



**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MOREIRA  
(*Maclura tinctoria*)**

**GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES**

**1999**

of the ... of the ...  
... of the ... of the ...  
... of the ... of the ...  
... of the ... of the ...

... of the ... of the ...  
... of the ... of the ...  
... of the ... of the ...

GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MOREIRA (*Maclura tinctoria*)**

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

Orientador

Prof. RENATO PAIVA, Ph.D.

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1999

Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Gomes, Guilherme Augusto Canella  
Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*) / Guilherme  
Augusto Canella Gomes. -- Lavras : UFLA, 1999.  
92 p. : il.

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

1. Micropropagação. 2. Lenhosa Nativa. 3. Moreira. 4. Cultura de  
tecidos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973962  
-631.53

Reservado ao  
unidade?

GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MOREIRA (*Maclura tinctoria*)**

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

APROVADA em 19 de março de 1999

Prof. MOACIR PASCOAL

Profa. PATRÍCIA D. O. PAIVA



---

Prof. RENATO PAIVA, PhD.  
Orientador

**Aos meus pais, Sebastião e Maria do Carmo**

**A minha tia Márcia**

**Ao vô "Lemão", vó Gessa e vó "Quininha"**

**Pelos incansáveis esforços para propiciar-me  
as melhores condições de estudo, e sobretudo  
pelos respectivos exemplos de vida,**

**DEDICO**

**Ao meu irmão Paulo,**

**Pelas atitudes de um verdadeiro irmão e amigo.**

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e à Universidade Federal de Lavras, em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Prof. Renato Paiva pela orientação, conselhos e amizade.

Aos demais professores do curso de Fisiologia Vegetal.

Ao Prof. Eduardo Bearzotti pela orientação durante a realização das análises estatísticas.

À Profa. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários: Izonel, Evaristo, Dartagnan, Joel, Odorêncio, Maria Helena e Mauro.

À Aninha pelo carinho, atenção e amizade.

Aos colegas de turma: Silvana, Eva, Ana Gabriela, Flávia Dionísio, Flávia Landa, Paulo Artur, Alessandro e demais amigos, pelo auxílio nos momentos difíceis.

Às bolsistas de iniciação científica e amigas Fernanda e Ênali pela inestimável ajuda.

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

**AGRADEÇO**

## **BIOGRAFIA**

**GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES, filho de Maria do Carmo Canella Gomes e Sebastião Venancio Gomes, nasceu em 11 de abril de 1973 em Botucatu-SP. Aos 2 anos de idade mudou-se para Santo André-SP, onde iniciou seu estudos no colégio Instituto Coração de Jesus, permanecendo neste até a conclusão do segundo grau em dezembro de 1990. Em meados de 1991 foi aprovado no vestibular para graduação em Agronomia da Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em dezembro de 1996. Durante o período de realização deste curso desenvolveu projetos de pesquisa, como bolsista de iniciação científica (CNPq-PIBIC), inicialmente no Setor de Genética e Melhoramento de Plantas e em seguida no Setor de Fisiologia Vegetal. Logo após sua graduação, em março de 1997, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em março de 1999.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iii</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Descrição da Espécie <i>Maclura tinctoria</i> .....	2
2.2 Propagação por Cultura de Tecidos.....	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
<b>CAPÍTULO II. ESTUDOS SOBRE GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>10</b>
1. RESUMO.....	10
2. ABSTRACT.....	10
3. INTRODUÇÃO.....	11
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
4.1 Germinação.....	12
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1 Germinação <i>in vitro</i> .....	14
5.1.1 Obtenção e assepsia do material vegetal.....	14
5.1.2 Preparo e inoculação dos explantes.....	14
5.1.3 Aclimatação.....	15
5.2 Germinação <i>in vivo</i> .....	16
5.3 Avaliações e análises estatísticas.....	16
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17

7. CONCLUSÕES.....	22
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

**CAPÍTULO III. INDUÇÃO DE FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOREIRA**

<i>(Maclura tinctoria)</i> .....	25
1. RESUMO.....	25
2. ABSTRACT.....	25
3. INTRODUÇÃO.....	26
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Coleta e assepsia do material vegetal.....	28
5.2 Inoculação dos explantes.....	29
5.3 Análises estatísticas.....	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÕES.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

**CAPÍTULO IV. INDUÇÃO E CRESCIMENTO DE BROTAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOREIRA**

<i>(Maclura tinctoria)</i> .....	38
1. RESUMO.....	38
2. ABSTRACT.....	39
3. INTRODUÇÃO.....	40
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	40
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
5.1 Indução de brotações a partir de calos friáveis.....	43
5.1.1 Inoculação dos explantes.....	43

5.1.2 Análises estatísticas.....	43
5.2 Indução de brotações a partir de segmentos nodais.....	44
5.2.1 Coleta e assepsia dos explantes.....	44
5.1.2 Inoculação dos explantes.....	45
5.1.2 Análises estatísticas.....	45
5.3 Crescimento <i>in vitro</i> de brotações.....	45
5.3.1 Inoculação dos explantes.....	45
5.3.2 Avaliações.....	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1 Indução de brotações a partir de calos friáveis.....	46
6.2 Indução de brotações a partir de segmentos nodais.....	50
6.3 Crescimento <i>in vitro</i> de brotações.....	54
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

**CAPÍTULO V. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES  
OBTIDAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOREIRA**

<b>(<i>Maclura tinctoria</i>).....</b>	<b>60</b>
1. RESUMO.....	60
2. ABSTRACT.....	60
3. INTRODUÇÃO.....	61
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	61
4.1 Enraizamento <i>in vitro</i> .....	61
4.2 Carvão ativado.....	64
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
5.1 Enraizamento <i>in vitro</i> .....	65
5.2 Análises estatísticas.....	65
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66

7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

**CAPÍTULO VI. ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE DE  
MOREIRA (*Maclura tinctoria*) OBTIDAS IN  
VITRO.....**

1. RESUMO.....	78
2. ABSTRACT.....	78
3. INTRODUÇÃO.....	79
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	80
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
<b>ANEXO .....</b>	<b>91</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**V/V: Volume por Volume**

**P/V: Peso por Volume**

**$\mu \text{ mol. s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ : Quantum**

**AIB: Ácido indol butírico**

**ANA: Ácido naftaleno acético**

**AIA: Ácido indol acético**

**2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

**BAP = BA: 6- Benzilaminopurina = 6-Benzilamina**

**GA<sub>3</sub>: Ácido giberélico**

**CA: Carvão Ativado**

**$\mu \text{ mol/L}$ : micromol por litro**

**WPM: Meio básico Wood Plant Medium**

**MS: Meio básico de Murashige e Skoog**

## RESUMO

GOMES, Guilherme Augusto Canella. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). Lavras, UFLA, 1999. 92 P. (Tese de Mestrado em Agronomia)

