combinations, isolated or in interaction with KIN and BAP. The explants dressing percentage were evaluated for callus and fresh and dry biomass yield. After inoculation, all treatments were kept in darkness under controlled temperature conditions. The results indicated that there was no difference between explants in the callus induction. The medium without growth regulators did not promote callusgenesis. PIC gave better answers to all variables studies when compared to 2,4-D. In the leaves, the higher explants dressing percentage for callus was obtained from 1.0 mg L⁻¹ PIC + 0.5 mg L⁻¹ KIN, in the seedlings was obtained from 1,0 mg L⁻¹ PIC + 0,5 mg L⁻¹ BAP. The bigger biomass yield was verified in 1.0 mg L⁻¹ PIC + 0.5 mg L⁻¹ BAP and 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ BAP, in the leaves and seedlings, respectively.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major professor).

3 INTRODUÇÃO

Teoricamente, quando um segmento de tecido vegetal devidamente desinfestado ou assepticamente cultivado é transferido para um meio de cultura apropriado e mantido sob condições adequadas, algumas células se dividem e após intensa proliferação dão origem a uma massa não diferenciada de células (Arasu & Paranjothy, 1975). Esta massa é chamada de calo e tem sido o explante mais empregado em cultura de tecidos de plantas, sendo capaz de crescer sem limite, se subcultivado em novos e apropriados meios de cultura. De modo geral, o calo tem sido utilizado para estudar o crescimento e o desenvolvimento de plantas, para a exploração de produtos do metabolismo secundário e para a propagação *in vitro* em si (Constabel, 1984).

O calo é um tecido produzido em resposta a uma injúria física ou química. Nem todas as células em um explante contribuem para a formação de calos, no entanto, o mais importante é que existem certos tipos de células de calos que são competentes para regenerar estruturas organizadas, enquanto outros tipos de células não parecem ser competentes para expressar a totipotencialidade. Isto significa que qualquer célula vegetal viva possui informação genética suficiente para produzir uma planta idêntica à planta mãe (Pinto & Lameira, 2001).

Segundo Rey et al. (1980), auxinas e citocininas são exigidas para o crescimento de calos. As primeiras propiciam um calo mais friável, enquanto as outras calos mais firmes. A concentração dos reguladores de crescimento influencia o desenvolvimento da cultura de calos *in vitro* e, geralmente, concentrações semelhantes de auxinas e citocininas no meio promovem a formação de calos. Tisserat (1985) verificou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina; entretanto, quando foi adicionada citocinina, a proliferação dos mesmos aumentou.

Um fator importante para na indução de calos é a seleção do explante. A escolha do material em um estado biológico adequado para o início dos calos é fundamental, sendo os tecidos jovens mais adequados que os maduros. De acordo com Pierik (1990), explantes advindos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de tecidos por possuírem alta capacidade de regeneração. Este autor também menciona que a desdiferenciação, ou seja, a reversão de células adultas a células juvenis, pode ocorrer, levando a um processo de intensa multiplicação celular. Este processo é mais lento do que quando são utilizadas células não diferenciadas e também mais dependente de reguladores de crescimento e de condições ambientais, principalmente luz e temperatura.

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 estimular ou inibir a formação de calos (George, 1996).

Este trabalho objetivou desenvolver um protocolo para calogênese em can-deia a partir de explantes foliares e *seedlings* submetidos a diferentes balanços hormonais, constituídos de duas auxinas (2,4-D e Picloram) e duas citocininas (Cinetina e BAP).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Efeito dos tratamentos nos explantes foliares e *seedlings*

Explantes foliares

Para o experimento de indução de calos, foram utilizados explantes foliares jovens, oriundos de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS, suplementado com 3% de açúcar, solidificado ágar a 0,6% e pH aferido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

As folhas foram cortadas, de modo que o seu tamanho final para inoculação fosse de aproximadamente $1,0\text{ cm}^2$ (Figura 1) e foram inoculadas com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo. Os tubos foram levados à sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em regime de ausência de luz durante todo experimento, conforme experimentos realizados anteriormente, que indicaram efeito positivo no escuro.

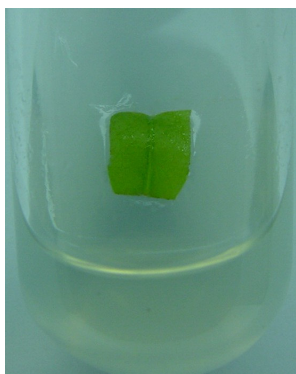


FIGURA 1. Aspecto visual do explante foliar inoculado, nos diferentes tratamentos, visando a calogênese. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Seedlings

Por meio da avaliação dos resultados para porcentagem de germinação de sementes realizada em experimentos anteriores, foi possível verificar que o meio de cultura WPM/4 proporcionou *seedlings* com maior rapidez. Diante destes resultados, foram inoculadas sementes de can-deia em meio WPM/4, suplementado com 3% de açúcar, solidificado ágar a 0,6% e pH aferido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos. A assepsia das sementes antes da inoculação foi conduzida conforme o item 1.3 (página 29).

Ao completar 15 dias de incubação, os *seedlings* apresentavam aproximadamente 1,0 cm de comprimento, tamanho que serviu de padrão para o explante visando à uniformidade do experimento. *Seedlings* foram retirados do meio de germinação e inoculados no de indução de calos (Figura 2). Os tubos de ensaio foram levados à sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em regime de ausência de luz, conforme experimentos realizados anteriormente, que indicaram efeito positivo no escuro.

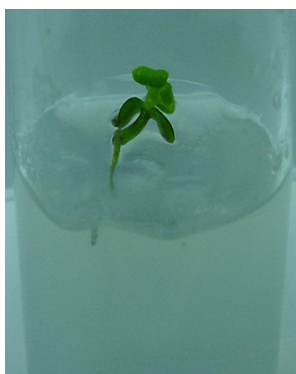


FIGURA 2. Aspecto visual do *seedling* inoculado, nos diferentes tratamentos, visando a calogênese. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos

Os balanços hormonais (Tabela 1) utilizados neste experimento foram os mesmos para os dois explantes. Foi utilizado o meio MS básico, acrescido de 3% de açúcar, solidificado com ágar a 0,6% e pH aferido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

TABELA 1. Combinação dos diferentes balanços hormonais testados na indução de calos em candeia. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamento	Balanços hormonais
T ₁	Controle (ausência de reguladores)
T ₂	1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D*
T ₃	2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D
T ₄	1,0 mg L ⁻¹ PIC**
T ₅	2,0 mg L ⁻¹ PIC
T ₆	1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ KIN
T ₇	1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ KIN
T ₈	1,0 mg L ⁻¹ PIC + 0,5 mg L ⁻¹ KIN
T ₉	1,0 mg L ⁻¹ PIC + 1,0 mg L ⁻¹ KIN
T ₁₀	1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ BAP
T ₁₁	1,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ BAP
T ₁₂	1,0 mg L ⁻¹ PIC + 0,5 mg L ⁻¹ BAP
T ₁₃	1,0 mg L ⁻¹ PIC + 1,0 mg L ⁻¹ BAP

*ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram)

Avaliações

Ao final de 45 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes formadores de calos, porcentagem de cobertura dos explantes por calos (%AE), biomassa fresca (BF) e seca (BS). Para mensurar os

valores da BF e BS, foi utilizada balança de precisão, com sensibilidade de 0,0001g, onde foram colocados os explantes originais cobertos ou não por calos; para %AE, atribuíram-se valores de 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, conforme o explante original se apresentava coberto por calos.

O experimento foi constituído por 13 tratamentos (balanços de fitorreguladores), e cada tratamento constituiu-se de 5 repetições e cada uma contendo 6 tubos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) composto por dois tipos de explantes e treze balanços hormonais. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito dos diferentes balanços hormonais nos explantes foliares e *seedlings* de candeia

Neste trabalho houve diferenças significativas entre os explantes utilizados para a indução de calos em candeia para porcentagem de cobertura (%AE), porém para o número de explantes formadores de calos (NºEF) não foram verificadas diferenças (Tabela 1). Os resultados mostraram superioridade dos *seedlings* em relação às folhas jovens. Apesar dos dois explantes utilizados terem sido constituídos por células jovens, com alto poder de diferenciação, os *seedlings* tinham apenas 15 dias de cultivo, enquanto que as folhas foram retiradas de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro*. Esta diferença de tempo de estabelecimento *in vitro* pode ter influenciado as respostas dos dois explantes no processo de calogênese.

TABELA 1. Valores médios para porcentagem de cobertura dos explantes por calos e para número de explantes formadores de calos aos 45 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Explante	%AE	NºEF
Folha	21,54 b*	2,03 a**
<i>Seedling</i>	28,33 a	2,12 a

*Dados transformados para asen $(x/100)^{1/2}$

** Dados transformados para $(x+1)^{1/2}$

A escolha dos explantes utilizados neste experimento partiu do pressuposto de que explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em regiões meristemáticas, são mais apropriados para a cultura de tecidos, por possuírem alta capacidade de regeneração.

Assim sendo, foram avaliados, em ambos explantes, a porcentagem média de cobertura por calos e o número de explantes formadores de calos em cada tratamento. A porcentagem média de cobertura por calos está representada na Tabela 02. Estes resultados são contrários aos de Grzelak & Janiszowska (2002), que trabalharam com duas fontes de explante – cotilédones (aos seis dias de cultivo) e foliares jovens (15 a 20 dias de cultivo) de *Calendula officinalis* para a obtenção de calos. Nesta espécie, os autores não verificaram diferenças significativas entre o cotilédone e o explante foliar para tal variável. Nugent et al. (2001), ao tentarem induzir calos em *Eucalyptus globulus*, a partir do hipocótilo e do cotilédone das sementes, também não observaram diferenças significativas entre eles.

TABELA 2. Valores médios para porcentagem de cobertura dos explantes por calos em explantes foliares e *seedlings* aos 45 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Porcentagem de cobertura por calos	Folha	Seedling
TESTEMUNHA	0,00 c*	0,00 c*
1,0 2,4-D	11,67 b	11,67 b
2,0 2,4-D	9,17 b	15,83 b
1,0 PIC	26,67 a	38,33 a
2,0 PIC	34,17 a	39,17 a
1,0 2,4-D + 0,5 KIN	15,83 b	32,50 a
1,0 2,4-D + 1,0 KIN	11,67 b	25,83 a
1,0 PIC + 0,5 KIN	35,00 a	47,50 a
1,0 PIC + 1,0 KIN	29,17 a	29,17 a
1,0 2,4-D + 0,5 BAP	15,83 b	23,33 a
1,0 2,4-D + 1,0 BAP	22,50 a	30,83 a
1,0 PIC + 0,5 BAP	40,00 a	38,33 a
1,0 PIC + 1,0 BAP	28,33 a	35,84 a

*Dados transformados para asen $(x/100)^{1/2}$

Diferenças também não foram observadas por Kumar et al. (2002), que estudaram calogênese a partir de cotilédones, hipocótilos (3 dias após germinação das sementes *in vitro*) e folhas jovens (2 semanas após a germinação das sementes) de *Gymnema sylvestre*. Embora estes autores não tenham obtido respostas diferentes entre os explantes, ao final de quatro semanas todos estavam cobertos por calos.

A diversificação dos explantes utilizados em trabalhos de indução de calos é importante no estudo da otimização da produção destes. Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, como por exemplo, genótipo, idade da planta, do órgão ou do tecido. Estes fatores, somados a outros, como meio nutritivo, reguladores de crescimento, luz, temperatura, entre outros, atuam acelerando, retardando ou até mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento de um calo. Vale ressaltar que um dos fatores mais importantes para se obter indução de calos é a escolha do explante (Bonga, 1977), uma vez que o potencial morfogenético dos calos geralmente varia com a origem dos explantes (Mehra & Mehra, 1974).

Quanto à avaliação do número de explantes formadores de calos, verificou-se que não houve diferenças significativas entre os *seedlings* e folhas jovens. Novamente, os *seedlings* apresentaram uma pequena superioridade. Os explantes foliares só apresentaram valores maiores nos tratamentos em que o PIC ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) estava em combinação com KIN ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e BAP ($0,5$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$). Nos demais, os *seedlings* obtiveram maior frequência de indução de calos (Tabela 3).

