

56284
047993

ANA HORTÊNCIA FONSÊCA CASTRO

**ASPECTOS DA PROPAGAÇÃO, ECOFISIOLOGIA E FITOQUÍMICA
DE *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: UMA ESPÉCIE MEDICINAL
DO CERRADO**

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

Orientador

Prof. Dr. AMAURI ALVES DE ALVARENGA

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA
N.º CLAS. 7583.214

CAS

asp

N.º REGISTRO 6.56284
DATA 06/10/103

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



56284

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

Castro, Ana Hortência Fonsêca

Aspectos de propagação, ecofisiologia e fitoquímica de *Byrsonina verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do Cerrado / Ana Hortência Fonsêca Castro. -- Lavras : UFLA, 2003.

130 p. : il.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Murici. 2. *Byrsonina verbascifolia*. 3. Tanino. 4. Planta medicinal. 5. Fenilalanina amônia-liase. 6. Propagação. 7. Ecofisiologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.214

ANA HORTÊNCIA FONSECA CASTRO

**ASPECTOS DA PROPAGAÇÃO, ECOFISIOLOGIA E FITOQUÍMICA
DE *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: UMA ESPÉCIE MEDICINAL
DO CERRADO**

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

APROVADA em 03 de julho de 2003.

Prof. Dr^a. Angela Maria Sorares

UFLA

Pesq. Dr. Antônio Álvaro Corsetti Purcino

EMBRAPA Milho e Sorgo

Pesq^a. Dr^a. Maria Cláudia Marx Young

Instituto de Botânica/ SP

Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À Deus, pela força e serenidade nos momentos mais difíceis,
À memória de meu pai, Geraldo e pelo seu exemplo em vida,

OFEREÇO

À minha mãe Leila, por seu amor, sua dedicação e presença constante,
Aos meus sobrinhos Matheus, Lucas e Renan, pela alegria que me
proporcionam,
Ao Guilherme, por seu amor e carinho,

DEDICO

" Eu sou a terra, eu sou a vida,
Do meu barro primeiro veio o homem,
De mim veio a mulher e veio o amor,
Veio a árvore, veio a fonte,
Vem o fruto e vem a flor..."

(Cora Coralina, "O Cântico da Terra")

AGRADECIMENTOS

À Deus, por capacitar-me em todos os momentos da condução deste trabalho;

Aos meus familiares, pelo apoio e carinho constantes;

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade;

Ao Prof. Amauri Alves de Alvarenga, pela orientação, amizade e apoio;

À Prof.^a Angela Maria Soares, por sua orientação, amizade e valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

À Pesq.^a Dr.^a Maria Cláudia Marx Young, do Instituto de Botânica/SP, pela orientação, estímulo e amizade;

Ao Prof. Renato Paiva, pelo apoio, orientação e amizade no transcorrer de todo curso;

Ao Pesq. Dr. Antônio Álvaro C. Purcino, da EMBRAPA Milho e Sorgo, pela orientação e valiosas sugestões;

Ao Gui, pelo carinho, dedicação, amor e que apesar da distância, sempre esteve presente em todos os momentos desta caminhada;

Ao amigo e colega Rupert Barros, pela amizade, estímulo, companheirismo e auxílio nas várias etapas deste trabalho;

À amiga Eliana Alcântara, pela imensa ajuda na etapa experimental;

Ao Joel, pela eficiente e valiosa colaboração nos trabalhos de campo;

Aos funcionários e amigos do Setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade e companheirismo;

" À todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos..."

BIOGRAFIA

ANA HORTÊNCIA FONSÊCA CASTRO, filha de Maria Leila Fonseca Castro e Geraldo Miranda Castro, nasceu em 23 de setembro de 1967, em Lavras-MG. Graduiu-se em Farmácia, em 1988 e em Bioquímica, em 1989 pela Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA). Concluiu mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, pela Universidade Federal de Lavras, em junho de 1997. Em março de 2000, iniciou o curso de doutorado em Agronomia – Fisiologia Vegetal, concluindo-o em julho de 2003. Atualmente é docente dos cursos de Farmácia-Bioquímica do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS) e da Universidade Vale do Rio Verde (UNINCOR), onde é responsável pelas disciplinas Farmacobotânica e Farmacognosia.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii

CAPÍTULO I: Aspectos da propagação, ecofisiologia e fitoquímica de <i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do Cerrado	1
1 Introdução Geral	1
2 Referencial Teórico	2
2.1 O Meio Ambiente dos “Cerrados”: a vegetação, o clima e os solos	2
2.1.1 O Cerrado do Sul de Minas Gerais	7
2.2 Caracterização botânica e importância econômica do murici	9
2.3 Aspectos gerais dos taninos vegetais e da enzima fenilalanina amônia-liase	12
2.3.1 Taninos	13
2.3.2 Fenilalanina amônia-liase	19
2.4 Propagação de espécies através do cultivo “ <i>in vitro</i> ”	21
2.5 Influência do ambiente no desenvolvimento das espécies, na atividade da fenilalanina amônia-liase e na produção de taninos vegetais	24
3 Referências Bibliográficas	30

→ CAPÍTULO 2: Propagação do murici (<i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich. ex A. Juss.), através do cultivo “<i>in vitro</i>” de embriões	41
1 Resumo	41
2 Abstract	41
3 Introdução	42
4 Material e Métodos	45

4.1 Caracterização geral e obtenção das sementes	45
4.2 Teste de viabilidade das sementes	46
4.3 Condução do experimento	46
4.3.1 Assepsia do material vegetal e extração dos embriões	46
4.3.2 Efeito da sacarose e proporções de sais do meio MS, na germinação e na matéria seca total	46
4.3.3 Características avaliadas	47
4.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas	47
4.4.5 Aclimatização das plântulas produzidas “ <i>in vitro</i> ”	48
5 Resultados e Discussão	50
5.1 Viabilidade	50
5.2 Condições de cultivo	50
5.3 Efeito da sacarose	52
5.4 Efeito dos níveis de sais do meio MS	56
5.5 Aclimatização das plântulas obtidas a partir do cultivo de embriões “ <i>in vitro</i> ”	59
6 Conclusões	61
7 Referências Bibliográficas	61

CAPÍTULO 3: Trocas gasosas e relações hídricas no murici

(<i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich. ex A. Juss.)	66
1 Resumo	66
2 Abstract	66
3 Introdução	67
4 Material e Métodos	69
4.1 Condições experimentais	69
4.2 Características avaliadas	73
4.2.1 Trocas gasosas	73

4.2.1 Potencial hídrico foliar	74
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas	74
5 Resultados e Discussão	75
5.1 O Microclima	75
5.2 Potencial hídrico foliar	78
5.3 Trocas gasosas	81
6 Conclusões	89
7 Referências Bibliográficas	90
> CAPÍTULO IV: Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais no murici (<i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich. ex A. Juss.)	94
1 Resumo	94
2 Abstract	95
3 Introdução	95
4 Material e Métodos	98
4.1 Considerações gerais: época, localização do experimento e condições experimentais	98
4.2 Características avaliadas e reagentes utilizados	101
4.2.1 Características bioquímicas	101
4.2.2 Características fitoquímicas	102
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas	103
5 Resultados e Discussão	104
6 Conclusões	115
7 Referências Bibliográficas	116
ANEXOS	121

RESUMO

CASTRO, Ana Hortência Fonsêca. Aspectos da propagação, ecofisiologia e fitoquímica do murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.): uma espécie medicinal do Cerrado. 2003. 130 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) é uma espécie pertencente à família Malphigiaceae e apresenta-se amplamente distribuída pelas diferentes regiões do Cerrado brasileiro. É uma planta melífera, de grande valor econômico, devido ao seu potencial medicinal e alimentício. Para uso terapêutico utilizam-se a casca, ramos com folhas e frutos. A casca é adstringente e apresenta um teor de 15 a 20% de taninos, que além de ser o principal princípio ativo desta espécie, torna-a também importante na indústria do curtume. Sua propagação ocorre através de via sexuada, cujas sementes apresentam baixa percentagem de germinação. O desenvolvimento das plantas no campo é considerado de lento a moderado, não ultrapassando 1,5m aos 2 anos de idade. Fatores ambientais como água, luz e temperatura, entre outros, influenciam diretamente o crescimento, desenvolvimento e a produção vegetal, por promoverem alterações físicas e químicas no metabolismo. Hipóteses ecológicas, que tentam explicar as estratégias adaptativas das plantas, sugerem que a produção dos princípios ativos vegetais está relacionada a processos de crescimento ou diferenciação, regulados pela disponibilidade de recursos ambientais. Assim, pesquisas que investiguem o comportamento das espécies medicinais e a produção dos princípios ativos vegetais, em relação a diferentes fatores do ambiente físico, podem indicar condições adequadas de manejo que otimizem suas produções, proporcionando uma exploração mais racional do potencial medicinal dessas espécies. Neste contexto, este trabalho teve como propósitos principais estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro*, por via sexuada, visando a otimização da produção do murici em larga escala, avaliar o comportamento fisiológico de plantas já estabelecidas, frente a condições sazonais e caracterizar possíveis efeitos sazonais do ambiente físico na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis e taninos totais nesta espécie.

Comitê Orientador: Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Angela Maria Soares - UFLA e Maria Cláudia Marx Young - Instituto de Botânica/SP (Co-orientadoras).

ABSTRACT

CASTRO, Ana Hortência Fonsêca. Propagation aspects, ecophysiology and phytochemistry of murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.): a medicinal plant of Brazilian Cerrado. 2003. 130 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) is a species which belongs to Malphigiaceae family and is widely distributed throughout different regions of Brazilian Cerrado. It is a honey plant, with great economical value, due to its medicinal and food potential. Its bark, branches with leaves and fruits are used for therapeutic purposes. The bark is bitter and presents a content of 15 to 20% tannin, that besides being the main active principle of this species, becomes also important in the tannery industry. Its propagation occurs through sexual way, and the seeds present lower percentage of germination. The plant development in the field is considered slow to moderate, not exceeding 1,5 m height at 2 years of age. Environmental factors as water, light and temperature, besides other factors, influence directly the growth, development and vegetation production, since they promote physical and chemicals alterations in the metabolism. Ecological hypothesis, that explain the adapted strategies of plants, suggest that the production of vegetable active principles is related to the growth or differentiation processes, regulated by the availability of environmental resources. Thus, researches that investigate the behavior of medicinal species and the production of vegetable active principles related to different factors of physical environment, can indicate adequate conditions of management that optimize their production, providing a more reasonable exploitation of medicinal potential of these species. In this context, the objective of the present work was to establish a methodology of *in vitro* propagation, through seeds in order to optimize of murici production in a large scale; to evaluate physiological behavior of plants already established under seasonal conditions; and to characterize point out seasonal effects of physical environment in the phenylalanine ammonia-lyase activity as well as the total phenolic and tannin contents.

Guidance Committee: Amauri Alves de Alvarenga - UFLA (Adviser), Angela Maria Soares - UFLA and Maria Cláudia Marx Young - Instituto de Botânica/SP (Co-adviser).

CAPÍTULO 1: ASPECTOS DA PROPAGAÇÃO, ECOFISIOLOGIA E FITOQUÍMICA DE *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: UMA ESPÉCIE MEDICINAL DO CERRADO

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de espécies medicinais no tratamento de enfermidades e na recuperação da saúde é tão antiga quanto a própria história da humanidade. A fitoterapia, associada aos conhecimentos ligados à flora e suas propriedades curativas têm rompido barreiras, sendo transmitidos através de gerações.

Atualmente, tem-se observado uma crescente expansão na indústria de fitoterápicos, em decorrência de alguns fatores, como o alto custo dos medicamentos industrializados, a retomada da consciência ecológica, busca por medicamentos mais naturais e ao respaldo científico decorrente do avanço nas pesquisas com espécies medicinais, o que impulsionou a utilização mais segura das plantas. Entretanto, devido à exploração indiscriminada das espécies, algumas plantas utilizadas tradicionalmente têm desaparecido e o uso sustentado dos recursos naturais tem sido objeto de discussão pela comunidade científica.

O Brasil apresenta grande parte do seu território recoberto por diferentes espécies medicinais, distribuídas em vários ecossistemas. Estima-se que o Cerrado brasileiro contribua com 10.000 espécies de plantas, das 60.000 fanerógamas distribuídas pelo país. Destas, várias destacam-se pelo seu potencial econômico, sendo utilizadas na alimentação, na produção de madeira, como espécies ornamentais e na medicina popular, devido às suas propriedades medicinais, muitas delas, demonstradas em ensaios químicos e biológicos. Apesar deste inestimável potencial, o Cerrado tem sido pouco explorado em relação aos vários recursos disponíveis, principalmente no que diz respeito a muitos aspectos de sua flora medicinal, que ainda permanecem desconhecidos.

Investigações a respeito do comportamento das espécies medicinais, sob determinadas condições ambientais, podem acrescentar inestimável contribuição para a otimização na produção dos princípios ativos vegetais, em escala comercial, além de serem importantes para a preservação das espécies.

Entre a riqueza de espécies medicinais do Cerrado brasileiro, selecionou-se para este trabalho o “*murici*”, uma espécie de elevado potencial medicinal e nutritivo, podendo também ser utilizada como uma alternativa para a recuperação de áreas degradadas. Sua casca, utilizada tradicionalmente na medicina popular, é rica em tanino, princípio ativo adstringente, muito utilizado no tratamento de inflamações, queimaduras e como cicatrizante local. Entretanto, essa espécie apresenta como entrave para a sua produção em larga escala, a baixa percentagem de germinação de suas sementes e o desenvolvimento vegetativo lento das plantas em condições naturais.

Tendo em vista a dificuldade de propagação por via sexuada do murici e a hipótese de que as plantas desenvolvem um comportamento fisiológico, bioquímico e químico diferenciado, em resposta a variações sazonais no ambiente físico, este trabalho teve como objetivos principais estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro*, por via sexuada, visando a otimização da produção desta espécie em larga escala, avaliar o comportamento fisiológico de plantas em ambiente natural, em resposta a variações sazonais e caracterizar possíveis efeitos dessas variações na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis e taninos totais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 O Meio Ambiente dos “Cerrados”: *a vegetação, o clima e os solos*

O Cerrado brasileiro representa o segundo maior bioma do país em área, apenas superado pela Floresta Amazônica, sendo, aproximadamente, 25% do

nosso território coberto por esta vegetação (figura 1). Ocupa uma área de cerca de 2 milhões de Km², dos quais 90% encontram-se situados na região do Brasil Central, abrangendo os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Goiás e Bahia (figura 2) (Ribeiro & Walter, 1998; Rodrigues, 1998).



Figura 1: Tipos de vegetação do território brasileiro (Fonte: IBGE, 2002 - adaptado).

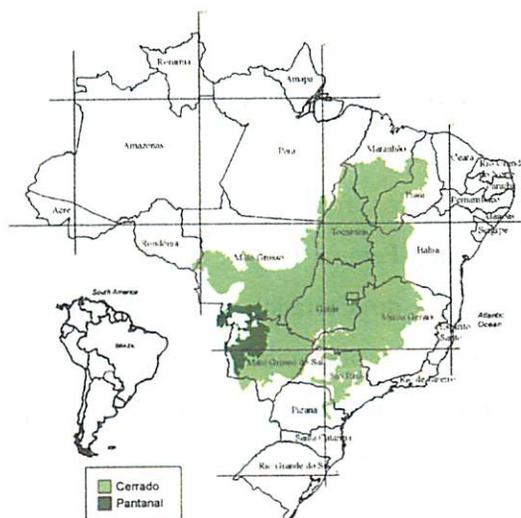


Figura 2: Distribuição das áreas de Cerrado no Brasil (Fonte: Fundação Biodiversitas, 2002 - adaptado).

Estende-se para fora do Brasil Central em manchas ao norte, cobrindo o sul do Maranhão e o norte do Piauí; a oeste, numa faixa estreita até Rondônia; para sul e sudeste, como uma série de áreas disjuntas, cobrindo aproximadamente 1/5 do Estado de São Paulo e metade do Estado de Minas Gerais. Ocorre também como áreas pequenas e disjuntas do Nordeste, entremeando a Caatinga ou ao longo da borda entre a Caatinga e Floresta Atlântica (Silva Júnior, 1984).

Segundo Rodrigues (1998), entende-se por Cerrado ou savana tropical, um tipo de cobertura vegetal bastante característico: uma vegetação rasteira, constituída principalmente por gramíneas, coexistindo com árvores e arbustos esparsos, baixos, tortuosos, de casca grossa, folhas largas e sistema radicular profundo. Para Ribeiro & Walter (1998), trata-se de um complexo vegetacional, que possui relações ecológicas e fisionômicas com outras Savanas da América Tropical e de continentes como a África e Austrália.

Neste complexo vegetacional, encontra-se uma grande variedade de sistemas ecológicos, variados tipos de solos, clima, relevo e altitude, prevalecendo em quase toda a sua extensão, uma combinação peculiar de condições edafo-climáticas, que deu origem à vegetação xeromorfa que a caracteriza (Veloso et al., 1991).

Baseado nos tipos fitofisionômicos que compõem o mosaico vegetacional do Cerrado, Pereira (1993) apresenta 5 tipos fitofisionômicos básicos para a vegetação do Cerrado: a) **Campo Sujo**: a forma de menor biomassa, muito aberta, com predomínio de gramíneas e espécies herbáceas, entremeada por arbustos e árvores muito espaçadas (o que dá o aspecto de campo sujo com árvores); b) **Campo Limpo**: campos revestidos maciçamente por gramíneas e outras espécies herbáceas, às vezes com pequenos arbustos muito afastados e ausência de árvores; c) **Campo Cerrado**: forma de Cerrado que ocorre em solos rasos, cascalentos, com composição florística

assemelhando-se à do Cerrado propriamente dita, sendo que a cobertura vegetal torna-se mais baixa, com árvores esparsas e muitos arbustos; d) **Cerrado *sensu stricto***: caracteriza-se pela presença de estratos arbóreo e arbustivo herbáceo definidos, com árvores distribuídas aleatoriamente pelo terreno, em diferentes densidades. Apresenta paisagem com árvores tortuosas, cascas grossas e gretadas, interrompida algumas vezes por uma outra árvore de porte mais ereto e emergente; e) **Cerradão**: tipo vegetacional peculiar, que difere do Cerrado propriamente dito pelo seu aspecto florestal, pois além de possuir maior densidade, as árvores não são tão ramificadas quanto neste.

Segundo Buschbacher (2000), este gradiente de formas fitofisionômicas do Cerrado é decorrente de fatores ambientais, que condicionam a ocorrência das espécies, tais como fatores físicos e químicos do solo (principalmente baixos teores de nutrientes e altos teores de alumínio), a geologia, condições topográficas, fatores climáticos, fogo e a intervenção humana. A natureza xeromórfica da vegetação do Cerrado, ainda é objeto de pesquisa, apesar de ter sido inicialmente relacionada à pobreza dos solos em elementos minerais (essenciais ao crescimento), alta acidez e excesso de alumínio, culminando na teoria do “escleromorfismo oligotrófico” de Arens (1958).

O clima das áreas de ocorrência do Cerrado brasileiro é bastante heterogêneo, sendo dividido por Azevedo & Caser (1980) em 5 sub-regiões: a) **Sub-região com influência amazônica**, mais quente e úmida (norte de Goiás e Mato Grosso e oeste do Maranhão); b) **Sub-região com influência do trópico semi-árido**, mais quente e seca (leste de Goiás, norte de Minas Gerais, Bahia e Piauí); c) **Sub-região de Cerrado em clímax**, constituída pela área nuclear da região; d) **Sub-região com influência austral continental**, mais fria e seca (Mato Grosso do Sul, sul de Goiás e norte de São Paulo); e) **Sub-região com influência austral atlântica**, mais fria e úmida (sul e sudoeste de Minas Gerais).

De acordo com Adámoli et al. (1986), o Cerrado caracteriza-se pela presença de invernos secos e verões chuvosos, um clima classificado como Aw, segundo a classificação climática de Köppen (tropical chuvoso, com duas estações bem definidas: seca (de abril a setembro) e chuvosa (de outubro a março), com precipitação média anual na ordem de 1500 mm, variando de 700 a 2000 mm. A temperatura média anual situa-se na faixa de 20 a 26°C, sendo a temperatura média do mês mais frio superior a 18°C (Ribeiro & Walter, 1998).

A heterogeneidade da região do cerrado também se manifesta na altimetria, com predominância de áreas de maior altitude nas partes central e sudeste, situando-se ao norte as áreas mais baixas. As áreas com altitudes abaixo de 300m constituem 22% da superfície da região do cerrado, áreas entre 300 e 900m constituem 73% e áreas acima de 900m constituem 5% (Adámoli et al., 1986). De acordo com Ribeiro & Walter (1998), o contraste entre as superfícies mais baixas (inferiores a 300m), as longas chapadas (entre 900 e 1600m) e a extensa distância em latitude, conferem ao Cerrado uma diversidade térmica bastante grande.

Segundo Ker & Resende (1996), as principais unidades de solos que ocorrem nas regiões de “cerrados” são os Latossolos, ocupando cerca de 46,06% do total. O solo do Cerrado se caracteriza por possuir baixa fertilidade, pH ácido e elevada saturação de alumínio. O alumínio é tóxico para a grande maioria das espécies cultivadas, promovendo a paralisação do sistema radicular e, conseqüentemente, prejudicando o desenvolvimento das plantas.

Apesar de ser um bioma pouco estudado, o Cerrado constitui uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, com um grau de endemismo significativo (Buschbacher, 2000). No entanto, a ocupação humana, estimulada por uma série de políticas desenvolvimentistas, tem transformado a região em uma paisagem fragmentada e em um ambiente onde predomina o sistema agropastoril. Segundo Buschbacher (2000), estudos recentes indicam que apenas

20% deste bioma ainda possui uma vegetação nativa, em estado relativamente intacto.

Nos anos 70, o Cerrado tornou-se motivo de preocupação para pesquisadores de órgãos e instituições privadas e governamentais, em relação à sua potencialidade. A EMBRAPA, através do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), vem desenvolvendo levantamentos de espécies medicinais do Cerrado, as quais estão sendo selecionadas para inclusão na lista de espécies prioritárias para conservação. Entre elas, citam-se alguns gêneros como *Brosimum*, *Byrsonima*, *Pterodon* e *Stryphnodendron*. Até o presente já foram reconhecidas e identificadas cerca de 200 a 250 espécies nativas das regiões dos cerrados, utilizadas pela população mais carente, com as seguintes finalidades: cicatrizantes, infecções do fígado e rins, emenagogo, doenças venéreas, contusões e pancadas, carminativas, diarreias, verminoses, afrodisíaco, bronquites, gripes, entre outras (Rodrigues, 1998).

2.1.1 O Cerrado do Sul de Minas Gerais

Aproximadamente, 17% da área do Cerrado brasileiro encontra-se em Minas Gerais e 53% da área do Estado (30,8 milhões de hectares) são recobertos por esta vegetação. Quase todo este Cerrado localiza-se a oeste, em sua maior parte e, em áreas disjuntas, no sudeste e sul do Estado (figura 3) (Carvalho, 1987; Rodrigues & Carvalho, 2001).

Segundo Azevedo & Caser (1980), o sul e o sudeste de Minas Gerais estão sob a influência austral Atlântica, com um clima mais frio e úmido. Pela classificação de Köppen, a região apresenta o clima Cw (temperado chuvoso), macrotérmico, com inverno seco, com variações entre Cwa (subtropical) e Cwb (temperado propriamente dito), devido a alterações de temperatura (Carvalho, 1987). De acordo com Rodrigues & Carvalho (2001), o clima predominante na

região é tropical de altitude, com temperatura média anual variando de 19-21°C e com precipitação anual entre 1200 a 1500 mm.

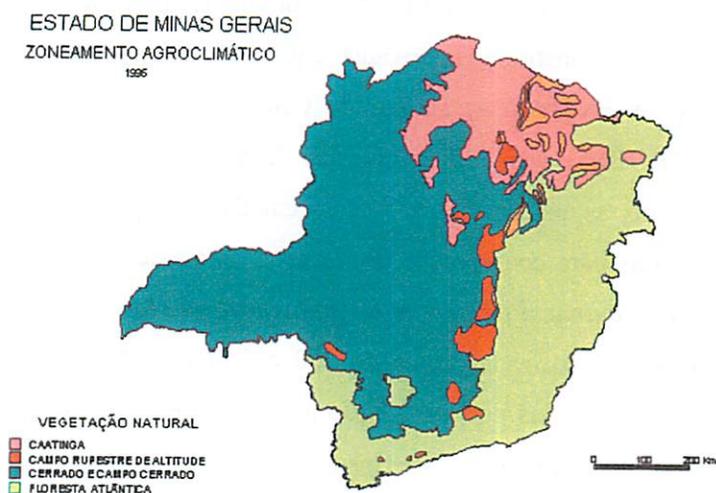


Figura 3: Localização das áreas de Cerrado no Estado de Minas Gerais (Fonte: SEA, 1996 - adaptado).

Dentre os solos que predominam na região, destacam-se os solos Litóticos, Cambissolos, Podzólicos vermelho-amarelo, Latossolos vermelho-amarelo, Hidromórficos e Aluviais (Rodrigues & Carvalho, 2001). Ainda, de acordo com esses mesmos autores, a região apresenta vegetação bem diversificada, com formações florestais, constituídas por prolongamentos da Floresta Atlântica através do Planalto Central, formações campestres e formações antrópicas. Segundo Carvalho (1987), o Cerrado aparece na região, sob a forma de manchas, condicionadas pela ocorrência de solos mais arenosos e profundos. Apresenta gradações que vão desde cerradões, passando pelos cerrados, até os campos limpos.

2.2 Caracterização botânica e importância econômica do murici

O murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) é uma espécie pertencente à família Malpighiaceae, sendo também conhecida como murici-cascudo, douradinha-falsa, mirici, muricizinho, orelha-de-burro, orelha-de-veado e semaneira (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1998; Rodrigues & Carvalho, 2001). Segundo Barroso (1991), a família Malpighiaceae é constituída por aproximadamente 63 gêneros, que abrangem uma média de 800 espécies. No Brasil ocorrem 32 gêneros, com aproximadamente 300 espécies, distribuídas nas diferentes regiões. O gênero *Byrsonima* ocorre principalmente nas regiões de cerrado, cerradão e campo cerrado, sendo distribuído pelos Estados de Alagoas, Amapá, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, São Paulo e Tocantins (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1998).

O murici é uma planta perene e arbustiva, medindo de 3 a 4m de altura, com reprodução por sementes (Silva et al., 1994). Apresenta tronco muitas vezes torto e ramificado, com a casca espessa e muito fragmentada. Suas folhas são opostas, obovadas agudas, simples, inteiras, curto-pecioladas, com superfície densamente pilosa, em ambas as faces, com 14-20cm de comprimento e 6 a 12cm de largura. Apresenta inflorescências axilares e terminais, em racemos densos, com muitas flores de coloração amarela (figura 4). Seu período de floração ocorre entre os meses de setembro a novembro e esporadicamente em outras épocas (Barros, 1992; Lorenzi, 1998). O fruto é do tipo drupa, com aproximadamente 1,3 a 1,5 cm de diâmetro e amarelo; mesocarpo caroso e fino; núculeo constituído de 1 a 3 lóculos, com aproximadamente 6mm de diâmetro, adnatas ao endocarpo (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1998) (figura 5). O embrião é do tipo circinado, ou seja, cilíndrico, enrolado em espiral (Barroso,

1991). De acordo com Silva et al. (1994), encontram-se, aproximadamente, 100 a 500 frutos por planta, pesando de 1 a 4g por fruto.

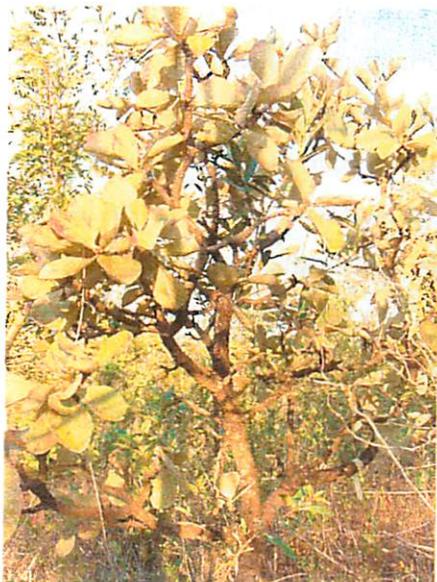


Figura 4: Aspecto geral do murici na área experimental. Ijaci, MG. 2002.