Algumas espécies nativas produzem sementes com baixo poder germinativo e, na maioria dos casos dormentes, o que dificulta o aparecimento de novos indivíduos via propagação sexuada. A moreira está sendo considerada uma espécie em extinção devido principalmente a grande utilização da sua madeira e ao baixo poder germinativo das sementes. O presente estudo teve por objetivo estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro* de moreira. Os resultados indicaram que a máxima germinação *in vitro* de sementes pode ser obtida utilizando-se concentrações de sacarose entre 1,0 e 1,5 g/L. As plantas cujas sementes foram germinadas *in vitro* reduziram em 100 dias (50%) o tempo para a formação das mudas. A produção expressiva de calos friáveis a partir de segmentos nodais jovens foi obtida utilizando-se 2,0 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP. Enquanto a produção máxima de brotações a partir de calos friáveis foi obtida através da utilização de 0,75 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP, boa produção de brotações a partir de segmentos nodais, foi obtida utilizando-se 1,0 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP. Foi observado crescimento das brotações através da utilização de 2,0 mg/L de GA<sub>3</sub>. Para se obter o enraizamento de brotações recomenda-se o uso de meio WPM, pH ajustado para 7,0, acrescido de 4,8 mg/L de AIB e 4,7 g/L de Carvão Ativado. A metodologia proposta para o processo de aclimação mostrou-se eficiente, pois o uso de sombrite 70% por sete dias, transferindo em seguida para local

com sombrite 50% e 30% também por sete dias proporcionou uma taxa de sobrevivência de plântulas de 97%.

---

Orientador: Renato Paiva-UFLA.

### ABSTRACT

GOMES, Guilherme Augusto Canella. *In vitro* propagation of moreira (*Maclura tinctoria*). Lavras, UFLA, 1999. 106 P.

Some native species produce seeds with low germinative percentage and in most cases with dormancy which make it difficult the appearance of new individuals through sexual propagation. The *Maclura tinctoria* has been considered an endangered species due to the use of its wood and presence of low seed germination. The objective of the present study was to establish an *in vitro* propagation methodology for this species. The results indicated that higher *in vitro* seed germination might be obtained using sucrose concentrations between 1.0 and 1.5 g/L. Plantlets obtained from seeds germinated *in vitro* reduced in 100 days (50%) the period for its formation. Expressive friable callus formation from nodal segments was obtained using 2.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP. While maximum shoot production from friable callus was obtained using 0.75 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP, reasonable shoot formation was obtained when 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP were used. Shoot growth was also observed using 2.0 mg/L GA<sub>3</sub>. For root formation, the use of WPM medium with pH adjusted to 7.0 supplemented with 4.8 mg/L IBA and 4.7 mg/L activated charcoal is suggested. The proposed methodology for the acclimatization process was

efficient. The use of 70% light screen for 7 days followed by the use of 50 and 30% light screen also for 7 days each provided 97% platelet survival.

# CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de produção vegetal nem sempre leva em consideração o melhor manejo dos recursos naturais, e em resultado, pode promover a degradação do ambiente. Assim, com o passar dos tempos, o homem vem procurando encontrar um ponto de equilíbrio entre o uso racional dos recursos naturais e os sistemas de produção vegetal.

Infelizmente, a falta de educação ambiental contribuiu para que as fronteiras agrícolas avançassem sobre áreas de preservação do cerrado brasileiro.

Em relação ao impacto ambiental, o uso irracional dos recursos naturais, pode promover a degradação de matas ciliares, contribuindo efetivamente para o assoreamento, erosão das margens, além é claro da extinção de algumas espécies da ictiofauna e flora desse ecossistema. Neste contexto, a revegetação de áreas de depleção utilizando-se espécies nativas exerce um papel fundamental na conservação desses ecossistemas.

No entanto, algumas espécies nativas do cerrado produzem sementes com baixo poder germinativo e, na maioria dos casos dormentes, o que dificulta a propagação das mesmas via sexuada.

Durante a leitura desta obra, o leitor poderá verificar de maneira simples e prática, como a técnica ou a “arte” da cultura de tecidos pode se tornar muito útil para a preservação ambiental.

Visando a produção de mudas em larga escala, o presente trabalho tem por objetivo estabelecer algumas alternativas de propagação para suprir as necessidades contínuas de mudas de moreira (*Maclura tinctoria*), uma espécie

nativa altamente adaptada a áreas de depleção mas que apresenta dificuldades de propagação através de sementes.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

A espécie *Maclura tinctoria* (L.) Gaudichaud (Figura 1) pertence à família Moraceae, pode ser encontrada do México até o sul do Brasil.

Esta espécie lenhosa, também conhecida como Amoreira (MG, BA, SP), Taiúva (RS), Tajuba (DF, MS), Tatajuba (MA, CE), Pau de Cores (CE) pode atingir até 20 m de altura. Possui como características principais tronco irregular, folhas alternas e simples com as bordas serrilhadas, flores unissexuais, fruto composto e comestível, de forma irregular, geralmente arredondado ou globoso (Carvalho, 1994).



FIGURA 1. Aspecto visual de uma moreira (*Maclura tinctoria*). A) Árvore adulta; B) Folhas; C) Frutos; D) Sementes; E) Casca; F) Madeira.  
 Fonte: Carvalho, 1994. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Segundo Berg (1986), a moreira também é conhecida por "Pau de Cores", pois outrora fora procurado pelos corsários franceses que retiravam da sua madeira corantes e pigmentos.

Seus frutos, suculentos e saborosos, são consumidos ao natural ou em sucos misturados a vinho. Estes produzem um grande número de sementes, as quais perdem rapidamente a viabilidade. A germinação é baixa, em torno de 30%, porém não apresentam dormência. (Davide\* ).

Em sua casca, folhas e segmentos encontra-se um suco leitoso que é utilizado pela medicina popular como cicatrizantes de feridas (Berg, 1986), e também no alívio de dores de dentes e hérnias (Braga, 1976)

\* Davide, A.C. (UFLA-MG). Comunicação pessoal, 1996.

Em Minas Gerais sua floração ocorre de setembro a janeiro. De acordo com Morellato (1991), é comum na espécie observar a sobreposição dos eventos fenológicos. Nos meses de setembro a janeiro pode-se observar a presença de botões florais, flores abertas e frutos em desenvolvimento em um mesmo indivíduo, e na região da bacia do Alto Rio Grande-MG, a maior parte dos frutos encontram-se maduros em meados de janeiro.

É considerada espécie secundária tardia, comum na vegetação secundária e adaptada a áreas de depleção (Torres et al, 1992). Quando encontrada em pastagens se torna baixa e copada, servindo como árvore de sombra para o gado (Nogueira, 1977).

Sua madeira possui alta resistência mecânica e resistência ao ataque de organismos xilófagos, permitindo o seu uso na fabricação de móveis, revestimentos decorativos, carpintaria, carroçarias, dormentes, mourões, postes e na construção civil.

Segundo Heringer (1947), a madeira da moreira pode substituir a madeira da Teca (*Tectonia grandis*) utilizada na construção naval.

A grande utilização da sua madeira associado ao baixo poder germinativo das sementes, são características que tornaram a *Maclura tinctoria* uma das espécies em extinção no sul de Minas Gerais (Vieira, 1990).

## 2.2 PROPAGAÇÃO POR CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos compreende um conjunto de técnicas, nas quais, um explante, que pode ser constituído de uma célula, um tecido ou um órgão, é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotência celular, segundo a qual,

qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Torres e Caldas, 1990).