TABELA 3. Valores médios para número de explantes formadores de calos em explantes foliares e *seedlings* aos 45 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Número de explantes formadores de calos	Folha	Seedling
TESTEMUNHA	0,00 c*	0,00 c*
1,0 2,4-D	1,60 b	1,80 b
2,0 2,4-D	1,80 b	2,60 b
1,0 PIC	3,60 a	4,20 a
2,0 PIC	3,40 a	4,20 a
1,0 2,4-D + 0,5 KIN	2,80 b	4,20 a
1,0 2,4-D + 1,0 KIN	2,40 b	3,60 a
1,0 PIC + 0,5 KIN	4,00 a	4,80 a
1,0 PIC + 1,0 KIN	4,60 a	3,40 a
1,0 2,4-D + 0,5 BAP	2,60 b	3,00 b
1,0 2,4-D + 1,0 BAP	3,20 a	4,00 a
1,0 PIC + 0,5 BAP	5,00 a	3,80 a
1,0 PIC + 1,0 BAP	4,20 a	3,80 a

*Dados transformados para $(x+1)^{1/2}$

Os resultados indicam que a eficiência para o processo de diferenciação celular e, conseqüentemente, a produção de calos entre os dois explantes é semelhante. No entanto, a vantagem de se utilizar os *seedlings* está no menor tempo para obtenção deste explante que foi de 15 dias, enquanto que, para folhas, foi de 60 dias de cultivo. Denchev & Conger (1995), objetivando indução e regeneração de calos em *Panicum virgatum* L., testaram dois tipos de explantes – cariopses maduras e *seedlings* jovens e, em concordância com o que foi observado na candeia, também não obtiveram diferenças no número de explantes com calos.

Já Tawfik & Noga (2002), visando estabelecer um protocolo para regeneração de *Cuminum cyminum* L. a partir de calos, utilizaram, como explantes para o processo de calogênese, o hipocótilo e o primeiro par de folhas

lançados depois de 2 a 3 dias de germinação das sementes. Os resultados mostram diferenças significativas entre os dois explantes, quando se avaliou a porcentagem de explantes produtores de calos. O hipocótilo se destacou com mais de 80% de indução, ao passo que as folhas tiveram menos de 20%.

5.2 Efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos

Os resultados apresentados por ambos os explantes de candeia para a indução de calos indicam que é possível a obtenção destes nesta espécie. Com isso, poderá ser estudada a indução de calos embriogênicos a partir das respostas obtidas neste experimento.

As respostas dadas à ausência ou à adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo indicaram diferenças altamente significativas entre as condições avaliadas. Os resultados obtidos com as auxinas (2,4-D e Picloram), adicionadas individualmente ou em interação com as citocininas (KIN e BAP), indicaram, na maioria dos balanços de fitorreguladores, uma maior eficiência do Picloram em relação ao 2,4-D no processo de cultura de calos, em ambos os explantes (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4. Efeito do balanço de fitorreguladores na biomassa fresca (BF) e seca (BS) do explante e na porcentagem da área do explante foliar coberta por calos (%AE). Médias sobre diferentes meios de cultura, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2004.

BALANÇO FITORREGULADORES (mg L ⁻¹)	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS		
	BF (mg)*	BS (mg)	%AE**
TESTEMUNHA	25,58 c***	3,00 d***	0,00 c***
1,0 2,4-D	188,44 c	17,12 c	11,67 b
2,0 2,4-D	136,08 c	10,84 d	9,17 b
1,0 PIC	396,28 b	24,80 c	26,67 a
2,0 PIC	552,18 b	28,34 b	34,17 a
1,0 2,4-D + 0,5 KIN	480,54 b	42,22 a	15,83 b
1,0 2,4-D + 1,0 KIN	448,26 b	42,26 a	11,67 b
1,0 PIC + 0,5 KIN	759,68 a	49,04 a	35,00 a
1,0 PIC + 1,0 KIN	607,74 a	44,58 a	29,17 a
1,0 2,4-D + 0,5 BAP	377,68 b	32,90 b	15,83 b
1,0 2,4-D + 1,0 BAP	499,46 b	40,54 a	22,50 a
1,0 PIC + 0,5 BAP	760,06 a	47,12 a	40,00 a
1,0 PIC + 1,0 BAP	408,72 b	33,32 b	28,33 a

* Dados transformados para $(x+1)^{1/2}$.

** Dados transformados para $\text{asen}(x/100)^{1/2}$.

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

TABELA 5. Efeito do balanço de fitorreguladores na biomassa fresca (BF) e seca (BS) do explante e na porcentagem da área do explante de *seedling* coberta por calo (%AE). Médias sobre diferentes meios de cultura, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2004.

BALANÇO FITORREGULADORES (mg L ⁻¹)	CARACTERÍSTICAS AVALIADAS		
	BF (mg)*	BS (mg)	%AE**
TESTEMUNHA	62,42 b***	4,38 b***	0,00 c***
1,0 2,4-D	127,66 b	11,02 b	11,67 b
2,0 2,4-D	164,84 b	13,40 b	15,83 b
1,0 PIC	313,42 a	19,72 a	38,33 a
2,0 PIC	274,20 a	17,12 b	39,17 a
1,0 2,4-D + 0,5 KIN	390,90 a	28,28 a	32,50 a
1,0 2,4-D + 1,0 KIN	285,80 a	22,62 a	25,83 a
1,0 PIC + 0,5 KIN	325,82 a	20,92 a	47,5 a
1,0 PIC + 1,0 KIN	338,76 a	24,32 a	29,17 a
1,0 2,4-D + 0,5 BAP	246,72 a	19,50 a	23,33 a
1,0 2,4-D + 1,0 BAP	419,76 a	33,38 a	30,83 a
1,0 PIC + 0,5 BAP	370,88 a	23,82 a	38,33 a
1,0 PIC + 1,0 BAP	343,24 a	24,54 a	35,84 a

* Dados transformados para $(x+1)^{1/2}$.

** Dados transformados para $\text{asen}(x/100)^{1/2}$.

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

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 4 e 5, é possível verificar que, no meio sem suprimento exógeno de reguladores de crescimento, não houve indução de calos, em ambos os explantes. Este resultado indicou que a quantidade de hormônios endógenos da candeia não proporcionou suporte

suficiente para a indução de calos, tendo havido apenas formação de raízes em alguns explantes foliares. Nas folhas inoculadas, ao final dos 60 dias de incubação, todas se apresentaram necrosadas (Figura 1A). Resultados semelhantes foram observados por Silva (2001), quando inoculou ápices caulinares de carqueja (*Baccharis trimera*) em meio sem adição de fitorreguladores, não observou indução de calos. Nogueira (2003), ao testar diferentes concentrações de 2,4-D para calogênese de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), constatou que a ausência deste regulador de crescimento não promoveu a formação de calos.

Tao et al. (2002) utilizaram, como fonte de explante, folhas jovens retiradas de *seedlings* de *Citrus grandis* inoculadas em meio MS sem adição de reguladores. Segundo estes autores, a quantidade endógena destas substâncias não foi suficiente para promover a cultura de calos. Esses trabalhos demonstram a importância da suplementação dos meios de cultura reguladores de crescimento. Os calos são respostas dadas às injúrias físicas e químicas feitas no explante. As injúrias físicas são as excisões realizadas no material antes da inoculação, enquanto que as químicas estão relacionadas com os reguladores e outras substâncias que compõem o meio de cultivo (Torres & Caldas, 1990).

Em relação aos *seedlings*, o tratamento controle (ausência de reguladores) não promoveu a necrose dos tecidos inoculados, assim como não induziu calos. Foi verificado um estiolamento destes explantes, provavelmente devido ao fato de todos estarem em condição de ausência de luz durante todo o experimento (Figura 2A).

Dessa forma, foi constatado que, para a candeia iniciar o processo de cultura de calos, é imprescindível a suplementação do meio nutritivo com reguladores de crescimento. Esta constatação é fundamentada por Vietz & San-José (1996), os quais mencionaram que, em muitos casos, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a calogênese. O balanço

de fitorreguladores proveniente dos níveis de auxinas e citocininas, exógenas e endógenas à planta é capaz de estimular a proliferação celular.

Os resultados obtidos com os dois explantes de candeia utilizados indicam que o PIC, isolado ou em combinação com as citocininas (KIN e BAP), apresentou melhores resultados para a porcentagem de cobertura dos explantes por calos, em relação ao 2,4-D. Em *Paspalum scrobiculatum* L., testaram-se 2,4-D e PIC, isolados ou em combinação com KIN, para avaliar a influência destes reguladores na indução e regeneração de calos. Este estudo, em concordância com as respostas dadas pela candeia, demonstrou superioridade do PIC em comparação com o 2,4-D (Kaur & Kothari, 2004).

Para os explantes foliares, a maior porcentagem de área coberta por calos foi verificada no meio contendo 1,0 mg L⁻¹ de PIC + 0,5 mg L⁻¹ de BAP, com 40%, em média, de cobertura (Figura 1L). Os calos produzidos apresentaram coloração que variou de marrom à creme, com predominância de calos na cor creme e textura compacta. Observações contraditórias foram constatadas por Conceição (2000) trabalhando com timbó (*Derris urucu*). Este autor, ao testar interações de PIC com BAP, obteve calos predominantemente marrons e de consistência friável.

O PIC (1,0 mg L⁻¹), em interação com KIN (0,5 mg L⁻¹), destacou-se como o segundo melhor tratamento na cobertura dos explantes por calos (Figura 1H), não diferindo estatisticamente do primeiro. Esta interação benéfica para a produção de calos ocorreu também em *Rudgea jasminoides*, quando explantes foliares foram inoculados em meio MS contendo 2,22 μM de KIN + 2,07 μM de PIC, havendo maior ocorrência destes (Stella & Braga, 2002).

A utilização do PIC isolado na concentração 2,0 mg L⁻¹ promoveu boa produção de calos nas folhas inoculadas, com coloração clara (de creme a branco) e consistência altamente friável (Figura 1E). O desenvolvimento de calos brancos e friáveis em *Rudgea jasminoides* foram observados apenas na

ausência de cinetina, em meio de cultura suplementado com PIC na concentração de 8,28 μM (Stella & Braga, 2002). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Fitch & Moore (1990) para cana-de-açúcar, os quais descreveram que altas concentrações de PIC no meio proporcionaram calos brancos translúcidos. Também concordam com os de Ciddi & Shuler (2000), em *Nothapodytes foetida*, utilizando o PIC na concentração 2,0 mg L^{-1} , apresentou o melhor desenvolvimento de calos friáveis para posterior transferência para meio de cultivo em suspensão celular. O estabelecimento de calos friáveis é de suma importância para utilização em suspensão celular e determinação de protocolos visando à produção de metabólitos secundários *in vitro* e estudo das rotas metabólicas.

Por outro lado, o 2,4-D, isolado ou em interação com as citocininas (KIN e BAP) no processo de calogênese, proporcionou queda nos valores de cobertura dos explantes foliares por calos. Este decréscimo foi mais intenso quando esta auxina foi adicionada ao meio na ausência destas citocininas. Os valores de área coberta ficaram entre 9,17% e 11,67% (Figura 1C e 1B, respectivamente). Em relação ao aspecto visual, os calos eram escuros e de consistência compacta. Tao et al. (2002), tentaram induzir calos em explantes foliares de *seedlings* de *Citrus grandis*. Para isso, os autores estudaram diferentes concentrações de auxinas (2,4-D; 4-CPA; ANA; 2,4,5-T; MCPA; Dicamba e Picloram) e verificaram que o 2,4-D, em qualquer uma das concentrações estudadas (0,9; 4,5; 9,1; 22,6; e 32,2 μM), apresentou altas porcentagens de explantes cobertos por calos (em torno de 95%), sendo que nas concentrações entre 9,1 e 32,2 μM os calos apresentaram alta friabilidade. Já o PIC, mostrou-se ineficiente no processo de calogênese, apresentando menos de 30% de explantes cobertos por calos.

Ao contrário do que ocorreu com a candeia, vários trabalhos destacam o 2,4-D como uma eficiente auxina na produção de calos, como em *Croton*

urucurana (Lima, 2004), *Inga vera* (Soares, 2003), *Byrsonima intermedia* (Nogueira, 2003), *Gymnema sylvestre* (Kumar et al., 2002) e *Rudgea viburnoides* (Bonilla, 2002). O 2,4-D é a auxina mais comumente utilizada na indução de calos, tanto em espécies herbáceas como lenhosas.