Figura 5: Frutos e sementes de murici. A) 1. Frutos; 2. Endocarpos esclerificados; 3. Sementes. B) 1. Endocarpio esclerificado; 2. Endocarpio rompido mostrando as sementes no interior; 3. Sementes. UFLA. Lavras, MG. 2002.

É uma planta melífera e, para uso medicinal, utilizam-se a casca, ramos com folhas e frutos (Almeida et al., 1998; Rodrigues & Carvalho, 2001). A casca é adstringente e apresenta um teor de 15 a 20% de taninos que, além de ser o principal princípio ativo desta espécie, torna-a também importante na indústria de curtume (Silva Filho, 1992; Almeida et al., 1998). Segundo Silva Filho (1992), na tinturaria, a casca é usada na extração de um corante preto, utilizado no tingimento de tecidos, conferindo cor cinzenta ao algodão. Na alimentação, o fruto de sabor agridoce, lembrando o marolo, é comestível ao natural e usado na fabricação de doces, licores, sucos e sorvetes. Sua madeira é amarela ou avermelhada, acetinada e brilhante, própria para a construção civil e marcenaria de luxo (Almeida et al., 1998).

Raras são as informações sobre a propagação de *Byrsonima verbascifolia*, assim como de outras espécies do gênero *Byrsonima*. De acordo com Lorenzi (1998), a propagação do murici se faz por via sexuada, cujas sementes apresentam baixa percentagem de germinação. As sementes são obtidas através de frutos colhidos diretamente das árvores, quando do início da queda espontânea ou recolhidos do chão, após a queda. Em seguida, devem ser deixados amontoados em sacos plásticos, até a decomposição parcial da polpa, visando facilitar a remoção da semente, através da lavagem em água corrente. Logo após a coleta e processamento do fruto, as sementes devem ser colocadas para germinar em canteiros a pleno sol, com substrato arenoso. A emergência ocorre entre 4 a 9 semanas. O desenvolvimento das plantas no campo é considerado lento a moderado, não ultrapassando 1,5 m aos 2 anos.

A frutificação ocorre de novembro a fevereiro, podendo ocorrer esporadicamente em outras épocas. A produção de frutos é irregular e alta. Contudo, os frutos caem facilmente quando maduros, sendo comestíveis e muito apreciado por pássaros (Silva et al., 1994; Almeida et al., 1998).

Várias são as propriedades terapêuticas atribuídas a *Byrsonima verbascifolia*. A casca é anti-febrífuga e adstringente, sendo tóxica em doses elevadas, os ramos com folhas possuem atividade anti-sifilítica, diurética e emética e os frutos, se ingeridos com açúcar, constituem um laxante brando, além de serem utilizados no combate de tosses e bronquites (Almeida et al., 1998; Rodrigues & Carvalho, 2001).

2.3 Aspectos gerais dos taninos vegetais e da enzima fenilalanina amônia-liase

As plantas geralmente produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, que exercem funções vitais em seu organismo, participando de processos básicos como a divisão celular, crescimento, respiração, armazenamento de substâncias e reprodução. Tais substâncias são denominadas metabólitos primários e têm sido exaustivamente estudadas (Bourgaud et al., 2001). Além destas, outras substâncias são produzidas, geralmente em quantidades menores que 1% da fitomassa. Estas substâncias apresentam papéis biológicos tão importantes quanto ao dos metabólitos primários, sendo definidas como metabólitos secundários (Dey & Harborne, 1997).

Segundo Harborne (1999), os metabólitos secundários são geralmente classificados de acordo com suas rotas biossintéticas. Três grandes classes são normalmente consideradas: os compostos fenólicos, os terpenos e esteróides e os alcalóides, os quais apresentam distribuição restrita no reino vegetal, o que constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química. De acordo com Bourgaud et al. (2001), os produtos secundários apresentam um papel importante na adaptação das plantas ao seu ambiente, atuando como defesas químicas, aleloquímicos, antioxidantes e protetores foliares, além de representarem uma importante fonte de produtos farmacologicamente ativos.

Levantamentos recentes, realizados em países ocidentais têm mostrado que 25% das moléculas utilizadas na indústria farmacêutica são naturais e de origem vegetal.

De acordo com Harborne (1999), dentre a ampla variedade de metabólitos secundários, vários contêm pelo menos um grupo fenólico. Estas substâncias, classificadas como compostos fenólicos, representam um grupo bastante heterogêneo e desempenham uma variedade de funções químicas nas plantas.

2.3.1 Taninos

Os taninos são substâncias polifenólicas, solúveis em água, com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton, os quais apresentam a capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatinas e outras proteínas (Santos et al., 2000). São substâncias com sabor adstringente e que têm a capacidade de curtir o couro, processo este conhecido como tanização.

Os taninos são substâncias amplamente encontradas no reino vegetal. Para Perevolotsky (1994), aproximadamente 80% das dicotiledôneas lenhosas perenes conhecidas contêm taninos, os quais localizam-se em folhas, frutos, raízes, sementes e especialmente na casca. Sua proporção nos vegetais é considerável, variando, contudo, em diferentes espécies do mesmo gênero (Matos & Matos, 1989). Nas células vegetais estão localizados separadamente das proteínas e enzimas do citoplasma, dissolvidos no interior dos vacúolos e geralmente contribuem para a adstringência dos alimentos e também para reações de escurecimento enzimático (Parra Pozo, 1997).

Segundo Aerts et al. (1999), os taninos são substâncias não cristalizáveis, difíceis de se separar, formam soluções coloidais na presença de água e apresentam reação ácida e forte sabor adstringente. Provocam a precipitação de soluções de gelatina e de alcalóides; com sais férricos formam

compostos solúveis, de coloração azul-escuro ou preto esverdeado; com o ferricianeto de potássio e amônia, produzem cor vermelho-escuro. Na presença de sais de cobre, chumbo e estanho, bem como solução forte de dicromato de potássio aquoso (ou 1% de ácido crômico), os taninos são precipitados.

Haslam (1996) relata que, na medicina tradicional são bastante utilizados como antídoto no caso de envenenamento por alcalóides, no tratamento de queimaduras, na forma de solução aquosa e nas infecções intestinais, pela sua ação adstringente. Possuem também propriedades hemostáticas nas hemorragias de origem capilar, por precipitarem as proteínas do soro, formando coágulos. Vários grupos têm investigado as atividades farmacológica e biológica dos taninos, utilizando-se de testes *in vitro* realizados com extratos ricos nestas substâncias. Dentre estas atividades podem-se citar: ação bactericida (Evans et al., 2002), ação fungicida (Scalbert, 1991), ação antiviral (De Bruyne et al., 1999), ação anti-protozoária (Otshudi et al., 2000), ação anticarcinogênica e anti-oxidante (Chung et al., 1998).

Os taninos vegetais são classificados em duas grandes categorias: os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados (figura 6A) são oligômeros e polímeros formados pela polimerização oxidativa de duas ou mais unidades dos difenilpropanóides flavan-3-ol (catequina) ou flavan-3,4-diol (leucoantocianidina), que se unem por meio de ligações carbono-carbono (De Bruyne et al., 1999). Esta classe de taninos é também denominada de proantocianidina e mais recentemente, poliflavonóides (Schofield et al., 2001). Para De Bruyne et al. (1999), os taninos condensados, ao serem aquecidos na presença de ácidos minerais fortes, são oxidativamente despolimerizados, formando pigmentos antocianidínicos e outros produtos não bem caracterizados, tais como os taninos vermelhos.

Os taninos hidrolisáveis (figura 6B) são compostos de ácido gálico ou de sua condensação, produzindo o ácido elágico, que também constitui uma

unidade básica, e que se encontram estereificados a grupos hidroxilas da glucose. São hidrolisáveis por enzimas ou ácidos, produzindo como produtos um açúcar, um álcool poliídrico e um ácido. Os taninos hidrolizáveis são divididos em dois tipos: os galotaninos e os elagitaninos. Ambos os tipos possuem carboidratos, tipicamente a glucose; porém, os que contêm ácido gálico são definidos, freqüentemente, como galotaninos e, quando contêm, além do ácido gálico, um ácido elágico, são chamados elagitaninos (Müller-Harvey, 2001).

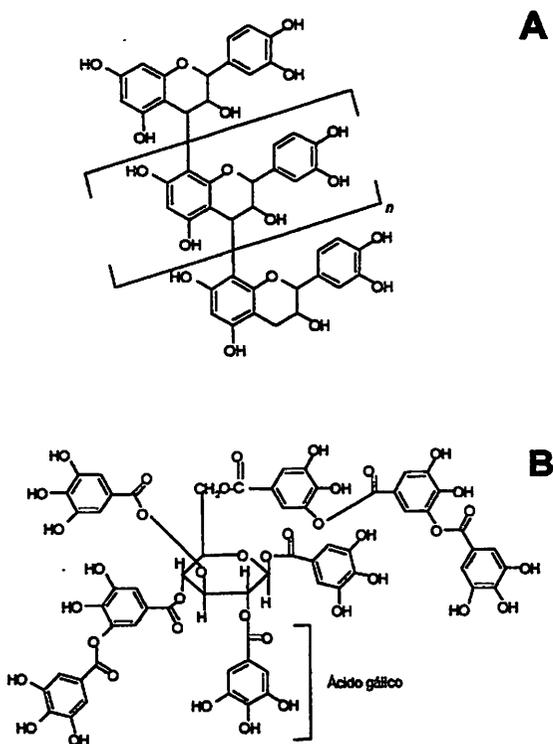


Figura 6: Estrutura geral de um tanino condensado (A), onde n é usualmente 1-10. (B) Tanino hidrolisável, consistindo de glucose e 8 moléculas de ácido gálico (adaptado de Taiz & Zeiger, 1998).

Segundo Mehansho et al. (1987), as plantas possuem, simultaneamente, taninos hidrolizáveis e condensados, mas com o predomínio de um deles. A quantidade relativa de taninos varia de acordo com o órgão, idade e estágio de desenvolvimento da planta.

Para De Bruyne et al. (1999), os taninos, assim como quase todos os compostos fenólicos, derivam-se de um intermediário biossintético comum, a fenilalanina ou de seu precursor ácido shiquímico, produzidos através da rota do shiquimato (figura 7). Esta rota promove a conversão dos carboidratos precursores D-eritrose-4-fosfato e do ácido fosfoenol pirúvico (PEP), nos aminoácidos aromáticos fenilalanina ou tirosina e está presente em vegetais, fungos e bactérias, porém, não é encontrada em animais (Taiz & Zeiger, 1998).

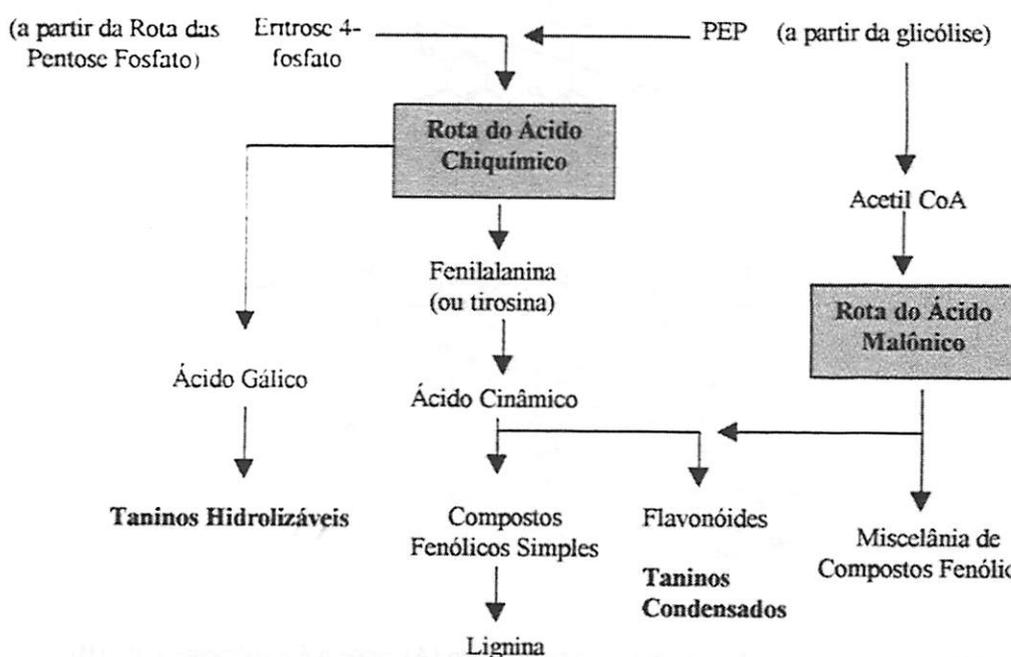


Figura 7: Os fenólicos vegetais são biossintetizados através de diferentes caminhos. Em vegetais superiores muitos fenólicos são derivados, pelo menos em parte da fenilalanina, via rota do ácido shiquímico (adaptado de Taiz & Zeiger, 1991).

Os taninos condensados apresentam, como precursor básico, o ácido trans-cinâmico, um fenilpropanóide produzido pela desaminação da fenilalanina, reação esta catalizada pela enzima fenilalanina-amônia-liase. A partir da produção do ácido trans-cinâmico, uma cascata de reações leva à síntese de diferentes compostos fenólicos vegetais, incluindo os taninos condensados (Aerts et al., 1999). Os taninos hidrolisáveis são derivados diretos do ácido gálico, que apresenta como precursor básico a fenilalanina. Entretanto, o mecanismo exato da reação de síntese do ácido gálico a partir da fenilalanina ainda é questionável (Santos et al., 2000).

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

Os métodos colorimétricos são amplamente utilizados devido à sua simplicidade e alta sensibilidade. Nesta classe incluem-se os métodos de Folin-Denis (Folin & Denis, 1915), Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927) e Prince-Butler (Prince & Butler, 1977) para a determinação de fenóis totais. Entretanto, Hagerman (1987) relata que estes métodos não são específicos e não distinguem fenóis de baixo peso molecular. Para Müeller-Harvey (2001), os testes colorimétricos devem ser utilizados somente para comparações semi-quantitativas. Os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu fundamentam-se na redução de uma mistura dos ácidos fosfomolibidico-fosfotúngstico, em solução alcalina, pelos fenóis totais presentes na amostra vegetal, resultando na formação de um cromóforo azul representado pelo complexo fosfomolibidato/fosfotungstato, de estrutura ainda não definida, que é quantificado por espectrofotometria.

Os métodos gravimétricos apresentam a vantagem de não necessitarem de padrões. Entretanto, são menos sensíveis que os métodos colorimétricos

comuns, além de serem específicos somente para fenóis totais (Parra Pozo, 1997).

Vários métodos físico-químicos também têm sido desenvolvidos para se quantificar taninos vegetais. Segundo Parra Pozo (1997), estes métodos baseiam-se na precipitação de proteínas por taninos presentes nos extratos vegetais. Um dos métodos físico-químicos mais utilizados para a quantificação de taninos em extratos vegetais é o Método da Difusão Radial, descrito por Hagerman (1987). Neste método, o extrato é aplicado em cavidades feitas em um gel de agarose, adicionado de proteína (BSA). A medida que os taninos difundem-se no gel, vão se complexando com a albumina, desenvolvendo um halo de precipitação. A área do halo é proporcional à quantidade de tanino no extrato. A área obtida é comparada com uma curva padrão, preparada a partir de soluções de ácido tânico de concentrações conhecidas. Segundo Hagerman (1987), este método é simples, sensível e específico, podendo ser aplicado, especialmente, em estudos envolvendo um grande número de amostras.

Atualmente, além dos métodos usuais para o doseamento de taninos, outros têm sido descritos como a Espectrofotometria no UV, Cromatografia líquido-gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase normal e fase reversa (Salminen et al., 1999; Müller-Harvey, 2001). Informações estruturais para identificação de taninos podem ser obtidas, utilizando-se métodos como Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear e Hidrólise Química (Hammerstone et al., 1999).

Independente do método de análise empregado para a quantificação dos taninos, cuidados especiais devem ser tomados em relação ao preparo da amostra do material vegetal e ao processo de extração. Segundo Santos et al. (2000), em geral, os taninos não devem ser analisados em tecidos frescos, sendo indispensável a secagem do material. A secagem ao sol ou em estufa, com temperaturas iguais ou superiores a 70°C, assim como aquelas realizadas ao ar, à

sombra ou à temperatura ambiente devem ser evitadas, pois diminuem consideravelmente a concentração de taninos e outros fenólicos na amostra vegetal. O método mais indicado é a liofilização, pois além de preservar os taninos, aumenta o seu rendimento na amostra. Os solventes mais recomendados nos processos de extração são metanol:água (com aquecimento ou à temperatura ambiente), metanol:ácido e acetona:água. A utilização de acetona apresenta dois inconvenientes: o bloqueio na associação tanino:proteína, o que normalmente não ocorre com o metanol e a redução na estabilidade dos taninos.

2.3.2 Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) é uma enzima chave e regulatória da rota biossintética dos fenilpropanóides e de seus derivados. Ela catalisa a transformação por desaminação do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico, sem o requerimento de cofatores (figura 8), sendo este o primeiro passo para a biossíntese dos fenólicos vegetais (Bekeblia, 2000; Santiago et al., 2000; Assis et al., 2001).

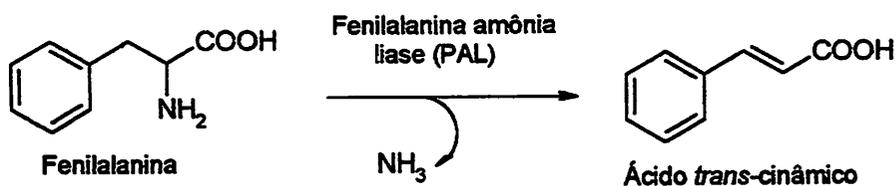


Figura 8: A desaminação da fenilalanina a ácido trans-cinâmico (adaptado de Taiz & Zeiger, 1998).

O ácido trans-cinâmico produzido é o precursor direto de uma ampla variedade de compostos fenólicos como os taninos, flavonóides, lignina,

cumarinas e fenilpropanóides (Saltviet et al., 2000) Estudos recentes, realizados com plantas transgênicas têm mostrado que a atividade desta enzima é um dos principais pontos de controle na regulação da rota dos fenilpropanóides (Sarma et al., 1998).

A fenilalanina amônia-liase tem sido isolada de várias fontes, desde que foi purificada inicialmente por Koukol & Conn (1961). Sua presença pode ser observada em uma ampla variedade de plantas superiores e fungos, mas não em tecidos animais (Kim et al., 1996). Métodos de imunolocalização, realizados em tecidos de *Populus kitakamiensis* têm revelado a presença desta proteína, especificamente em fibras do xilema e floema (Osakabe et al., 1996). Em *Phyllanthus tenellus*, Santiago et al. (2000), demonstraram através de estudos imunocitoquímicos, a síntese desta enzima no citoplasma e em cloroplastos de células esponjosas e em paliçada do mesofilo foliar.

Segundo Sarma et al. (1998), em várias espécies vegetais como *Arabidopsis*, feijão, ervilha, salsa, arroz e tomate, a fenilalanina amônia-liase é codificada por uma pequena família multigênica. Para Kumar & Ellis (2001), sendo esta uma enzima chave, a expressão do gene *pal* é regulada por diversos fatores como injúrias mecânicas, infecções, ambiente e estágio de desenvolvimento da planta.

De acordo com Camm & Towers (1973), em um determinado tecido, os níveis desta enzima podem flutuar significativamente, em intervalos relativamente curtos, em resposta a uma ampla variedade de estímulos. O concomitante aumento nos níveis de fenilalanina amônia-liase e de compostos fenólicos tem sido demonstrado em muitas plantas e tecidos vegetais. Vários trabalhos descrevem a regulação da atividade desta enzima por uma ampla variedade de fatores abióticos e bióticos. Dentre estes fatores destacam-se o fotoperíodo, fitocromo, alagamento, mudanças de temperatura, radiação UV, deficiência de nutrientes, tratamento com herbicidas, reguladores de

crescimento, injúrias mecânicas, íons metálicos, infecções fúngicas, virais e ataque de insetos (Bekeblia, 2000; Santiago et al., 2000; Saltveit, 2000; Assis et al., 2001; Rivero et al., 2001), bem como o estágio de desenvolvimento vegetal e o grau de diferenciação de células e tecidos (Solecka & Kacperska, 1995).

Segundo Margna (1977), o acúmulo de polifenóis derivados da fenilalanina, é considerado, geralmente, como um processo controlado em nível enzimático. Entretanto, sob condições fisiológicas, normalmente presentes na célula vegetal, este parece não ser sempre o principal fator limitante. Dados experimentais disponíveis sugerem que o acúmulo de fenilpropanóides pode também ser controlado por outros mecanismos celulares, não diretamente relacionados com a atividade catalítica das enzimas envolvidas.

2.4 Propagação de espécies através do cultivo *in vitro*

Entre os diversos problemas apresentados por espécies economicamente viáveis, destacam-se aqueles referentes à sua propagação. Pesquisas relacionadas à propagação *in vitro* de espécies com interesse econômico e, em especial, com potencial medicinal, têm-se mostrado cada vez mais promissoras. Segundo Melo (2000), através desta técnica, as dificuldades de propagação podem ser minimizadas, permitindo a multiplicação rápida das plantas, seleção precoce de material superior, produção de plântulas em larga escala e uso de pequeno espaço físico, sendo por isto, uma tecnologia adequada para culturas de ciclo longo, visando a produção de mudas para matrizes e plantios comerciais.

Segundo Oliveira (2001), em cultura de tecidos, o cultivo de embriões *in vitro* é um método de propagação muito utilizado para várias culturas de interesse econômico, como suporte a programas de melhoramento genético e para a propagação comercial. Este método baseia-se no fato de que os embriões podem ser retirados das sementes e transferidos para um meio de cultura

contendo nutrientes apropriados e em concentrações adequadas, onde sofrem desdiferenciação e, posterior diferenciação, obtendo-se plântulas inteiras (Sacchi, 1985).

O primeiro trabalho com cultura de embriões foi realizado por Hanning, em 1904 (Hu & Wang, 1986), com a produção de plântulas a partir de embriões de crucíferas. Este trabalho pioneiro forneceu informações para a identificação dos fatores que controlam o crescimento de embriões cultivados.

De acordo com George (1996), o cultivo de embriões consiste no isolamento estéril e no crescimento de um embrião maduro ou imaturo *in vitro*, com o objetivo de se obter uma planta viável. Entre as várias potencialidades desta técnica, destacam-se a superação da dormência de sementes, estudo de problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos de embriões em vários estádios de desenvolvimento, recuperação de embriões híbridos abortivos, oriundos de cruzamentos incompatíveis, produção de novas plantas em curto espaço de tempo e propagação vegetativa, devido a sua natureza juvenil (Andreoli, 1985; Pierik, 1990; George, 1996).

Segundo Illg (1986), o embrião, proveniente de um processo normal de fecundação, pode ser facilmente separado e cultivado, sob condições assépticas em um meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável e produzindo descendentes. Segundo Andreoli (1986), o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo, quando se utiliza o embrião como explante, uma vez que este encontra-se alojado em um ambiente estéril. Desta maneira, a desinfestação direta do embrião não é necessária, bastando apenas a desinfestação da superfície externa da semente, a não ser que esta superfície esteja rachada ou haja a presença de patógenos.

Pierik (1990) sugere que uma vantagem adicional do uso de embriões e de folhas jovens, como explantes para a cultura de tecidos vegetais é a não

destruição das plantas matrizes e a eficiência na propagação de algumas espécies.

Um dos aspectos mais importantes da cultura de embriões é a seleção correta do meio nutritivo, que estimule o desenvolvimento dos mesmos (George, 1996). Segundo Oliveira (2001), o meio de cultura adequado, tanto para propagação, quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Para Andreoli (1985), diferentes meios podem ser utilizados para manter as culturas de embriões, mas o mais frequentemente utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962), originalmente desenvolvido para o cultivo de calos de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). A concentração dos nutrientes do meio MS é geralmente considerada elevada e, em função disto, muitas modificações têm sido estudadas com o objetivo de reduzir os níveis dos nutrientes, permitindo assim maior adaptação de cultivos *in vitro* (Samartin, 1989). Por outro lado, segundo Krikorian (1991), a alta salinidade do MS é eficiente para cultivos que exigem concentrações mais elevadas de íons.

De acordo com George (1996), em geral, o desenvolvimento de embriões maduros *in vitro* ocorrem em meios nutritivos simples, compostos de sais minerais, vitaminas e açúcares. No caso dos embriões imaturos, entretanto, é necessário um meio mais completo, contendo, além dos componentes acima mencionados, substâncias reguladoras de crescimento, compostos orgânicos e extratos naturais. A exigência em sacarose é variável em função do estágio de maturação dos embriões (Hu & Wang, 1986), onde os imaturos exigem maiores concentrações (Saravitz & Raper, 1995). Pierik (1990) sugere que os embriões maduros sejam cultivados em meios contendo de 2 a 3% de sacarose e os imaturos, 8 a 12%. Segundo Hu & Wang (1986), os embriões excisados maduros ou quase maduros são autotróficos, ou seja, são capazes de germinar em meio simples, sem suprimento adicional de sacarose.

De acordo com Pierik (1990), os reguladores de crescimento não são requeridos na cultura de embriões maduros. Entretanto, para embriões muito jovens de algumas espécies, os reguladores são adicionados para suprir a germinação precoce ou estimular seu crescimento. George (1996) relata que altas concentrações de auxinas induzem a formação do embrião, porém o seu desenvolvimento ocorre sob baixas concentrações de auxinas. As giberelinas atuam no processo de germinação, quebra de dormência e crescimento de embriões. Vários trabalhos mostram o efeito positivo das giberelinas quando adicionadas ao meio, proporcionando a iniciação e o desenvolvimento da zona meristemática radicular e ainda estimulando o desenvolvimento da radícula já existente (Saravitz & Raper, 1995).

Segundo Andreoli (1985) e George (1996) vários parâmetros afetam a cultura de embriões, citando-se o genótipo, estágio de desenvolvimento do embrião no isolamento, condições de crescimento da planta mãe, composição do meio de cultivo, liberação de substâncias fenólicas no meio, remoção inadequada do embrião, além da luz e temperatura.

2.5 Influência do ambiente no desenvolvimento das espécies, na atividade da fenilalanina amônia-liase e na produção de taninos vegetais

Para Wilkinson (1994), as respostas das plantas ao ambiente têm sido um paradigma para o milênio. Estas respostas podem ser avaliadas através de estudos ecofisiológicos, os quais permitem compreender os mecanismos utilizados pelas plantas para sua sobrevivência e reprodução em seu ambiente natural (Caldwell & Percy, 1994).

Segundo Abrams & Mostoller (1995), os estudos ecofisiológicos, em geral, são conduzidos de maneira a verificar-se as respostas das plantas ligadas a

um fator ambiental isolado, enquanto que poucos estudos têm sido feitos sobre a variação fenotípica em relação a múltiplos estresses, os quais são responsáveis por concomitantes respostas nas plantas. Estes múltiplos fatores de estresse, também denominados fatores limitantes (Caldwell & Percy, 1994), possuem valor no diagnóstico das causas que levam a uma baixa produtividade da espécie em questão. A utilização de informações isoladas é complicada por alguns fatores como a interação entre respostas e a variabilidade do ambiente natural (Jones, 1992).

No Cerrado, as variações climáticas são caracterizadas principalmente pela distinção entre a estação chuvosa e a estação seca. Antes ou durante a seca, ocorre a queda de folhas, em maior ou menor grau, dependendo da espécie e tipo de solo. Há um período que coincide, ou que vem imediatamente após a abscisão foliar, de paralisação das atividades de crescimento da maioria destas espécies (Barros & Caldas, 1980).

Para Souza (1999), a deficiência hídrica é um dos principais fatores responsáveis pela limitação do crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas. Este estresse se desenvolve quando a perda de água excede a absorção, em intensidade suficiente para causar, entre outros, o decréscimo no conteúdo de água na planta, redução do turgor e, conseqüentemente, o decréscimo na expansão celular e alteração de vários processos fisiológicos. Deve-se ressaltar, também, que a extensão dos efeitos e o tipo de déficit hídrico dependem da intensidade e da duração do estresse, da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta (Tezara et al., 2002).