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

Nos casos em que variações genéticas sejam desejadas nos descendentes, as técnicas por via indireta são empregadas, pois a ocorrência natural de variações genéticas em clones de células isoladas ou em tecidos não organizado como é o caso do calo, parece ser uma regra geral (George, 1996).

Segundo George (1996), a utilização da cultura de tecidos para fins de propagação de plantas é comumente dividida nos seguintes 5 estágios: estágio 0 (seleção e preparo da planta matriz), estágio 1 (estabelecimento de uma cultura asséptica), estágio 2 (produção de propágulos adequados), estágio 3 (preparação para o crescimento em meio natural) e estágio 4 (aclimatação).

No estágio 0, ocorre a seleção e preparo da planta matriz, as quais devem ser típicas da espécie e livres de doenças. Alguns tratamentos podem ser instalados para reduzir os níveis de contaminação e oxidação dos explantes.

Segundo Bajaj (1986), explantes quando retirados de plantas jovens ou plântulas apresentam melhores respostas de crescimento *in vitro* em relação a explantes obtidos de plantas adultas.

O estágio 1 caracteriza-se pelo estabelecimento de uma cultura asséptica do material vegetal selecionado. O sucesso neste estágio depende primeiramente da transferência dos explantes para o meio de cultivo livres de contaminantes microbianos.

Outro fator fundamental neste estágio, especialmente para espécies lenhosas é a grande quantidade de compostos fenólicos liberados no meio de cultura pelo

explante, os quais são polimerizados alterando a cor do meio e impedindo o crescimento dos explantes. Um dos procedimentos mais usados para o controle da oxidação é a lavagem prévia dos explantes em água corrente. Porém, segundo Kozai (1994), em *Eucaliptus*, esse procedimento pode afetar o desenvolvimento da cultura, diminuindo ou paralisando a formação de brotações da parte aérea.

A manutenção de explantes na ausência de luz ou sob baixas intensidades luminosas também tem sido utilizada para prevenir a ação de oxidases ativadas pela luz (Marks e Simpson, 1990). Outra forma de controle da oxidação envolve o uso de PVP, carvão ativado ou ácido cítrico no meio de cultura (Hildebrandt, 1988).

O objetivo do estágio 2 é a obtenção de propágulos que, quando separados da cultura originam plantas intactas. Este estágio inclui a formação de tecidos meristemáticos com posterior formação de órgãos através da aplicação de reguladores de crescimento no meio de cultivo em concentração adequadas. Os reguladores, em particular as auxinas e citocininas, são usados com o propósito de estimular o crescimento e desenvolver gemas, embriões e/ou calos (George, 1996).

Normalmente, as plântulas obtidas no estágio 2 são pequenas e incapazes de suportar o crescimento em substrato, em ambiente *ex vitro*.

O estágio 3 tem como objetivo a obtenção de plantas individuais, capazes de realizar fotossíntese e sobreviverem sem um suprimento artificial de carboidratos. Nesse estágio, ocorre a formação de raízes que inclui o enraizamento *in vitro* dos ramos antes da sua transferência para o solo (George, 1996).

Os processos de transferência para o meio *ex vitro* (estágio 4) são extremamente importantes. Por serem mantidos em ambientes *in vitro* sob alta umidade e baixa intensidade luminosa. As plantas apresentam menor formação de ceras epicuticulares quando comparadas com plantas produzidas em casa de vegetação ou viveiros. Os estômatos de plantas produzidas *in vitro* também podem ser atípicos e incapazes de fechamento completo em condições de baixa umidade

relativa do ar. O que uma perda de água mais rapidamente quando transferidas para condições externas.

Existem inúmeras outras aplicações da técnica de cultura de tecidos. Segundo George (1996), a cultura de tecidos além de permitir a propagação de espécies com problemas de propagação sexuada, possibilita a obtenção de plantas isentas de virose e de clones mais produtivos, preservação e intercâmbio de germoplasmas e estudos envolvendo biologia molecular.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y.P.S. Regeneration of plants from ultra-low frozen anthers of *Primula obconica*. *Scientia Hortiscience*. V.14, p.93-95, 1986.
- BERG, M.E.V.D. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal do Maranhão. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. Anais.... Brasília: 1986. P. 119-125.
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra a Seca, 1976. 540p.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies Florestais Brasileiras. Recomendações Silviculturais, Potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA: Paraná. 1994. p.168-172.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, part 1 - The Technology, 2 ed Edington: Exegetics Limited, 1996a, 1574p.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Editores. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA\_CNPH, 1990. P.99-169.
- HERINGER, E. P. Contribuição ao conhecimento da flora da Zona da Mata de Minas Gerais. Boletim do Serviço Nacional de Pesquisas Agronômicas, Rio de Janeiro, n.2, p.1-187, 1947.
- HILDEBRANDT, A.C. *In vitro* propagation of *Syringa vulgaris*. HortScience v.18, p. 432-434, 1988.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERG, P. C. & ZIMMERMAN, R. H. (eds) Micropropagation: Technology and Application. London: Kluwer Academic Press, 1991, p. 447-469.
- MARKS, T.R; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. Journal of Horticultural Science, Kent, v.65, n. 2. P. 103-11, Mar. 1990.
- MORELLATO, L.P.C. Estudo da fisiologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. Campinas: UNICAMP, 1991. 176p. Tese Doutorado em Agronomia.
- NOGUEIRA, J.C.B. Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas. São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo. 1977. 71p. (IF. Boletim Técnico, 24).

**TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Editores. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA\_CNPQ, 1990. P.99-169.**

**TORRES, R.B. MATHEUS L.A.F.; RODRIGUES, R.R., LEITÃO FILHO, H. DE F. Espécies florestais nativas para plantio em áreas de brejo. O Agrônomo, Campinas, v.44, n.1/2/3, p.13-16, 1992.**

**VIEIRA, M.C.W. Fitogeografia e conservação em florestas em Monte Belo, Minas Gerais Estudo de caso: Fazenda Lagoa. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro., 1990. 129p. Tese Mestrado em Agronomia.**

## **CAPÍTULO II. ESTUDOS SOBRE GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MOREIRA (*Maclura tinctoria*)**

### **1. RESUMO**

O baixo poder germinativo e a rápida perda de viabilidade de suas sementes associadas ao uso indiscriminado de sua madeira, fizeram com que a moreira (*Maclura tinctoria*) fosse incluída na lista das espécies em extinção no estado de Minas Gerais. Objetivando estabelecer uma metodologia para propagação rápida desta espécie, sementes foram germinadas em areia lavada e em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de sacarose ( $T_0= 0$ ;  $T_1= 1,5$  g/L;  $T_2= 3,0$  g/L;  $T_3= 4,5$  g/L;  $T_4= 6,0$  g/L;  $T_5= 7,5$  g/L) e solidificado com 0,7% de ágar. As sementes foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa de  $13\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  durante 30 dias. Segundo o modelo de regressão ajustado, a máxima percentagem de germinação poderia ser obtida utilizando-se concentrações de sacarose entre 1,0 e 1,5g/L as quais também promovem um melhor desenvolvimento do sistema radicular. Comparando-se plantas de mesma idade, germinadas *in vitro* com as germinadas em areia, observou-se que as obtidas *in vitro* apresentaram-se bem mais desenvolvidas.