O aspecto visual dos calos formados a partir de explantes foliares de candeia nos diferentes tratamentos está representado na Figura 1.

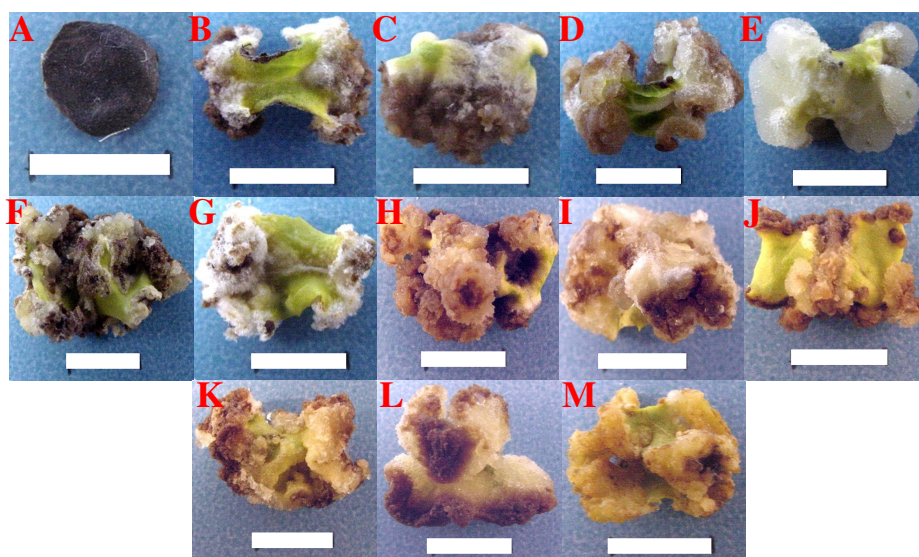


FIGURA 1. Aspecto visual dos calos induzidos a partir de explantes foliares de candeia nos diferentes balanços hormonais (em mg L^{-1}), sendo: controle (A); 1,0 2,4-D (B); 2,0 2,4-D (C); 1,0 PIC (D); 2,0 PIC (E); 1,0 2,4-D + 0,5 KIN (F); 1,0 2,4-D + 1,0 KIN (G); 1,0 PIC + 0,5 KIN (H); 1,0 PIC + 1,0 KIN (I); 1,0 2,4-D + 0,5 BAP (J); 1,0 2,4-D + 1,0 BAP (K); 1,0 PIC + 0,5 BAP (L); 1,0 PIC + 1,0 BAP (M). As barras nas figuras correspondem a 1cm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Em candeia, foi possível observar que as folhas jovens obtiveram melhores ganhos de biomassa fresca nos tratamentos em que o meio MS foi suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PIC em combinação com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP

(Figura 1L) e 0,5 ou 1,0 mg L⁻¹ de KIN (Figura 1H e 1I, respectivamente), não tendo havido diferenças significativas. Nestes dois balanços hormonais verificaram-se 760,06 mg e 759,69 mg de biomassa fresca, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Conceição (2000) e Kaur & Kothari (2004). O primeiro avaliou a indução de calos em explantes radiciais de *Derris urucu* por meio da interação de ANA + BAP, PIC + BAP e dos reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, AIB, PIC e BAP isolados, inoculados em meio MS, para a avaliação das variáveis matéria fresca e seca dos calos produzidos. Por meio deste experimento o autor pôde concluir que, de modo geral, as melhores respostas para a indução de calos em segmento radicial, em termos de peso de matéria fresca e seca, foi com o tratamento 1,6 + 3,2 mg L⁻¹ de PIC + BAP, alcançando 0,7841 g e 0,0420 g, respectivamente. Estes valores foram superiores aos induzidos por ANA + BAP, porém, inferiores aos calos formados pelo uso de 2,4-D.

Já Kaur & Kothari (2004), ao trabalhar com *Paspalum scrobiculatum* L., inocularam inflorescências imaturas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e PIC (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹), isolados ou em combinação com KIN (0,5 e 1,0 mg L⁻¹), visando iniciação e regeneração de calos. Estes autores puderam concluir que a máxima produção de biomassa fresca foi atingida quando se adicionou ao meio PIC (1,0 mg L⁻¹) em combinação com KIN (1,0 mg L⁻¹), onde o valor obtido foi da ordem de 585 mg de calos, após quatro semanas de cultivo.

Figueiredo et al. (2000) trabalharam com explantes foliares de *Rollinia mucosa* para a indução de calos em regime de ausência de luz. Estes autores testaram diversos reguladores de crescimento (2,4-D, BAP, ANA e GA₃) e quatro níveis de PIC e concluíram que o meio acrescido de 20,9 μM de PIC foi o que respondeu melhor ao acúmulo de massa fresca e seca. No explante foliar de candeia, o PIC isolado na concentração de 2,0 mg L⁻¹ mostrou-se eficaz (552,18

mg), porém, a adição das citocininas promoveu ganhos mais significativos. Esta resposta dada pela candeia está de acordo com Tisserat (1985), que comprovou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina. No entanto, quando se adicionou citocinina, a proliferação celular aumentou.

O 2,4-D isolado mostrou baixa eficiência em relação ao acúmulo de biomassa em candeia em ambas as concentrações estudadas. No entanto, os dados indicam que o incremento da concentração deste regulador promoveu um declínio nestas variáveis avaliadas. Esta resposta pode ser consequência de uma provável fitotoxicidade provocada pelo aumento do fitorregulador no meio de cultura. Bonilla (2002), ao trabalhar com *Rudgea viburnoides*, verificou que níveis crescentes de 2,4-D tiveram um efeito significativo sobre os valores médios do peso da matéria fresca e seca dos calos, tanto para explantes foliares como para caulinares.

Em relação aos *seedlings*, as respostas obtidas foram semelhantes às dos explantes foliares, ou seja, para a porcentagem de área coberta por calos, os melhores resultados foram nos tratamentos que utilizaram PIC, com ou sem citocininas. O maior valor para esta variável avaliada foi verificado na interação PIC + KIN (1,0 + 0,5 mg L⁻¹), em que a média de cobertura atingiu 47,5% (Figura 2H), seguido das médias obtidas para os tratamentos com o PIC isolado nas duas concentrações (Figuras 2D e 2E) e em combinação com 0,5 mg L⁻¹ BAP (Figura 2L), com 39,17 e 38,33%, respectivamente. Nestes balanços, os calos apresentaram textura altamente friável e coloração variando do marrom-claro ao creme, ao passo que nos tratamentos com 2,4-D, além da baixa taxa de indução de calos, estes eram mais compactos e tendendo, na maioria, à cor marrom.

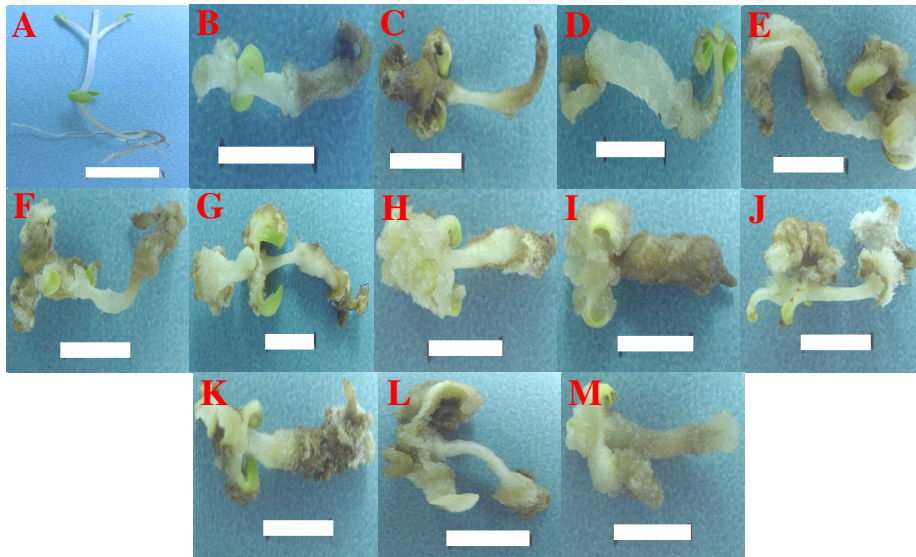


FIGURA 2. Aspecto visual dos calos induzidos a partir de seedlings de candeia nos diferentes balanços hormonais (em mg L^{-1}), sendo: controle (A); 1,0 2,4-D (B); 2,0 2,4-D (C); 1,0 PIC (D); 2,0 PIC (E); 1,0 2,4-D + 0,5 KIN (F); 1,0 2,4-D + 1,0 KIN (G); 1,0 PIC + 0,5 KIN (H); 1,0 PIC + 1,0 KIN (I); 1,0 2,4-D + 0,5 BAP (J); 1,0 2,4-D + 1,0 BAP (K); 1,0 PIC + 0,5 BAP (L); 1,0 PIC + 1,0 BAP (M). As barras nas figuras correspondem a 1cm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Denchev & Conger (1995), ao estudarem indução e regeneração de calos em *Panicum virgatum* L., testaram dois explantes (cariopses maduras e *seedlings* jovens) inoculados em diferentes tipos e concentrações de auxinas e citocininas para avaliar a eficiência do processo de calogênese e a conseqüente regeneração de *Panicum virgatum* L. Este experimento testou três níveis de 2,4-D e PIC (11,3; 22,5 e 45,0 μM) em combinação com quatro níveis de BAP (0,0; 5,0; 15,0 e 45,0 μM), e os explantes mantidos no escuro. Ambas as auxinas apresentaram bons desempenhos, isoladas ou em combinação com o BAP. Para o explante cariopses maduras, os autores mencionaram que, quando foi utilizado o PIC, o melhor desempenho na indução de calos foi verificado na concentração 45,0 μM

em interação com 0,0 a 45,0 μM de BAP. Já o 2,4-D com BAP, em todos os balanços, produziu calos, mas não com a mesma eficiência que o PIC. Em relação aos *seedlings* jovens, os melhores resultados foram observados com 11,3 μM PIC + 0,0 ou 5,0 μM BAP e 22,5 μM 2,4-D + 0,0 μM BAP, seguidos de 11,3 μM 2,4-D + 0,0 μM BAP. Verificou-se que, para os *seedlings*, a interação do PIC com baixas concentrações de BAP foi benéfica, enquanto que as demais apresentaram decréscimo na produção de calos. O 2,4-D revelou-se melhor isolado do que em combinação com o BAP. Ozias-Akins & Vasil (1985) mencionaram que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas.

Woo et al. (2000) testaram duas auxinas (2,4-D e ANA) em combinação com KIN, para a indução de calos em segmentos cotiledonares de *Fagopyrum esculentum* Moench. Concluíram que o 2,4-D, nas concentrações 1,0; 2,0 e 3,0 mg L^{-1} com KIN 0,2 mg L^{-1} , apresentou alta eficiência para a cultura de calos (100% de indução). Já a interação de ANA (nas mesmas concentrações que o 2,4-D) e KIN (0,2 mg L^{-1}) não formou calos em nenhuma das condições testadas. Pierik (1990) mencionou que, no processo de calogênese, o incremento exógeno de reguladores de crescimento é, freqüentemente, indispensável na indução de calos em qualquer explante. Este requerimento exógeno de fitorreguladores (tipo, concentração e razão auxina/citocinina) depende do genótipo e conteúdo endógeno de hormônios.

Para a variável biomassa fresca e seca dos *seedlings* de candeia, os resultados foram diferentes dos apresentados para a porcentagem de cobertura dos explantes por calos. Nesta avaliação, o balanço hormonal que atingiu o maior acúmulo de massa foi 1,0 mg L^{-1} 2,4-D + 1,0 mg L^{-1} BAP (Figura 2K), com 419,76 e 33,38 mg, para biomassa fresca e seca, respectivamente. Salman (2002), estudou diferentes combinações de 2,4-D (0,0; 0,5 e 1,0 mg L^{-1}) com BAP (0,0; 0,2; 0,5 e 2,5 mg L^{-1}), visando à produção de calos em *Gypsophila*

paniculata para cultura de suspensão celular. Esta interação promoveu grande desenvolvimento de calos com textura friável. Neste experimento foram avaliadas as variáveis biomassa fresca e biomassa seca da cultura de calos. Os resultados indicaram que a concentração ideal foi de 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D e 0,2 mg L⁻¹ BAP. O tratamento com ausência de reguladores foi o que apresentou o menor acúmulo de biomassa para esta espécie, indicando que apenas os hormônios endógenos não foram suficientes para a indução de calos em *Gypsophila paniculata*. Estes resultados corroboram com as respostas obtidas no presente trabalho.