A interação entre a demanda evaporativa da atmosfera, o estado hídrico do solo, distribuição e densidade do sistema radicular e os processos metabólicos revelam o estado hídrico da planta, sendo este um valioso instrumento nos estudos das relações água-planta. Na planta, a avaliação do estado hídrico é feita geralmente com base na medição do potencial hídrico

foliar (ψ_f), que funciona como um indicador do estado de hidratação da planta (Schulze, 1986). Winkel & Rambal (1990) sugerem que, apesar do potencial hídrico ser a variável mais examinada nos estudos sobre relações hídricas e considerada como responsável pelo controle direto da perda de água pela planta, esta função é conferida aos reguladores hormonais e à pressão de turgor das células guarda. Segundo Nagarajah (1989), o ψ_f antes do amanhecer é definido como o potencial hídrico máximo e constitui um adequado indicador dos níveis de estresse hídrico, pois não é afetado pelas condições ambientais.

Apesar da medida do ψ_f caracterizar o estado hídrico da planta, seu emprego de forma isolada é muito restrito e não fornece informações sobre o comportamento fisiológico das plantas em resposta à baixa disponibilidade de água, tornando-se indispensável correlacioná-la com outras características como condutância estomática, fotossíntese e transpiração (Souza, 1999).

O controle dos movimentos estomáticos é o meio mais rápido que a planta dispõe para ajustar-se às variações ambientais a que são submetidas (Chaves, 1991). Através dos estômatos, ocorre influxo de CO_2 necessário ao processo fotossintético e ao crescimento e efluxo de água, por meio da transpiração. Segundo Winkel & Rambal (1993), além da disponibilidade de água no solo, o movimento dos estômatos pode ser diretamente influenciado por diversos fatores do ambiente como a radiação solar, o déficit de pressão de vapor da atmosfera (DPV), a concentração interna e externa de CO_2 e a temperatura do ar.

Uma das respostas mais significativas à baixa disponibilidade hídrica do solo é a diminuição da abertura estomática, que previne a perda de água. Entretanto, este mecanismo reduz a absorção de CO_2 e, conseqüentemente, a taxa fotossintética (Kaiser, 1987; Chaves, 1991). De acordo com Sutcliffe (1980), no curso de uma evolução diurna, o fechamento dos estômatos pode ocorrer preferencialmente como uma resposta da planta ao gradiente de

potencial hídrico entre a folha e a atmosfera, embora exista em menor proporção, influência da disponibilidade de água no solo.

Beadle et al. (1985) sugerem que em folhas de *Pinus*, o fator determinante da condutância estomática é o DPV no ar, exceto ao amanhecer e ao entardecer, quando este controle é realizado pela radiação e temperatura. Para Damesin & Rambal (1995), um aumento no DPV pode induzir o fechamento estomático e, conseqüentemente, reduzir as trocas gasosas. Segundo Mielke (1997), a modulação da condutância estomática, pelo déficit de pressão de vapor do ar é particularmente importante para que as plantas possam evitar uma perda excessiva de água, sob condições em que a demanda evaporativa da atmosfera é alta.

Variações diurnas na fotossíntese podem ser encontradas em função do DPV. Aumento no DPV promove a queda da capacidade fotossintética, devido a uma redução do ψ_f e conseqüente fechamento estomático (Schulze, 1986). A fotossíntese também está na dependência de condições ambientais como irradiância, temperatura e suprimento de nutrientes, responsáveis por mudanças diurnas e sazonais na mesma. Segundo Chaves (1991), reduções na concentração interna de CO_2 e condutância estomática são indicativos da redução da fotossíntese, devido ao fechamento estomático. Em plantas de oliveira, Moriana et al. (2002) verificaram que a condutância estomática foi um fator limitante da fotossíntese em plantas submetidas a estresses hídricos de médio a moderado, enquanto que fatores não estomáticos influenciaram a fotossíntese líquida somente sob condições de estresse severo.

A transpiração é outro parâmetro que apresenta uma expressiva inter-relação com a condutância estomática, sendo que ambos variam em função direta da demanda evaporativa da atmosfera. Observa-se geralmente que, nas primeiras horas da manhã, a condutância estomática pode ser relativamente alta, ao passo que a taxa de transpiração não. A transpiração geralmente diminui em

razão direta com o ψ_E principalmente como resultado do aumento da resistência estomática à difusão de vapor de água (Jarvis & McNaughton, 1986; Mielke, 1997). Em uma comunidade vegetal, além da regulação estomática, outros fatores, como a energia radiante absorvida, ou a eficiência de remoção de vapor de água da superfície evaporante, podem apresentar um papel semelhante ou até mais significativo do que o controle estomático sobre a transpiração. Em alguns casos o controle estomático da transpiração verificado nas folhas, pode apresentar um pequeno ou nenhum controle sobre a taxa de transpiração do dossel (Jarvis & McNaughton, 1986; Hinckley & Braatine, 1994).

Além dos efeitos no desenvolvimento das espécies, pesquisas têm apontado a influência do ambiente na produção de metabólitos secundários vegetais, onde muitos se destacam devido sua importância como princípios ativos de plantas (Salmien et al., 1999; Castro et al., 2001).

Várias hipóteses ecológicas, para as estratégias adaptativas das plantas, sugerem que a produção de metabólitos secundários está relacionada a processos de crescimento e diferenciação vegetal, regulados pela disponibilidade de recursos ambientais. Nas plantas, a alocação de carbono para a biossíntese de metabólitos secundários é determinada tanto pela disponibilidade de recursos (nutrientes, luz, concentração de CO_2), como por estresses específicos como seca, poluentes e radiação (Koricheva et al., 1998). Pelo fato do metabolismo secundário estar intimamente relacionado com o metabolismo primário, vários fatores que afetam o crescimento, a fotossíntese e outros aspectos do metabolismo primário, também podem afetar o metabolismo secundário. Lavola et al. (2000) sugerem que o aumento nas concentrações de CO_2 atmosférico promove o crescimento e acelera os processos fisiológicos em folhas jovens, devido a um incremento na disponibilidade interna de carbono, a mudanças no particionamento de assimilados entre órgãos vegetais e ao acúmulo de metabólitos secundários.

Segundo Kouki & Manetas (2002), a disponibilidade de recursos pode ocasionar flutuações nos níveis de compostos fenólicos vegetais, além de promoverem efeitos regulatórios na atividade de enzimas chaves da rota biossintética destes compostos. Para Janas et al. (2000), a atividade da fenilalanina amônia-liase e o acúmulo de vários fenilpropanóides ocorrem como consequência de vários estresses. Entre eles citam-se os estresses bióticos, como infecção por microorganismos, ataque de insetos e herbívoros e estresses abióticos como temperatura, luz, ferimentos, disponibilidade hídrica e níveis de CO₂ atmosférico (Janas et al., 2000; Lavola et al., 2000; Saltviet, 2000; Chakraborty et al., 2001; Rivero et al., 2001). Para Solecka & Kacperska (1995) estes estresses podem modificar tanto a síntese da enzima, como a sua atividade, em uma ampla variedade de plantas.

Alterações nos padrões de taninos vegetais, em decorrência de diferentes condições de estresse também são bem documentadas. Koricheva et al. (1998) consideram que os níveis de taninos vegetais estão, parcialmente, sob o controle genético, sendo também determinados pelas condições ambientais. Lavola et al. (2000), estudando os efeitos de diferentes níveis de CO₂ atmosférico e da radiação UV na alocação de carbono para o crescimento e a síntese de metabólitos secundários em plântulas de *Betula pendula* Roth., verificaram uma correlação positiva entre a concentração de CO₂ e a radiação UV-B, na síntese de compostos fenólicos. A radiação UV-B aumentou, principalmente, a atividade da fenilalanina amônia-liase, levando ao acúmulo de alguns fenólicos intermediários e de determinados produtos finais. Altas concentrações de CO₂ afetaram, principalmente, o nível constitutivo de metabólitos secundários, promovendo o incremento nos níveis de taninos condensados.

Estudos realizados por Lindroth et al. (2001) com álamo (*Populus tremuloides*) e bétula (*Betula papyrifera*) submetidas a diferentes tratamentos

com CO₂ e O₃ demonstraram aumentos desprezíveis nos níveis de taninos condensados em álamo e aumentos mais acentuados em bétula, em resposta a um incremento nos níveis de CO₂. Em *Pinus*, Jordan et al. (1991) observaram a alocação de carbono, para a síntese de taninos foliares em consequência do estresse causado pela poluição. Aumentos sazonais no acúmulo de taninos foliares em *Cryptomeria japonica* D. Don. também puderam ser observados por Katoh et al. (1989), entre os meses de junho, setembro e novembro, em resposta à poluição ambiental. Hatano et al. (1986) revelaram a presença de mudanças sazonais no conteúdo de taninos em *Liquidambar formosana*, uma espécie medicinal chinesa, coletada em diferentes épocas do ano. Variações sazonais nos conteúdos de taninos hidrolisáveis também foram detectadas por Salminen et al. (2001), em folhas jovens de *Betula pubescens*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, M. D.; MOSTOLLER, S. A. Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understory sites during a drought. *Tree Physiology*, Victoria, v. 15, n. 6, p. 361-370, June 1995.
- ADÂMOLI, J.; MACÊDO, J.; AZEVEDO, L. G.; MADEIRA NETTO, J. Caracterização da região dos Cerrados: In: GOEDERT, W. J. (Ed.). *Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo*. São Paulo: Nobel, 1986. p. 33-74.
- AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Amsterdam, v. 75, n. 1/2, p. 1-12, July 1999.
- ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. *Anais. . . Brasília: ABCTP/EMBRAPA*, 1986. p. 25-28.

ARENS, K. O Cerrado como vegetação oligotrófica. *Boletim da Faculdade de Ciências da Universidade de São Paulo (Botânica)*, São Paulo, v. 224, n. 15, p. 59-77, 1958.

ASSIS, J. S.; MALDONADO, R.; MUNOZ, T.; ESCRIBANO, M. I.; MERODIO, C. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 33-39, Sept. 2001.

AZEVEDO, L. G.; CASER, R. L. Regionalização do Cerrado em função dos seus geossistemas. In: *SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO: uso e manejo*. Brasília, 1980. p. 5.

BARROS, M. A. G.; CALDAS, L. S. Acompanhamento de eventos fenológicos apresentados por cinco gêneros nativos do cerrado (Brasília-DF). *Brasil Florestal*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 42, 7-14, abr/jun. 1980.

BARROSO, G. M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: UFV, 1991. v. 2, 377 p.

BEADLE, C. L.; NELSON, R. E.; TALBOT, H.; JARVIS, P. G. Stomatal conductance and photosynthesis in a mature scots pine forests. I. Diurnal, seasonal and spatial variation in shoots. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v. 22, n. 2, p. 557-571, June 1985.

BEKEBLIA, N. Phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, piruvic acid and total phenolics variations in onion bulbs during long-term storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, London, v. 33, p. 112-116, 2000.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, Clare, v. 161, n. 5, p. 839-851, Oct. 2001.

BUSCHBACHER, R. *Expansão agrícola e perda da biodiversidade do Cerrado: origens históricas e o papel do comércio internacional*. Brasília: WWF Brasil, 2000. 104 p.

CALDWELL, M. M.; PEARCY, R. W. (Ed.) *Exploitation of environmental heterogeneity by plants*. San Diego: Academic Press, 1994. 429 p.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia-lyase: a review article. *Phytochemistry*, Oxford, v. 12, n. 5, p. 961-973, May 1973.

CARVALHO, D. A. de Composição florística e estrutura de cerrados do sudoeste de Minas Gerais. 1987. 201 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CASTRO, A. H. F.; YOUNG, M. C. M.; ALVARENGA, A. A. Influence of photoperiod on the accumulation of allantoin in comfrey plants. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Londrina, v. 13, n. 1, p. 49-54, abr. 2001.

CHAKRABORTY, U.; DUTTA, S.; CHAKRABORTY, B. Drought induced biochemical changes in young tea leaves. Indian Journal of Plant Physiology, New Delhi, v. 6, n. 1, p. 103-106, 2001.

CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. Journal of Experimental Botany, London, v. 42, n. 234, p. 1-16, Jan. 1991.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C. Y.; HUANG, Y. W. Y.; LIN, Y. Y. Tannins and human health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v. 38, n. 6, p. 421-464, June 1998.

DAMESIN, C.; RAMBAL, S. Field study of leaf photosynthetic performance by a mediterranean deciduous oak tree (*Quercus pubescens*) during a severe summer drought. New Phytologist, New York, v. 131, n. 2, p. 159-167, Oct. 1995.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. Biochemical Systematics and Ecology, Oxford, v. 27, n. 4, p. 445-459, June 1999.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. Plant biochemistry. San Diego: Academic Press, 1997. 530 p.

EVANS, C. E.; BANSO, A.; SAMUEL, O. A. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*: an in vitro study. Journal of Ethnopharmacology, Clare, v. 80, n. 1, p. 21-24, Apr. 2002.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 91, n. 1, p. 3-20, 1927.

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

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS: Disponível em:
<<http://www.biodiversitas.org.br>>. Acesso em: 25 maio 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 – the technology**, 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

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

HAMMERSTONE, J. F.; LAZARUS, S. A.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H. H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 10, p. 490-496, Oct. 1999.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products. In: WALTON, N. J.; BROWN, D. E. (Ed.). **Chemicals from plants: perspectives on secondary plant products**. Imperial College Press, 1999. p. 1-25.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 2, p. 205-215, Feb. 1996.

HATANO, T.; KIRA, R.; YOSHIZAKI, M. L.; OKUDA, T. Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 2787-2789, Dec. 1986.

HINCKLEY, T. M.; BRAATINE, J. H. Stomata. In: WILKINSON, R. E. (Ed.) **Plant-environment interactions**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 323-355.

HU, C.; WANG, P. Embryo culture: technique and application. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: technique and applications**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. v. 4, p. 43-96.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:
<<http://www.Ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 maio 2002.

ILLG, R. D. Metodologia de seleção in vitro para a resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPOSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais.... Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p. 45-47.

JANAS, K.; CVIKROVÁ, M.; PALAGIEWICZ, A. EDER, J. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 38, n. 7/8, p. 587-593, July/Aug. 2000.

JARVIS, P. G.; McNAUGHTON, K. G. Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. *Advances in Ecological Research*, New York, v. 15, p. 1-49, 1986.

JONES, H. G. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, 1992. 428 p.

JORDAN, D. N.; GREEN, T. H.; LOCKABY, B. G.; MELDAHL, R. S.; GJERSTAD, D. A.; Response of total tannins and phenolics in loblolly pine foliage expose to ozone and acid rain. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 17, n. 3, p. 505-513, Mar. 1991.

KAISER, W. M. Effects of water deficits on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 71, n. 1, p. 142-149, Sept. 1987.

KATOH, T.; KASUYA, M.; KAGAMIMORI, S.; KOZUKA, H.; KAWANO, S. Effects of air pollution on tannin biosynthesis and predation damage in *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 28, n. 2, p. 439-445, Feb. 1989.

KER, J. C.; RESENDE, M. Recursos edáficos dos cerrados: ocorrência e potencial. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO: biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos Cerrados, 8., 1996, Brasília. Anais... Planaltina: EMBRAPA/CPAC, 1996. p. 15-19.

KIM, S. H.; KRONSTAD, J. W.; ELLIS, B. E. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago maydis*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 43, n. 2, p. 351-357, Sept. 1996.

KORICHEVA, J.; LARSSON, S.; HAUKIOJA, E.; KEINÄNEN, M. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, Copenhagen, v. 83, p. 212-226, 1998.

KOUKI, M.; MANETAS, Y. Resource availability affects differentially the levels of gallotannins and condensed tannins in *Cerotonia siliqua*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 30, n. 7, p. 631-639, July 2002.

KOUKOL, J.; CONN, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 236, n. 10, p. 2692-2698, Oct. 1961.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. H.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). *Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT, 1991. p. 41-78.

KUMAR, A.; ELLIS, B. E. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry: structure, expression, and evolution. *Plant Physiology*, Rockville, v. 127, n. 1, p. 230-239, Sept. 2001.

LAVOLA, A.; TITTO, R. J.; ROSA, T. M. de la; LETTO, T.; APHALO, P. J. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 109, n. 3, p. 260-267, July 2000.

LINDROTH, R. L. Consequences of elevated carbon dioxide and ozone for foliar chemical composition and dynamics in trembling aspen (*Populus tremuloides*) and paper birch (*Betula papyrifera*). *Environmental Pollution*, Oxford, v. 115, n. 3, p. 395-404, 2001.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. v. 2, 352 p.

MARGNA, U. Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cell. *Phytochemistry*, Oxford, v. 16, n. 4, p. 419-426, 1977.

MATOS, J. M.; MATOS, M. E. O. *Farmacognosia: curso teórico-prático*. Fortaleza: UFC, 1989. 246 p.

MEHANSHO, H.; BUTLER, L. G.; CARLSON, M. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms. *Annual Reviews in Nutrition*, Palo Alto, v. 7, p. 423-440, 1987.

MELO, B. Cultivo de embrião *in vitro* da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MIELKE, M. S. Regulação fisiológica e ambiental das trocas gasosas num plantio clonal de híbridos de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden. 1997. 92 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

MORIANA, A.; VILLALOBOS, F. J.; FERERES, E. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 25, n. 3, p. 395-405, Mar. 2002.

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

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

NAGARAJAH, S. Physiological responses of grapevines to water. *Acta Horticulturac*, Wageningen, v.240, p.249-256, 1989.

OLIVEIRA, A. F. de Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). 2001. 122 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OSAKABE, Y.; NANTO, K.; KITAMURA, H.; KAWAI, S.; KATAYAMA, Y.; MOROHOSHI, N. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase in tissues of *Populus kitakamiensis*. *Planta*, Berlin, v. 200, n. 1, p. 13-19, Sept. 1996.

OTSHUDI, A. L.; VERCRUYSSSE, A.; FORIERS, A. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 71, n. 3, p. 411-423, Aug. 2000.

- PARRA POZO, L. A.** Estudo “in vitro” do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais sobre o *Clostridium difficile*. 1997. 77 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PEREIRA, J. A. R.** Classificação de vegetação dos cerrados por meio de componentes principais de uma imagem Landsat-TM. 1993. 46 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PEREVOLOTSKY, A.** Tannins in mediterranean woodland species: lack of response to browsing and thinning. *Oikos*, Copenhagen, v. 71, p. 333-340, 1994.
- PIERIK, R. L. M.** In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1990. 344 p.
- PRINCE, M. L.; BUTLER, L. G.** Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Washington, v. 25, n. 6, p. 1268-1277, 1977.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T.** Fitofisionomias do bioma cerrado. In: **SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de Cerrado: ambiente e flora.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 89-168.
- RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; GARCIA, P. C.; SANCHEZ, E.; ROMERO, L.** Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, Clare, v. 160, n. 2, p. 315-321, Jan. 2001.
- RODRIGUES, V. E. G.** Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto do Rio Grande – Minas Gerais. 1998. 235 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A.** de Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.
- SACCHI, N.** Aspectos bioquímicos e histológicos do desenvolvimento de embriões de feijão (*Phaseolus vulgaris*) in vitro. 1985. 60 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SALMIEN, J. P.; OSSIPOV, V.; LOPONEM, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 864, n. 2, p. 283-291, Dec. 1999.

SALTVEIT, M. E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 61-69, Dec. 2000.

SAMARTIN, A. A comparative study of effects of nutrient media and cultural conditions on shoot multiplication of *in vitro* cultures of *Camellia japonica* explants. **Journal of Horticultural Science**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 73-79, Jan. 1989.

SANTIAGO, L. J. M.; LOURO, R. P.; OLIVEIRA, D. E. de Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 5, p. 1023-1032, Nov. 2000.

SANTOS, S. da C.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade, 2000. p. 517-544.

SARAVITZ, C. H.; RAPER Jr., C. D. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 799-805, Apr. 1995.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y. SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Dec. 1998.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Food Chemistry**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, Dec. 1991.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1/2, p. 21-40, May 2001.

SEA: Disponível em: <<http://www.unb.br/ig/sites:htm>>. Acesso em: 20 maio 2003.

SCHULZE, E. D. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v. 37, p. 247-274, 1986.

SILVA, J. A. et al *Frutas nativas dos cerrados*. Brasília: EMBRAPA-CPAC/EMBRAPA-SPI, 1994. 166 p.

SILVA FILHO, P. V. Plantas do Cerrado produtoras de matéria tintorial. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 16, n. 173, p. 28-32, mar/abr. 1992.

SILVA JÚNIOR, M. C. *Composição florística, estrutura e parâmetros fitossociológicos do Cerrado e sua relação com o solo na Estação Florestal de Experimentação de Paraopeba, MG*. 1999. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SOLECKA, D.; KACPERSKA, A. Phenylalanine ammonia-lyase in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 33, n. 5, p. 585-591, Sept./Oct. 1995.

SOUZA, C. R. de *Alguns aspectos da enxertia de mesa com forçagem e respostas fisiológicas à deficiência hídrica na produção de mudas de videira*. 1999. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUTCLIFFE, J. F. *As plantas e a água*. São Paulo: EPU/EDUSP, 1980. 126 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 2. ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1998. 792 p.

TEZARA, W.; MITCHELL, V.; DRISCOLI, S. P. LAWLOR, D. W. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 53, n. 375, p. 1781-1791, Aug. 2002.

VELOSO, H. P.; LORENÇO FILHO, R. R.; LIMA, J. C. A. L. *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE. Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124 p.

WILKINSON, R. E. (Ed.) *Plant environment interactions*. New York: Marcel Dekker 1994. 599p.

WINKEL, T.; RAMBAL, S. Stomatal conductance of some grapevines growing in the field under a mediterranean environment. *Agricultural and Forest Meteorology*, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 107-121, June 1990.

WINKEL, T.; RAMBAL, S. Influence of water stress on grapevines growing in the field: from leaf to whole plant response. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 20, p. 143-157, 1997.

CAPÍTULO 2: PROPAGAÇÃO DO MURICI (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.), ATRAVÉS DO CULTIVO “*IN VITRO*” DE EMBRIÕES

1 RESUMO

O murici é uma espécie medicinal e frutífera, amplamente distribuída no Cerrado brasileiro, com desenvolvimento lento e baixa percentagem de germinação, em condições naturais. Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para a propagação desta espécie, através do cultivo *in vitro* de embriões, visando a produção comercial de mudas. Os embriões foram obtidos removendo-se o endocarpo e o tegumento, após desinfestação dos frutos com hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos. A seguir foram submetidos a duas condições experimentais: na primeira, os embriões foram inoculados em meio MS, acrescido de cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹) e na segunda, os embriões foram submetidos a quatro concentrações de sais no meio MS (0, 25, 50 e 100%), suplementados com 3% de sacarose. Os meios foram solidificados com agar na proporção de 7 g.L⁻¹ e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem. Após inoculação foram mantidos em sala de crescimento, a 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, constituídas de 10 tubos cada. Após 15 dias de inoculação, avaliou-se a percentagem de oxidação e contaminação do meio e dos explantes e aos 30 dias a percentagem de germinação dos embriões e peso de matéria seca total das plântulas formadas. Os resultados indicaram que as várias concentrações de sacarose empregadas, influenciaram significativamente a percentagem de germinação e o peso de matéria seca das plântulas, enquanto que os diferentes níveis do meio MS afetaram apenas o acúmulo de biomassa. Plântulas com idades entre seis e oito semanas e 3 a 4 pares de folhas foram aclimatizadas, através do aumento progressivo na intensidade luminosa e diminuição da umidade do meio, tornando-se aptas para o cultivo em casa de vegetação, 120 dias após o início do processo.

2 ABSTRACT

Propagation of murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) through *in vitro* cultivation of embryos

The murici is a medicinal and fruit species, widely distributed in Brazilian Cerrado, that presents a slow development and low germination

percentage in natural conditions. The objective of the present work was to establish a methodology of propagation of this species, through *in vitro* cultivation of embryos. The embryos were obtained by removing the endocarp and seed coat, after 10 minutes of disinfection of fruit with of 2% sodium hypochlorite. Then, they were submitted to the following experimental conditions: (1), the embryos were inoculated in MS medium, supplemented with five concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45, and 60 g.L⁻¹); (2), the embryos were inoculated in MS medium with the following salt concentrations (0, 25, 50, and 100%), supplemented with 3% sucrose. The medium was solidificated with 7 g.L⁻¹ agar and the pH was adjusted to 5.7 ± 0.1, prior autoclavation. After the inoculation the embryos were maintained in a growing room, at 27 ± 1 °C, for a 16 hour photoperiod. It was used a complete block design, with five replications with 10 testing tubes each. After 15 days of inoculation, it was evaluated the percentage of embryo germination and the weight of total dry matter of formed seedlings. The results indicated that the concentrations of sucrose used, influenced significantly the percentage of germination and the weight of dry matter of the seedlings, while the different levels of the MS medium affected only the biomass accumulation storage. Seedlings between six and eight weeks of age and 3 to 4 pairs of leaves were acclimatized by the progressive increase on the light intensity and the decrease of environment humidity, turning them capable for the greenhouse cultivation, 120 days after the beginning of the process.

3 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro constitui-se em uma grande fonte natural de recursos biológicos, com inúmeras espécies de elevado valor medicinal, incluindo o murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) (Rodrigues & Carvalho, 2001). Almeida et al. (1998) relatam que muitos processos patológicos podem ser curados através da utilização de extratos obtidos, principalmente, a partir da casca desta espécie, ricos em tanino, um princípio ativo adstringente muito utilizado no tratamento de inflamações, queimaduras e como cicatrizante local (Otshudi et al., 2000; Ahmad & Beg, 2001).

A utilização indiscriminada de espécies medicinais na medicina popular e também pela indústria farmacêutica, tem ocasionado uma redução considerável

na densidade populacional de algumas destas plantas, em áreas onde elas ocorrem naturalmente, sendo importante o desenvolvimento de protocolos efetivos que viabilizem a produção destas espécies em escala comercial (Nadeem et al., 2000).

O murici produz frutos do tipo drupa e sua propagação se faz através de via sexuada, cujas sementes apresentam baixa percentagem de germinação, sendo o desenvolvimento das plantas em condições de campo considerado de lento a moderado, não ultrapassando 1,5m aos 2 anos de idade (Barroso, 1991; Lorenzi, 1998). Para Almeida et al. (1998), esta dificuldade de propagação é causada, possivelmente, pela presença de um endocarpo esclerificado que envolve o embrião e que atua como uma barreira mecânica, dificultando a protusão da radícula e, conseqüentemente, a emergência da plântula.

Atualmente, o cultivo de embriões *in vitro* tem-se mostrado como uma alternativa economicamente viável, para a propagação de várias espécies de interesse econômico (Acebedo et al., 1997; Andrade, 1998; Das et al., 1999; Maliro & Kwapata, 2000; Melo, 2000; Nadeem et al., 2000; Oliveira, 2001). Segundo Oliveira (2001), o cultivo de embriões reduz o tempo para a obtenção de um novo indivíduo, permite boa uniformidade e alto percentual de germinação. Para Andrade (1998), outras vantagens são a multiplicação rápida do material selecionado e a antecipação da época de plantio. Pierik (1990) sugere que uma vantagem adicional do uso de embriões e de folhas jovens, como explantes para a cultura de tecidos vegetais é a não destruição das plantas matrizes e a eficiência na propagação de algumas espécies.

Um dos aspectos mais importantes da cultura de embriões é a seleção correta do meio nutritivo, que estimule o desenvolvimento dos mesmos (George, 1996). Segundo Oliveira (2001), o meio de cultura adequado, tanto para propagação, quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Maliro & Kwapata (2000) relatam que o meio mais freqüentemente

utilizado é o MS (Murashige & Skoog, 1962), originalmente desenvolvido para o cultivo de calos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). A concentração dos nutrientes do meio MS é geralmente considerada elevada e, em função disto, muitas modificações têm sido estudadas com o objetivo de reduzir os níveis dos nutrientes, permitindo assim maior adaptação de cultivos *in vitro* (Samartin, 1989). Por outro lado, segundo Krikorian (1991), a alta salinidade do MS é eficiente para cultivos que exigem concentrações mais elevadas de íons.

De acordo com George (1996), em geral, o desenvolvimento de embriões maduros *in vitro* ocorrem em meios nutritivos simples, compostos de sais minerais, vitaminas e açúcares. No caso dos embriões imaturos, entretanto, é necessário um meio mais completo, contendo, além dos componentes acima mencionados, substâncias reguladoras de crescimento, compostos orgânicos e extratos naturais. A exigência em sacarose é variável em função do estágio de maturação dos embriões (Hu & Ferreira, 1990), quando os imaturos exigem concentrações mais elevadas (Saravitz & Raper, 1995). Segundo Hu & Wang (1986), os embriões excisados maduros ou quase maduros são autotróficos, ou seja, são capazes de germinar em meio simples, sem suprimento adicional de sacarose.