### **2. ABSTRACT**

**Studies on *in vitro* and *in vivo* germination of moreira (*Maclura tinctoria*)**

Low germination percentage, rapid seed viability loss and extensive use of its wood are characteristics that have made the *Maclura tinctoria* to be

considered an endangered species in the state of Minas Gerais. With the objective to establish a rapid propagation methodology for this species, seeds were germinated washed sand and in MS medium solidified with 0.7% agar and supplemented with different concentrations of sucrose (0; 1.5; 3.0; 4.5; 6.0 and 7.5 g/L). The seeds were maintained in a growth room at  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  and light intensity of  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  during 30 days. According to the adjusted regression model, maximum germination percentage might be obtained using sucrose concentrations between 1.0 and 1.5 g/L which also provided better root development. Comparing plants with the same age whose seeds were germinated *in vitro* or in sand, it was observed that those obtained from *in vitro* germination presented better development.

### 3. INTRODUÇÃO

De acordo com Bewley e Black (1994) a germinação inicia-se com a absorção de água pela semente (embebição) e finaliza com o início da elongação do eixo embrionário, usualmente a radícula. Porém para que este processo ocorra, é necessário que as sementes estejam viáveis e as condições ambientais sejam favoráveis.

Os fatores ambientais que influenciam de forma mais marcante o processo da germinação são a disponibilidade de água, temperatura adequada, presença de uma composição atmosférica apropriada, assim como a luz para algumas espécies, sendo a quantidade desses fatores variáveis de acordo com as espécies e cultivares. No entanto, condições ambientais favoráveis podem ser fornecidas através da germinação *in vitro*.

Através do uso da técnica de cultura de tecidos, algumas condições adequadas à germinação como disponibilidade de água, temperatura, luminosidade e concentrações de reguladores de crescimento, podem ser fornecidos às sementes, visando o aumento da porcentagem de germinação.

Por apresentar sementes com baixo poder germinativo, aproximadamente 30%, e estas perderem rapidamente a viabilidade, estudos comparativos entre os métodos de germinação tradicional e *in vitro* de Moreira foram realizados.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. GERMINAÇÃO

A água é extremamente importante no processo de reidratação das sementes, e ocorre através da embebição da semente. Este processo depende principalmente da composição química da semente, da permeabilidade do tegumento e da presença de água no meio. A embebição é um processo físico, ligado às propriedades das substâncias coloidais e, portanto, ocorre em sementes vivas ou mortas. Este processo também é influenciado pelo pH da solução e pela temperatura do ambiente (Welbaum, 1990).

Embora cada espécie necessite de uma quantidade mínima de água para iniciar a germinação, as sementes podem se adaptar a regimes de deficiência ou excesso de água (Kermode, 1991).

Segundo George (1996), a determinação da quantidade mínima de água necessária para que o processo de germinação seja iniciado, é obtido através da variação da concentração de sacarose do meio de cultura, visto que, este é considerado o principal componente regulador do potencial hídrico do meio.

Amador e Stewart (1987), trabalhando com germinação *in vitro* de várias espécies lenhosas, obtiveram sucesso no controle do potencial osmótico do meio de cultura utilizando diferentes concentrações de sacarose.

Em seus trabalhos, Rangaswamy (1963) e Gmitter (1986) obtiveram um significativo aumento na percentagem de germinação variando concentrações de sacarose no meio de cultura em *Orobancha aegyptica* e *Citrus*, respectivamente. Resultados semelhantes também foram observados por Komatsuda (1992) em seus trabalhos com várias espécies lenhosas.

Outro fator que interfere na germinação de sementes é a temperatura.

Sementes expostas a baixas temperaturas tendem a reduzir a velocidade da germinação e temperaturas elevadas tendem a aumentar essa velocidade. Esta diferença em temperaturas pode induzir uma crescente desorganização do mecanismo germinativo, impossibilitando que sementes menos vigorosas completem seu ciclo (Cocucci, 1991).

A temperatura de germinação considerada ótima para a maioria das espécies adaptadas a clima tropical se encontra na faixa entre 15 a 30°C. Existem no entanto, espécies cujas sementes germinam melhor em um regime de alternância diária de temperatura, em relação a uma temperatura constante (Ni, 1992).

Segundo Ikuma e Thimann, citados por Coelho (1980), o processo da germinação envolve quatro fases distintas. A fase de pré-indução, altamente sensível à temperatura ocorre quando a semente absorve água e se prepara para receber a radiação visível. A fase de indução, independe da temperatura, mas apresenta o máximo de atuação do fitocromo. A fase de pós-indução, caracteriza-se pela participação ativa do fitocromo na ausência de luz e sensibilidade à temperatura ideal de 25°C. A última fase, a fase de germinação visível, ocorre quando a radícula transpõe os envoltórios da semente.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

#### 5.1.1 OBTENÇÃO E ASSEPSIA DO MATERIAL VEGETAL

Para a realização deste trabalho foram utilizados frutos maduros coletados de diferentes árvores de moreira (*Maclura tinctoria*), localizadas às margens dos rios Capivari (Lavras-MG) e Rio Grande (Ijaci-MG). Estes foram colocados em um becker com água destilada e levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras.

Os frutos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar, através da imersão em etanol 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 50% (v/v) durante 10 minutos. Após realização do processo de desinfestação, os frutos foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada para remoção do excesso das soluções desinfestantes.

#### 5.1.2 PREPARO E INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Após a realização do processo de desinfestação, os frutos foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo papel de filtro, onde sofreram cortes para a retirada das sementes.

As sementes foram retiradas dos frutos e inoculadas em frascos contendo 30mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Anexo 1), suplementado com diferentes concentrações de sacarose ( $T_0= 0$ ;  $T_1= 1,5g/L$ ;  $T_2= 3,0g/L$ ;  $T_3= 4,5g/L$ ;  $T_4= 6,0g/L$ ;  $T_5= 7,5g/L$ ) e solidificado com 0,7% de ágar. O pH do meio foi ajustado em 5,8. Em seguida o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Os frascos inoculados com as sementes foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa de  $13 \mu \text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  durante 30 dias. Após este período, avaliou-se o número de sementes germinadas.

### 5.1.3 ACLIMATAÇÃO

As plântulas germinadas *in vitro*, apresentando o seu segundo par de folhas expandidas, foram transferidas para caixas tipo gerbox contendo vermiculita.

Estas caixas foram mantidas em sala de crescimento por 20 dias sob um sombrite 70%. Para evitar a transpiração excessiva das plântulas, os próprios frascos utilizados na germinação foram usadas para o controle da umidade relativa (Figura 2).



FIGURA 2. Aclimatação de plântulas de moreira (*Machura tinctoria*) germinadas *in vitro* em caixas tipo gerbox contendo vermiculita. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Após este período, as plantas foram transplantadas para sacos plásticos contendo terra, areia e esterco na proporção 3:1:1 e mantidas em casa de vegetação com sombrite 50%, onde permaneceram durante 45 dias, até a transferência para o campo.