Em *Calendula officinalis*, Grzelak & Janiszowska (2002) estudaram o efeito de duas auxinas (2,4-D e AIB) e duas citocininas (KIN e 2iP) na indução de calos. Os resultados mostraram que a melhor condição para se obter acúmulo de biomassa nos explantes foi a partir de baixas concentrações dos reguladores de crescimento. Neste estudo, a combinação ideal foi de 0,4 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,4 mg L⁻¹ de KIN, a qual promoveu maior eficiência no desenvolvimento de calos. Neste estudo, o 2,4-D e o AIB, isolados, não promoveram indução de calos, sendo necessária a interação destes com citocininas.

Ao contrário da candeia, em *Croton urucurana*, a máxima produção de matéria fresca de calos foi obtida a partir de altas concentrações de 2,4-D (entre 3,0 e 5,0 mg L⁻¹) (Lima, 2004). De acordo com Kaur & Kothari (2004), para a espécie *Paspalum scrobiculatum*, quando a concentração de 2,4-D foi incrementada de 2,0 para 5,0 mg L⁻¹, observou-se declínio no peso fresco de calos em comparação com o nível ótimo (0,5 – 1,0 mg L⁻¹).

6 CONCLUSÕES

Houve diferenças entre os explantes utilizados em relação à porcentagem de cobertura por calos em candeia, porém, para o número de explantes formadores de calos, os explantes não diferiram estatisticamente entre si.

O meio MS sem adição de reguladores de crescimento não promoveu indução de calos em ambos os explantes.

Em geral, o PIC apresenta melhores respostas para as variáveis estudadas em comparação com o 2,4-D.

Em relação à porcentagem da área dos explantes cobertos por calos, os melhores resultados foram obtidos a partir de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ PIC + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN em folhas e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ PIC + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP em *seedlings*.

O acúmulo de biomassa fresca e seca é mais evidente em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ PIC + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP nos explantes foliares, enquanto que, para os *seedlings*, as maiores médias foram alcançadas em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARASU, N. T.; PARANJOTHY, K. Tissue culture as na aid in crop improvement. In: RAJARAO, J. C.; PARANJOTHY, K. (Ed.). NATIONAL PLANT TISSUE CULTURE SYMPOSIUM, 1975, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia, 1975. p. 1-7.

BONGA, J. M. Applications of tissue culture in forestry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.** Berlim: Springer-Verlag, 1977. p. 93-108.

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

CIDDI, V.; SHULER, M. L. Camptothecine from callus cultures of *Nothapodytes foetida*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 129-132, Jan. 2000.

CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.).** 2000. 191 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CONSTABEL, F. Callus culture: initiation and maintenance. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications.** Orlando: Academic Press, 1984. p. 27-35.

DENCHEV, P. D.; CONGER, B. V. In vitro culture of switchgrass: Influence of 2,4-D and picloram in combination with benzyladenine on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 43-48, Jan. 1995.

FIGUEIREDO, S. F. L.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 85-92, 2000.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Comparasion of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures or sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 20, p. 157-163, 2000.

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

GRZELAK, A.; JANISZOWSKA, W. Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 29-40, Oct. 2002.

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

KUMAR, H. G. A.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema sylvestre*. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 85-88, Oct. 2002.

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* BAILL.)**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MEHRA, A.; MEHRA, P. N. Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in almond. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 135, n. 1, p. 61-73, 1974.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globules*. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 85-88, Oct. 2001.

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.

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

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 102 p.

REY, H.; MROGINSKI, L. A.; FERNANDEZ, A. Inducción *in vitro* de callos y raices en explanaos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pitón**, Buenos Aires, v. 39, n. 1, p. 161-170, 1980.

SALMAN, M. N. Establishment of callus and cell suspension cultures from *Gypsophila paniculata* leaf segments and study of the attachment of host cells by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 189-196, 2002.

SILVA, F. G. **Estudos de calogênese *in vitro* e dos efeitos do manejo fitotécnico no crescimento e na produção de óleo essencial em plantas de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D. C.]**. 2001. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga Vera* WILLD. Subsp. *Affinis* (DC.) T. D. PENN.]**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 271-276, Mar. 2002.

TAO, H.; SHAOLIN, P.; GAOFENG, D.; LANYING, Z.; GENGGUANG, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 141-146, May 2002.

TAWFIK, A. A.; NOGA, G. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 35-40, Apr. 2002.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis on plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p. 79-105.

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

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

WOO, S. H.; NAIR, A.; ADACHI, T.; CAMPBELL, C. G. Plant regeneration from cotyledon tissues of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 358-361, Sept./Oct. 2000.

CAPÍTULO 4

Indução de brotações em segmentos apicais e nodais de candeia sob diferentes condições de cultivo

1 RESUMO

ROSAL, Louise Ferreira. Indução de brotações em segmentos apicais e nodais de candeia sob diferentes condições de cultivo. In: _____. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 68-90. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

Em sistemas nos quais a propagação *in vitro* é obtida por meio da regeneração direta de gemas contidas nos explantes, é possível obter plântulas idênticas à planta-mãe e em tempo e espaço físico bastante reduzidos. O objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo de propagação *in vitro*, por meio da organogênese direta de brotações a partir de segmentos apicais e nodais de candeia. O material utilizado foi retirado de plântulas germinadas *in vitro*. Os segmentos apicais foram inoculados em meio MS, sob diferentes combinações de ANA e BAP, e os segmentos nodais em meio MS com diferentes combinações de GA₃ e ANA. Foram avaliados o número de brotações e o tamanho dos explantes no experimento com segmentos apicais e comprimento das brotações, nos segmentos nodais. Os resultados indicaram que a melhor condição para a obtenção de maior número de brotações foi em meio contendo ANA e BAP, ambos na concentração de 1,0 mg L⁻¹. O meio suplementado apenas com ANA (1,0 mg L⁻¹) promoveu maior comprimento dos explantes nos segmentos apicais. Nos segmentos nodais, as gemas axilares obtiveram maior comprimento em meio contendo 2,0 mg L⁻¹ de ANA.

* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador).

2 ABSTRACT

ROSAL, Louise Ferreira. Indução de brotações em segmentos apicais e nodais de candeia sob diferentes condições de cultivo. In: _____. **Germination, callus induction, micropropagation and foliar anatomy of candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 68-90. Dissertation (Master Program in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The in vitro propagation is got by direct buds regeneration from explants, it is possible to have identical plantlets like the plant mother and in time and in a physical space reduced. The purpose of this work was to determinate an in vitro propagation protocol, through direct shoots organogenesis from candeia's apical and nodal segments. It was used materials from in vitro germinated plantlets. Apical segments were inoculated in MS medium under different NAA and BAP combinations, and the nodal segments, in MS medium with different GA₃ and NAA combinations. Shoots number, explants size in the experiment with apical segments and shoots length in the nodal segment were evaluated. The results indicated that the best condition to have the largest number of shoots, was the medium having NAA and BAP, both in 1.0 mg L⁻¹ concentration. The supplied medium with NAA (1.0 mg L⁻¹) only, gave higher explants length in the apical segments. On nodal segments the axial buds had longer length in the medium having 2.0 mg L⁻¹ of NAA.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major professor).

3 INTRODUÇÃO

A micropropagação foi descrita por Giles (1985) como um processo que envolve a multiplicação *in vitro* de plantas em condições estéreis e em um meio de cultura definido, com a incorporação de reguladores de crescimento específicos que estimulam respostas de crescimento. Assim sendo, neste processo, os reguladores de crescimento adicionados ao meio modificam as relações hormonais no explante, fazendo com que os meristemas se desenvolvam.

O conceito de que a diferenciação de órgãos em plantas é regulado pela interação de dois tipos de hormônios (auxinas e citocininas) é utilizado no desenvolvimento de sistemas de micropropagação em diversas espécies. Outro grupo de reguladores de crescimento, utilizado na fase de multiplicação, é formado pelas giberelinas, que estimulam o crescimento, pois promovem a expansão celular (Schuch & Peters, 1993). A adição de reguladores exógenos depende fundamentalmente dos níveis de hormônios endógenos. Ao mesmo tempo, quando um regulador exógeno é adicionado, a planta responde compensando este aumento pelo incremento da concentração de hormônios endógenos no processo de morfogênese (George, 1996).

A morfogênese é, fundamentalmente, o resultado da divisão e diferenciação de células organizadas, com padrões definidos e que dependem, basicamente, da atividade e expressão de certos genes. Existem dois processos morfogenéticos, a embriogênese somática (formação de embriões) (Mathews et al., 1993) e a organogênese (formação de brotos) (Hossain et al., 1993). De acordo com Echeverrigaray et al. (2001), em sistemas nos quais a micropropagação é obtida por meio da regeneração direta, o efeito dos reguladores de crescimento são ainda mais evidentes e concentrações maiores de citocininas se fazem, em geral, necessárias. No caso da camomila romana (*Anthemis nobilis* L.), altas taxas de regeneração são obtidas a partir de explantes

cultivados em meio contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (Echeverrigaray et al., 2000).

Além dos reguladores de crescimento, o meio de cultivo também interfere no desenvolvimento das plântulas *in vitro*, já que afeta diretamente a nutrição das mesmas. Várias soluções salinas têm sido utilizadas para o desenvolvimento de cultura de tecidos de plantas. Essas soluções apresentam variações nas concentrações de sais e na fonte de nitrogênio e outros compostos essenciais. A solução salina mais utilizada, tanto em plantas aromáticas e medicinais quanto em outras espécies vegetais, é a solução proposta originalmente por Murashige & Skoog (1962) para o cultivo de *Nicotiana tabaccum* L. (Echeverrigaray et al., 2001).

O sucesso da multiplicação *in vitro* depende também da fonte de explante utilizada. No processo de organogênese, vários estudos relatam a utilização de duas fontes de explante: segmento apical e nodal. Nesse contexto, Mantell et al. (1994) mencionam que brotos axilares são aqueles que emergem a partir de suas posições normais, nas axilas das folhas, enquanto que os brotos apicais são os que ocupam a extremidade apical. Ambos contêm meristemas quiescentes ou ativos, dependendo do estado fisiológico da planta.

A maioria das plantas vasculares tem um modo indeterminado de crescimento e a axila das folhas contém meristemas subsidiários, cada um dos quais é capaz de desenvolver um broto que é idêntico ao eixo principal. Dependendo do grau de ramificação apresentado por uma espécie em particular (aspecto esse que também é influenciado, até certo grau, pelo ambiente), somente um número limitado de meristemas axilares se desenvolve, sendo a maioria inibida pela dominância apical. Ainda que se tenha demonstrado que o mecanismo de dominância apical está sob o controle de vários reguladores de crescimento, em muitas plantas, o desenvolvimento de gemas axilares parece depender do suprimento de citocinina para o seu meristema. Portanto, os brotos

apicais cultivados em meio basal, sem regulador de crescimento, desenvolvem-se tipicamente em brotos semelhantes a plântulas, com forte dominância apical.

Em geral, a técnica de proliferação por meio de brotos axilares é aplicável a qualquer planta que produza regularmente brotos axilares e responda a citocininas, tais como BAP, 2iP e zeatina. Isso inclui um número crescente de espécies lenhosas, especialmente árvores de florestas e pomares, para as quais há claramente grandes vantagens em se terem sistemas rápidos de propagação clonal. Para a propagação vegetativa de árvores, por meio de métodos *in vitro*, é da maior importância o estado juvenil. A fase de crescimento das plântulas, que se segue à germinação, é descrita como fase juvenil. Esta é uma fase de crescimento muito ativo. Em vista disso, os explantes de gemas e brotos axilares e apicais são geralmente utilizados para a propagação de culturas durante esta fase de crescimento. No entanto, devido às dificuldades de descontaminação de explantes provenientes de campo, tem-se preferido a utilização de explantes oriundos de sementes germinadas em condições assépticas (Del Pontes, 1999; Coelho, 1999; Pinto et al., 1994).

O objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo de propagação *in vitro*, por meio da regeneração direta de brotações a partir de segmentos apicais e nodais de candeia provenientes de plântulas cultivadas assepticamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Indução de brotações em segmentos apicais de candeia

Foram utilizados, como fonte de explantes segmentos, apicais obtidos a partir das plântulas provenientes de sementes germinadas *in vitro* em meio MS. Os segmentos apicais com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram inoculados em meio MS sem reguladores e suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) em interação com ANA (0,5 e 1,0 mg L⁻¹), acrescidos de 3% de açúcar. Os meios foram solidificados com ágar 0,6% e o pH foi aferido para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos de ensaio, cada um contendo 1 segmento, foram mantidos em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 25 μmol. m⁻². s⁻¹.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído por nove combinações de fitorreguladores (Tabela 1) e 5 repetições de 4 tubos cada uma. As avaliações foram realizadas após 45 dias de incubação. As variáveis foram analisadas pelo programa SISVAR (Ferreira, 1999), no qual as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Após 45 dias de incubação, foram analisados presença de raízes, comprimento dos explantes e número de brotações.

TABELA 1. Combinação das diferentes concentrações de BAP e ANA utilizadas para indução de brotações em segmentos apicais de candeia. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamento	BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)
T ₁	0,0	0,0
T ₂	0,0	0,5
T ₃	0,0	1,0
T ₄	0,5	0,5
T ₅	0,5	1,0
T ₆	1,0	0,5
T ₇	1,0	1,0
T ₈	1,5	0,5
T ₉	1,5	1,0

Experimentos anteriores apontaram a utilização de BAP em interação com ANA como ideal para a indução de brotações axilares em segmentos apicais de candeia. Porém, o BAP isolado proporcionava hiper-hidratação nos explantes.

Indução de brotações em segmentos nodais de candeia

Foram utilizados, como fonte de explantes, segmentos nodais obtidos a partir das plântulas provenientes de sementes germinadas *in vitro* em meio MS. Os segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm de comprimento e contendo 2 gemas laterais foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,0 e 2,0 mg L⁻¹) em interação com GA₃ (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e acrescidos de 3% de açúcar. Os meios foram solidificados com ágar 0,6% e o pH foi aferido para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos de ensaio, cada um contendo 1 segmento, foram mantidos em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $25 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído por seis combinações de fitorreguladores (Tabela 2), com 5 repetições de 4 tubos cada uma. Avaliou-se o comprimento médio das brotações, após 45 dias de incubação. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 2. Combinação das diferentes concentrações de ANA e GA₃ utilizadas para a indução de brotações em segmentos nodais de candeia. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamento	ANA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)
T ₁	0,0	0,0
T ₂	0,0	0,5
T ₃	0,0	1,0
T ₄	2,0	0,0
T ₅	2,0	0,5
T ₆	2,0	1,0

Experimentos anteriores não demonstraram efeito benéfico da interação de BAP com ANA, por isso foram utilizados os reguladores ANA e GA₃ com intuito de alongar as gemas laterais dos segmentos nodais de candeia, para promover a multiplicação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de brotações em segmentos apicais de candeia

De acordo com os resultados apresentados na Figura 1, pode-se inferir que o meio MS sem reguladores de crescimento, ou suplementado apenas com ANA nas duas concentrações testadas (0,5 e 1,0 mg L⁻¹), não se mostrou eficaz quando se avaliou o número de brotações (tratamentos 1, 2 e 3). Nestas condições, os explantes apenas alongaram, não lançando nenhuma brotação axilar, ao passo que a interação do BAP com ANA promoveu o lançamento de brotações axilares.

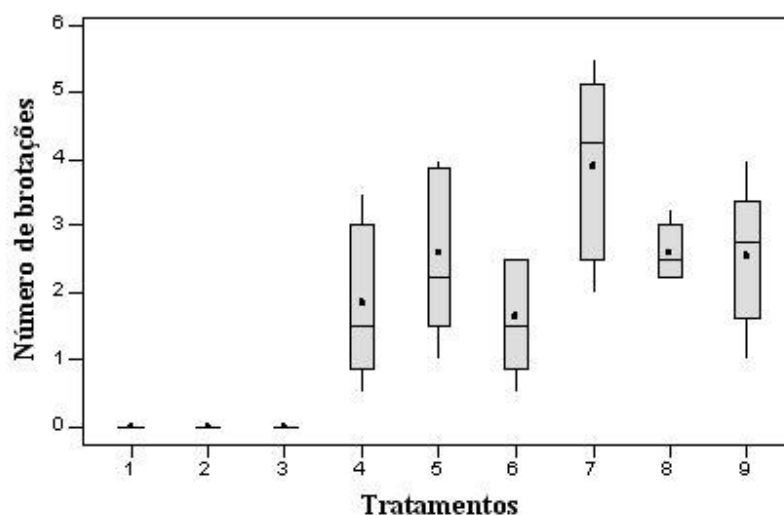


FIGURA 1. Número de brotações emitidas a partir de segmentos apicais de candeia inoculados sob diferentes combinações dos reguladores ANA e BAP (em mg L⁻¹), sendo: testemunha (1); 0,5 ANA (2); 1,0 ANA (3); 0,5 BAP + 0,5 ANA (4); 0,5 BAP + 1,0 ANA (5); 1,0 BAP + 0,5 ANA (6); 1,0 BAP + 1,0 ANA (7); 1,5 BAP + 0,5 ANA (8) e 1,5 BAP + 1,0 ANA (9). Os pontos no gráfico indicam a média, os traços, a mediana, e a caixa, a variabilidade dentro dos tratamentos. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Em função das repostas obtidas nos tratamentos em que o meio não foi acrescido de reguladores ou apenas suplementado com ANA, analisaram-se os demais tratamentos. Os resultados indicaram que os balanços hormonais utilizados diferem estatisticamente entre si (Tabela 1), sendo a combinação 1,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA (tratamento 7), com média de 3,9 brotações por explante, o melhor balanço para induzir a emissão de brotações axilares.

TABELA 1. Número de brotações obtidas a partir de segmentos apicais de candeia inoculados em meio MS adicionado de BAP e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamento	Nº brotações
(T7) 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 1,0 mg L ⁻¹ ANA	3,90 a*
(T8) 1,5 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ ANA	2,60 b
(T5) 0,5 mg L ⁻¹ BAP + 1,0 mg L ⁻¹ ANA	2,60 b
(T9) 1,5 mg L ⁻¹ BAP + 1,0 mg L ⁻¹ ANA	2,55 b
(T4) 0,5 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ ANA	1,85 b
(T6) 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ ANA	1,65 b

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Já para a variável comprimento dos explantes, as maiores médias foram obtidas nos tratamentos 2 e 3, em que o ANA foi utilizado isolado. O maior comprimento médio dos explantes (3,65 cm) foi verificado no meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA (Figura 2). Estas respostas podem estar relacionadas à capacidade que as auxinas têm de induzir o alongamento celular e, desse modo, promover o crescimento do explante (Teixeira & Marbach, 2000). A ausência de reguladores ou a interação entre BAP e ANA não promoveram desempenho satisfatório no desenvolvimento dos explantes.

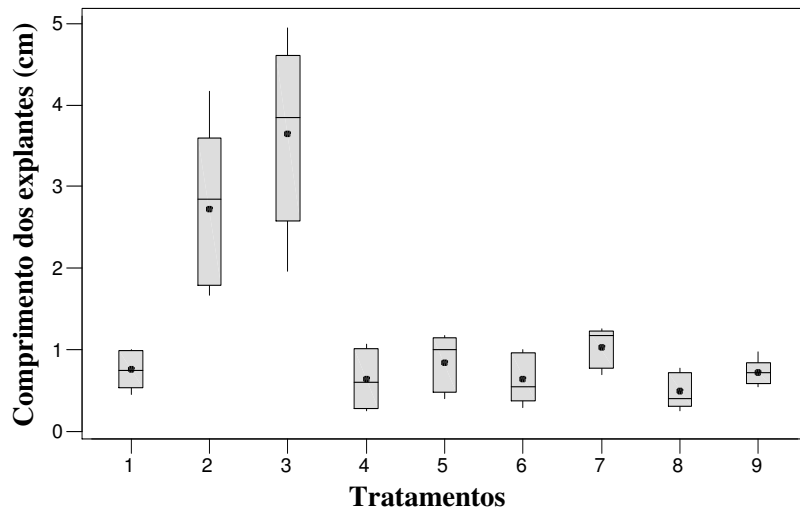


FIGURA 2. Comprimento dos explantes emitidos a partir de segmentos apicais de candeia inoculados sob diferentes combinações dos reguladores ANA e BAP (em mg L^{-1}), sendo: testemunha (1); 0,5 ANA (2); 1,0 ANA (3); 0,5 BAP + 0,5 ANA (4); 0,5 BAP + 1,0 ANA (5); 1,0 BAP + 0,5 ANA (6); 1,0 BAP + 1,0 ANA (7); 1,5 BAP + 0,5 ANA (8) e 1,5 BAP + 1,0 ANA (9). Os pontos no gráfico indicam a média, os traços, a mediana, e a caixa, a variabilidade dentro dos tratamentos. UFLA, Lavras, MG, 2004.

De acordo com os resultados apresentados, é possível afirmar que, para a indução de brotações axilares em segmento apical de candeia, é necessária a adição de BAP ao meio de cultura; no entanto, sua presença (nas concentrações testadas) afetou o crescimento das brotações. Segundo Zhang & Stoltz (1991), o uso de reguladores de crescimento em altas concentrações, em particular as citocininas, pode induzir brotações com crescimento reduzido, o que pode ser corrigido por meio da redução do nível destas. Resultados semelhantes foram reportados por Bais et al. (2002), que desenvolveram um protocolo de propagação clonal *in vitro* a partir de gemas axilares de *Spilanthes mauritiana*. Para a determinação deste protocolo foram utilizados os reguladores BAP (0,0 - 1,8 μM) e ANA (0,0 - 0,2 μM), testados isolados ou em combinação. Não foi

observado desenvolvimento de brotações em meio sem reguladores. Na presença de BAP (1,0 μM) + ANA (0,1 μM), 96,7% dos segmentos apresentavam indução de brotações, com média de 5,6 brotos por explante, sendo esta a máxima produção. Tratamentos contendo BAP e ANA isolados não foram eficazes na regeneração de brotações, comparados à interação destes.

Como visto anteriormente, a produção máxima de brotações (3,90 brotos/explante) em candeia foi obtida pela interação de BAP (1,0 mg L^{-1}) + ANA (1,0 mg L^{-1}). Este resultado está em consonância com o apresentado por Gomes (1999), o qual testou várias interações de BAP com ANA e obteve o melhor resultado (5 brotos/explante) quando ambos os reguladores estavam na concentração de 1,0 mg L^{-1} . Outros autores, como Macêdo et al. (2003), Al-Wasel (2000) e Casado et al. (2002), em seus trabalhos com *Ananas comosus*, *Acacia seyal*, *Santonina canescens*, respectivamente, apontam para a necessidade de utilização da combinação entre auxina e citocinina para a indução de brotações nestas espécies. Em contrapartida, Zobayed et al. (2002) estudaram o efeito dos reguladores BAP e ANA em segmentos nodais de *Annona squamosa* na propagação *in vitro* desta espécie e obtiveram as melhores respostas em meio suplementado apenas com BAP (1,5 mg L^{-1}), com 43,2 brotos/explante. A interação dos reguladores não promoveu resultados satisfatórios. As respostas obtidas neste trabalho, e em outros citados, indicam a importância do genótipo na organogênese *in vitro*.

A concentração dos reguladores (auxinas e citocininas) é um fator determinante para se obter sucesso no processo de propagação *in vitro*. Estas concentrações variam de espécie para espécie. Para *Typhonium flagelliforme*, o meio ideal para a obtenção de múltiplos brotos normais foi determinado quando BAP e ANA estavam em concentrações baixíssimas (ambos com 0,1 mg L^{-1}), com média de 26,2 brotos por explante (Sai et al., 2000). Já para segmentos apicais de *Acacia seyal*, os melhores resultados foram obtidos a partir de

combinações de BAP ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) com ANA ($0,1$ ou $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e BAP ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) com ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), que resultaram em máxima multiplicação de brotos com 6,3 a 6,7 por explante (Al-Wasel, 2000).