Normalmente, as plantas provenientes do cultivo *in vitro* necessitam de um período de aclimatização, antes de serem transferidas para condições de campo. Para George (1996), este processo se faz necessário porque o ambiente *in vitro* normalmente afeta a morfogênese das plantas, que apresentam uma natureza mais frágil pelo fato de terem sido cultivadas em condições de baixa irradiância e alta umidade relativa. Segundo Gomes (1999), a transferência de plântulas, das condições assépticas e heterotróficas, típica da cultura de tecidos, para o ambiente externo deve ser realizada de forma gradativa e cuidadosa, para evitar sua morte.

Tendo em vista as poucas informações relativas à propagação do murici e à dificuldade de germinação das sementes em condições naturais, este trabalho teve como objetivo principal desenvolver uma metodologia efetiva para a propagação desta espécie, através do cultivo de embriões *in vitro*, visando ao enriquecimento populacional da espécie e o uso sustentado dos cerrados, através da produção comercial de mudas em larga escala.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização geral e obtenção das sementes

Este estudo foi conduzido no período entre janeiro de 2001 a março de 2002, no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Setor de Fisiologia Vegetal/DBI, da Universidade Federal de Lavras, município de Lavras, MG.

As sementes de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) foram coletadas nos meses de janeiro a março de 2001, em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, situado ao sul do Estado de Minas Gerais. Amostras do material vegetal foram coletadas e herborizadas. As exsiccatas foram identificadas, catalogadas e depositadas no Herbário ESAL, registradas sob o nº 17228.

Após a coleta dos frutos maduros, o epicarpo e mesocarpo foram removidos, utilizando-se peneira, água corrente e solução de NaOH 0,1M. A seguir, o endocarpo foi tratado com solução de Benomyl a 2% e, após secagem à temperatura ambiente, foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria, a uma temperatura de 4 °C, no escuro.

4.2 Teste de viabilidade das sementes

Após a coleta e processamento dos frutos, 30 sementes foram submetidas ao teste do tetrazólio, segundo Nadeem et al. (2000), imediatamente após a coleta (tempo zero) e após armazenamento por 6 e 12 meses, a 4 °C, no escuro. O padrão de coloração em diferentes regiões foi observado.

4.3 Condução do experimento

4.3.1 Assepsia do material vegetal e extração dos embriões

Os endocarpos esclerificados foram desinfestados com NaOCl 2% (hipoclorito de sódio comercial) por 10 minutos e lavados rapidamente em água destilada esterelizada. A seguir, os embriões foram extraídos, removendo-se cuidadosamente o endocarpo e os tegumentos, com auxílio de martelo e bisturi, respectivamente, em câmara asséptica de fluxo laminar.

4.3.2 Efeito da sacarose e proporções de sais do meio MS, na germinação e matéria seca total

Embriões excisados foram submetidos a dois experimentos distintos. No primeiro, os embriões foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (tabela 1, anexo B) completo, suplementado com as seguintes concentrações de sacarose: 0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹. No segundo experimento, os embriões foram inoculados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de sais componentes do meio (0, 25, 50 e 100%), suplementados com sacarose a 30 g.L⁻¹.

Nos dois experimentos, os meios foram solidificados com agar, na proporção de 7 g.L⁻¹ e o pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm de pressão, por 20 min. Cada tubo de ensaio (15x250 mm) recebeu aproximadamente 15 mL do meio de cultura. Após inoculação, os embriões foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo branca-fria. A radiação foi determinada através de sensor Hansatech.

4.3.3 Características avaliadas

Após 15 dias de inoculação, avaliaram-se a percentagem de oxidação e a contaminação do meio e dos explantes e, aos 30 dias, a percentagem de germinação dos embriões e a matéria seca total das plântulas formadas. A germinação foi avaliada adotando-se critérios fisiológicos, considerando-se germinados todos os embriões com protusão de radícula.

4.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para ambos experimentos empregou-se o delineamento inteiramente casualizado. O primeiro experimento foi constituído de meio MS, suplementado com cinco quantidades de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹). No segundo experimento, utilizaram-se quatro concentrações de sais componentes do meio MS (0, 25, 50 e 100%). Cada experimento foi constituído de 5 repetições, empregando-se para cada parcela experimental, 10 tubos de ensaio. Foi inoculado um embrião por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para percentagem de germinação e peso de matéria seca total, seguindo modelos

matemáticos próprios para o delineamento inteiramente casualizado e analisados estatisticamente utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (Ferreira, 2000). Para comparação dos contrastes entre médias dos tratamentos utilizou-se o Teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.5 Aclimatização das plântulas produzidas *in vitro*

Para o processo de aclimatização, adotou-se como referência a metodologia proposta por Gomes (1999).

Entre 6 a 8 semanas após a inoculação dos embriões, as plântulas produzidas foram transferidas para caixas plásticas tipo gerbox, contendo o substrato Plantmax umedecido e previamente autoclavado a 121 °C, por 20 minutos. Foram submetidas ao processo de aclimatização todas as plântulas que apresentavam entre 3 a 4 pares de folhas, com parte do sistema radicular atingindo a superfície inferior do tubo de ensaio (figura 1A e 1B). A seguir, as caixas foram envolvidas em um saco plástico transparente para criar um ambiente saturado de umidade (figura 1C) e transferidas para sala de crescimento a uma temperatura de 24 ± 2 °C onde permaneceram sob diferentes níveis de irradiância (30%, 50% e 70%), cuja densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos era de 30, 48 e 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente, por um período de 14 dias em cada (figura 1D). Os níveis de irradiância foram obtidos com a utilização de telas pretas de naylon, conhecidas comercialmente como “telas sombrite”, conforme especificações do fabricante, que permitem a redução proporcional da radiação fotossinteticamente ativa. À medida que os sombrites eram substituídos, ao final de cada período, eram feitas aberturas, em uma das extremidades da embalagem plástica, para incrementar as trocas gasosas. Finalmente, o sombrite 30% e a embalagem plástica foram retirados e

↓ Fotos

As mudas foram transplantadas para sacolas de polietileno, com capacidade para 1 kg de substrato cada, sendo este constituído de uma mistura de terra, areia e esterco (3:2:1), onde permaneceram por 90 dias, até transferência para casa de vegetação.



Figura 1: Aclimatização das plântulas obtidas a partir do cultivo *in vitro* de embriões.
A. Plântulas utilizadas no processo; B. Após transferência para caixas tipo gerbox; C. Caixa gerbox envolvida em embalagem plástica; D. Aclimatização sob sombrite. UFLA Lavras MG, 2001.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade

O teste de viabilidade indicou que, em média, 85% das sementes recentemente coletadas eram viáveis e que o armazenamento não influenciou na viabilidade das mesmas (tabela 1). Os resultados indicam que a baixa percentagem de germinação do murici em condições naturais, não está diretamente relacionada com a perda de viabilidade das sementes.

TABELA 1: Padrão de coloração em algumas partes das sementes de murici, em função do teste do tetrazólio, imediatamente após a coleta e após armazenagem por 6 e 12 meses, a 4 °C, no escuro. UFLA. Lavras, MG. 2001.

PADRÃO DE COLORAÇÃO	% de sementes coradas		
	MESES APÓS O ARMAZENAMENTO		
	0	6	12
Toda semente corada	85	80	77
Somente o embrião corado	10	10	08
Cotilédones não corados	0	08	06
Radícula não corada	0	04	04
Embrião não corado	10	11	10
Sementes não coradas	0	0	02

5.2 Condições de cultivo

As condições de assepsia e de remoção dos endocarpos e tegumentos mostraram-se satisfatórias para a obtenção de embriões, como fonte de explante

para o cultivo *in vitro*. Observou-se que cada fruto apresentava de 1 a 2 sementes em condições adequadas para a extração do embrião.

Após inoculação, não se verificou qualquer indício de escurecimento no explante, ou no meio de cultura, indicativos do desenvolvimento de processos oxidativos, muito comuns no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.

O percentual de contaminação foi praticamente desprezível, demonstrando não ser necessária a desinfestação direta da superfície externa da semente e do embrião. Através destas observações, nota-se que no murici, as sementes e os embriões desenvolvem-se em condições assépticas, devido ao fruto apresentar um endocarpo esclerificado, que atua como uma barreira, dificultando a penetração de patógenos, desde que intacto. Baixos índices de contaminação *in vitro* também são relatados por Andreoli (1986), quando se utilizam embriões como fonte de explante, uma vez que os mesmos são produzidos em ambientes estéreis.

A remoção do tegumento foi um fator que contribuiu para o sucesso obtido na propagação *in vitro* desta espécie. Ensaio preliminares mostraram que os embriões desprovidos de tegumento germinaram em 7 dias, apresentando no 12^a dia após a inoculação, plântulas mais desenvolvidas e com o seu segundo par de folhas em expansão. Embriões com tegumento germinaram em 12 dias, apresentando o segundo par de folhas formado somente aos 20 dias após inoculação. Trinta dias após inoculação, diferenças marcantes foram observadas em relação ao desenvolvimento inicial das plântulas originadas de embrião com e sem tegumento. Resultados semelhantes foram descritos por Maliro & Kwapata (2000), em estudos realizados com sementes de *Vapaca kirkiana*, uma espécie frutífera tropical da África do Sul, onde a remoção do tegumento aumentou a percentagem de germinação de 55% para 78%, além de favorecer o desenvolvimento das plântulas formadas. Os autores sugerem que a presença do

tegumento pode atuar como uma barreira entre o meio nutritivo e o embrião interferindo com a nutrição e o desenvolvimento dos mesmos.

A retirada do endocarpo mostrou-se como um ponto positivo para o incremento na taxa e na uniformidade da germinação. Levando-se em consideração que os frutos produzidos pelo murici são do tipo “drupa” e que a semente encontra-se envolvida pelo caroço (endocarpo esclerificado), verificou-se que a remoção do mesmo torna-se necessária, pois o endocarpo atua como uma barreira mecânica, dificultando e, até mesmo, impedindo a protusão da radícula. Estudos realizados por Acebedo et al. (1997) e por Melo (2000), com frutos de oliveira e guarirrobeira, respectivamente, também demonstraram a necessidade da retirada do endocarpo, para a obtenção de maiores taxas de germinação das sementes nestas espécies.

5.3 Efeito da sacarose

As concentrações de sacarose empregadas influenciaram a percentagem de germinação e a matéria seca total das plântulas formadas ($p < 0,05$). O estudo da regressão polinomial para as duas variáveis revelou uma resposta quadrática de ambas, em função da concentração utilizada (figuras 2 e 3).

Maiores percentagens de germinação foram observadas quando foram empregadas concentrações de sacarose inferiores a 60 g.L^{-1} (figura 4), em que altos níveis de germinação foram conseguidos independente da concentração de sacarose acrescida ao meio. A partir da concentração 30 g.L^{-1} percebeu-se uma ligeira queda, não significativa, na percentagem de germinação, da ordem de 8,9%. Esta redução mostrou-se mais acentuada e significativa, da ordem de aproximadamente 30%, quando a concentração de sacarose foi elevada de 45 para 60 g.L^{-1} .

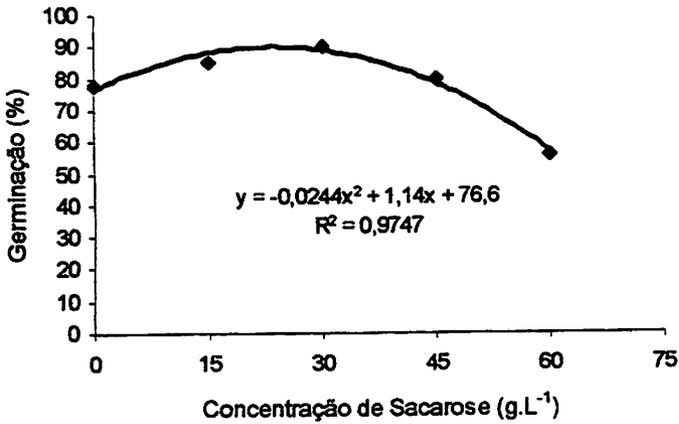


Figura 2: Valores percentuais médios de germinação *in vitro* de embriões de murici, submetidos a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. UFLA. Lavras, MG, 2001.

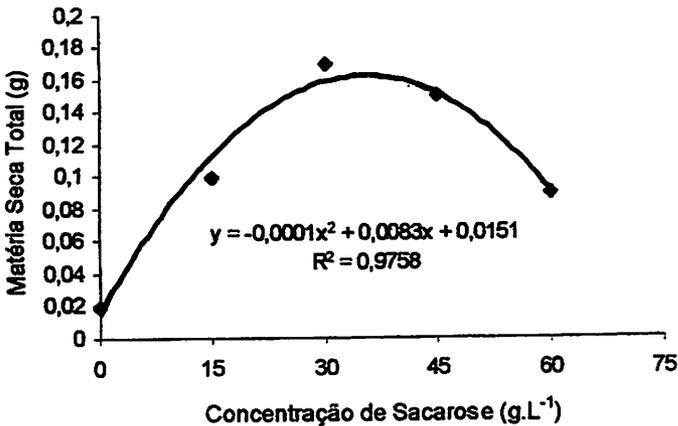


Figura 3: Valores médios de matéria seca total de plântulas de murici, submetidas a diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. UFLA. Lavras, MG, 2001.

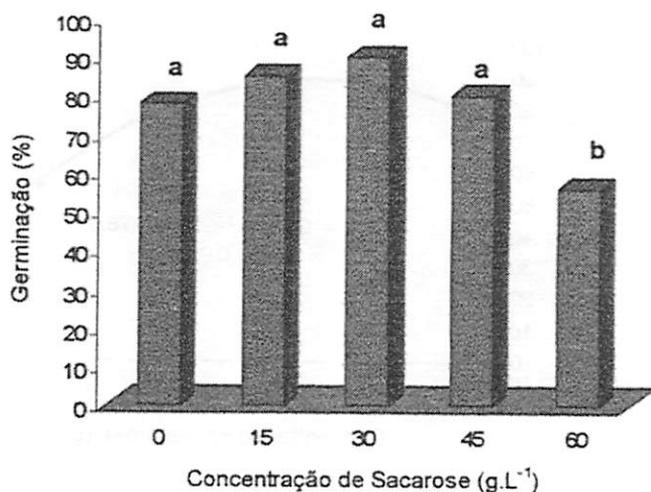


Figura 4: Percentual médio de germinação de embriões cultivados *in vitro*, utilizando-se diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2001.

Estes resultados revelaram que no murici, o processo de germinação ocorre, possivelmente, devido às reservas nutricionais dos cotilédones, independente do fornecimento externo de nutrientes, fato este concordante com relatos de Melo (2000), para guarirobeira. Resultados semelhantes descritos por Canãs et al. (1987) demonstraram que o cultivo *in vitro* de embriões de oliveira pode ser conseguido apenas com a utilização de agar no meio de cultura. Os menores percentuais de germinação foram observados quando se empregou a concentração de 60 g.L⁻¹, provavelmente devido a uma redução considerável do potencial osmótico do meio de cultura, em decorrência do incremento na concentração de sacarose, o que diminui consideravelmente a disponibilidade de água para o embrião, fundamental no início do processo de germinação.

Em relação ao crescimento da plântula, tomando por base a matéria seca total, observou-se um aumento desta variável, até a concentração de 30 g.L⁻¹ de

sacarose no meio de cultura, com incrementos de 80% e 70% na biomassa, quando as concentrações foram aumentadas de 0 para 15 g.L⁻¹ e 15 a 30 g.L⁻¹, respectivamente. A partir deste ponto, verificou-se decréscimos de 11,76% e 53,33% na matéria seca total, quando as concentrações aumentaram de 30 para 45 g.L⁻¹ e 45 para 60 g.L⁻¹ (figura 5).

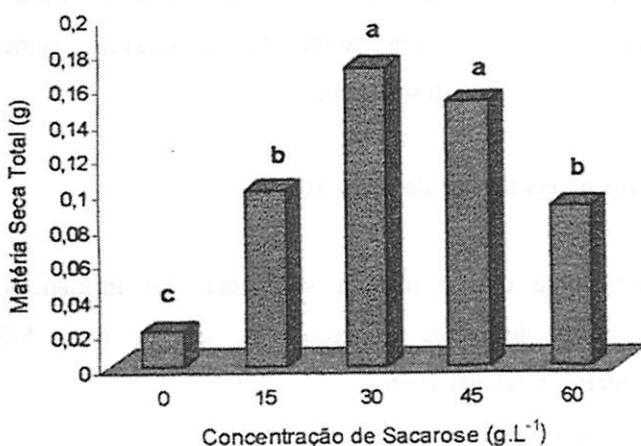


Figura 5: Valores médios de matéria seca total de plântulas cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2001.

Maiores valores de matéria seca total foram apresentados por plântulas cultivadas em meio MS, suplementado com sacarose nas concentrações de 30 e 45 g.L⁻¹. Observou-se ainda, que praticamente não houve crescimento dos embriões na ausência de sacarose e que este foi limitado quando se empregaram concentrações de 15 e 60 g.L⁻¹. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2000) com plântulas de oliveira cultivadas *in vitro*, em meios com diferentes concentrações de sacarose. Segundo Hu & Ferreira (1990), a

exigência em sacarose é variável em função do estágio de maturação do embrião, sendo que os imaturos exigem, normalmente, maiores concentrações de sacarose para seu crescimento. Pierik (1990) sugere que os embriões maduros sejam cultivados em meios contendo de 2 a 3% de sacarose. Para Hoffmann (1999), a matéria seca é constituída, principalmente, de carboidratos insolúveis presentes na parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), sendo que a maior disponibilidade de carboidratos facilmente assimiláveis, como a sacarose, permite aumento na síntese destes compostos.

5.4 Efeito dos níveis de sais do meio MS

Verificou-se que a matéria seca total foi influenciada de forma pronunciada pelas diferentes proporções de sais no meio MS, não sendo observado, porém, qualquer efeito na percentagem de germinação dos embriões ($p > 0,05$) (figuras 6 e 7).

A figura 6 mostra que altos percentuais de germinação foram alcançados, independente dos níveis de sais presentes nos meios empregados. Apesar do aumento observado na percentagem de germinação em meio completo (100%) não ser significativo estatisticamente, nota-se que, na prática, a utilização deste meio pode ser mais vantajosa para produção de mudas desta espécie em larga escala, pois favorece a germinação de 10% de embriões a mais que o meio com metade da concentração dos sais.

Através da figura 7 verifica-se um acúmulo linear de biomassa em relação às plântulas formadas, relacionado à presença de maiores concentrações de sais no meio. Oliveira (2001), sugere que o meio MS completo permite à planta uma maior eficiência na utilização da sacarose presente no meio de cultivo, a qual, por sua vez, otimiza a absorção dos minerais disponíveis.

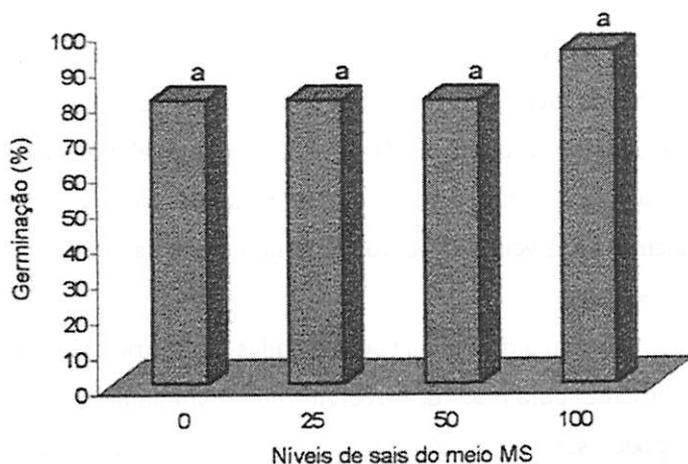


Figura 6: Valores percentuais médios de germinação de embriões cultivados *in vitro*, sob diferentes concentrações de sais no meio MS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2001.

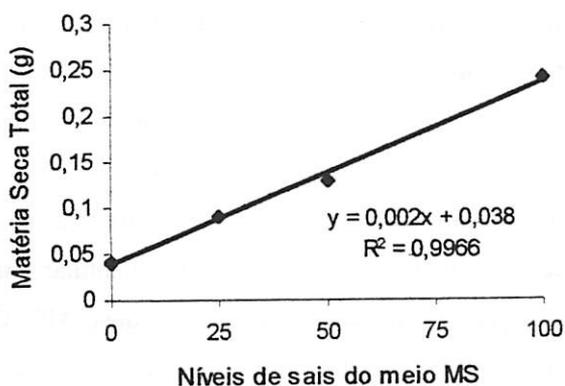


Figura 7: Valores médios de matéria seca total de plântulas de murici, submetidas a diferentes proporções de sais no meio MS. UFLA. Lavras, MG, 2001.

O acúmulo de biomassa pelas plântulas foi 79,61% superior em meio MS completo, em relação àquele apresentado por plântulas cultivadas em meio

com ausência de sais (0%). Comparando-se o acúmulo de matéria seca entre os diferentes níveis do meio MS, verifica-se que maiores incrementos de biomassa foram observados entre os níveis 0 e 25%, responsável por um aumento de 54,35% na biomassa total, enquanto que menores elevações puderam ser verificadas entre os níveis 50% e 100%, sendo estas da ordem de 26,98% e 38,83%, respectivamente.

Os resultados indicam que as plântulas de murici são exigentes em termos de nutrientes para o seu desenvolvimento e, um aumento na produção de biomassa, pode ser observado mesmo quando o tratamento utilizado disponibiliza baixas concentrações de sais, desde que a concentração de sacarose no meio seja favorável para absorção dos mesmos. Em feijão, Sacchi (1985) observou que o embrião maduro exige apenas CO₂, O₂, sais minerais e luz para continuar seu desenvolvimento. Isto indica que durante o desenvolvimento ocorrem mudanças progressivas na capacidade de biossíntese no interior dos tecidos até que a condição autotrófica seja conseguida pela planta. Para Gardingo (1986), o desenvolvimento é controlado tanto por fatores endógenos, como por fatores exógenos.

Embora o murici seja uma espécie exigente em termos nutricionais, vários trabalhos relatam que este comportamento varia de espécie para espécie. Estudos realizados, a partir do cultivo *in vitro* de oliveira, mostraram efeitos lineares significativos sobre a fitomassa das plântulas produzidas, em decorrência da variação na concentração de sais do meio MS (Oliveira, 2001). Por outro lado, Paiva (1998) relata que o desenvolvimento de plântulas de estrelícia, obtidas a partir do cultivo de embriões *in vitro*, não foi influenciado pelas diferentes condições do meio MS empregado (12,5 a 125% de sais), mas sim pelos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões, quando coletados.

6.5 Aclimatização das plântulas obtidas a partir do cultivo de embriões *in vitro*

Os estudos indicaram que 30 dias após o início do processo de aclimatização, as plântulas de murici apresentavam o seu número inicial de folhas duplicado e sistema radicular desenvolvido. Aos 60 dias de aclimatização, observou-se que as folhas apresentavam-se brilhantes, recobertas por ceras epicuticulares e com o aparato fotossintético funcional, observações estas coincidentes com a remoção do último sombrite (figura 8). Segundo Brassard (1996), estas características são fundamentais para a sobrevivência da plântula no ambiente *ex vitro*. O período de 15 dias, para que as plantas passem para uma condição autotrófica, também é sugerido por Ziv (1995).

A percentagem de sobrevivência das plântulas após o transplântio para as sacolas plásticas foi de 90% (figura 9). Segundo Pereira Pinto* (comunicação pessoal), uma perda de até 4% durante o processo de aclimatização é considerada admissível. Percentagens de sobrevivência semelhantes também foram observadas por Pattnaik et al. (1996), durante a aclimatização de plântulas de *Morus acidosa* e *Morus australis*. Em moreira (*Maclura tinctoria*), Gomes (1999) verificou uma percentagem de 97% de sobrevivência das plântulas e Deshpande et al. (1998) obtiveram 100% de sobrevivência após aclimatização de *Ficus religiosa*.



Figura 8: Aspecto visual de plântulas de murici obtidas *in vitro*. A. antes da aclimatização; B. 30 dias após aclimatização. UFLA. Lavras, MG, 2001.



Figura 9: Plântulas de murici em processo de aclimatização. A. 30 dias após a transferência para o substrato. B. 120 dias de idade, em casa de vegetação. UFLA. Lavras, MG, 2001.

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que este trabalho foi conduzido, pôde-se concluir que:

1. O armazenamento das sementes por 12 meses não afetou sua viabilidade.
2. A remoção do endocarpo esclerificado e do tegumento da semente são procedimentos favoráveis e necessários à propagação desta espécie.
3. O emprego de meio MS completo, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose proporcionou elevado percentual germinativo dos embriões e plântulas com maior acúmulo de matéria seca.
4. A aclimatização desta espécie é possível, a partir de plântulas com 6 a 8 semanas de idade e com 3 a 4 pares de folhas desenvolvidas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEBEDO, M. M.; LAVEE, S.; LIÑAN, J.; TRONCOSO, A. *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 69, n. 3/4, p. 207-215, May 1997.

AGRAWAL, P. K.; KARIHALLO, J. L.; AHMED, S. M. M.; GUPTA, P. C. Predicting germinability in maizen wheat and paddy on the basis of tetrazolium test. *Seed Research*, Wellington, v. 1, n. 1, p. 83-85, Mar. 1973.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-grug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 74, n. 2, p. 113-123, Feb. 2001.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
ANDRADE, L. M. da C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ANDREOLI, C. **Cultura de embrião**. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p. 25-28.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. V. 2, 377 p.

BRASSARD, N.; BRISSETTE, L.; LORD, D.; LALIBETÉ, S. **Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature material of hybrid lard**. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 37-44, Jan. 1996.

CAÑAS, L. A.; CARRAMOLINO, L.; VICENTE, M. **Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos**. *Plant Science*, Limerick, v. 50, n. 1, p. 85-90, 1987.

DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. **Factors affecting in vitro development of embryonic axes of cashewnut**. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 82, n. 1/2, p. 135-144, Dec. 1999.

DESHPANDE, S. R.; JOSEKUTTY, P. C. PRATHAPASENAN. **Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa***. *Plant Cell Reports*, New York, v. 17, n. 6/7, p. 571-573, Apr. 1998.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0**. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos, SP: UFSCar/SIB, 2000. p. 255-258.

GARDINGO, J. R. **Aplicação de técnicas de cultura de embrião e diversidade gamética na hibridação interespecífica no gênero *Cucurbita***. 1986. 139 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GOMES, G. A. C. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). 1999. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HOFFMANN, A. Enraizamento e aclimação de mudas micropropagadas de porta-enxertos de macieira “marubakaido” e “M-26”. 1999. 240 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HU, C.; WANG, P. Embryo culture: technique and application. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. (Ed.). *Handbook of plant cell culture: technique and applications*. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. v. 4, p. 43-96.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CNPH-ABCTP, 1990. p. 71-86.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. H.; MROGINSKI, L. A., eds. *Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos e aplicaciones*. Cali: CIAT, 1991. p. 41-78.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. v. 2, 352 p.

MALIRO, M. F. A.; KWAPATA, M. B. Apomitic embryo development and survival in *Uapaca kirkiana* under *in vitro* and *in vivo* seed germination. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 139-147, Feb. 2000.

MELO, B. de Cultivo de embrião *in vitro* da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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, 1962.

NADEEM, M.; PALNI, L. M. S.; PUROHIT, A. N.; PANDEY, H.; NANDI, S. K. Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. *Biological Conservation*, Oxford, v. 92, n. 1, p. 121-129, Jan. 2000.

OLIVEIRA, A. F. Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). 2001. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OTSHUDI, A. L.; VERCRUYSE, A.; FORIERS, A. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 71, n. 3, p. 411-423, Aug. 2000.

PAIVA, P. D. de O. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle da oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura. 1998. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PATTNAIK, S. R.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* *Plant Cell Reports*, New York, v. 15, n. 3/4, p. 841-845, Dec. 1996.

PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1990. 344 p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SACCHI, N. Aspectos bioquímicos e histológicos do desenvolvimento de embriões de feijão (*Phaseolus vulgaris*) *in vitro*. 1985. 60 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SAMARTIN, A. A comparative study of effects of nutrient media and cultural conditions on shoot multiplication of *in vitro* cultures of *Camellia japonica* explants. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v. 64, n. 1, p. 73-79, Jan. 1989.

SARAVITZ, C. H.; RAPER Jr., C. D. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 799-805, Apr. 1995.

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

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T. SMITH, M. L. A. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 493-516.