## 5.2 GERMINAÇÃO *IN VIVO*

Para a realização da germinação *in vivo*, ou convencional, 100 sementes foram colocadas em uma caixa de madeira contendo areia lavada. As plântulas obtidas permaneceram 45 dias nesta caixa, até expansão total do segundo par de folhas. Após este período, transplantou-se para sacolas plásticas contendo terra, areia e esterco na proporção 3:1:1 e manteve-se as plantas em casa de vegetação com sombrite 50%, por 120 dias, quando então realizou-se a transferência para o campo.

## 5.3 AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As avaliações foram realizadas através da contagem do número de sementes germinadas por parcela ou por caixa de areia.

Para a germinação *in vitro* foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 25 parcelas por tratamentos, sendo que cada parcela (frasco) continha 4 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento.

Como o número de sementes germinadas foi considerada uma variável binomial (não-normal), optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (Demétrio, 1993), utilizando a função logística como função de ligação  $\eta$  (ligação canônica) ou seja :

$$\eta = \ln p / (1-p)$$

onde "p" é a probabilidade de sucesso do modelo binomial.

O preditor linear " $\eta$ " correspondeu a:  $\eta = \mu + t_i$

onde " $\mu$ " é o efeito de uma constante e " $t_i$ " o efeito do tratamento  $i$ . Como os tratamentos são de natureza quantitativa, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão apropriados, se detectada diferenças significativas entre tratamentos. A escolha do melhor modelo de regressão foi baseada na qualidade do ajustamento e, se possível, na ausência de significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de "Deviance" (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que:

$$p = \exp\{f(x)\} / (1 + \exp\{f(x)\})$$

onde  $f(x)$  é o modelo de regressão ajustado, que é função da concentração de sacarose.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo o modelo de regressão ajustado representado na Figura 3, a máxima germinação de sementes de moreira (*Maclura tinctoria*) pode ser obtida utilizando-se concentrações de sacarose entre 1,0 e 1,5g/L.

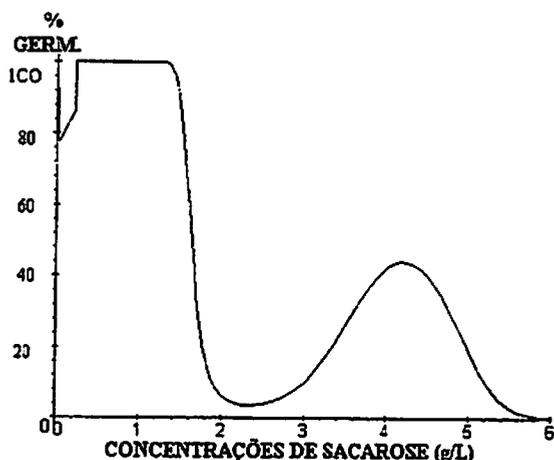


FIGURA 3. Modelo de regressão ajustado representando a porcentagem de germinação *in vitro* em função da concentração de sacarose (g/L) no meio de cultura. UFLA, Lavras-MG, 1997.

A utilização de concentrações superiores a 1,5 g/L de sacarose reduziu a germinação das sementes. Segundo George (1996), esta inibição é decorrente da regulação osmótica do meio, visto que concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura não possua água disponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início do processo de germinação.

Concentrações inferiores a 1,0 g/L de sacarose também proporcionaram condições satisfatórias para a germinação das sementes, porém as plântulas obtidas nestas condições necessitavam ser transferidas para outro meio de cultivo contendo concentrações mais elevadas de carboidratos. A necessidade de fontes exógenas de carboidratos para o desenvolvimento de plântulas obtidas através da germinação *in vitro* também foi verificada apresentada por Penning de Vries (1975).

A utilização de concentrações entre 4,0 e 4,5 g/L de sacarose apresentaram uma percentagem de germinação em torno de 40%. Este resultado é oriundo de observações experimentais, não sendo proveniente do ajustamento estatístico. Este resultado pode ser decorrente de variações fisiológicas deste grupo de sementes.

Observa-se na Figura 4 que plântulas obtidas de sementes germinadas em meio de cultura contendo sacarose apresentaram um melhor desenvolvimento do sistema radicular.



FIGURA 4. Plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) obtidas de sementes germinadas *in vitro* e em areia. A) germinadas *in vitro* na presença de 1,5 g/L de sacarose; b) germinada em areia; c) germinadas *in vitro* na presença de 1,0 g/L de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Os resultados da análise de “Deviance” (Tabela 1) apresentam desvios não significativos, indicando que o modelo de regressão adotado foi satisfatório.

Tabela 1. Análise de "Deviance" referente à variação entre tratamentos e a decomposição desta em "Regressão" e "Desvios de regressão". UFLA, Lavras-MG, 1997.

<b>Causas de variação</b>	<b>GL</b>	<b>"Deviance"</b>
<b>Tratamentos</b>	(5)	364,2282**
<b>Regressão</b>	3	363,9775**
<b>Desvios</b>	2	0,2507 NS
<b>Resíduo</b>	144	227,3244

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

Pelos resultados obtidos, podemos verificar, na Tabela 2, que sementes inoculadas *in vitro* germinaram em apenas 5 dias, enquanto que sementes germinadas em areia necessitaram de 35 dias. O tempo de permanência no viveiro de mudas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* sofreu uma redução de 75 dias, quando comparado com o tempo de permanência no viveiro de mudas obtidas a partir de sementes germinadas em areia. Portanto, a principal vantagem da utilização da metodologia de germinação *in vitro* é a redução em 50% (100 dias) do período necessário para a formação de mudas de moreira (*Maclura tinctoria*) (Tabela 2). Segundo George (1996), a redução do tempo para a obtenção de mudas pode ser atribuído ao maior desenvolvimento inicial das plântulas obtidas *in vitro*.

TABELA 2. Número de dias necessários para a formação de mudas de moreira (*Maclura tinctoria*) cujas sementes foram germinadas *in vitro* e em areia (*in vivo*). UFLA, Lavras-MG, 1997.

	IN VITRO	IN VIVO
GERMINAÇÃO	5*	10-35*
FRASCO/SEMENTEIRA	30	45
ACLIMATAÇÃO	20	-
VIVEIRO	45	120
TOTAL	100	200

\* Valores em dias.

Comparando-se plantas com doze meses de idade, cujas sementes foram germinadas *in vitro* com as germinadas em areia, observou-se crescimento no campo muito superior das plântulas obtidas *in vitro* (Figura 5).

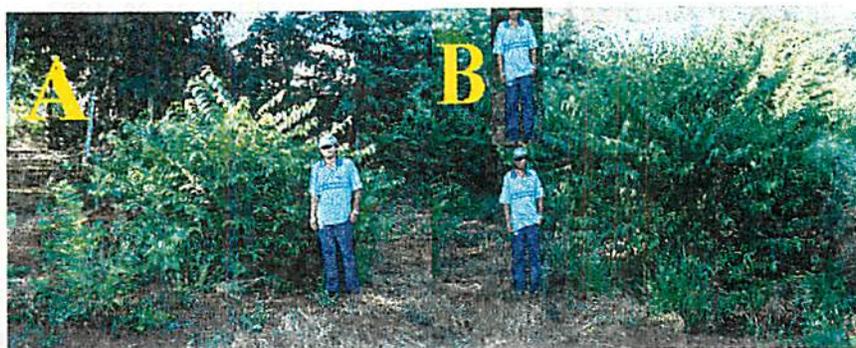


FIGURA 5. Plantas de moreira (*Maclura tinctoria*) com doze meses de idade. A) Planta oriundas de semente germinada em areia; B) Planta obtida a partir de semente germinada *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1998.