O uso do explante apical de candeia exemplifica o efeito da dominância do ápice sobre as gemas axilares. A suplementação com citocinina favorece a liberação desta dominância. Neste contexto, pela Figura 3 é possível observar o comportamento dos explantes inoculados em meio MS, sob diferentes concentrações de ANA e BAP.

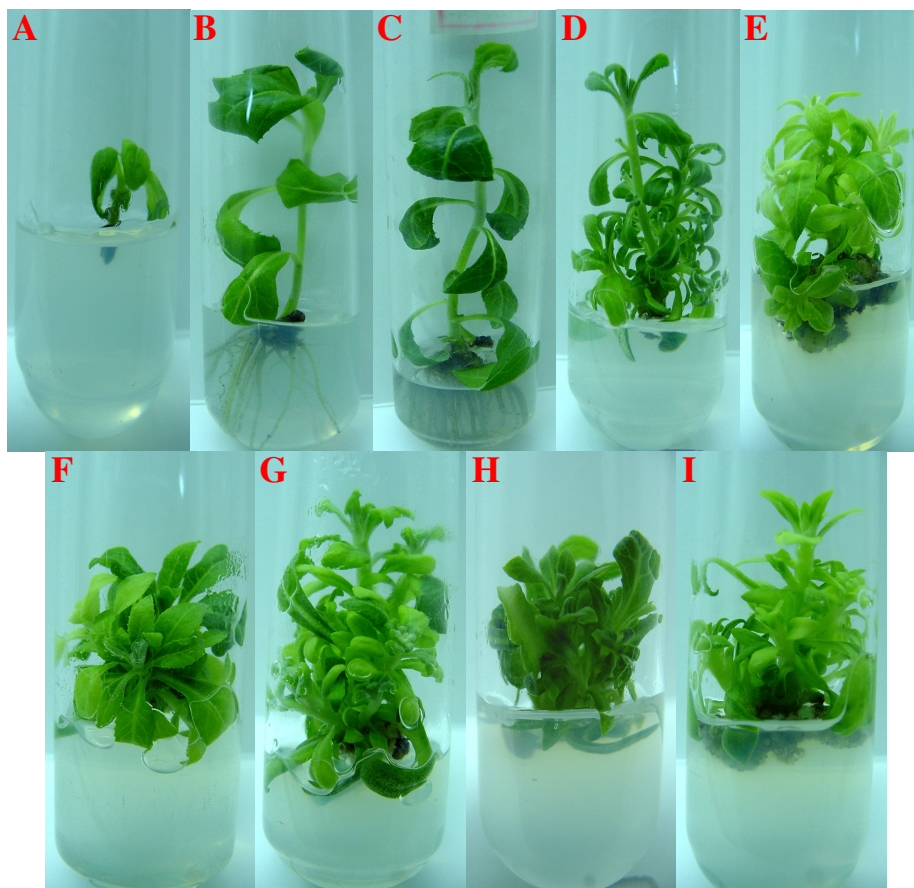


FIGURA 3. Segmentos apicais de candeia sob diferentes combinações dos reguladores ANA e BAP (em mg L^{-1}), sendo: testemunha (A); 0,5 ANA (B); 1,0 ANA (C); 0,5 BAP +0,5 ANA (D); 0,5 BAP + 1,0 ANA (E); 1,0 BAP + 0,5 ANA (F); 1,0 BAP + 1,0 ANA (G); 1,5 BAP + 0,5 ANA (H) e 1,5 BAP + 1,0 ANA. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Conforme ilustra a Figura 3, a presença de BAP inibiu a emissão de raízes nos explantes, enquanto o ANA promoveu intensa produção de raízes, principalmente quando se elevou a concentração de 0,5 para 1,0 mg L^{-1} . Estas respostas estão de acordo com Casado et al. (2002), que reportaram a inibição de formação de raízes em segmentos de *Santolina canescens* em todas as

concentrações (1,33; 2,2 e 4,4 μM) de BAP testadas. Não obstante, Sai et al. (2000) evidenciaram que explantes de *Typhonium flagelliforme* cultivados em meio MS contendo apenas BAP produziram brotações e raízes normais, enquanto que, na presença do ANA isolado ou em combinação com BAP, não apresentaram raízes e, em alguns casos, estas eram anormais (curtas e atrofiadas).

5.2 Indução de brotações em segmentos nodais de candeia

Conforme os resultados apresentados na Figura 1, é possível verificar que o tratamento em que o ANA foi utilizado isolado e na concentração de 2,0 mg L^{-1} atingiu a maior média no comprimento das brotações (1,49 cm) em segmentos nodais de candeia. Em contrapartida, o GA_3 isolado não foi eficaz no alongamento das brotações e, na concentração máxima utilizada neste experimento (1,0 mg L^{-1}), atingiu 0,40 cm de comprimento, sendo esta a menor média obtida para a variável estudada.

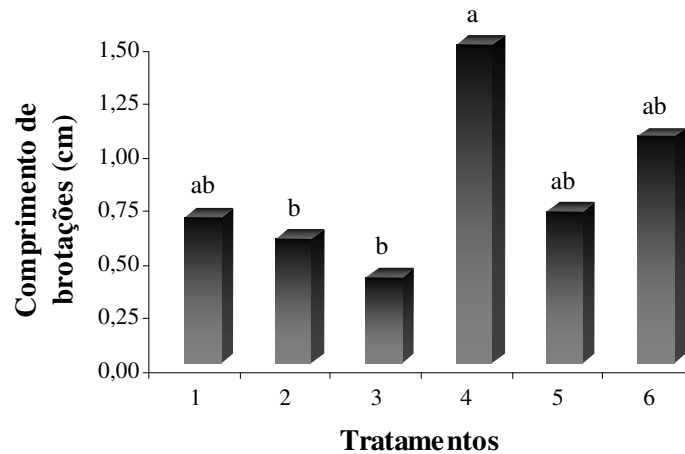


FIGURA 4. Comprimento dos explantes emitidos a partir de segmentos nodais de candeia inoculados sob diferentes combinações dos reguladores GA_3 e ANA (em $mg L^{-1}$), sendo: testemunha (1); $0,5 GA_3$ (2); $1,0 GA_3$ (3); $2,0 ANA$ (4); $2,0 ANA + 0,5 GA_3$ (5); $2,0 ANA + 1,0 GA_3$ (6). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Os dados apresentados na Tabela 1 mostram as médias obtidas em cada tratamento. Estes resultados apontam para a superioridade do tratamento em que o meio MS foi suplementado com ANA ($2,0 mg L^{-1}$), em relação aos demais no que tange ao comprimento das brotações, pela capacidade que tem de promover o alongamento celular (Teixeira & Marbach, 2000). Esta resposta é de extrema importância para a continuidade do processo de micropropagação em segmentos nodais de candeia, visto que, segundo George (1996), o tamanho do explante é um fator determinante na sobrevivência deste na fase de enraizamento e, principalmente, na aclimação.

TABELA 1. Comprimento das brotações obtidas a partir de segmentos nodais de can-deia inoculados em meio MS adicionado de GA₃ e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamento	Comp. brotações (cm)*
(T4) 2,0 mg L ⁻¹ ANA + 0,0 mg L ⁻¹ GA ₃	1,49 a**
(T6) 2,0 mg L ⁻¹ ANA + 1,0 mg L ⁻¹ GA ₃	1,06 a b
(T5) 2,0 mg L ⁻¹ ANA + 0,5 mg L ⁻¹ GA ₃	0,71 a b
(T1) 0,0 mg L ⁻¹ ANA + 0,0 mg L ⁻¹ GA ₃	0,68 a b
(T2) 0,0 mg L ⁻¹ ANA + 0,5 mg L ⁻¹ GA ₃	0,58 b
(T3) 0,0 mg L ⁻¹ ANA + 1,0 mg L ⁻¹ GA ₃	0,40 b

* Dados transformados para $(x+1)^{1/2}$.

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O tratamento sem adição de reguladores apresentou melhor desenvolvimento das gemas laterais em comparação com os meios adicionados de GA₃. À medida que se aumentou a concentração deste regulador, ocorreu um decréscimo no desenvolvimento das brotações. Estes resultados indicaram um efeito negativo da presença de GA₃ no meio de multiplicação (Figura 2). No entanto, Figueiredo et al. (2001) consideraram necessária a utilização de GA₃ para alongamento de brotações de *Rollinia mucosa*, antes de transferi-las para o meio de enraizamento e não constataram nenhuma resposta adversa à presença deste regulador. Já Hazra et al. (2002) apontaram a eficiência do GA₃ (1,44 µM) em combinação com BAP (2,22 µM) para alongamento de brotações de *Agave sisalana*, antes de enraizá-las.

Contudo, Scarpa et al. (2000) estudaram a influência de vários reguladores de crescimento (BAP, ANA, GA₃ e AIA), em diferentes quantidades, na propagação *in vitro* de *Myrtus communis*. A máxima proliferação de brotações axilares foi obtida a partir da interação de BAP com

ANA, enquanto que a utilização de GA₃ e AIA inibiu o processo de regeneração das brotações.

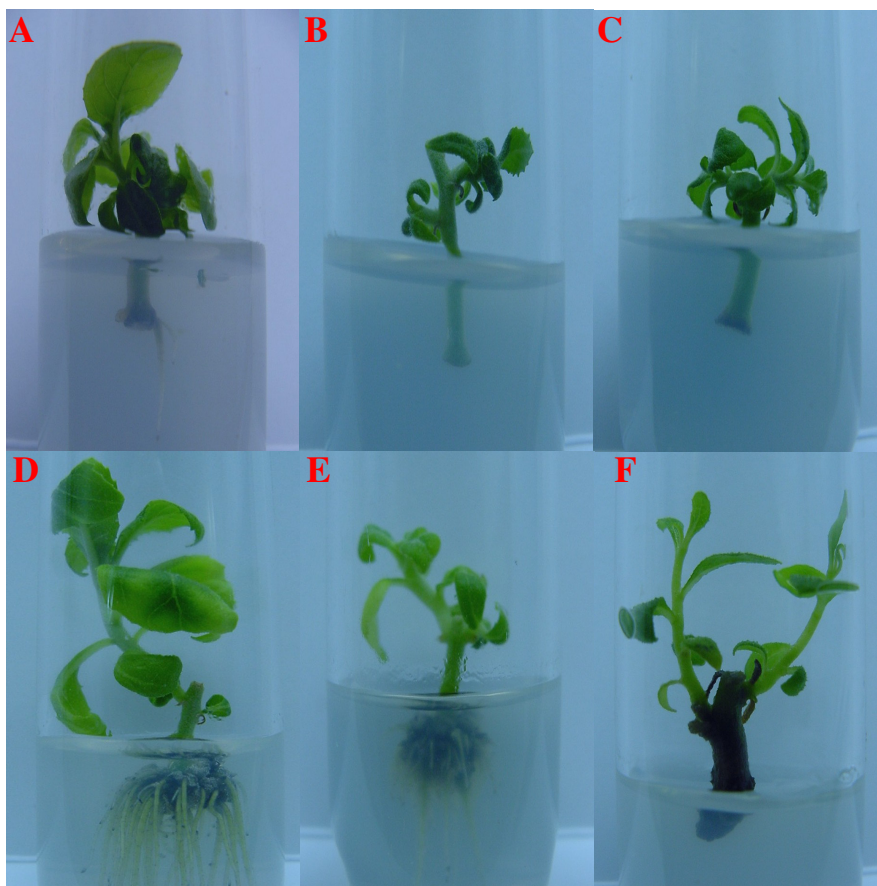


FIGURA 5. Segmentos nodais de candeia sob diferentes combinações dos reguladores GA₃ e ANA (em mg L⁻¹), sendo: testemunha (A); 0,5 GA₃ (B); 1,0 GA₃ (C); 2,0 ANA + 0,0 GA₃ (D); 2,0 ANA + 0,5 GA₃ (E); 2,0 ANA + 1,0 GA₃ (F). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Assim como neste estudo em candeia, outros trabalhos testaram a utilização do GA₃ como indutor de brotações e não somente como agente promotor do alongamento de brotações já formadas. Neste contexto, Purohit et

al. (2002) estudaram indução de brotações em embriões e em nós cotiledonares de *Quercus leucotrichophora* e *Quercus glauca*. Neste trabalho foram utilizados os reguladores de crescimento BAP, isolado ou em combinação com GA₃ e AIB. Os resultados obtidos para indução de múltiplas brotações e maior altura dos brotos indicaram que a melhor fonte de explante foram os nós cotiledonares, em meio suplementado com BAP (22,19 µM) em combinação com GA₃ (2,89 µM).