**CAPÍTULO 3: TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM
MURICI (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.)**

1 RESUMO

As respostas das plantas ao ambiente podem ser avaliadas através de estudos ecofisiológicos, que permitem compreender os mecanismos utilizados pelas plantas para sobreviverem e reproduzirem em seu ambiente natural. Com o objetivo de investigar a influência das variações sazonais do ambiente físico, nas trocas gasosas e no estado hídrico foliar do murici, um experimento foi conduzido em área de formação campestre, com fisionomia de Cerrado *sensu strictu*, localizada no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais entre os meses de novembro de 2001 a setembro de 2002. Para as avaliações selecionaram-se seis plantas, com altura média de $2,70 \pm 0,21$ m e diâmetro basal médio de $0,15 \pm 0,04$ m. Foram avaliados, a uma frequência mensal, o potencial hídrico foliar, às 7 e 12 horas e as trocas gasosas, às 10 e 12 horas. Os resultados mostraram que o potencial hídrico foliar situou-se entre $-0,10$ a $-0,50$ MPa, pela manhã e $-0,88$ a $-1,50$ MPa, ao meio dia, durante o período experimental. Não se observou variações sazonais significativas do potencial hídrico, indicando que as plantas encontravam-se em condições hídricas similares, nas estações seca e chuvosa. Em geral, os valores de fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática foram mais elevados entre os meses de novembro de 2001 a março de 2002, com reduções significativas, a partir de abril de 2002. As maiores taxas de fotossíntese líquida e condutância foram verificadas às 10 horas, com decréscimos nestes valores às 12 horas. A transpiração não variou entre os horários de avaliação. As maiores taxas de fotossíntese líquida e transpiratória foram observadas na estação chuvosa. A fotossíntese líquida mostrou-se mais elevada pela manhã, não se observando, entretanto, variações significativas na transpiração entre os horários de avaliação. A condutância estomática atingiu valores próximos em ambas as estações, sugerindo a participação de fatores não estomáticos nas variações sazonais observadas para as trocas gasosas.

2 ABSTRACT

Gas exchange and water relations in murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.)

The plant responses to the environment can be evaluated through ecophysiological studies, which permit to understand the mechanisms used by

plants in order to survive and reproduce in their natural environment. An experiment was conducted with an objective to investigate the influence of seasonal variation of physical environment on gas exchange and on leaf water state of murici. The used area was a prairie, with a physiomy of Cerrado *stricto sensu*, located in Ijaci, south of the State of Minas Gerais, from november, 2001 to september, 2002. For the evaluation, six plants were selected with an average height of $2.70 \pm 0.21\text{m}$ and an average basal diameter of $0.15 \pm 0.04\text{ m}$. Leaf potential at 7 and 12 am and gas exchange at 10 and 12 am was evaluated ever month. During the experimental period the results showed that the leaf water potential was established between -0.10 to -0.55 MPa in the morning and -0.88 to -1.50 MPa at noon. It was not observed significant seasonal variations of water potential indicating that the plants were in similar water conditions in both dry and rainy seasons. The general, the net photosynthesis, transpiration and stomatal conductance were higher from november, 2001 to march, 2002, with significant reductions starting in april, 2002. Higher rates of net photosynthesis and conductance were verified at 10 am, with a decreasing on these values at 12 am. The transpiration showed no changes during the evaluating hours. Higher photosynthetic and transpiration rates were observed during rainy season. The net photosynthesis showed higher in the morning, although no significant variations of transpiration on the evaluating hours were observed. The stomatal conductance reached similar values in both seasons, suggesting a participation of non stomatal factors on the seasonal variation observed for the gas exchange.

3 INTRODUÇÃO

O ambiente fisico desempenha um papel considerável no crescimento, desenvolvimento e na produtividade das plantas, promovendo alterações físicas e químicas no metabolismo vegetal (Janas et al., 2000).

Abrams & Mostoller (1995) sugerem que as plantas exibem variações não genéticas em sua morfologia e fisiologia, em resposta à variação ambiental. Esse fenômeno, conhecido como plasticidade fenotípica é responsável pelos diferentes padrões de crescimento e desenvolvimento das espécies que vivem em diferentes ecossistemas.

O Cerrado brasileiro representa o segundo maior bioma do país e concentra sobre a sua superfície uma fonte inestimável de recursos biológicos,

pouco explorada e de elevado potencial econômico, com um grande número de espécies medicinais, frutíferas, ornamentais e fornecedoras de madeira (Almeida et al., 1998). Segundo Sarmiento (1984), as comunidades do Cerrado são complexas e caracterizam-se por uma grande diversidade de espécies arbóreas. Entre os principais fatores que influenciam a estrutura da vegetação incluem-se o fogo, os baixos níveis de nutrientes, alta temperatura e demanda evaporativa e a pronunciada sazonalidade de precipitação (Pivello & Coutinho, 1992). Para Adámoli et al. (1986), as variações climáticas, caracterizadas principalmente pela distinção entre uma estação seca (abril a setembro) e outra chuvosa (outubro a março), representam a principal limitação ambiental do Cerrado. Há, geralmente, um verão úmido, com alta precipitação, que coincide com altas irradiancias e altas temperaturas e um inverno seco, com baixa precipitação e menores temperaturas. Alvim & Alvim (1975) relatam que em ecossistemas tropicais, o potencial interno de água parece ser um fator diretamente relacionado com o ritmo de crescimento e, segundo os autores, o estresse hídrico seria a causa primária do crescimento vegetativo, sendo este um pré-requisito para a quebra da dormência dos brotos. Meinzer et al. (1999) consideram que o padrão de comportamento das espécies do Cerrado não esteja totalmente na dependência dos fatores hídricos e, sim, de uma interação dos fatores edafoclimáticos e das características peculiares desta vegetação.

O murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) destaca-se como uma espécie medicinal e frutífera, de ampla distribuição no Cerrado brasileiro. Popularmente, sua casca, rica em taninos, é muito utilizada como cicatrizante e anti-inflamatória, devido à sua elevada adstringência (Rodrigues & Carvalho, 2001). Levantamentos fitossociológicos, realizados por Almeida et al. (1998) mostraram que esta espécie apresenta uma densidade regular, variando com a fitofisionomia do Cerrado e da região. Apesar de sua importância econômica, é

ouco estudada, principalmente, em relação ao seu comportamento diante de variações no ambiente físico em que se desenvolve.

O monitoramento periódico das variações sazonais e diurnas do *status* hídrico e das trocas gasosas, particularmente da fotossíntese e transpiração, quando associadas a medições da condutância estomática e de variações de características ambientais e edáficas, pode servir como uma importante ferramenta para se compreender como uma determinada espécie ou genótipo utiliza os recursos disponíveis do ambiente e de como as flutuações sazonais destes recursos afetam a produtividade primária (Roberts et al., 1992). Segundo Hogan et al. (1995) e Ishida et al. (1996), medições “in situ” das trocas gasosas e de diferentes características de clima e solo têm sido amplamente utilizadas como ferramenta para avaliar, em nível pontual, as respostas de produtividade primária de espécies florestais diante das variações diurnas e sazonais nas condições ambiente.

A inexistência de pesquisas sobre o comportamento do murici em seu ambiente natural levou à presente investigação, que teve como propósito principal investigar a influência das variações sazonais do ambiente físico, nas trocas gasosas e nas relações hídricas desta espécie, em condições naturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições experimentais

O estudo foi conduzido no período de novembro de 2001 a de setembro de 2002, em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, situado ao sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9° 00' W GRW (figura 1). A temperatura média anual do ar dessa região é 19,4 °C e as médias

anuais de temperatura do ar máxima e mínima são, respectivamente, 26,1 °C e 14,8 °C, com precipitação anual de 1529,7 mm (Brasil, 1992). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, apresentando duas estações bem definidas: seca, de abril a setembro e chuvosa, de outubro a março.

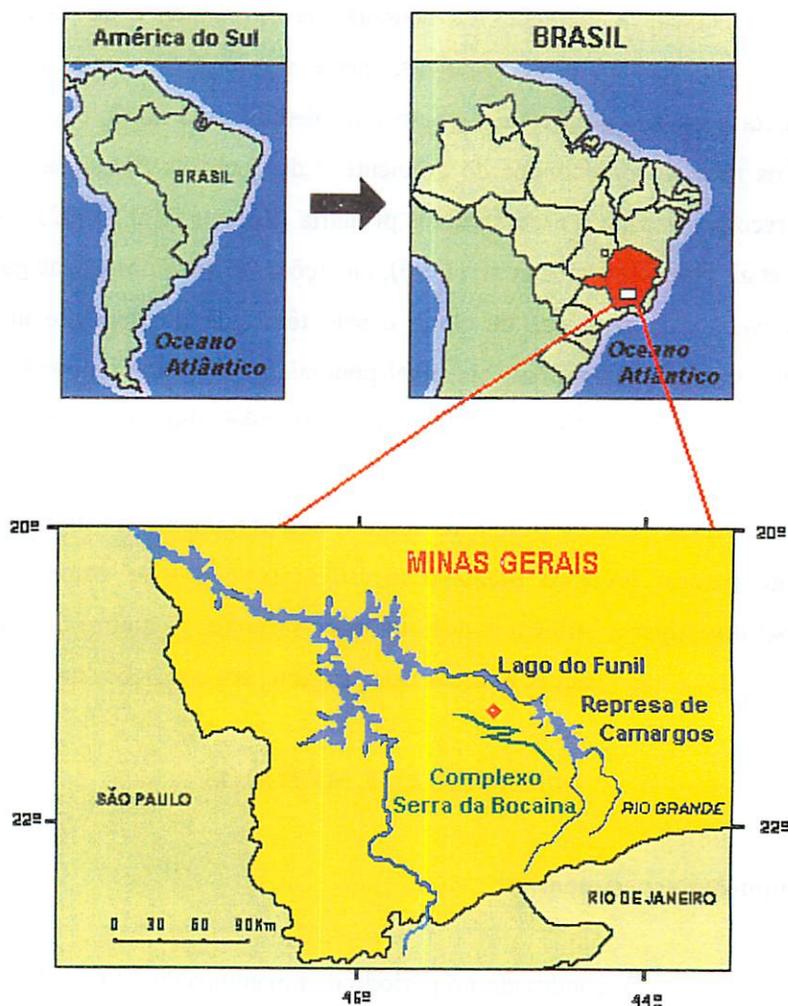


Figura 1: Localização geográfica da área experimental, onde o símbolo \blacklozenge representa o município de Ijaci (Adaptado de Rodrigues & Carvalho, 2001).

A figura 2 apresenta os valores diários de temperaturas máxima e mínima e precipitação, referentes ao período experimental, coletados na Estação Climatológica Principal de Lavras, situada a aproximadamente 10 Km da área experimental.

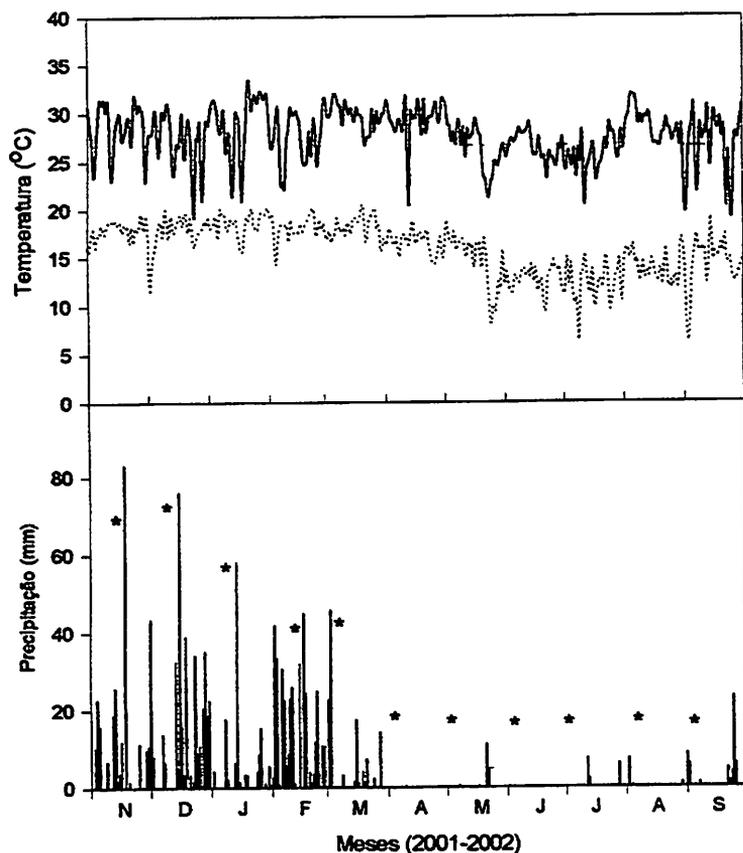


Figura 2: Valores diários de temperaturas máxima (-) e mínima (...) e precipitação diária (mm), observados durante o período experimental. As datas correspondentes às avaliações das características biofísicas estão indicadas pelo asterisco (*). Fonte: Estação Climatológica Principal de Lavras. UFLA. Lavras, MG, 2002.

De maneira geral, o período experimental foi caracterizado por condições de temperaturas máxima e mínima acima das normais climatológicas para a região (Brasil, 1992) (figura 3).

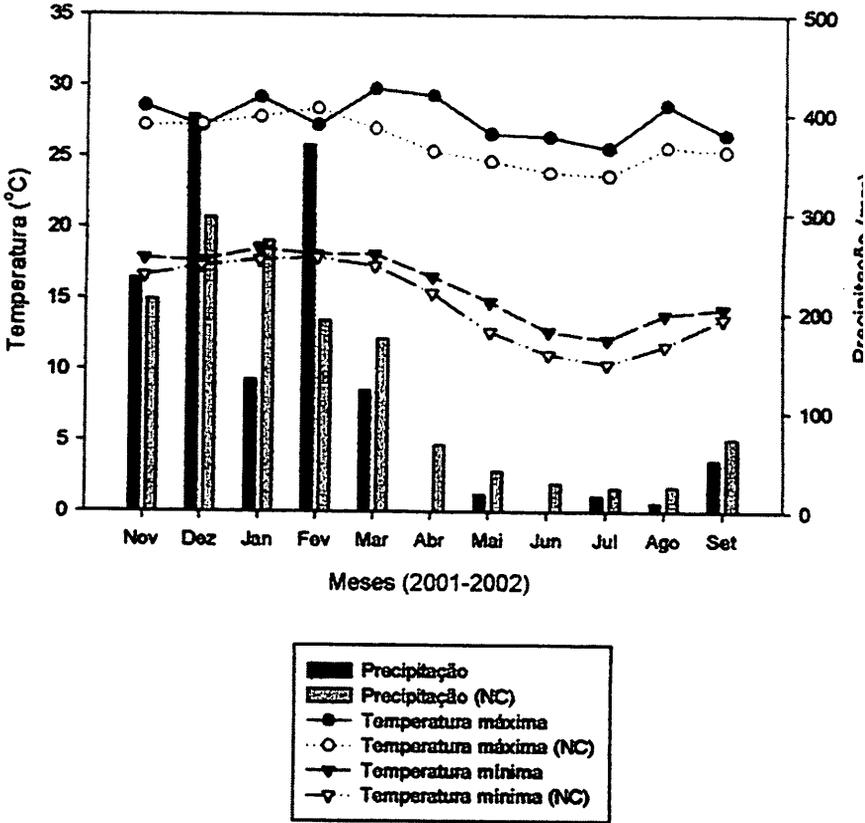


Figura 3: Valores mensais médios de temperaturas máxima e mínima e precipitação mensal (mm), durante o período experimental (Fonte: Estação Climatológica Principal de Lavras) e normais climatológicas (NC) observadas de 1965-1990 (UFLA, Lavras, MG, 2002).

Com exceção dos meses de dezembro/2001 e fevereiro de 2002, os demais meses apresentaram-se mais quentes, com elevações médias de 1 a 2 °C na temperatura. Precipitações mais elevadas foram verificadas nos meses de dezembro e fevereiro, sendo estas 26% e 48% superiores àquelas esperadas para o período, enquanto que os meses de abril a setembro mostraram-se mais secos, com baixos índices pluviométricos.

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, muito argiloso, relevo ondulado fase cerrado, segundo o Departamento de Ciência do Solo/UFLA, para onde foi encaminhada também uma amostra para análise, cujos resultados encontram-se descritos na tabela 2 (anexo B).

A espécie estudada foi o murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss), pertencente à família Malphiaceae. Para as avaliações foram selecionadas 6 plantas, com altura média $2,70 \pm 0,21$ m e diâmetro basal médio de $0,15 \pm 0,04$ m, medido a 5 cm do solo.

4.2 Características avaliadas

4.2.1 Trocas Gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas utilizando-se analisador portátil de CO₂ infravermelho (IRGA), modelo ADC-LCA-4 (Hoddesdon, UK). Foram avaliadas as seguintes características: fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s), concentração de CO₂ intercelular (C_i), densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), temperatura da folha (T_f) e da cubeta (T), umidade relativa (UR). A partir dos dados de umidade relativa e temperatura da cubeta, foram obtidos os valores do déficit de pressão de vapor da cubeta. As avaliações foram realizadas a uma frequência mensal, em dias predominantemente claros, nos horários de 10:00 e 12:00 horas (hora solar),

aproximadamente, sempre em folhas completamente expandidas. Os dois horários foram escolhidos por serem representativos de períodos com diferentes demandas atmosféricas, o que permite eliminar possíveis efeitos limitantes do horário das 12:00 horas sobre os tratamentos.

4.2.2 Potencial Hídrico (ψ foliar)

A avaliação do estado hídrico das plantas foi realizada através das medidas do potencial hídrico foliar às 7:00 e 12:00 h, respectivamente, empregando-se bomba de pressão (Soil Moisture – Modelo 3005), nas mesmas datas das trocas gasosas. Cada repetição foi constituída de uma folha, completamente expandida, por planta.

4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para todas as avaliações, empregou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de 6 repetições por tratamento (6 plantas), utilizando-se uma folha por planta. As avaliações foram realizadas sempre em folhas completamente expandidas, de ramos localizados no terço médio e com a mesma orientação solar, isto é, no sentido leste.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguindo os modelos matemáticos próprios para o delineamento inteiramente casualizado e analisados estatisticamente, utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (Ferreira, 2000). Para comparação dos contrastes entre médias dos tratamentos utilizou-se Teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O Microclima

A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) variou entre 266 a 1992 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, independente dos horários de avaliação (figura 4 a e b). O déficit de pressão de vapor (DPV) apresentou pequenas oscilações pela manhã (10:00 horas), mas de maneira geral, situou-se em uma faixa média de 2,0 kPa. Ao meio dia, as variações no DPV foram mais acentuadas, variando significativamente de 1,65 a 5,85 kPa. Em geral, a DFFFA e o DPV assumiram maiores valores na estação chuvosa, em relação aos menores valores observados na estação seca. A temperatura da folha mostrou-se mais elevada ao meio dia ($p < 0,05$), situando-se em uma faixa de 27,0 a 44,0 °C, com um aumento médio de aproximadamente 5 °C, em relação ao período da manhã (figura 4 c).

Na figura 5 estão apresentados os valores de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, déficit de pressão de vapor e temperatura da folha, correspondentes às médias para as estações chuvosa e seca, observadas às 10 e 12 horas, durante o período experimental. Verifica-se que os maiores valores de DFFFA, DPV e temperatura da folha ocorreram na estação chuvosa, sendo estes 51%, 38% e 19% superiores àqueles da estação seca, respectivamente. Aumentos no DPV e na temperatura foliar foram observados ao meio dia ($p < 0,05$), em ambas as estações, enquanto que a DFFFA não apresentou variações significativas entre os horários de avaliação, possivelmente devido às características dos estratos arbóreos que compõem a área em estudo, tornando-a mais sombreada.

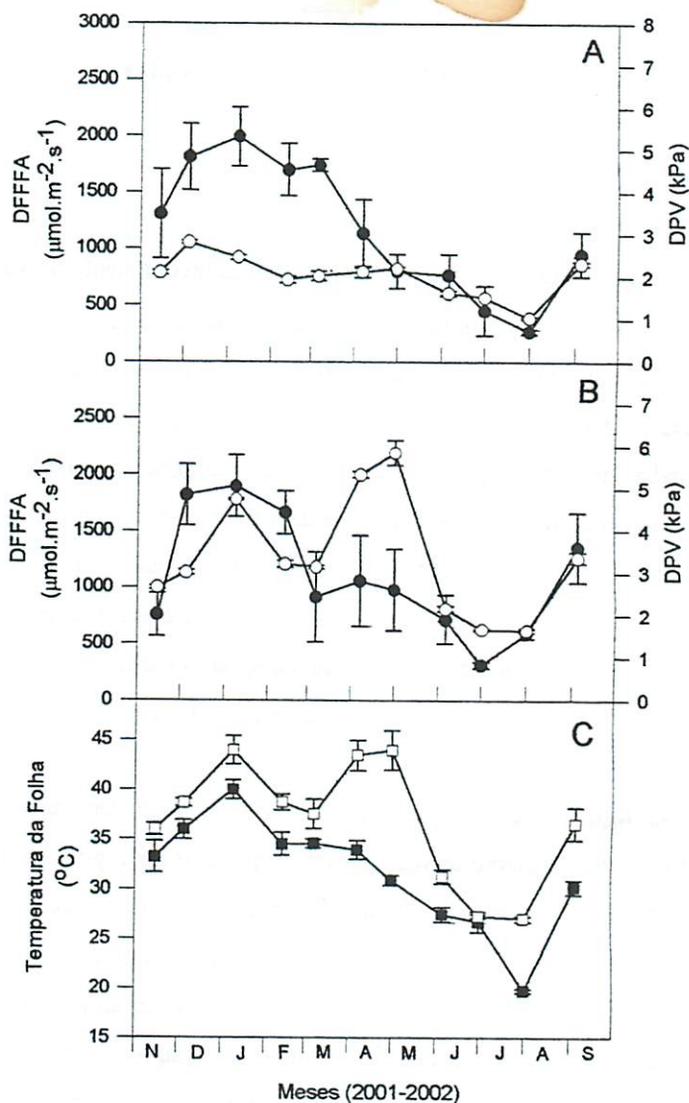


Figura 4: Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), déficit de pressão de vapor (DPV) e temperatura foliar durante o período experimental. A. DFFFA (●) e DPV (○) às 10:00 h; B. DFFFA (●) e DPV (○) às 12:00 h; C. Temperatura foliar às 10:00 (■) e 12:00 h (□). Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

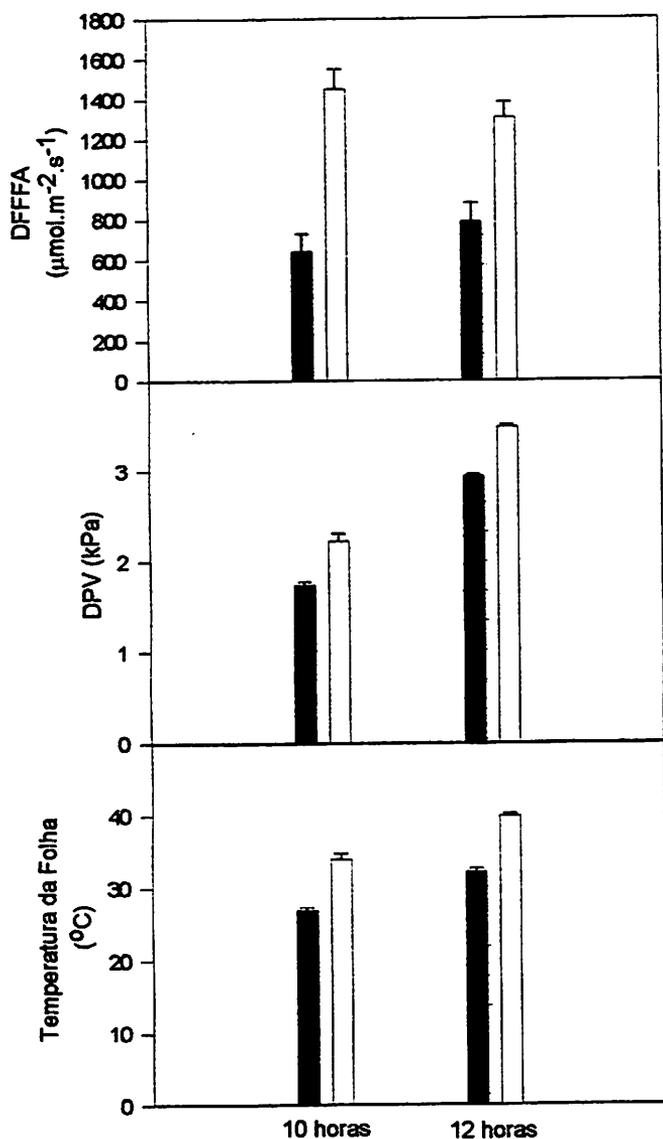


Figura 5: Valores médios da DFFFA, DPV e temperatura da folha nas estações seca (■) e chuvosa (□), às 10:00 e 12:00 h. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

5.2 Potencial hídrico foliar

A figura 6 apresenta os valores do potencial hídrico foliar das plantas de murici, às 7:00 h e 12:00h, durante o período experimental. Observa-se a ocorrência de variações mensais significativas, em ambos horários de avaliação situando-se em uma faixa de -0,10 a -0,55 MPa para o período da manhã e -0,88 a -1,50 MPa, ao meio dia.

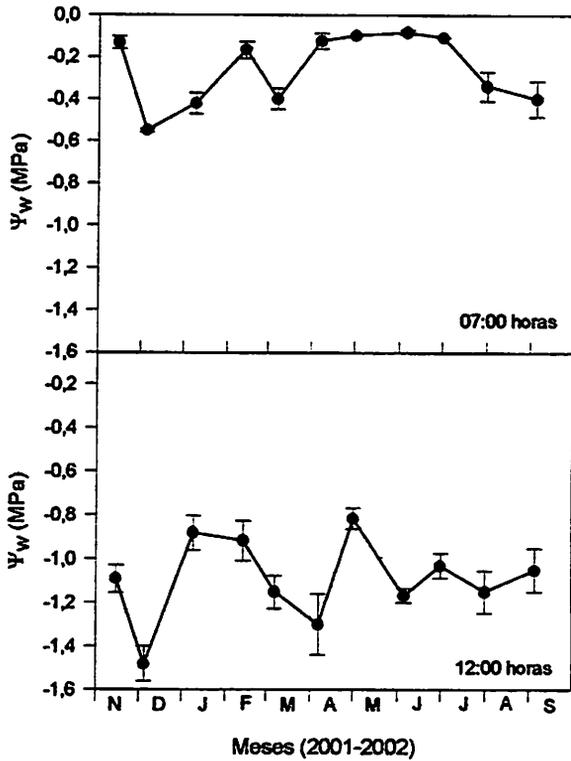


Figura 6: Potencial hídrico foliar (ψ_w) às 7:00 e às 12:00 h, referentes ao período experimental. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

Às 7:00 horas, o potencial hídrico variou em torno de um valor médio de -0,26 MPa e maiores valores foram observados no mês de abril, acentuando-se nos três meses subsequentes, o que coincidiu com o período de seca, permanecendo em torno de -0,10 MPa. Estes aumentos foram acompanhados por reduções no déficit de pressão de vapor, associados às menores temperaturas verificadas neste horário (figuras 2 e 5). As elevações observadas no potencial hídrico foliar, nos meses de novembro de 2001 e fevereiro de 2002, pela manhã, estão associadas às chuvas ocasionais ocorridas em dias imediatamente anteriores às avaliações, como pode ser observado na figura 2. Em geral, ao meio dia, observaram-se valores significativamente menores de potencial hídrico foliar, em relação àqueles observados às 7 horas. Em alguns casos, como nos meses de novembro de 2001 e abril, junho e julho de 2002, estas reduções chegaram a 90%, em média, sendo mais acentuadas em períodos de maior demanda evaporativa da atmosfera e menor disponibilidade de água no solo.

A figura 7 mostra os resultados obtidos para o potencial hídrico foliar referentes à média das estações seca e chuvosa, durante o período experimental. A análise dos resultados mostrou que os valores de potencial hídrico não variaram significativamente entre as estações, indicando que as plantas se encontravam em condições hídricas similares. Estes resultados refletem a alta disponibilidade hídrica das camadas mais profundas do solo e reforçam as observações de Goodland & Ferri (1979), Medina & Francisco (1994) e Franco (1998), de que os solos sob Cerrado conservam-se, em geral, úmidos durante todo o ano, mesmo nos períodos de seca mais intensa. Segundo Matos et al. (1997), em geral, as árvores e arbustos do Cerrado apresentam potencial hídrico ao amanhecer entre -0,1 e -0,3 MPa, na estação chuvosa e -0,3 e -0,8 MPa, na estação seca e potencial hídrico mínimo ao meio dia, geralmente alcançando valores de -1,0 a -3,0 MPa, na estação chuvosa e -2,0 a -4,0 MPa, na estação seca.