## 7. CONCLUSÕES

- 100% de germinação *in vitro* de sementes de moreira (*Maclura tinctoria*) pode ser obtida utilizando-se concentrações de sacarose no meio de cultura entre 1,0 e 1,5 g/L.

- A utilização de germinação *in vitro* possibilita a formação de mudas de moreira (*Maclura tinctoria*) em 100 dias.

- A utilização de germinação *in vitro* reduz em 50% o tempo para formação de mudas de moreira (*Maclura tinctoria*) em relação à germinação convencional em areia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADOR, A.M.; STEWART, K.A. Osmotic potencial and pH of fluid drilling gels as influenced by moisture loss and incorporation of growth regulators. *Journal of American Society HortScience*. V.112, p. 26-28, 1987.

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

COCUCCI, M.; NEGRINI, N. Calcium-calmodulin in germination of *Phacelia tanacetifolia* seeds: Effects of light, temperature, fusicoccin and calcium-calmodulin antagonist. *Physiology Phantherum*, v. 82, p. 143-149, 1991.

**COELHO, R. C.** Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes dormentes de alface (*Lactuca sativa* L.). Viçosa: FV, 1980. 79 p.

**DEMÉTRIO, C.G.B.** Modelos Lineares na Experimentação Agronômica. In: V Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica. 125p. 1993.

**GMITTER, F.G.Jr; MOORE, G.A.** Plant regeneration fom undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**.v. 6, p. 139-147, 1986.

**GEORGE, E.F.** Plant propagation by tissue culture, part 1 - The Technology, 2 ed Edington: Exegetics Limited, 1996, 1574p.

**KERMODE, A. R.** Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.9, p.155-195, 1990.

**KOMATSUDA, T.; LEE W.** Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**.v. 3, p. 239-242, 1992.

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

NI, B.R., BRADFORD, K.J. Quantitative models describing the sensitivity of tomato seed germination to abscisic acid , temperature and osmotium. **Plant Physiology**. v.98, p. 1057-1068, 1992.

PENNING DE VRIES, F. W. T. Use of assimilates in higher plants. In: COOPER, J. P. (ed). **Photosynthesis and Productivity in Different Enviroments**. London, Cambridge University Press, p. 459-480, 1975.

RANGASWAMY, N.S. Studies on culturing seeds of *Orobanche aegyptiaca*. In: Maheshwari and Ranga Swamy (eds.), 1963.

WELBAUM, G.E., TISSAOUI, T. Water relations of seed germination in muskmelon (*Cucumis melo L.*). III. Sensitivity of germination to water potencial and abscisic acid during development. **Plant Physiology**. v.92, p.1029-1037, 1990.

# **CAPÍTULO III. INDUÇÃO DE FORMAÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS, A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOREIRA (*Maclura tinctoria*).**

## **1. RESUMO**

Com o objetivo de induzir a formação de calos friáveis visando a regeneração *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*), segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 30g/L de sacarose, 7g/L de ágar e as seguintes combinações de reguladores de crescimento: (T<sub>0</sub>= controle; T<sub>1</sub>=0,5mg/L ANA; T<sub>2</sub>=1,0mg/L ANA; T<sub>3</sub>=2,0mg/L ANA; T<sub>4</sub>=0,5mg/L BAP; T<sub>5</sub>=0,5mg/L BAP + 0,01mg/L ANA; T<sub>6</sub>=0,5mg/L BAP + 0,1mg/L ANA; T<sub>7</sub>=0,5mg/L BAP + 1,0mg/L ANA; T<sub>8</sub>=1,0mg/L BAP; T<sub>9</sub>=1,0mg/L BAP + 0,01mg/L ANA; T<sub>10</sub>=1,0mg/L BAP + 0,1mg/L ANA e T<sub>11</sub>=1,0mg/L BAP + 1,0mg/L ANA). Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, à temperatura de 27<sup>o</sup> C ± 2<sup>o</sup> C por um período de 30 dias. A máxima produção de calos friáveis (2,5 g/explante) foi conseguida utilizando-se a combinação de 2 mg/L de ANA + 1 mg/L de BAP.

## **2. ABSTRACT**

### **Induction of friable callus formation from nodal segments of moreira (*Maclura tinctoria*)**

With the objective to induce the formation of friable callus as a mean to obtain the *in vitro* regeneration of moreira (*Maclura tinctoria*), nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with 30 g/L sucrose, 7 g/L agar and the following combinations of growth regulators (T<sub>0</sub>= control; T<sub>1</sub>= 0.5 mg/L NAA; T<sub>2</sub>=

1.0 mg/L NAA; T<sub>3</sub>= 2.0 mg/L NAA; T<sub>4</sub>= 0.5 mg/L BAP; T<sub>5</sub>= 0.5 mg/L BAP + 0.01 mg/L NAA; T<sub>6</sub>= 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA; T<sub>7</sub>= 0.5 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA; T<sub>8</sub>= 1.0 mg/L BAP; T<sub>9</sub>= 1.0 mg/L BAP + 0.01 mg/L NAA; T<sub>10</sub>= 1.0 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA and T<sub>11</sub>= 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA). After inoculation, the explants were maintained in the absence of light in a growth room at a temperature of  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  during 30 days. Maximum production of friable callus (2.5 g/explant) was obtained using the combination of 2.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP.

### 3. INTRODUÇÃO

A procura de técnicas alternativas para o processo de propagação é de fundamental importância quando as espécies apresentam dificuldades de multiplicação sexuada.

A organogênese por via indireta, ou seja, através da indução de formação de calos tem sido uma alternativa muito utilizada em propagação de plantas. Os calos, podem também induzir variações genéticas nos descendentes, o que garante a biodiversidade genética do repovoamento.

Quando trabalhamos com repovoamento de ecossistemas naturais, esta biodiversidade é de fundamental importância para a rápida e perfeita recomposição do ambiente.

A rápida perda de viabilidade da semente associado à dificuldade de se obter o enraizamento de estaca, justifica a procura de alternativas de propagação para a produção em larga escala de mudas de moreira (*Machura tinctoria*).

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para indução de formação de calos friáveis a partir de segmentos nodais de moreira.

#### 4. REFERENCIAL TEÓRICO

Calos são tecidos que podem apresentar diferenciação parcial, constituídos por uma massa de células irregulares, diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente, em resposta a injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciarem em tecidos e órgãos (Torres e Caldas, 1990).

A desdiferenciação e indução de regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo (Grattapaglia e Machado, 1990). Espécies lenhosas por exemplo, são mais difíceis de se propagar *in vitro* comparadas com espécies herbáceas, por apresentarem maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, menor taxa de multiplicação, maior concentração de fenóis, além de dificuldades de manutenção das plantas matrizes em casas de vegetação.