No caso da candeia, a presença de GA₃ no meio para propagação, diminuiu consideravelmente o desenvolvimento das brotações, principalmente no meio sem ANA. Comportamento semelhante foi verificado por Pruski et al. (2000), em seus estudos visando o estabelecimento *in vitro* e indução de brotações em *Prunus virginiana*, por meio de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com AIB e BAP isolados, ou com BAP em combinação com GA₃. Estes autores reportaram que o meio suplementado apenas com BAP é ideal para propagação clonal *in vitro* desta espécie. Já a presença de GA₃ reduziu significativamente a produção de brotos.

6 CONCLUSÕES

Nos segmentos apicais de candeia, o maior número de brotações é obtido quando eles são inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, com, aproximadamente, 3,9 brotos por explante.

A presença de BAP no meio de cultura inibe a formação de raízes nos explantes apicais, porém, quebra a dominância do ápice e libera as brotações axilares.

O maior comprimento dos explantes em segmentos apicais ocorre quando são inoculados em meio contendo apenas ANA, na concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, com 3,65 cm.

No caso de segmentos nodais, o maior comprimento das brotações é verificado quando os explantes são inoculados em meio adicionado de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA isolado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WASEL, A. S. Micropropagation of *Acacia seyal* Del. in vitro. **Journal of Arid Environments**, London, v. 46, n. 4, p. 425-431, Dec. 2000.
- BAIS, H. P.; GREEN, J. B.; WALKER, T. S.; OKEMO, P. O.; VIVANCO, J. M. *In vitro* propagation of *Spilanthes mauritiana* DC. , an endangered medicinal herb, through axillary bud cultures. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 598-601, Nov./Dec. 2002.
- CASADO, J. P.; NAVARRO, M. C.; UTRILLA, M. P.; MARTINEZ, A.; JIMÉNEZ, J. Micropropagation of *Santonina canescens* Lagasca and in vitro volatiles production by shoot explants. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 147-153, May 2002.
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DEL PONTES, E. M. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus***. 1999. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
- ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A, L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.
- ECHEVERRIGARAY, S.; FRACARO, F.; ANDRADE, L. B.; BIASIO, S.; ATTI-SERAFINI, L. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of Roman Chamomille. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 1-4, 2000.
- FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2001.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 – the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

- GILES, K. L. Micropropagation in a growing world: The impact of micropropagation. **World Crops**, Surrey, v. 37, n. 1, p. 6-10, 1985.
- GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- HAZRA, S. K.; DAS, S.; DAS, A. K. Sisal plant regeneration via organogenesis. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 235-240, Sept. 2002.
- HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ISLAM, R.; JOARDER, O. I. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, n. 2, p. 99-102, Dec. 1993.
- MACÊDO, C. E. C.; SILVA, M. G. da; NÓBREGA, F. S. da; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.
- MANTELL, S. H.; MATTEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Principles of plant biotechnology**: an introduction to genetic engineering in plants. 5. ed. New York: Balckwell Scientific, 1994.
- MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R. N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 6, p. 328-333, Apr. 1993.
- 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.
- PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; TAYLOR, D. A. H. **Flora Neotropica**: Meliaceae. New York: The New York Botanical Garden, 1994. p. 389-405. (Monograph number 28).
- PRUSKI, K. W.; LEWIS, T.; ASTATKIE, T.; NOWAK, J. Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 93-100, 2000.

PUROHIT, V. K.; TAMTA, S.; CHANDRA, S.; VYAS, P.; PALNI, L. M. S.; NANDI, S. K. In vitro multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Quercus glauca*: Important Himalayan oaks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 121-133, May 2002.

SAI, S. T.; KENG, C. L.; PARGINI, N.; TEO, C. K. H. In vitro propagation of *Typhonium flagelliforme* (Lodd) Blume. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 402-406, Sept./Oct. 2000.

SCARPA, G. M.; MILIA, M.; SATTA, M. The influence of growth regulators on proliferation and rooting of *in vitro* propagated myrtle. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 175-179, 2000.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Xilld, Borkh) e megumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433-437, abr. 1993.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. Fitohormônios. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 101-132, 2000.

ZHANG, B.; STOLTZ, L. P. *In vitro* proliferation and *in vitro* establishment of *Euphorbia fulgens*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, p. 859-863, 1991.

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

CAPÍTULO 5

Anatomia foliar comparada de plantas de candeia provenientes do cultivo *in vivo* e *in vitro*

1 RESUMO

ROSAL, Louise Ferreira. Anatomia foliar comparada de plantas de candeia provenientes do cultivo *in vivo* e *in vitro*. In: _____. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 91-106. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento adaptativo do vegetal. Considerando a importância do conhecimento das estruturas anatômicas na definição de um protocolo para micropropagação de candeia, este estudo teve como objetivo comparar a estrutura interna de folhas desta espécie cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Para as avaliações anatômicas foram utilizadas folhas do terceiro nó, do ápice para base, de plantas com 60 dias de cultivo *in vitro* e de plantas adultas cultivadas em área experimental. O estudo anatômico das folhas baseou-se no exame microscópico de seções transversais do limbo foliar. As estruturas foliares de plantas provenientes do ambiente *in vivo* apresentam epiderme unisseriada e cutícula espessa. O mesófilo possui organização dorsiventral e é constituído por duas camadas de parênquima paliçádico organizado e justaposto, e duas a três camadas de parênquima esponjoso. A nervura central apresenta três feixes vasculares colaterais. A folha é do tipo hipoestomática. Em plantas cultivadas *in vitro*, foi verificada apenas uma camada de parênquima paliçádico (pouco desenvolvido) e três a quatro camadas de parênquima esponjoso, ainda pouco diferenciado. As epidermes apresentaram-se menos espessas que as oriundas do cultivo *in vivo* e houve pouca deposição de cera sobre a epiderme adaxial. Na nervura central apenas um feixe vascular foi formado. A folha é do tipo anfiestomática.

* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador).

2 ABSTRACT

ROSAL, Louise Ferreira. Anatomia foliar de plantas de candeia provenientes do cultivo *in vivo* e *in vitro*. In: _____. **Germination, callus induction, micropropagation and foliar anatomy of candeia (*Eremanthus erythropappus* Mac Leish)**. 2004. p. 92-106. Dissertation (Master Program in Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

An appropriate understanding of a basic plant or organ structure is essential to get a knowledge adjustment of a plant. Considering the knowledge importance of anatomical structures in the protocol definition to candeia's micropropagation, this study had as purpose to compare the leaves internal structures from this cultured specie *in vivo* and *in vitro*. For anatomical evaluations were used the third leaf, from the tip to the base, plants with 60 days of *in vitro* growth and from adult plants growing in experimental area. The leaves anatomical study was based on microscope examination from transversal sections from leaf blade. The leaves structures from plants coming from *in vivo* environment show uniseriate epiderm and thick cuticle. Mesophyl has dorsiventral organisation and is made of two layers of palisade parenchyma and two to three spongy parenchyma layers. A central nervure shows three colateral vascular bundle. The leaf is from the hypostomatic type. *In vitro* cultured plants, was verified only one palisade parenchym layer (not well developed) and three to four spongy parenchym layers, still not well differentiated. The epiderms showed to be less thicker than the ones from *in vivo* culture and to have less wax deposition on adaxial epiderm. In the central nervure only one vascular bundle was formed. The leaf is from the anisostomatic type.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major professor).

3 INTRODUÇÃO

Espécies lenhosas propagadas *in vitro* são, freqüentemente, afetadas por vários fatores do meio de cultura, que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. 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).

Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e transpiração. Muitas dessas evidências indicam que o estado da água e a fase gasosa durante os vários estágios da cultura são a chave dos fatores envolvidos na desorganização morfológica *in vitro*. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos na planta. Algumas respostas, comumente, assemelham-se a plantas cultivadas sob condições de estresse (Fidelis, 1998).

Plantas cultivadas *in vitro* são heterotróficas ou mixotróficas devido à falta de um ativo sistema fotossintético e à baixa ou inadequada atividade de enzimas fotossintéticas (Grout & Aston, 1977; Grout & Donkin, 1987). A baixa atividade metabólica associada à fotossíntese e à assimilação de carboidratos é, provavelmente, resultado da presença de alto nível de sacarose no meio, assim como a baixa intensidade de luz durante o cultivo *in vitro* (Capellades et al., 1990; Kozai et al., 1987).

A desordem estrutural nas plantas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura, que induzem à desordem estrutural e funcional das folhas. A conseqüência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas depois de transferidas para ambiente *ex vitro*. A compreensão dos vários fatores do meio de cultura é importante e conhecê-los pode fornecer instrumentos para o controle da morfogênese de plantas cultivadas *in vitro*, anterior à transferência para casa de vegetação (Ziv, 1987).

Considerando a importância do conhecimento das estruturas anatômicas para a definição de um protocolo para micropropagação de candeia, este estudo teve como objetivo comparar a estrutura interna de folhas desta espécie cultivadas *in vivo* e *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para as avaliações anatômicas foram utilizadas folhas do terceiro nó, do ápice para a base, de plântulas com 60 dias de cultivo *in vitro* e de plantas adultas cultivadas em área experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Sementes de candeia foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose em tubo de ensaio (25x150mm) vedado com tampa plástica e filme de PVC, acondicionado em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 25 μmol. m⁻². s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

O material vegetal proveniente de cultura de tecidos e o de ambiente natural foram fixados em álcool 70°GL. O estudo anatômico das folhas se baseou no exame microscópico de seções transversais do limbo foliar. Os cortes foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50%. O corante usado foi a mistura azul de astra-safranina, seguindo-se os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997).

A partir das seções transversais, com o auxílio de ocular micrométrica, foram efetuadas as medições. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX 60.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído de 5 repetições, correspondentes a cinco folhas oriundas de cinco plantas diferentes. Os tratamentos foram representados por duas condições de cultivo (*in vivo* e *in vitro*). Após a análise de variância, utilizou-se o teste Skott-Knott a 5%, para a comparação das médias entre tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio dos resultados obtidos na anatomia foliar comparada da candeia cultivada *in vivo* e *in vitro*, observaram-se diferenças significativas na espessura média das epidermes adaxial e abaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, assim como na espessura total do limbo foliar (Tabela 1).

TABELA 1. Espessura média (μm) das epidermes adaxial e abaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso e espessura total do limbo foliar de candeia cultivada *in vivo* e *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamentos	Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico (μm)	Parênquima esponjoso	Espessura total
<i>In vivo</i>	23,22 a	10,89 a	102,5 a	72,29 a	209,9 a
<i>In vitro</i>	11,17 b	10,35 b	44,17 b	60,11 b	125,77 b

Limbo foliar

De acordo com os resultados das medições realizadas nas seções transversais do limbo foliar, as epidermes adaxial e abaxial de plantas cultivadas *in vivo* apresentaram-se unisseriadas, com cutícula espessa e bem mais desenvolvida que as folhas provenientes de ambiente *in vitro*. Estas características conferem às plantas cultivadas em ambiente natural uma proteção extra contra a ação da radiação solar pelo reflexo dos raios solares, evitando um superaquecimento do citoplasma das células do mesofilo (Alquini et al., 2003).

No entanto, plântulas cultivadas *in vitro* apresentaram as epidermes menos espessas e uma pobre formação de cera epicuticular (Sutter, 1988) (Figura 1). É possível inferir que estas respostas podem estar relacionadas com a menor irradiância e temperatura proporcionada pela sala de crescimento. Resultados semelhantes foram observados por Nogueira (2003) e Lima (2004).