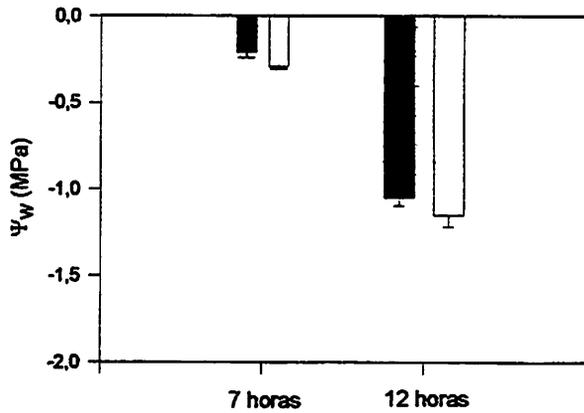


Figura 7: Valores médios do potencial hídrico foliar (ψ_w) nas estações seca (■) e chuvosa (□), às 7:00 e 12:00 h. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas no estado hídrico das plantas, determinado através do potencial hídrico foliar, entre as estações seca e chuvosa, nota-se através da figura 6, que os maiores valores de potencial hídrico foram alcançados nos meses de maio, junho e julho, meses estes típicos da estação seca. Estes resultados mostraram uma coincidência relevante com o período de senescência e abscisão foliar das plantas e estão associados, possivelmente, a uma redução no número de folhas e ao fato das plantas em estudo habitarem áreas mais sombreadas, fatores estes limitantes do consumo de água pelas plantas. A redução na atividade metabólica no período seco, associada à baixa temperatura pode representar uma estratégia de adaptação desenvolvida pela espécie em estudo, a uma baixa disponibilidade hídrica, comum nesta época do ano. Damesin & Rambal (1995), em estudos realizados com *Quercus pubescens* relatam que a senescência foliar induzida pela

seca pode ser um mecanismo de adaptação e indica uma estratégia de escape à esta condição ambiental.

Os resultados apontam o envolvimento de um complexo padrão de exploração de água, presentes nas camadas mais profundas do solo, durante a estação seca, o que, segundo Abdalla et al. (1998) é uma característica típica de muitas espécies lenhosas do Cerrado. A presença de raízes profundas possibilita a absorção de água em quantidade suficiente, para balancear a perda durante a transpiração na estação seca, mantendo o potencial hídrico foliar relativamente alto neste período.

5.3 Trocas gasosas

A figura 8 ilustra o comportamento das plantas em relação à fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática, observados às 10 horas e ao meio dia, durante o período experimental. Em geral, os valores de fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática foram mais elevados entre os meses de novembro de 2001 a março de 2002, observando-se, a partir do mês de abril, reduções médias de aproximadamente 46% para as trocas gasosas e 20% para a condutância estomática, pela manhã e ao meio dia, mostrando uma delimitação nítida de respostas das plantas, em relação às estações chuvosa e seca, respectivamente. Estes decréscimos apresentaram-se como uma característica marcante do período experimental e estão associados ao efeito das condições microclimáticas do período sobre a condutância estomática. Pela manhã, as reduções podem ser atribuídas a uma diminuição na DFFFA e ao meio dia, a uma elevação no DPV e na temperatura da folha, conforme pode ser observado pelos resultados apresentados na figura 4.

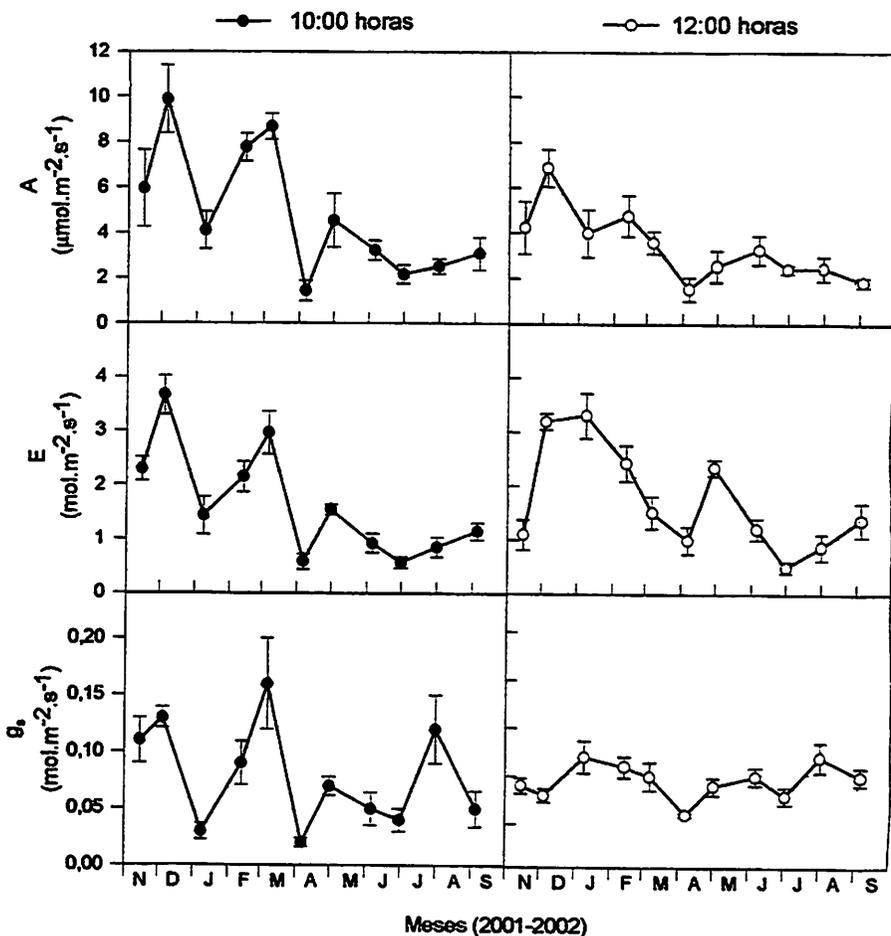


Figura 8: Fotossíntese (A), Transpiração (E) e Condutância Estomática (g_s) medidas às 10:00 e 12:00 h, durante o período experimental. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

As maiores taxas fotossintéticas e valores mais elevados de condutância estomática foram verificados às 10 horas ($p < 0,05$), com oscilações na faixa de 1,44 a 9,88 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 0,01 a 0,16 $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. Ao meio dia, as variações na condutância foram menos acentuadas, permanecendo em torno

de $0,05 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e decréscimos médios de 27 % na fotossíntese líquida e 46% na condutância estomática foram observados, em relação ao horário das 10 horas. A transpiração situou-se em uma faixa de $0,56$ a $3,66 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no período da manhã e $0,51$ a $3,30 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ao meio dia, não apresentando diferenças significativas em relação aos horários de avaliação. Os valores de fotossíntese líquida verificados para o murici, no período chuvoso, mostraram-se próximos àqueles relatados para outras espécies lenhosas do Cerrado, como *Qualea parviflora*, *Dalbergia miscolobium* e *Pterodon pubescens*, com valores de fotossíntese líquida da ordem de $12,5$, $8,0$ e $6,0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente (Bustamante et al., 1996).

A relação entre a fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática estão representadas na figura 9. Em geral, a fotossíntese líquida e a transpiração acompanharam as variações na condutância estomática, com uma resposta mais direta da transpiração, sugerindo uma modulação das trocas gasosas por fatores estomáticos, ao longo do período experimental.

O particionamento das variâncias da fotossíntese líquida e da transpiração, através de estudos de regressão, em relação à condutância estomática, mostrou que 58% da variância da taxa assimilatória ($r=0,76$) e 59% da variância da transpiração ($r= 0,77$) estiveram na dependência do movimento estomático, indicando uma resposta das trocas gasosas a estes fatores (figura 10). Segundo Jones (1998), entretanto, a análise do papel dos estômatos no controle das trocas gasosas é complexo, devido à existência de vários pontos de “feedback”, em que as próprias alterações nos padrões de assimilação e transpiração, resultantes de mudanças na condutância estomática, podem, por sua vez, afetar o movimento estomático.

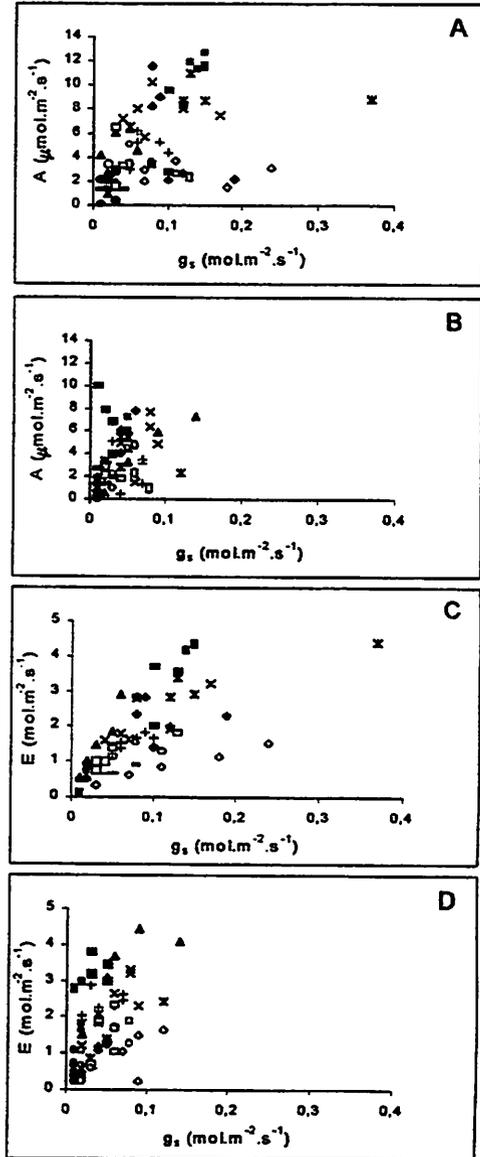


Figura 9: Relação entre a fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s), entre novembro de 2001 a setembro de 2002. A. Fotossíntese Líquida às 10 h; B. Fotossíntese Líquida às 12 h; C. Transpiração às 10 h; D. Transpiração às 12 h. UFLA:Lavras, MG, 2002.

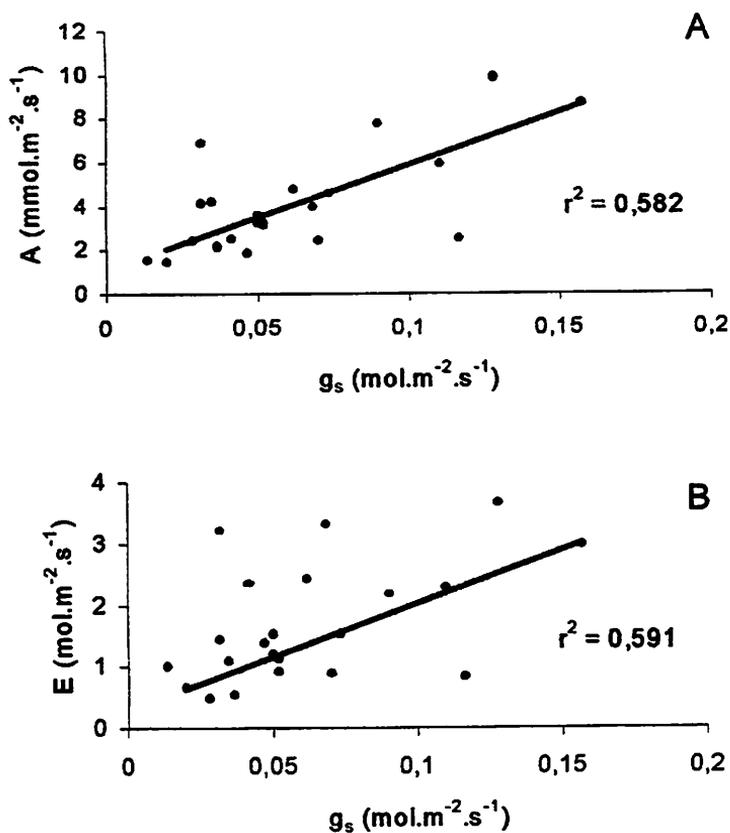


Figura 10: Relação entre a fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s), durante o período experimental. A. Fotossíntese Líquida; B. Transpiração. Valores médios. UFLA:Lavras, MG, 2002.

Analisando-se as figuras 4 e 8 verifica-se que a resposta estomática, em ambos os horários de avaliação pode ser atribuída, principalmente, a variações significativas no DPV, visto que a DFFFA atingiu valores próximos, às 10 e 12 horas, provavelmente pelo fato do murici ser uma espécie de subbosque. De acordo com Grantz (1990), o incremento no déficit de pressão de vapor pode induzir o fechamento estomático, reduzindo subsequentemente a condutância

estomática. Segundo Liao & Weng (2002), vários fatores afetam o movimento estomático. Além da disponibilidade hídrica do solo, o movimento estomático pode ser diretamente influenciado por condições ambientais como a radiação solar, déficit de pressão de vapor, concentração interna e externa de CO₂ e temperatura do ar. Além destes, determinados aspectos xeromórficos das folhas, peculiares da maioria das espécies lenhosas do Cerrado, como a presença de uma intensa pilosidade, cutícula espessa e estômatos em depressões, podem interferir em determinadas respostas estomáticas e, conseqüentemente, nas trocas gasosas (Prado & Moraes, 1997).

Os resultados médios sazonais para a fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática, observados às 10 e 12 horas, estão apresentados na **figura 11**. As maiores taxas de fotossíntese líquida e transpiração foram verificadas na estação chuvosa ($p < 0,05$), sendo estas 47% e 45% superiores, respectivamente, àquelas observadas na estação seca. A fotossíntese líquida mostrou-se mais elevada no período da manhã, apresentando ao meio dia, um decréscimo de 27% em seus valores, associado ao fechamento estomático, ocasionado por uma maior demanda atmosférica do horário, conforme pode ser verificado nas **figuras 5 e 11**. Não foram observadas variações significativas nas taxas de transpiração entre os horários de avaliação, entretanto, através da **figura 8** nota-se que as plantas apresentaram uma restrição em seu processo transpiratório, no início do período seco. Este comportamento assemelha-se àquele relatado por Franco (2000) para espécies lenhosas de Cerrado, quando estudos apontam que muitas espécies transpiram livremente durante o ano, algumas restringem sua transpiração somente no final da estação seca e poucas restringem sua transpiração a partir do início da estação seca.

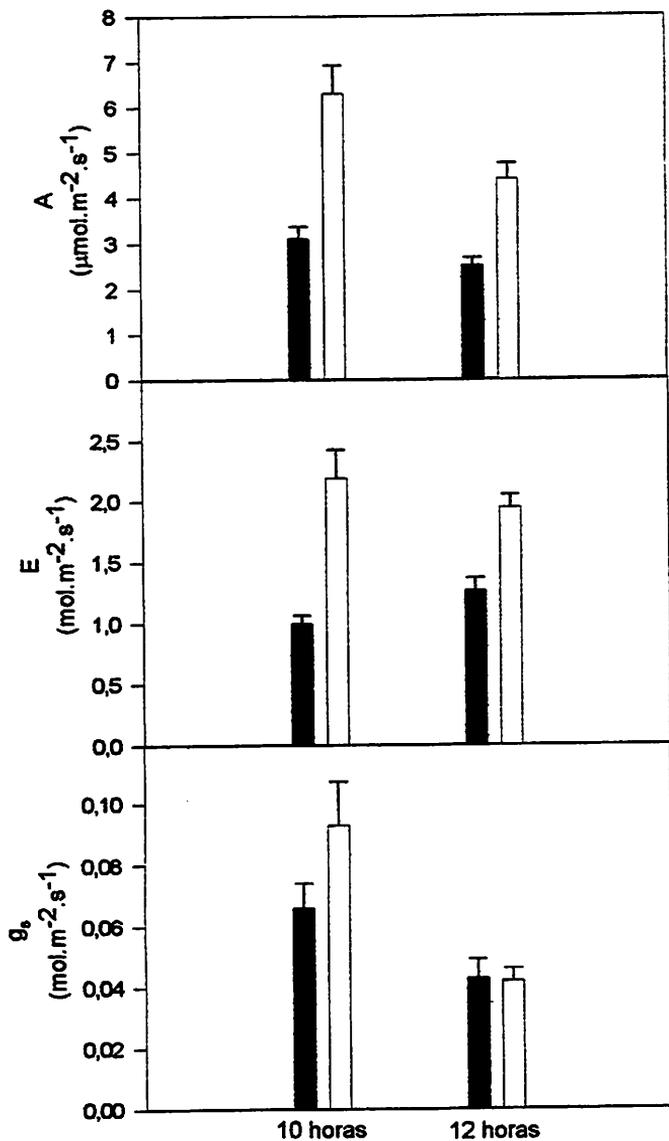


Figura 11: Valores sazonais médios da fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s), referentes à estação seca (■) e à estação chuvosa (□), às 10:00 e 12:00 h. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

A análise do comportamento estomático nas estações chuvosa e seca revelou que a condutância estomática atingiu valores próximos em ambas as estações ($p > 0,05$), indicando que o movimento estomático não respondeu às variações das condições microclimáticas do período. Estes resultados sugerem a participação de outros fatores, não estomáticos, nas variações sazonais observadas para as trocas gasosas. Alguns estudos revelam que fatores como radiação, temperatura e déficit de pressão de vapor, além da redução na concentração e atividade da enzima rubisco, fotoinibição e redução na eficiência fotoquímica do fotossistema II, exercem um controle importante sobre as trocas gasosas, e, principalmente, sobre a fotossíntese (Chaves e Rodrigues, 1987; Patakas, 1993; Souza, 1999).

Segundo Ninemets (2002), em muitas espécies, apenas a condutância estomática não pode explicar as variações percebidas no comportamento fotossintético. Mudanças nos padrões fotossintéticos podem ser ocasionadas tanto por fatores estomáticos, quanto por fatores do ambiente físico como DFFFA, temperatura e umidade do ar. Entretanto, a sensibilidade e o padrão de resposta estão condicionados à espécie em particular (Damesin & Rambal, 1995; Flexas et al., 2001). De acordo com Matos et al. (1997), vários estudos com plantas lenhosas adultas do Cerrado *sensu stricto* têm mostrado a ausência de um controle pronunciado das trocas gasosas, pela condutância estomática, durante a estação seca.

Observações de campo mostraram que o murici apresentou um padrão de desenvolvimento, dentro daquele descrito por Sarmiento & Monastério (1983), para outras espécies do Cerrado. Os processos de alta demanda energética como o florescimento, a frutificação e a produção de sementes ocorreram durante a estação chuvosa, coincidindo com o período de maior atividade assimilatória nestas plantas. O período vegetativo iniciou-se em meados do mês de abril, estendendo-se até setembro, com a queda total das

folhas, meses estes típicos da época seca. Decréscimos na atividade fotossintética foram observados neste período, juntamente com os primeiros sinais de senescência foliar, manifestando-se através de um leve amarelecimento foliar, acentuando-se nos meses seguintes e culminando com a abscisão foliar (figura 1, anexo A). Segundo Damesin & Rambal (1995), a ocorrência de altas taxas de assimilação fotossintética, antes da disfunção foliar induzida pelo déficit hídrico é um mecanismo importante e que garante a sobrevivência das espécies.

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que este trabalho foi conduzido, pôde-se concluir que:

1. O potencial hídrico foliar não apresentou variações sazonais significativas, indicando que as plantas de murici encontravam-se em condições hídricas similares nas estações seca e chuvosa.
2. Os maiores valores de potencial hídrico, antes do amanhecer, apresentados nos meses de maio, junho e julho, associados à senescência foliar observada neste período, são indicativos de uma estratégia de adaptação desenvolvida pelo murici, à baixa disponibilidade hídrica do solo, comum nesta época do ano.
3. As plantas apresentaram maiores taxas fotossintética e transpiratória na estação chuvosa, entretanto, a condutância estomática atingiu valores próximos em ambas as estações, sugerindo a participação de fatores não estomáticos nas variações sazonais observadas para as trocas gasosas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA, G. C.; CALDAS, L. S.; HARIDASAN, M.; EITEN, G. Above and belowground organic matter and root:shoot ratio in a cerrado in central Brazil. *Brazilian Journal of Ecology*, v. 2, n. 1, p. 11-23, 1998.
- ABRAMS, M. D.; MOSTOLLER, S. A. Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understory sites during a drought. *Tree Physiology*, Victoria, v. 15, n. 6, p. 361-370, June 1995.
- ADÂMOLI, J.; MACÊDO, J.; AZEVEDO, L. G.; MADEIRA NETTO, J. Caracterização da região dos Cerrados: In: GOEDERT, W. J. (Ed.). *Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo*. São Paulo: Nobel, 1986. p. 33-74.
- ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ALVIM, R.; ALVIM, P. de T. *Hidroperiodicidade dos fluxos foliares do cacaueiro*. Itabuna: CEPEC, 1975. p. 42-48. (CEPEC. Informe Técnico)
- BUSTAMANTE, M. M. C.; KOZOVITS, A. R.; SILVA, L. F.; DUARTE, G. F.; CASTRO, A. A. Assimilação de nitrato e taxas fotossintéticas de três espécies lenhosas de Cerrado. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 3., 1996, Brasília, DF. *Anais...* Brasília, 1996. p. 49-53.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. *Normas climatológicas*. Brasília, 1992. 84 p.
- CHAVES, M.M.; RODRIGUES, M.L. Photosynthesis and water relations of grapevines growing in Portugal – responses to environmental factors. In: TENHUNEN, J.D.; CATARINO, F.M.; LANGE, O.L. et al. (Eds.). *Plant response to stress*, Berlim: NATO ASI, 1987, p. 379-390 (NATO ASI, séries G15).
- DAMESIN, C.; RAMBAL, S. Field study of leaf photosynthetic performance by a mediterranean deciduous oak tree (*Quercus pubescens*) during a severe summer drought. *New Phytologist*, New York, v. 131, n. 2, p. 159-167, Oct. 1995.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos, SP: UFSCar/SIB, 2000. p. 255-258.

FLEXAS, J.; GULÍAS, J.; JONASSON, S.; MEDRANO, S.; MUS, M. Seasonal patterns and control of gas exchange in local populations of the Mediterranean evergreen shrub *Pistacia lentiscus* L. *Acta Oecologica*, Paris, v. 22, n. 1, p. 33-43, Jan./Feb. 2001.

FRANCO, A. C. Seasonal patterns of gas exchange, water relations and growth of *Roupala montana*, an evergreen savana species. *Plant Ecology*, Dordrecht, v. 136, n. 1, p. 69-76, May 1998.

FRANCO, A. C. Water and light used strategies by Cerrado woody plants. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2000, Brasília, DF. Tópicos Atuais em Botânica. Brasília, 2000. p. 292-298.

GOODLAND, R.; FERRI, M. G. *Ecologia do cerrado*. São Paulo: EDUSP., 1979. 193 p.

GRANTZ, D. A. Plant response to atmospheric humidity. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 13, n. 7, p. 667-679, Sept. 1990.

HOGAN, K. P.; SMITH, A. P.; SAMANIEGO, M. Gas exchange in six tropical semi-deciduous forest canopy tree species during the wet and dry seasons. *Biotropica*, St. Louis, v. 27, n. 3, p. 324-333, Sept. 1995.

ISHIDA, A.; TOMA, T.; MATSUMOTO, Y. et al. Diurnal changes in leaf gas exchange characteristics in the uppermost canopy of a rain forest tree, *Dryobalanops aromatica* Gaerth. *F. Tree Physiology*, Victoria, v. 16, n. 9, p. 779-785, Sept. 1996.

JANAS, K.; CVIKROVÁ, M.; PALAGIEWICZ, A. et al. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 38, n. 7/8, p. 587-593, July/Aug. 2000.

JONES, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental of Botany*, London. v.49. Special Issue. p.387-398, 1998.

LIAO, T. S.; WENG, J. H. Ecophysiological characteristics of Taiwan alder (*Alnus formosana*) seedlings adapted to the subtropical region. **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, n. 5, p. 355-362, Apr. 2002.

MATOS, E. A.; REINERT, F.; MORAES, J. A. P. V. Comparasion of carbon isotope discrimination and CO₂ and H₂O exchange between the dry and the wet season in leaves of several Cerrado woody species. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 9, n. 1, p. 77-82, 1997.

MEDINA, E.; FRANCISCO, M. Photosynthesis and water relations of savanna tree species differing in leaf phenology. **Tree Physiology**, Victoria, v. 14, n. 12 p. 1367-1381, Dec. 1994.

MEINZER, F. C.; GOLDSTEIN, G.; FRANCO, A. C.; BUSTAMONTE, M.; RUNDEL, P. W. Atmospheric and hydraulic limitations on transpiration in Brazilian cerrado woody species. **Functional Ecology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 273-282, Apr. 1999.

NINEMETS, Ü. Stomatal conductance alone does not explain the decline in foliar photosynthetic rates with increasing tree age and size in *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, n. 6, p. 515-535, June 2002.

PATAKAS, A. Diurnal changes in gas exchange and water relations in field growth grapevines. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 335, p. 251-256, 1993.

PIVELLO, V. R.; COUTINHO, L. M. Transfer of macro-nutrients to the atmosphere during experimental burnings in an open Cerrado (Brazilian savanna). **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 487-497, Nov. 1992.

PRADO, C. H. B. A.; MORAES, J. A. P. V. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of Cerrado vegetation under field conditions. **Photosynthetica**, Prague, v. 33, n. 1, p. 103-112, 1997.

ROBERTS, J. M.; ROSIER, P. T. W.; SRINIVASA MURTHY, K. V. Physiological studies in young eucalyptus stands in Southern India and their use in estimating forest transpiration. In: CALDER, I. R.; HALL, R. L.; ADLARD, P. G. (Ed.). **Growth and water use of forest plantations**. Chichester: John Wiley & Sons, 1992. p. 226-243.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SARMIENTO, G. The ecology of neotropical savannas. Cambridge: Harvard University Press, 1983. 235 p.

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

SOUZA, C. R. de Alguns aspectos da enxertia de mesa com forçagem e respostas fisiológicas à deficiência hídrica na produção de mudas de videira. 1999. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO SAZONAL DA ATIVIDADE DA FENILALANINA AMÔNIA-LIASE E DOS TEORES DE FENÓIS E TANINOS TOTAIS NO MURICI (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.

1 RESUMO

Variações sazonais do ambiente físico, características das estações seca e chuvosa influenciam diretamente o crescimento, desenvolvimento e produtividade vegetal, por promoverem alterações fisiológicas e bioquímicas no metabolismo das plantas. A disponibilidade de recursos pode ocasionar flutuações nos níveis de metabólitos secundários vegetais e efeitos regulatórios na atividade de enzimas-chaves da rota biossintética destes compostos. Com o objetivo de avaliar a influência das condições do ambiente físico, na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis e taninos totais, durante as estações seca e chuvosa, em plantas de murici desenvolvidas em condições naturais, um estudo foi conduzido em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, MG, entre os meses de novembro de 2001 e setembro de 2002. Durante o período experimental, folhas e cascas de plantas previamente selecionadas foram coletadas a uma frequência mensal e analisadas em relação à atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais, respectivamente empregando-se metodologias usuais. O delineamento empregado foi em blocos casualizados, constituído de 3 blocos, com 11 indivíduos cada. Os resultados obtidos revelaram que durante o período experimental a atividade da fenilalanina amônia-liase apresentou-se dentro de uma ampla faixa de variação (13,0 a 35,5 $\mu\text{mol de } \text{ác. cinâmico} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF), os teores de fenóis totais permaneceram praticamente constantes, em torno de 27,5% e variações significativas foram observadas em relação aos conteúdos médios de taninos totais que se situaram entre 6 a 13%, aproximadamente. Variações sazonais significativas na atividade enzimática e nos teores de taninos totais foram observados, sendo os incrementos na atividade enzimática e os declínios nos teores de taninos totais característicos da estação seca. Os níveis de fenóis totais não variaram significativamente entre as estações seca e chuvosa. Os teores de taninos totais acompanharam as respostas fotossintéticas das plantas, enquanto que a atividade enzimática mostrou-se mais influenciada pelas condições ambientais.

2 ABSTRACT

Seasonal evaluation of phenylalanine ammonia-lyase activity and total phenolic and tannin contents of murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.)