A época do ano em que é feita a coleta de explantes é considerado por Bonga (1987), como fator de grande importância para o sucesso do estabelecimento *in vitro*. Bajaj (1991) observou que explantes de *Pinus ponderosa* coletados em outubro formavam gemas laterais, enquanto que coletas realizadas em fevereiro sofreram o processo de calogênese.

Com o estímulo das substâncias endógenas de crescimento ou de reguladores de crescimento, adicionados ao meio de cultura, o metabolismo celular é modificado de quiescente para um metabolismo ativo (Fortes, 1992).

Para a produção dos calos *in vitro* ocorrem fases de indução, divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, as células preparam-se para a divisão, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante. A duração desta fase depende do estado fisiológico das células (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

Após algumas semanas de cultivo, Constabel e Vasil (1989) observaram que os calos de fumo apresentaram sinais de desaceleração do crescimento, seguido de necrose, coloração marrom e finalmente, dessecação. Este fato ocorreu em função de fatores, como a exaustão de nutrientes, inibição da difusão de nutrientes, evaporação de água acompanhada pelo aumento na concentração de alguns nutrientes do meio e acúmulo de metabólitos, os quais segundo Remashire (1997), podem ser tóxicos.

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura visa suprir as possíveis deficiências dos teores de fitohormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz. As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e geralmente, dependendo da concentração, causam alongação celular e expansão ou divisão celular. Em geral, com o uso de baixas concentrações de auxinas, predomina a formação de raízes adventícias, enquanto que altas concentrações induzem a formação de calos.

Stimart (1986), trabalhando com brotações ortotrópicas de três espécies de *Coffea* em meio contendo 1 mg/l de ANA, 0,1 mg/L de 2,4-D ou 0,1 mg/L de Cinetina, obteve rápida proliferação de calos nas espécies de *Coffea arabica*.

A interação entre auxinas e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese. Hee-Ju Yu e seus colaboradores (1997), induziram calos em explantes foliares de *Lithospermum erythrorhizon* utilizando a combinação entre a auxina ANA e a citocinina BAP.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 COLETA E ASSEPSIA DOS EXPLANTES

Foram utilizados como explantes segmentos nodais jovens com aproximadamente 1,5cm de comprimento, retirados de plantas matrizes com 6 meses

de idade mantidas em casa de vegetação, localizada no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

A desinfestação dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar utilizando-se imersão em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e hipoclorito de sódio 50% (v/v) durante 10 minutos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada, por três vezes, em câmara de fluxo laminar para remoção do excesso das soluções desinfestantes.

## 5.2 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Os explantes foram inoculados em frascos contendo 30 mL do meio de cultura Wood Plant Medium (Lloyd e Mc Cown, 1980) (Anexo 2), suplementado com 30g/L de sacarose, 7g/L de ágar e as seguintes combinações de reguladores de crescimento: T<sub>0</sub>= controle; T<sub>1</sub>=0,5mg/L ANA; T<sub>2</sub>=1,0mg/L ANA; T<sub>3</sub>=2,0mg/L ANA; T<sub>4</sub> =0,5mg/L BAP; T<sub>5</sub>=0,5mg/L BAP+0,01mg/L ANA; T<sub>6</sub>=0,5mg/L BAP+0,1mg/L ANA; T<sub>7</sub>=0,5mg/l BAP+1,0mg/L ANA; T<sub>8</sub>=1mg/L BAP; T<sub>9</sub>=1mg/L BAP+0,01mg/L ANA; T<sub>10</sub>=1mg/L BAP+0,1mg/L ANA; T<sub>11</sub>=1mg/L BAP+1mg/L ANA.

O meio de cultura foi ajustado para pH 6,0 e autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, em sala de crescimento à temperatura de 27°C ± 2°C por um período de 30 dias, quando a indução de calogênese foi avaliada através da diferença entre o peso inicial do explante e o seu peso final.

## 5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento, sendo que cada repetição continha apenas um explante.

As médias das quantidade de calos formados foram consideradas como tendo distribuição Poisson (não-normal), e assim optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (Demétrio, 1993), utilizando a função logística como ligação canônica "η" ou seja :

$$\eta = \ln . \lambda$$

onde "λ" é o parâmetro da distribuição Poisson.

O preditor linear "η" correspondeu a:

$$\eta = \mu + t_i$$

em que "μ" é o efeito de uma constante e "t<sub>i</sub>" o efeito do tratamento i. Como os tratamentos são de natureza quantitativa, se dectadas diferenças significativas entre eles, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão múltipla apropriados (superfícies de resposta).

Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que:

$$f(x) = \exp \{ \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_2^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_2^2 \}$$

em que f(x) é o modelo de regressão ajustado, que é função X<sub>1</sub> (concentração de ANA) e X<sub>2</sub> (concentração de BAP).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo indicaram que para a indução expressiva de calos friáveis a partir de segmentos nodais jovens de moreira (*Maclura tinctoria*) foi necessário a utilização da combinação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP. Segmentos nodais jovens inoculados na ausência de reguladores de crescimento não apresentaram calogênese. Explantes inoculados na presença de apenas um tipo

de regulador de crescimento (ANA ou BAP) apresentaram pequena produção de calos (Figura 6).

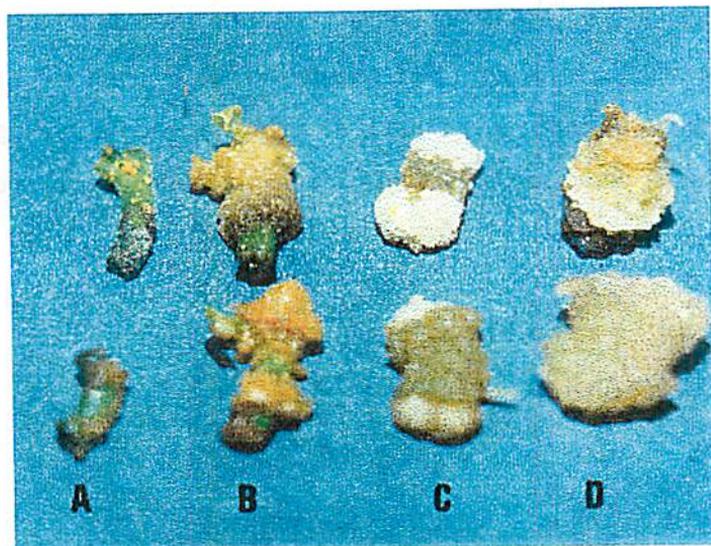


Figura 6. Aspecto geral de calos friáveis obtidos a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*). (A) explantes inoculados na presença de ANA; (B) explantes inoculados na presença de BAP; (C e D) explantes inoculados na presença de ANA + BAP. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Utilizando a mesma combinação de ANA e BAP, Penchel (1995) obteve sucesso na indução de calos friáveis em *Eucalyptus grandis*. Já Cardoso (1996), obteve respostas contraditórias às mencionadas acima, pois a indução de calos em *Hypericum brasiliensis* só foi possível utilizando-se no meio de cultura BAP ou ANA isoladamente.