Segundo estes autores, as estruturas foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) e sangra d'água (*Croton urucurana*), respectivamente, desenvolvidas *in vivo*, apresentaram as epidermes adaxial e abaxial mais espessas em comparação às oriundas do cultivo *in vitro*. Em contrapartida, Souza (2003) e Santos (2001) verificaram que folhas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) e de cafeeiro (*Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã'), respectivamente, obtidas por meio de plântulas cultivadas *in vivo* eram menos espessas que as originárias do ambiente *in vitro*.

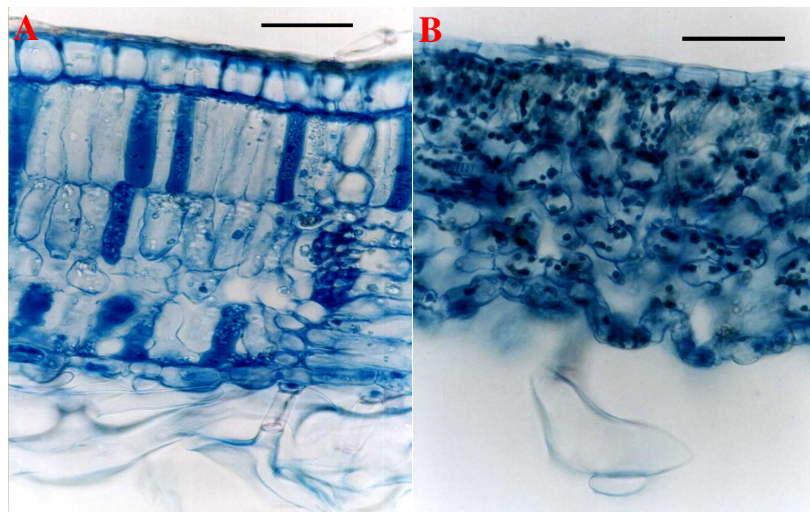


FIGURA 1. Seções transversais do limbo foliar de candeia em condições de cultivo *in vivo* (A) e *in vitro* (B). As barras nas figuras correspondem a 50 µm. UFLA, Lavras, MG, 2004.

O mesofilo das plantas de candeia cultivadas *in vivo* apresentou uma organização dorsiventral. O mesofilo apresentou-se constituído por duas camadas de células paliçádicas organizadas e justapostas e pelo parênquima esponjoso, formado por duas a três camadas de células. De acordo com Menezes

et al. (2003), em espécies com mesofilo dorsiventral, a grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico. Devido à forma e ao arranjo das células do paliçádico, os cloroplastos podem se dispor paralelamente às paredes das células, utilizando o máximo de luz e, conseqüentemente, aumentando a eficiência fotossintética. Outro importante fator que aumenta esta eficiência é a ampliação de um sistema de espaços intercelulares no mesofilo, já que facilita as trocas gasosas. Devido ao arranjo das células do mesofilo, grandes superfícies das células ficam expostas e entram em contato com o ar presente nos espaços intercelulares.

Em contrapartida, no mesofilo de plantas cultivadas *in vitro*, observou-se pouca diferenciação das células constituintes, sendo formado somente por uma camada de parênquima paliçádico e três a quatro camadas de células do parênquima esponjoso, com bastante espaços intercelulares. A excessiva perda de água que contribui para a dessecação das plantas após a transferência tem sido atribuída a diversas anormalidades induzidas pelas condições *in vitro* e uma delas é a reduzida diferenciação do mesofilo das folhas com alta proporção de espaços intercelulares (Capellades et al., 1990). A organização do mesofilo de plantas de ambiente *in vitro* apresentou-se bem menor que as cultivadas *in vivo*. Estes resultados estão em consonância com os obtidos por Fidelis (2000), nos quais o exame da seção histológica revelou que as folhas de plantas de mamacadeira (*Brosimum guadichaudii*) crescidas *in vitro* apresentaram-se menos espessadas, tinham um pobre desenvolvimento da camada paliçádica com um significativo espaço de ar no mesofilo, quando comparadas às plantas da casa de vegetação.

O grau de desenvolvimento da anatomia do mesofilo no limbo foliar de plantas de candeia cultivadas *in vitro* indicou que correções durante este processo de cultivo precisam ser realizadas de modo a promover uma maior diferenciação das células constituintes do mesofilo. Isso porque, sem um

aumento no desenvolvimento das estruturas anatômicas, a taxa de sobrevivência das plântulas no processo de aclimação poderá ser comprometida.

Nervura central

Os resultados obtidos a partir da nervura central das folhas de candeia, em ambos os ambientes de cultivo, indicaram que há grandes diferenças entre os sistemas vasculares (Figura 2). Em ambiente natural, estes apresentaram-se mais desenvolvidos e bastante diferenciados.

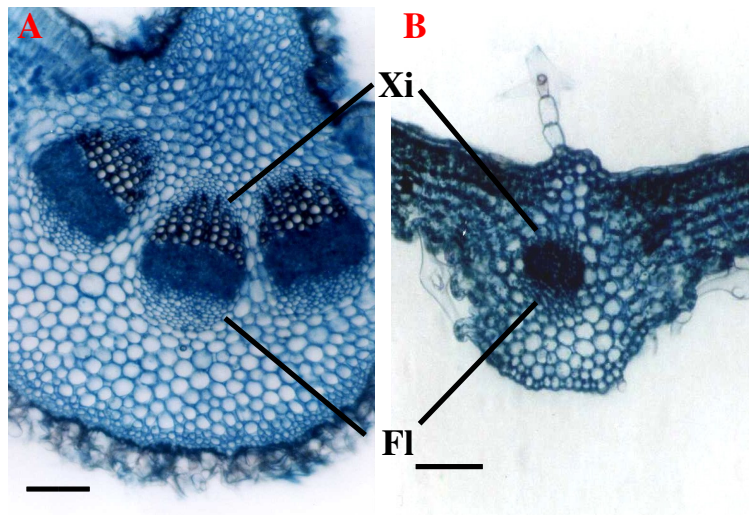


FIGURA 2. Seções transversais da nervura central das folhas de candeia em condições de cultivo *in vivo* (A) e *in vitro* (B), com destaque para o xilema (Xi) e floema (Fl). As barras nas figuras correspondem a 100 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Conforme apresentado na Figura 2, em plantas cultivadas *in vivo* foi verificada a presença de três feixes vasculares colaterais. As células do sistema vascular apresentaram-se em maior número em relação às obtidas *in vitro* e, devido à alta diferenciação, tornou-se possível a visualização destas que

apresentaram estruturas anatômicas mais arranjadas. Uma grande presença de tricomas também foi constatada em ambas epidermes (adaxial e abaxial).

Todavia, nas folhas oriundas do cultivo *in vitro*, somente um feixe vascular foi formado, com pouca diferenciação das células do sistema vascular. Estas se apresentaram em menor número que as verificadas *in vivo*. Estes resultados estão em consonância com os obtidos por Soares (2003) que, por meio das seções transversais da nervura mediana das folhas de ingazeiro (*Inga vera*) cultivadas *in vitro*, verificou a ocorrência de células dos vasos do xilema em menor número, tamanho e espessura que as células do xilema da nervura central de folhas cultivadas *in vivo*.

Souza (2003) reportou a ocorrência de maior número de feixes vasculares nas folhas de arnica (*Lychnophora pinaster*) de plantas aclimatadas e das provenientes do hábitat natural, em comparação com as que foram cultivadas *in vitro*.

Em relação à presença de estômatos nas epidermes das folhas cultivadas nos dois ambientes, as folhas provenientes do cultivo *in vivo* podem ser classificadas como hipoestomáticas, enquanto que as plântulas cultivadas *in vitro* são anfiestomáticas (Figura 3).

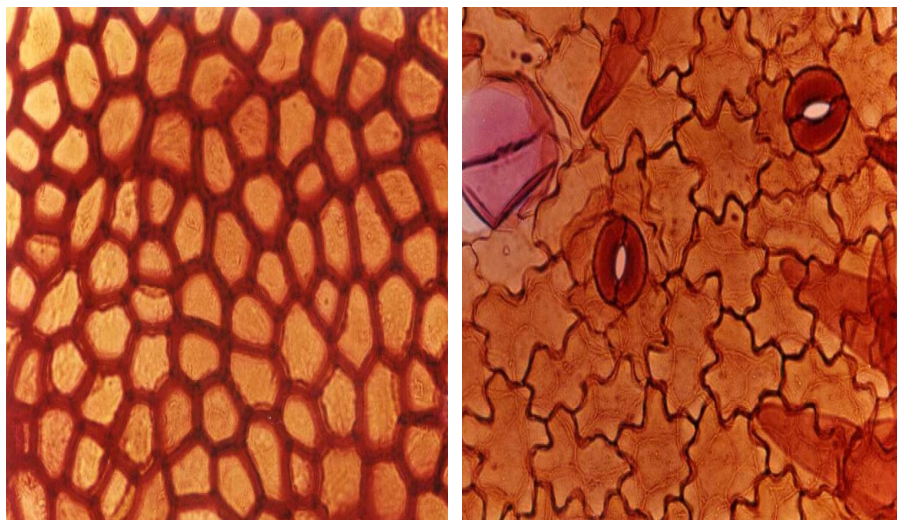


FIGURA 3. Epiderme adaxial de folhas de candeia cultivadas *in vivo* (A) e *in vitro* (B). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Não foi possível fazer a contagem do número de estômatos na epiderme abaxial das folhas advindas do ambiente natural, devido ao grande número de tricomas. Em folhas coletadas de plântulas cultivadas *in vitro*, os tricomas, apesar de estarem em menor número, também não tornaram possível a contagem dos estômatos na face abaxial. No entanto, foi realizada a contagem dos estômatos na epiderme adaxial de folhas provenientes de material cultivado *in vitro*, que apresentaram uma média de 56 estômatos/mm². A ocorrência de estômatos nas duas epidermes indica que o meio em que as plântulas estavam sendo cultivadas induziu esta formação como uma forma de adaptação da planta ao ambiente em que se encontrava. Como a umidade relativa dentro dos recipientes de cultivo *in vitro* encontra-se alta, provavelmente, estes estômatos estão relacionados com uma maior necessidade de estruturas que facilitem a entrada e saída de ar, assim como a saída de água no interior dos órgãos (Alquini et al., 2003).

Os estômatos verificados em plantas cultivadas *in vitro* apresentaram formato circular, indicando que estes estômatos são menos funcionais que os de formato elíptico. Estudos mencionam que a estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas apresentam grandes diferenças em relação às plantas que se desenvolveram em ambiente natural (Fráguas, 2003). Além dos estômatos, diferenças no formato das células também foram verificadas. O formato das células da epiderme *in vitro* exibiu-se sinuoso, enquanto que o das plantas oriundas do campo, sem sinuosidade.

6 CONCLUSÕES

As estruturas foliares de plantas provenientes do ambiente *in vivo* apresentaram epiderme unisseriada e cutícula espessa. O mesofilo organização dorsiventral e foi constituído por duas camadas de parênquima paliçádico organizado e justaposto, e duas a três camadas de parênquima esponjoso. A nervura central apresentou três feixes vasculares colaterais e a folha foi do tipo hipoestomática.

Em plantas cultivadas *in vitro*, foi verificada apenas uma camada de parênquima paliçádico (pouco desenvolvido) e três a quatro camadas de parênquima esponjoso, ainda pouco diferenciado. As epidermes apresentaram-se menos espessas que as oriundas do cultivo *in vivo* e houve pouca deposição de cera sobre a epiderme adaxial. Na nervura central apenas um feixe vascular foi formado e a folha foi do tipo anfiestomática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G. da; BARROS, C. F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 87-108.

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

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 (Doutorado de Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture I. Water loss and water related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edinburgh, v. 17, n. 1, p. 1-7, 1977.

GROUT, B. W. W.; DONKIN, M. E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture *in vivo* and at transplanting into soil. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 212, p. 323-327, 1987.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under higher photosynthetic photon fluxes on growth of tissue cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. In: DUCATÉ, G.; JACOB, M.; SIMEON, A. (Ed.). **Plant micropropagation in horticultural industries**. Liege: Press Universitaires, 1987. p. 47-54.

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

LIMA, E. C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* BAILL.)**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENEZES, N. L. de.; SILVA, D. da C.; PINNA, G. F. de A. M. de. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 301-325.

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.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

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. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.** 2003. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUTTER, E. G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American**

Society for Horticultural Science, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1988.

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