Seasonal variations of physical environment, a characteristic of both dry and rainy season may influence growth, development and plant productivity by promoting physiological and biochemical alterations on plant metabolism. The availability of resources may cause instability on the levels of plant secondary metabolite and regulatory effects on the activity of key enzymes of their biosynthetic pathway. An experiment study was conducted with the objective to evaluate the influence of physical environment conditions on the phenylalanine ammonia-lyase activity and on the total phenolic and tannin contents during dry and rainy period in murici plants developed in natural conditions. The study was performed in a prairie area, with a physiognomy of *stricto sensu* Cerrado, located in Ijaci, south of the State of Minas Gerais, from november, 2001 to september, 2002. During the experimental period, plant leaves and bark were previously selected, monthly collected and analysed according to phenylalanine ammonia-lyase activity and total phenolic and tannin contents. A complete block design, composed by of 3 plots, with 11 individuals each was used. The results revealed that during the experimental period the phenylalanine ammonia-lyase activity presented a wide range of variation (13.0 to 35.5 μmol cinnamic acid. h. g FW). The total phenolic content remained stable, around 27%. Significant variations (approximately 6-13%) were observed in relation to the average content of total tannin. It was also observed significant seasonal variations on enzyme activity and total tannins contents. The increase of the enzyme activity and decrease of the total tannins contents were characteristic of the dry season. The levels of total phenolics had no vary significant variation during the dry and rainy seasons, while the total tannin contents followed the photosynthetic response of plants, the enzyme activity was much more influenced by environmental conditions.

3 INTRODUÇÃO

Ao longo de seu biociclo, as plantas sintetizam uma grande variedade de metabólitos secundários, para os quais muitas funções ecológicas, fisiológicas e curativas têm sido atribuídas (Kouki & Manetas, 2002). Segundo Harborne (1999) e Santiago et al. (2000), os compostos fenólicos destacam-se como um

grupo de substâncias químicas aromáticas, amplamente distribuídos no reino vegetal e com uma grande diversidade de papéis biológicos, atuando como compostos de defesa de plantas contra herbívoros e patógenos (taninos), suporte mecânico (lignina), na atração de agentes polinizadores e dispersores de frutos e sementes (antocianina e flavonóis), absorção de radiação U.V. (furanocumarinas), ou interferindo no crescimento, por competição com outras plantas (fenóis simples e proantocianidinas). Além de sua importância biológica, muitos fenólicos vegetais como taninos, flavonóides e cumarinas têm sido empregados em fitoterapia, devido ao seu elevado potencial medicinal.

Os taninos são substâncias polifenólicas, de alto peso molecular e sabor adstringente, que se encontram dissolvidos no interior dos vacúolos vegetais (Parra Pozo, 1997; Santiago et al., 2000). Além de sua larga utilização nas indústrias de curtume (Santos et al., 2000), tradicionalmente são também utilizados na medicina popular, como antidotos contra intoxicações por alcalóides, no tratamento de queimaduras e em infecções intestinais, devido à sua ação adstringente (Haslam, 1996). De acordo com De Bruyne (1999), os taninos, assim como os demais compostos fenólicos, derivam-se de um intermediário biossintético comum, a fenilalanina, ou de seu precursor, o ácido shiquímico, sintetizados através da Rota do Shiquimato.

A fenilalanina amônia-liase destaca-se como uma enzima chave e regulatória da rota de biossíntese dos fenilpropanóides e seus derivados, catalisando a transformação, por desaminação, do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico, sendo este o primeiro passo para a biossíntese dos fenólicos vegetais (Solecka & Kacperscka, 1995; Benkeblia, 2000; Cheng et al., 2001).

Do ponto de vista fisiológico, os taninos são considerados metabólitos secundários, originados diretamente do metabolismo do carbono (Koricheva et al., 1998; Heyworth et al., 1998). Nas plantas, a alocação de carbono para a

síntese de metabólitos secundários é determinada tanto pela disponibilidade de recursos edafoclimáticos (água, nutrientes, luz, concentração de CO₂), como por estresses específicos (seca, poluentes atmosféricos, radiação ultra-violeta, temperatura) (Koricheva et al., 1998; Lavola, 1998; Kouki & Manetas, 2002). Devido à estreita inter-relação do metabolismo primário, com as rotas de biossíntese dos metabólitos secundários, vários fatores que afetam o crescimento, fotossíntese e outros aspectos do metabolismo primário, também causam efeitos no metabolismo secundário (Lavola et al., 2000). Contudo, segundo Lavola (1998), deve-se considerar que quando associados, estes fatores podem afetar diferentemente os padrões morfológicos e bioquímicos das plantas.

De acordo com Kouki & Manetas (2002), a disponibilidade de recursos pode ocasionar flutuações nos níveis de compostos fenólicos vegetais, além de promoverem efeitos regulatórios na atividade de enzimas chaves da rota biossintética destes metabólitos. Janas et al. (2000) ressaltam que a atividade da fenilalanina amônia-liase e o acúmulo de fenólicos ocorrem como consequência de vários estresses. Entre eles, citam-se os estresses bióticos, como infecção por microorganismos, ataque de insetos e herbívoros (Rivero et al., 2001) e estresses abióticos como temperatura (Solecka et al., 1999; Janas et al., 2000), luz (Lavola et al., 2000), disponibilidade de água (Chakraborty et al., 2001), ferimentos (Saltviet, 2000) e níveis de CO₂ atmosférico (Hartley et al., 2000; Assis et al., 2001). Solecka & Kacperska (1995) relatam que estes estresses podem modificar tanto a síntese da enzima, como a sua atividade, em uma ampla variedade de plantas.

Atualmente, várias pesquisas científicas relacionadas às plantas medicinais, ou com potencial medicinal, têm sido direcionadas, não somente em relação aos aspectos farmacológico e químico, mas também em relação aos aspectos fitotécnicos do crescimento, desenvolvimento e produção (Castro, 1999). O conhecimento do comportamento destas espécies, em relação às

condições impostas pelo ambiente físico e dos possíveis efeitos destas condições nos teores de seus princípios ativos é de fundamental importância para utilização sustentável desta inestimável fonte de recursos naturais.

A exploração indiscriminada de recursos vegetais tem contribuído para extinção de várias espécies utilizadas tradicionalmente na medicina popular. EMBRAPA, através do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), vem desenvolvendo trabalhos de levantamento de espécies medicinais do Cerrado, as quais estão sendo selecionadas para a inclusão na lista de espécies prioritárias para conservação (Almeida et al., 1998). Entre estas espécies encontra-se a *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss., conhecida comumente como murici, uma espécie medicinal e frutífera de ampla distribuição no Cerrado brasileiro. O murici é utilizado popularmente devido às suas propriedades adstringentes, atribuídas ao tanino, presente em altas concentrações na casca desta planta.

Devido a existência de poucas informações relacionadas à ação dos fatores ambientais, na síntese de metabólitos secundários com atividade terapêutica, propôs-se esta investigação, que teve como objetivo principal verificar a influência sazonal de fatores do ambiente físico, na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis e taninos totais em plantas de murici, desenvolvidas em condições naturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações gerais: época, localização e condições experimentais

O estudo foi conduzido no período de novembro de 2001 a setembro de 2002, em área de formação campestre com fisionomia de Cerrado *sensu stricto*, localizada no município de Ijaci, situado ao sul do estado de Minas Gerais, a 918

m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9° 00' W GRW. A temperatura média anual do ar dessa região é 19,4 °C e as médias anuais de temperatura do ar máxima e mínima são, respectivamente, 26,1 °C e 14,8 °C, com precipitação anual de 1529,7 mm (Brasil, 1992). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, apresentando duas estações bem definidas: seca, de abril a setembro e chuvosa, de outubro a março.

A figura 1 apresenta os valores diários de horas de insolação, temperaturas máxima, média e mínima e precipitação, referentes ao período experimental, coletados na Estação Climatológica Principal de Lavras, situada a aproximadamente 10 Km da área experimental. De maneira geral, o período experimental caracterizou-se por condições de temperaturas máxima e mínima acima das normais climatológicas para a região (Brasil, 1992), como mostrado no capítulo anterior. A temperatura média variou de 14,6 °C a 24,6 °C, enquanto que a insolação oscilou entre 0 a 12,2 horas.

O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, muito argiloso, relevo ondulado fase cerrado, segundo o Departamento de Ciência do Solo/UFLA, para onde foi encaminhada também uma amostra para análise, cujos resultados encontram-se descritos na tabela 2 (anexo B).

A espécie estudada foi o murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss), pertencente à família Malphigiaceae. Para as avaliações selecionaram-se plantas recém brotadas, com altura média $2,90 \pm 0,27$ m e diâmetro basal médio de $0,17 \pm 0,051$ m, medido a 5 cm do solo.

Para as avaliações bioquímicas, empregaram-se folhas completamente expandidas, retiradas de ramos localizados nos terços inferior, médio e superior das plantas e, para as avaliações fitoquímicas, coletou-se fragmentos de cascas do tronco, removidos a uma altura de aproximadamente 50 cm do solo, com auxílio de uma faca. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi

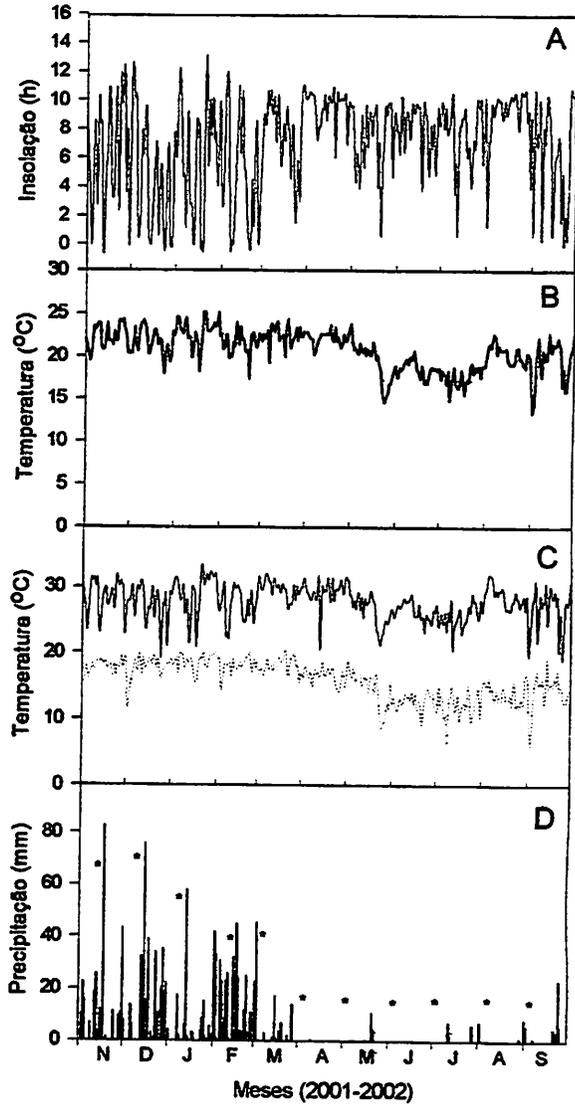


Figura 1: Valores diários de: A. insolação; B. temperatura média; C. temperatura máxima (–) e mínima (...); D. precipitação diária (mm), observados durante o período experimental. As datas das coletas estão indicadas pelo asterisco (*). Fonte: Estação Climatológica Principal de Lavras. UFLA. Lavras, MG 2002.

acondicionado em papel alumínio, etiquetado e armazenado em nitrogênio líquido. Posteriormente, as folhas foram transferidas para Freezer Forma Scientific (model 925), a $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de serem utilizadas. As cascas foram liofilizadas, utilizando-se liofilizador Labconco, modelo Freezone 6 e a seguir, trituradas em micro-moinho e armazenadas em frascos fechados e protegidos da luz.

As coletas foram realizadas nos mesmos dias das avaliações das trocas gasosas e potencial hídrico foliar, pela manhã, a uma frequência mensal, em dias predominantemente claros das estações seca e chuvosa (figura 1).

4.2 Características avaliadas e reagentes utilizados

Foram avaliadas características bioquímicas e fitoquímicas em plantas já estabelecidas na área em estudo.

A L-fenilalanina utilizada como substrato, o β -mercaptoetanol, o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), o polivinil polipirrolidona (PVPP), a agarose e o ácido tânico empregado como padrão foram obtidos da Sigma Chemical CO., St. Louis, MO. As demais substâncias químicas utilizadas apresentavam o maior grau de pureza disponível. A água empregada no preparo de todas as soluções foi previamente destilada e deionizada.

4.2.1 Características bioquímicas

O estudo bioquímico foi baseado na avaliação sazonal da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase. O procedimento descrito por Assis et al. (2001), com algumas modificações foi utilizado para extração e determinação da atividade enzimática.

Folhas congeladas (5 g) foram pulverizadas com nitrogênio líquido homogeneizadas com 20 mL de acetona 80% congelada. A seguir, homogenato foi transferido para um freezer (-2 °C), por 15 minutos posteriormente centrifugado a 20.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi seco, por 20 minutos, à vácuo. O extrato protéico foi obtido homogeneizando-se suavemente 0,5 g do pellet seco, em 9,7 mL de uma solução tampão de borato de sódio 0,1 M, pH= 8,8, contendo 5 mM de β-mercaptoetanol, 2 mM de EDTA e 4% (p/v) de PVPP, a 4 °C. Depois de 1 h, homogenato foi centrifugado a 27.000 g, por 30 minutos, a 4 °C. A mistura de reação foi constituída por 0,5 mL de L-fenilalanina 30 µM, 30 mM de tampão borato de sódio pH= 8,8 e 0,5 mL de extrato protéico cru, num volume total de 1 mL. O substrato foi adicionado após 10 minutos de pré-incubação e a reação foi interrompida com 0,1 mL de HCl 6 N. A atividade da fenilalanina amônia-lias foi determinada pela produção de cinamato, após 90 minutos, a 30 °C, sob agitação contínua, medida pela variação da absorbância a 290 nm. A atividade da enzima foi determinada em µmol de ácido cinâmico.h⁻¹.g⁻¹ de folha fresca. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2 Características fitoquímicas

O estudo fitoquímico foi baseado na determinação dos teores de fenóis e de taninos totais nas cascas da planta em estudo.

a) Fenóis Totais

Aproximadamente 500 mg de casca liofilizada e triturada foi extraída cinco vezes com 5 mL de uma mistura de metanol: água (1:1), sob refluxo. O volume final foi completado para 25 mL.

Uma alíquota de 100 μL do extrato foi utilizada para a determinação dos teores de fenóis totais, através do método de Folin-Dennis, segundo as normas da AOAC (1970). As determinações foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso em percentagem de ácido tânico, por g de casca seca

b) Taninos Totais

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

Um volume de 5 mL do extrato, previamente preparado para a determinação dos fenóis totais foi concentrado a 37 °C e posteriormente retomado com 0,5 mL de uma mistura de metanol:água (1:1). Uma alíquota de 15 μL foi utilizada para a determinação. Todas as determinações foram feitas em triplicata. O resultado foi expresso em percentagem de tanino, por g de casca seca.

4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental empregado para os estudos bioquímicos e fitoquímicos foi em blocos casualizados, sendo a área experimental dividida em 3 blocos, com 11 indivíduos (11 plantas) cada. Para minimizar possíveis interferências provocadas por variações edáficas, a coleta das cascas e folhas foi realizada em um indivíduo por bloco.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguindo os modelos matemáticos próprios para o delineamento em blocos casualizados e analisados estatisticamente, utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (Ferreira, 2000). Para comparação dos contrastes entre médias dos tratamentos utilizou-se Teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2 encontram-se representados os resultados da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais durante o período experimental. Conforme pode-se observar, a atividade da fenilalanina amônia-liase apresentou-se dentro de uma ampla faixa de variação, situando-se entre 13,0 e 35,5 μmol de ácido cinâmico. $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de matéria fresca ($p < 0,05$). Nos meses de dezembro de 2001 a maio de 2002, a atividade enzimática manteve-se praticamente constante, em torno de 16,0 μmol de ácido cinâmico. $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de matéria fresca. Entretanto, em junho observou-se uma queda de aproximadamente 35% na atividade, em relação a maio, o que coincidiu com o aumento na amplitude térmica verificada durante o período experimental (figura 1) e com o início do processo de senescência foliar das plantas (figura 1, anexo A). Imediatamente após, houve uma recuperação rápida e progressiva na atividade enzimática, alcançando valores máximos de atividade em meados do mês de setembro de 2002. Os teores médios de fenóis totais (figura 2B) permaneceram praticamente constantes durante todo o período de avaliação ($p > 0,05$), em torno de 27,5%. Entretanto, variações significativas foram observadas com relação aos conteúdos médios de taninos totais, que variaram de 6 a 13%, aproximadamente, durante o período experimental. Estes valores mostraram-se inferiores àqueles relatados para esta espécie na literatura, os quais, segundo Silva Filho (1992), encontram-se na faixa de 15 a 20%. Os maiores teores de taninos totais foram verificados entre os meses de novembro de 2001 e maio de 2002, situando-se entre 9,0 e 13,3%, com picos máximos de 11,7% e 13,3% nos meses de janeiro e abril, respectivamente. A partir de abril,

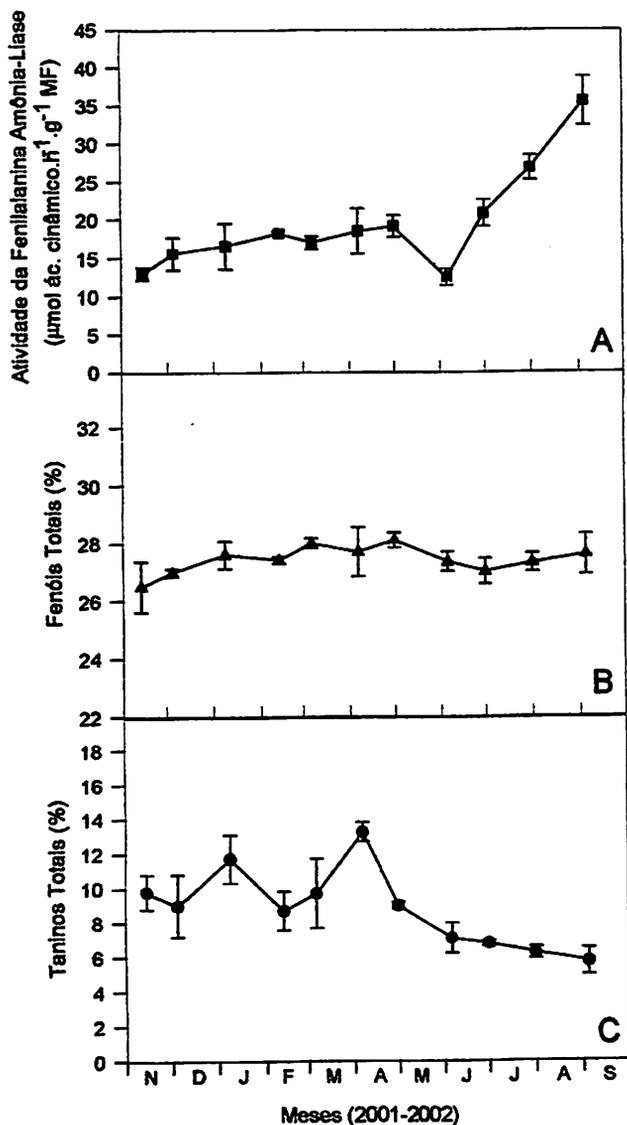


Figura 2: Valores médios de atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (A) e teores médios de fenóis (B) e taninos totais (C) no murici, durante o período experimental. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 3 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

observaram-se declínios progressivos e acentuados nestes teores, até que em setembro, o conteúdo médio alcançou a faixa de 6%.

Os resultados referentes às médias das estações seca e chuvosa, e relação às características analisadas estão indicados na figura 3. Estes resultados evidenciaram uma maior atividade da fenilalanina amônia-liase na estação seca, sendo esta cerca de 30% superior àquela observada na estação chuvosa ($p < 0,05$). Não foram observadas variações nos conteúdos de fenóis totais entre as estações, entretanto, um declínio significativo nos teores de taninos totais foi verificado na estação seca, sendo este da ordem de 33%, em média.

As variações observadas na atividade da fenilalanina amônia-liase mostraram uma coincidência relevante com as mudanças ocorridas nas condições microclimáticas, nas estações seca e chuvosa. Analisando-se os dados apresentados nas figuras 1 e 2A, percebe-se que as menores atividades foram características de períodos com menores amplitudes térmicas e maiores precipitações, isto é, de meses típicos da estação chuvosa, enquanto que as maiores atividades foram verificadas em condições opostas, ou seja, nos períodos mais frios e secos, com maiores amplitudes térmicas, característicos da estação seca. Uma relação inversa entre a atividade enzimática e a DFFFA (apresentada no capítulo 3) também pôde ser notada. A queda na atividade enzimática observada no mês de junho, coincidiu principalmente, com um aumento na amplitude térmica, próprio da estação seca. Segundo Lavola et al. (2000), declínios na atividade enzimática são característicos dos estádios iniciais de adaptação ou ajustamento das plantas, às novas condições ambientais a que estão sendo submetidas.

Variações na atividade da fenilalanina amônia-liase, em decorrência das modificações no ambiente físico, especialmente devido a alterações na temperatura, radiação e disponibilidade hídrica têm sido amplamente descritas, desde que esta enzima foi descoberta e caracterizada pela primeira vez, por

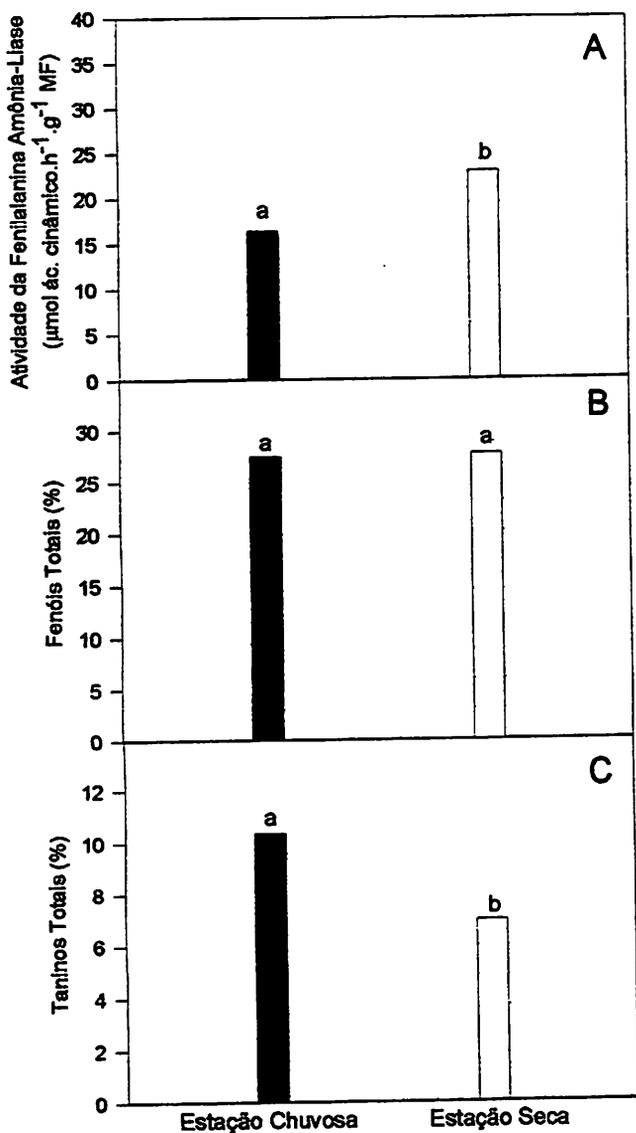


Figura 3: Valores sazonais médios de atividade da fenilalanina amônia-liase (A) e teores de fenóis (B) e taninos totais (C), referentes às estações seca e chuvosa. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2002.

Koukol & Conn (1961), em folhas de *Hordeum vulgare*. Segundo Rivero et al. (2001) e Chakraborty et al. (2001), a atividade da fenilalanina amônia-liase aumenta em resposta a diferentes tipos de estresse, especialmente ao estresse térmico, sendo considerada por muitos autores como “proteínas do estresse” relacionando-se com desenvolvimento de mecanismos de proteção e adaptação de plantas a situações adversas.

De acordo com Solecka et al. (1999), em condições naturais, as plantas são expostas a flutuações na temperatura, que podem manifestar-se como variações rápidas ou como flutuações sazonais, repetidas por vários meses. Estas mudanças geralmente aparecem combinadas com modificações de outros fatores ambientais como qualidade de luz, irradiância e disponibilidade de água (Solecka et al., 1999) e podem levar a injúrias irreversíveis ou à indução de uma cascata de reações resultando em um ajustamento das plantas às condições de estresse (Huner et al., 1996). Segundo Janas et al. (2000) e Chakraborty et al. (2001), a exposição a baixas temperaturas dispara mudanças fisiológicas e bioquímicas, que levam as plantas a ajustarem-se a estas condições. Atualmente, vários trabalhos têm relacionado o efeito das baixas temperaturas, com um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase, em diferentes espécies vegetais, como *Solanum tuberosum* L., *Brasica napus* L., *Glicine max* (L.) Merr., *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Citrullus lanatus* [Thomb.] Mansf. (Graham Patterson, 1982; Solecka & Kacperska, 1995; Solecka et al., 1999; Janas et al., 2000 e Rivero et al., 2001). Entretanto, faltam informações sobre os mecanismos responsáveis pela ativação desta enzima, sob baixas temperaturas (Solecka & Kacperska, 1995). Grandes avanços têm sido notados, porém, em relação ao aumento nos níveis da fenilalanina amônia-liase, nestas condições. Acredita-se que as concentrações da enzima aumentam com a diminuição da temperatura, porque o padrão de síntese sofre uma menor redução do que o padrão de degradação (Jones, 1984).

Além dos efeitos da temperatura, alguns trabalhos descrevem também o efeito da radiação e da disponibilidade hídrica sobre a atividade desta enzima. Zucker (1969), em um trabalho clássico, mostrou que baixas intensidades luminosas produzem um efeito máximo na atividade da fenilalanina amônia-liase em *Xanthium*, enquanto que altas intensidades são necessárias para obter-se atividade máxima desta enzima em morangueiro. Chakraborty et al. (2001) relatam que em folhas de *Camellia sinensis* submetidas a estresse hídrico moderado, por 7 a 14 dias, houve um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase e nos teores de fenóis totais, os quais, segundo os autores, relacionam-se com a proteção e a adaptação de plantas a esta condição de estresse.

As variações na atividade da fenilalanina amônia-liase têm sido freqüentemente relacionadas com modificações simultâneas no padrão de acúmulo de vários compostos fenólicos, como flavonóides, taninos, cumarinas, lignina e suberina, em diferentes espécies vegetais (Margna, 1977; Jones, 1984; Solecka & Kacperska, 1995; Janas et al., 2000). Assim, segundo Margna (1977), é de se esperar que qualquer condição que altere a atividade fenilalanina amônia-liase também afete os níveis de muitos fenólicos vegetais. Segundo Solecka & Kacperska (1995), vários compostos fenólicos podem estar envolvidos nas respostas e na proteção de plantas ao estresse provocado pela redução na temperatura. Um acúmulo destes compostos tem sido geralmente observado, como consequência de um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase (Solecka & Kacperska, 1995; Janas et al., 2000; Rivero et al., 2001). Entretanto, para Margna (1977), estas evidências não são absolutas, pois a fenilalanina amônia-liase e polifenóis relacionados podem exibir respostas opostas, sob a influência de diferentes fatores ambientais. Desta maneira, dentro de certos limites fisiológicos, modificações em determinadas condições do ambiente, como aquelas que caracterizam as estações seca e chuvosa, podem

resultar em um aumento na atividade enzimática e em uma redução no acúmulo destes compostos, ou vice-versa, ou ainda, até mesmo, em uma falta de correlação entre estas características. De acordo com Jones (1984), aumentos na atividade da fenilalanina amônia-liase nem sempre estão relacionados com aumentos nos teores de fenóis totais, além do que modificações nos níveis de um determinado composto fenólico podem ocorrer, sem que haja, necessariamente, correspondência com mudanças nos níveis dos fenóis totais.

No presente estudo, não se observou relação entre as variações na atividade da fenilalanina amônia-liase e os níveis de fenóis totais nas plantas durante o período experimental (figura 4A). Entretanto, flutuações significativas nos conteúdos de taninos totais foram verificadas, sendo estas inversamente proporcionais à atividade enzimática e sem correspondência recíproca com os níveis de fenóis totais (figura 4B e 4C). Jones (1984) relata que muitas vezes a falta de correlação entre a atividade da fenilalanina amônia-liase e os níveis de fenóis totais está na dependência, principalmente, da baixa disponibilidade do substrato primário, isto é, do aminoácido fenilalanina, e não propriamente no aumento da atividade enzimática.

Considerando-se simultaneamente as respostas fisiológicas do murici, em especial o comportamento fotossintético e as variações nos teores de taninos totais durante o período experimental, verifica-se que, em geral, os níveis de taninos acompanharam as respostas fotossintéticas das plantas, sendo os maiores valores observados em meses correspondentes à estação chuvosa, enquanto que reduções significativas foram notadas na estação seca (figura 5).

Os picos observados em relação aos conteúdos de taninos totais, nos meses de janeiro e abril refletem, possivelmente, a alta taxa assimilatória das plantas nos meses de dezembro de 2001 e março de 2002, respectivamente, visto que as coletas das cascas foram realizadas, geralmente, no início de cada mês. Esta possibilidade também é válida para se explicar a queda acentuada destes

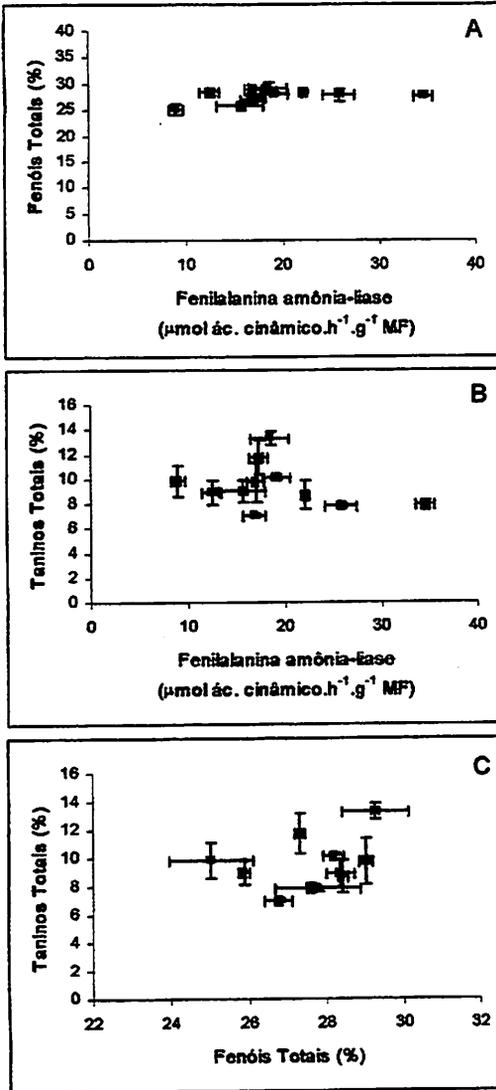


Figura 4: Relação entre a atividade média da fenilalanina amônia-liase e teores médios de fenóis e taninos totais, durante o período experimental. A. Fenilalanina amônia-liase e fenóis totais; B. Fenilalanina amônia-liase e taninos totais; C. Taninos e fenóis totais. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 3 observações. UFLA. Lavras, MG, 2002.

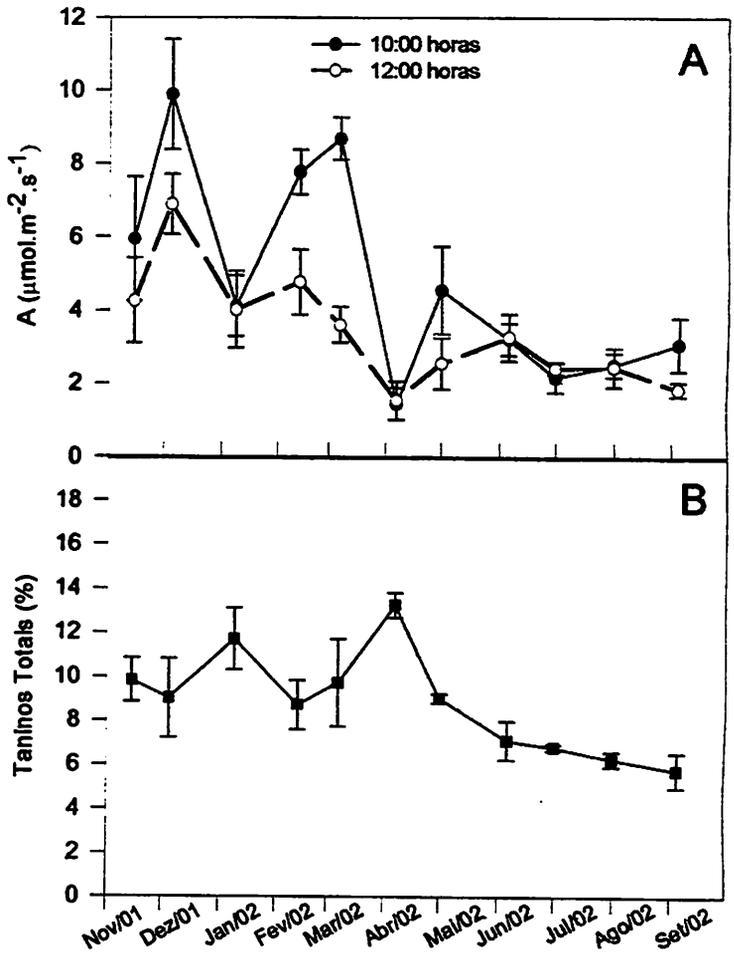


Figura 5: A. Valores médios de fotossíntese líquida; B. Teores médios de taninos totais durante o período experimental. Cada barra representa a média \pm o erro padrão de 6 observações para a fotossíntese líquida e 3 observações para teores de taninos totais. UFLA. Lavras, MG, 2002.

teores, observada no mês de maio, provavelmente em decorrência das baixas taxas fotossintéticas verificadas em abril.

Variações sazonais significativas nos teores de taninos totais e em tipos específicos de taninos têm sido detectadas em várias espécies vegetais, assim como para outras, não se têm encontrado respostas significativas. Feeny (1968), em estudos realizados com *Quercus robur* L., uma espécie lenhosa decídua, mostrou que os teores de taninos nas folhas maduras desta espécie aumentaram de 0,5%, para 5% durante a estação de crescimento das plantas, correspondentes aos meses de maio e setembro, respectivamente, período este cuja ocorrência de herbivoria era maior. O fracionamento dos taninos, presente em folhas de *Liquidambar formosa* coletadas em diferentes estações do ano, revelou a presença de tipos específicos de taninos hidrolisáveis na primavera e no outono, sendo as mudanças sazonais nas estruturas e nos teores destes taninos hidrolisáveis associadas à presença de uma rota biogenética particular para estas substâncias na espécie em estudo (Hatano et al., 1986). Glyphis & Puttick (1988) demonstraram a ocorrência de incrementos nos teores de proantocianidinas e na adstringência das folhas de 15 espécies vegetais, típicas de ecossistema mediterrâneo, durante o outono e reduções consideráveis na concentração destes compostos no inverno. Entretanto, Perevolotsky (1994) relata que em *Pistacia lentiscus*, *Cistus* spp., *Quercus calliprinos* e *Pillyrea latifolia*, os teores de taninos totais permaneceram praticamente constantes entre as estações seca e chuvosa. Este resultado foi atribuído à adaptação das plantas à forte herbivoria a que são submetidas, desde os seus estádios iniciais de desenvolvimento.

Neste estudo, as respostas obtidas evidenciaram uma resposta associada dos conteúdos taninos nas plantas, com o processo fotossintético, importante via de biossíntese dos metabólitos primários, o que tem sido frequentemente relatado na literatura (Gebauer et al., 1998; Heyworth et al., 1998; Koricheva et

al., 1998; Tognetti et al., 1998; Harttley et al., 2000; Kouki & Manetas, 2000). Os taninos vegetais, assim como outros compostos fenólicos são descritos por vários autores, como metabólitos secundários originados diretamente do metabolismo do carbono. Sua biossíntese está diretamente relacionada a processos de crescimento e diferenciação celular, regulados pela disponibilidade de recursos ambientais e que, segundo Lavola et al. (2000), podem competir com a alocação de carbono para o metabolismo secundário. Para Koricheva et al. (1998), os níveis destes metabólitos estão, em parte, sob o controle genético, sendo determinados também pelas condições ambientais.

Atualmente, várias hipóteses têm sido elaboradas para explicar o envolvimento dos padrões evolucionários e fenotípicos no acúmulo e na distribuição de metabólitos secundários derivados do metabolismo do carbono sob determinadas condições ambientais, que tendem a aumentar o conteúdo de carboidratos não estruturais. Em geral, estas hipóteses sugerem que as condições do ambiente que restringem em maior proporção o crescimento vegetal do que a fotossíntese, como luz, temperatura, disponibilidade de água e concentração de CO_2 , combinadas com uma baixa disponibilidade de nutrientes, tendem a produzir uma alta relação carbono:nutrientes e um excesso de carboidratos não estruturais, que se acumulam nas folhagens de plantas herbáceas e lenhosas. Este excesso, pode então, ser alocado para a produção de compostos derivados do carbono, como taninos e outros tipos de fenólicos vegetais (Heyworth et al., 1998; Gebauer et al., 1998). De acordo com Peñuelas et al. (1997) e Lavola et al. (2000), as variações nos teores destes metabólitos não podem ser explicadas somente pelas diferenças na disponibilidade de carboidratos, devendo-se considerar também a disponibilidade de precursores para sua síntese e as mudanças nos padrões de síntese e catabolismo destes compostos.

As quedas observadas nos conteúdos de taninos totais durante a estação seca, quando a atividade da fenilalanina amônia-liase mostrou-se mais elevada,

(figura 3A e 3C), sugerem que o acúmulo de taninos no murici está na dependência, principalmente, dos esqueletos de carbono, produzidos através do processo fotossintético e demonstram que os incrementos verificados na atividade enzimática não foram decisivos para aumentar os níveis dos taninos durante a estação seca. Segundo Hartley et al. (2000), estudos realizados com *Spergula arvensis* demonstraram que um aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase foi insuficiente para promover alterações significativas nos níveis de fenóis totais e de taninos condensados. Alternativamente, de acordo com Peng et al. (1991), aumentos na atividade da fenilalanina amônia-liase não se relacionam necessariamente, com aumentos nos níveis de fenólicos se outros fatores, como a disponibilidade de fenilalanina forem limitantes para o processo. Estudos desenvolvidos por Koricheva et al. (1998) demonstram que somente os metabólitos originados diretamente do metabolismo do carbono acompanham o padrão fotossintético das plantas e que a determinação dos teores de fenóis totais pode não ser uma medida representativa destas respostas.

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que este trabalho foi conduzido, pôde-se concluir que:

1. As plantas de murici apresentaram maior atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e menores teores de taninos totais na estação seca.
2. Os níveis de fenóis totais permaneceram constantes durante todo o período experimental.

3. A atividade da fenilalanina amônia-liase respondeu diretamente às variações ambientais, características das estações seca e chuvosa.
4. Os níveis de taninos totais acompanharam as respostas fotossintéticas das plantas, nas estações seca e chuvosa.
5. O aumento na atividade da fenilalanina amônia-liase não está relacionado à elevação nos teores dos fenóis e taninos totais na espécie em estudo.
6. No murici, modificações nos teores de taninos totais não estão necessariamente, associados a alterações nos níveis dos fenóis totais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.** Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ASSIS, J. S.; MALDONADO, R.; MUNOZ, T.; ESCRIBANO, M. I.; MERODIO, C.** Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 33-39, Sept. 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.** Official methods of the association of official analytical chemists. 11. ed. Washington, 1970. 1015 p.
- BEKEBLIA, N.** Phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, pyruvic acid and total phenolics variations in onion bulbs during long-term storage. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 33, p. 112-116, 2000.
- BRASIL.** Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. Normas climatológicas. Brasília, 1992. 84 p.

- CASTRO, A. H. F. Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de plantas de confrei (*Symphytum officinale* L.). 1999. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CHAKRABORTY, U.; DUTTA, S.; CHAKRABORTY, B. Drought induced biochemical changes in young tea leaves. *Indian Journal of Plant Physiology*, New Delhi, v. 6, n. 1, p. 103-106, 2001.
- CHENG, S. H.; SHEEN, J.; GERRISH, C.; BOLWELL, P. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 503, n. 2/3, p. 185-188, Aug. 2001.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 27, n. 4, p. 445-459, June 1999.
- FEENY, P. P. Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. *Phytochemistry*, Oxford, v. 7, n. 5, p. 871-880, May 1968.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos, SP: UFSCar/SIB, 2000. p. 255-258.
- GEBAUER, R. L. E.; STRAIN, B. R.; REYNOLDS, J. F. The effect of elevated CO₂ and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia*, New York, v. 113, n. 1, p. 29-36, Jan. 1998.
- GLYPHIS, J. P.; PUTTICK, G. M. Phenolics in some southern african mediterranean shrubland plants. *Phytochemistry*, Oxford, v. 27, n. 3, p. 743-751, Mar. 1988.
- GRAHAM, T. L.; PATTERSON, B. D. Responses of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v. 33, p. 347-382, 1982.
- HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 13, n. 3, p. 437-449, Mar. 1987.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products. In: WALTON N. J.; BROWN, D. E. (Ed.) **Chemicals from plants: perspectives on secondary plant products**. Imperial College Press, 1999. p. 1-25.

HARTLEY, S.; JONES, C. G.; COUPER, G. C.; JONES, T. H. Biosynthesis of plant phenolics compounds in elevated atmospheric CO₂. **Global Change Biology**, Oxford, v. 6, p. 497-506, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 2, p. 205-215, Feb. 1996.

HATANO, T.; KIRA, R.; YOSHIZAKI, M. L.; OKUDA, T. Seasonal changes in the tannins of *Liquidambar formosana* reflecting their biogenesis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 2787-2789, Dec. 1986.

HEYWORTH, C. J.; IARSON, G. R.; TEMPERTON, V.; JARVIS, P. G.; DUNCAN, A. J. The effect of elevated CO₂ concentration and nutrient supply on carbon-based plant secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. **Oecologia**, New York, v. 115, n. 3, p. 344-350, July 1998.

HUNER, N. P. A.; MAXWELL, D. P.; GRAY, G. R.; SAVITHC, L. V. FALK S. Sensing environmental temperature change through imbalance between energy supply and energy consumption:redox state of photosystem II. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 358-364, Oct. 1996.

JANAS, K.; CVIKROVÁ, M.; PALAGIEWICZ, A. EDER, J. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 7/8, p. 587-593, July/Aug. 2000.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, July 1984.

KORICHEVA, J.; LARSSON, S.; HAUKIOJA, E.; KEINÄNEN, M. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability:hypothesis testing by means of meta-analysis. **Oikos**, Copenhagen, v. 83, n. 2, p. 212-226, Nov. 1998.

- KOUKI, M.; MANETAS, Y. Resource availability affects differentially the levels of gallotannins and condensed tannins in *Cerotonia siliqua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 631-639, July 2002.
- KOUKOL, J.; CONN, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 236, n. 10, p. 2692-2698, Oct. 1961.
- LAVOLA, A. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. **Tree Physiology**, Victoria, v. 18, n. 1, p. 53-58, Jan. 1998.
- LAVOLA, A.; TITTO, R. J.; ROSA, T. M. de la; LETTO, T.; APHALO, P. J. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, n. 3, p. 260-267, July 2000.
- MARGNA, U. Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cell. **Phytochemistry**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 419-426, 1977.
- PARRA POZO, L. A. Estudo “in vitro” do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais sobre o *Clostridium difficile*. 1997. 77 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PENG, S.; SCALBERT, A.; MONTIES, B. Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* e *Quercus petraea* woods. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 775-778, Mar. 1991.
- PEÑUELAS, J.; ESTIARTE, M.; LLUSIÀ, J. Carbon-based secondary compounds at elevated CO₂. **Photosynthetica**, Prague, v. 33, n. 2, p. 313-316, 1997.
- PEREVOLOTSKY, A. Tannins in mediterranean woodland species: lack of response to browsing and thinning. **Oikos**, Copenhagen, v. 71, n. 2, p. 333-340, Nov. 1994.
- RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; GARCIA, P. C.; SANCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 2, p. 315-321, Jan. 2001.

SALTVEIT, M. E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 61-69, Nov. 2000.

SANTIAGO, L. J. M.; LOURO, R. P.; OLIVEIRA, D. E. de Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 86, n. 5, p. 1023-1032, Nov. 2000.

SANTOS, S. da C.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade, 2000. p. 517-544.

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

SILVA FILHO, P. V. Plantas do Cerrado produtoras de matéria tintorial. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 173, p. 28-32, mar./abr. 1992

SOLECKA, D.; BOUDET, A. M.; KACPERSKA, A. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. **Plant Physiology Biochemistry**, Montrouge, v. 37, n. 6, p. 491-496, 1999.

SOLECKA, D.; KACPERSKA, A. Phenylalanine ammonia-lyase in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, Montrouge, v. 33, n. 5, p. 585-591, Sept./Oct. 1995.

TOGNETTI, R.; JOHNSON, J. D.; MICHELOZZI, M.; RASCHI, A. Response of foliar metabolism in mature trees of *Quercus pubescens* and *Quercus ilex* to long-term elevated CO₂. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 233-245, June 1998.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine ammonia-lyase in *Xanthium* leaf disks. Photosynthetic requirement and effect of daylength. **Plant Physiology**, Rockville, v. 44, n. 6, p. 912-922, 1969.

ANEXOS

ANEXO A

Página

Figura 1	Estádios do desenvolvimento de <i>Byrsonima verbascifolia</i> , observados durante o período experimental. A. Novembro 2001; B. Dezembro de 2001; C. Janeiro de 2002; D. Junho de 2002 ; E. Outubro de 2002. Área experimental. Ijaci, MG.	122
----------	--	-----

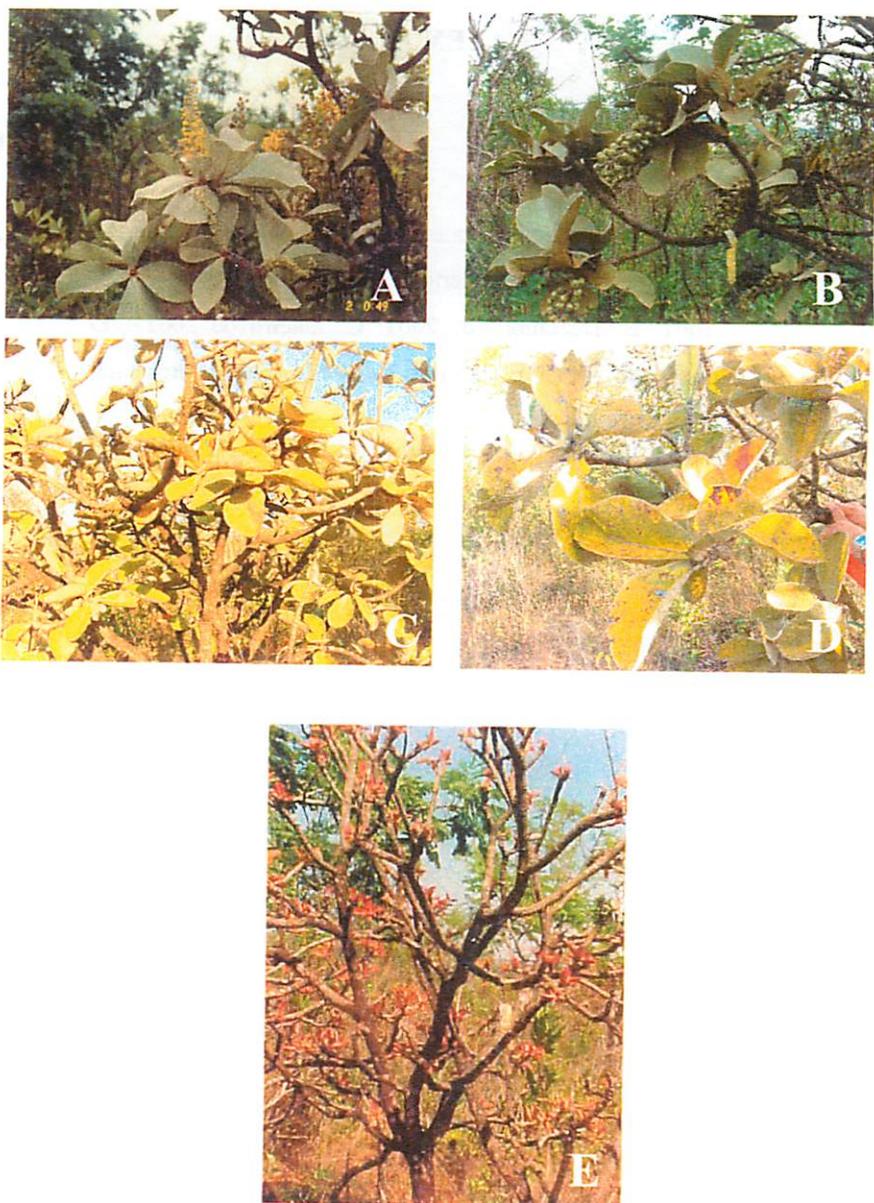


Figura 1: Estádios do desenvolvimento de *Byrsonima verbascifolia*, observados durante o período experimental. A. Novembro 2001; B. Dezembro de 2001; C. Junho de 2002; D. Agosto de 2002; E. Outubro de 2002. Área experimental. Ijaci, MG.

ANEXO B		Página
TABELA 1	Composição básica do meio Murashige e Skoog (1962).	125
TABELA 2	Resumo da análise mineral do solo da área experimental. Departamento de Ciência do Solo. UFLA. Lavras, MG, 2003.	126
TABELA 3	Resumo das análises de variância para os valores de germinação e peso de matéria seca total, em relação às concentrações de sacarose no meio MS. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2002.	127
TABELA 4	Resumo das análises de variância para os valores de germinação e peso de matéria seca total, em relação aos níveis de sais no meio MS. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2002.	127
TABELA 5	Resumo das análises de variâncias para os valores de DFFFA, DPV e Temperatura foliar, durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	127
TABELA 6	Resumo das análises de variância para os valores de DFFFA, DPV e Temperatura foliar, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	128

TABELA 7	Valores médios da DFFFA, DPV e temperatura da folha nas estações seca e chuvosa, às 10:00 e 12:00h. UFLA, Lavras, MG, 2002.	128
TABELA 8	Resumo das análises de variâncias para os valores de potencial hídrico foliar, durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	128
TABELA 9	Resumo das análises de variância para os valores de potencial hídrico foliar, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	129
TABELA 10	Resumo das análises de variâncias para os valores de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E), durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	129
TABELA 11	Resumo das análises de variância para os valores de A, gs e E, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	129
TABELA 12	Resumo das análises de variâncias para os valores de atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais, durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	130
TABELA 13	Resumo das análises de variâncias para os valores de atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.	130

TABELA 1. Composição básica do meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

SAIS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6,2
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{.EDTA}$	37,2
MIO-INOSITOL	100
TIAMINA.HCl	1,0
PIRIDOXINA.HCl	0,5
ÁC.NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0

TABELA 2: Resumo da análise mineral do solo da área experimental. Departamento de
Ciência do Solo. UFLA. Lavras, MG, 2003.

RESULTADOS ANALÍTICOS		
Descrição	Unidade	Amostra
Cálcio	cmolc/dm ³	0,8
Magnésio		0,2
Alumínio		1,1
H + Al		4,5
Potássio	mg/dm ³	22,0
Fósforo		0,9
Sódio		11,0
pH em H ₂ O 1:2,5		5,0
Soma de Bases Trocáveis	cmolc/dm ³	1,1
CTC efetiva		2,2
CTC a pH 7,0		5,6
Índice de Saturação de Bases		19,8
Índice de Saturação de Alumínio	%	50
Índice de Saturação de Sódio		2,16
Matéria Orgânica	dag/kg	2,2
Fósforo Remanescente	mg/L	11,2
Enxofre	mg/dm ³	7,5
Boro	mg/dm ³	0,6
Cobre	mg/dm ³	1,8
Ferro	mg/dm ³	231,2
Manganês	mg/dm ³	4,6
Zinco	mg/dm ³	1,4
ANÁLISES GRANULOMÉTRICAS		
Areia	dag/kg	10
Silte		11
Argila		79
Classe Textural	Muito Argilosa	

TABELA 3: Resumo das análises de variância para os valores de germinação e peso de matéria seca total, em relação às concentrações de sacarose no meio MS. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2002.

F. V.	QUADRADO MÉDIO		
	G. L.	GERMINAÇÃO	PMS TOTAL
Sacarose	4	834,0000**	0,0183**
Modelo Linear	(1)	1.152,0000*	0,0113**
Modelo Quadrático	(1)	2.062,8500**	0,0599**
Desvio do Modelo	(2)	60,5714	0,0011
Resíduo	20	196,0000	0,0008
TOTAL	44		
CV (%)		18,04	28,29

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.
** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 4: Resumo das análises de variância para os valores de germinação e peso de matéria seca total, em relação aos níveis de sais componentes do meio MS. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2002.

F. V.	QUADRADO MÉDIO		
	G. L.	GERMINAÇÃO	PMS TOTAL
Níveis de sais no meio MS	3	245,0000	0,0237**
Modelo Linear	(1)	-	0,0692**
Desvio do Modelo	(2)	-	0,0010
Resíduo	16	-	0,0013
TOTAL	44		
CV (%)		14,42	31,25

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 5: Resumo das análises de variâncias para os valores de DFFFA, DPV e Temperatura foliar, durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO		
		DFFFA	DPV	TEMP.FOLIAR
Meses	11	3033648,43**	8,2904**	330,0867**
Horário	1	445778,77	54,2677**	821,6822**
Resíduo	131	385504,44	0,4136	9,5673
CV (%)		54,09	24,36	9,05

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 6: Resumo das análises de variância para os valores de DFFFA, DPV Temperatura foliar, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO		
		DFFFA	DPV	TEMP.FOLIAR
Estações	1	3284268,13**	1,5504**	293,5102**
Horário	1	35497,04	9,0774**	149,3507**
Resíduo	21	72779,07	0,0118	1,6540
CV (%)		24,81	4,20	3,83

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 7: Valores médios da DFFFA, DPV e temperatura da folha nas estações seca chuvosa, às 10:00 e 12:00h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2002.

HORÁRIOS	DFFFA ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)		DPV (KPa)		Temperatura da folha (°C)	
	Estação Seca	Estação Chuvosa	Estação Seca	Estação Chuvosa	Estação Seca	Estação Chuvosa
	10:00 horas	645,33b	1606,43a	1,74b	2,22b	26,96b
12:00 horas	790,20b	1308,27a	2,94a	3,48a	33,20a	38,94a
Média	717,52b	1457,37a	2,34b	2,85a	30,08b	37,07a

TABELA 8: Resumo das análises de variâncias para os valores de potencial hídrico foliar, durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA Lavras, MG, 2003.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO
		POTENCIAL HIDRICO FOLIAR
Meses	11	23,8345**
Horário	1	2500,0000**
Resíduo	131	3,5671
CV (%)		28,04%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

QUADRADO MEDIO

FV	GL	A	gs	E
Estações	1	38,7350**	0,0007	38889,5504**
Horário	1	9,2628**	0,0072	3292,3837
Resíduo	21	0,9713	0,0005	1015,6526
CV (%)		24,16	36,99	15,61

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 11: Resumo das análises de variância para os valores de A, gs e E, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.

QUADRADO MEDIO

FV	GL	A	gs	E
Meses	11	51,3643**	0,0075**	8,2327**
Horário	1	65,1921**	0,0502**	0,0235
Resíduo	131	4,0781	0,0021	0,5759
CV (%)		47,05	52,91	45,14

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 10: Resumo das análises de variâncias para os valores de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E), durante o período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.

QUADRADO MEDIO

FV	GL	POTENCIAL HIDRICO FOLLAR
Meses	1	3,7288
Horário	1	414,3360**
Resíduo	21	1,1601
CV (%)		16,21%

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 9: Resumo das análises de variância para os valores de potencial hídrico foliar, durante as estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2003.

TABELA 12: Resumo das análises de variâncias para os valores de atividade fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais, durante período experimental. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG 2003.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO		
		ATIVIDADE ENZIMÁTICA	FENÓIS TOTAIS	TANINOS TOTAIS
Meses	11	92,8850**	3,3893	8,2800**
Resíduo	131	15,7219	0,3252	2,8387
CV (%)				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 13: Resumo das análises de variância para os valores de atividade fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais, durante estações seca e chuvosa. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG 2003.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO		
		ATIVIDADE ENZIMÁTICA	FENÓIS TOTAIS	TANINOS TOTAIS
Estações	1	68,6789*	2,0345	5,3426*
Resíduo	21	7,8976	0,0425	0,9876
CV (%)				

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