A interação entre auxinas e citocininas para a indução de calos também tem sido eficiente para espécies lenhosas como: *Lithospermum erythrorhizon* ( Hee-JU Yu, 1997) e *Jatropha curcas* (Sujatha, 1996).

Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 3), a produção máxima de calos (2,5g) a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) pode ser obtida utilizando-se 2,0 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP. O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos correspondente (Figura 8).

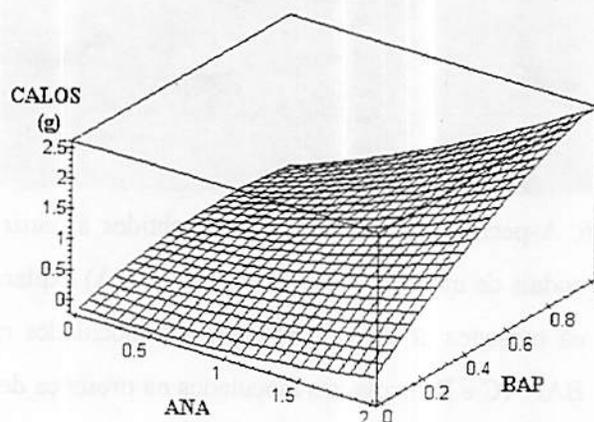
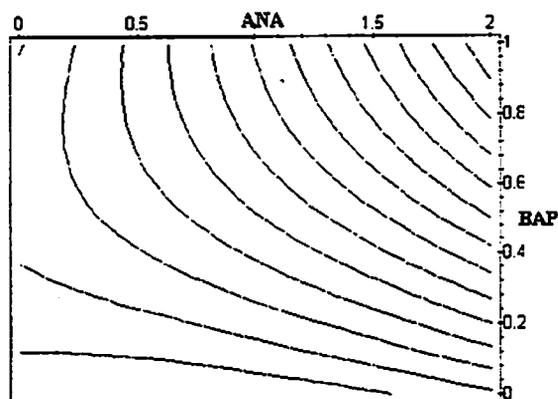


FIGURA 7. Modelo de superfície de resposta referente à indução de calos a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) em função de concentrações de ANA (mg/L) e BAP (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 1997.



**FIGURA 8.** Diagrama de contornos correspondentes a indução de calos a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) em função de concentrações de ANA (mg/L) e BAP (mg/L). Ponto de Máxima: 2 mg/L de ANA + 1 mg/L de BAP. UFLA, Lavras-MG, 1997.

A análise de variância (Tabela 3), demonstra que a interação entre ANA e BAP afetou significativamente a produção de calos em relação ao tratamento isento de reguladores de crescimento (controle). Apesar da alta significância encontrada na regressão, pode-se afirmar que, o modelo de regressão múltipla utilizado é apropriado com 97,63 % de confiança.

TABELA 3. Quadro de Análise de Variância para a indução de calos a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*). UFLA, Lavras-MG, 1997.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	5	1,71448	0,7812	4,285**
Desvios	6	0,48014	0,08002	
Total	11	2,19462		

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

CV = 51,47%

## 7. CONCLUSÕES

- Segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) inoculados em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento não apresentam a formação de calos friáveis.
- Segmentos nodais inoculados em meio de cultura suplementado com apenas um tipo de reguladores de crescimento (ANA ou BAP) apresentaram uma pequena formação de calos friáveis.
- A produção expressiva de calos friáveis a partir de segmentos nodais de moreira é obtido quando os explantes são inoculados em meio de cultura suplementado com a combinação entre BAP e ANA.
- A produção máxima de calos friáveis (2,5g) a partir de segmentos nodais de moreira é obtida utilizando-se 2,0 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP no meio de cultura.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHIISON, P.A. ; MACLEOD, A. ; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. ed., **Plant Tissue and Cell Culture**. 2 ed. Califórnia, Blackwell scientific Publications, 1977. P. 267-306.
- BAJAJ, Y.P.S. Automated micropagation for en masse production of plants. In: Y.P.S.BAJAJ **Biotechnology in agriculture and forestry 17: high-tech and micropropagation I**. Spring Verlang, N.York, 1991, p.3-16.
- BONGA, J.M. Applications of tissue culture in forestry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin, Springer – Verlag, p. 93-108, 1977.
- CARDOSO, M.A. OLIVEIRA, D.E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.44, p. 91-94, 1996.
- CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Vol. 4. Flórida, Academic Press, p. 597-614. 1989.
- DEMÉTRIO, C.G.B. **Modelos Lineares na Experimentação Agronômica**. In: V Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica. 125p. 1993.

- FORTES, G. R. L. Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Viçosa, UFV, 163p. (Tese de Doutorado em Agronomia), 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990, p. 99-169.
- HARADA, H. MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* v.46, p. 265-267, 1996.
- HEE-JU YU, SOO KYUNG OH, DONG-WOOG CHOI, YOUNG MYUNG KWON, and SANG-GU KIM. Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*. v.16. p.261-266, 1997.
- LLOYD, G. & Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* 15, 416 (abst. 321), 1980.
- PENCHEL, R.M., COELHO, C.R., Indução de calos morfogênicos e regeneração *in vitro* de plantas em tecidos de eucalipto. In: V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. UFLA, Lavras-MG, p.116. 1995.
- REMASHIREE, A.B. *In vitro* organogenesis in *Aristolochia indica*. *Phytomorphology*, v.47(2), p. 161-165, 1997.
- STIMART, D. P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: Zimmerman et al. (eds) 1986, p. 301-315.

SUJATHA, M.; MUKTA, N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v.44, p.135-141, 1996.

TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1990.**

## CAPÍTULO IV. INDUÇÃO E CRESCIMENTO DE BROTAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE CALOS FRIÁVEIS E SEGMENTOS NODAIS JOVENS DE MOREIRA (*Maclura tinctoria*)

### 1. RESUMO

Objetivando estabelecer uma metodologia para a micropropagação de moreira (*Maclura tinctoria*), calos friáveis e segmentos nodais jovens foram inoculados em meio WPM, suplementado com 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e as combinações entre os reguladores de crescimento ANA (0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L) e BAP (0; 0,5; 1,0 mg/L). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 24°C e sob intensidade luminosa de 13  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  por um período de 30 dias. As brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio WPM, suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e as seguintes concentrações de GA<sub>3</sub>: 0; 1; 2; 4; 6 mg/L. Após inoculados os explantes foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de 13  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  a 24  $\pm$  2 °C, durante 20 dias. Independente do tipo de explante (folhas ou segmentos nodais) que originou os calos, a mesma resposta *in vitro* foi observada quando os explantes foram submetidos aos tratamentos com ANA, BAP ou GA<sub>3</sub>. A análise dos resultados indicou que a produção máxima de brotações (12 brotações/explante) a partir de calos friáveis pode ser obtida através da utilização de 0,75 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP. A produção máxima de brotações (5 brotações/explante) a partir de segmentos nodais, pode ser obtida utilizando-se 1,0 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP. O crescimento *in vitro* das brotações foi observado com a utilização de 2,0 mg/L de GA<sub>3</sub>.

## 2. ABSTRACT

### **Induction and growth of shoots obtained from friable callus and young nodal segments of moreira (*Maclura tinctoria*)**

With the objective to establish a methodology for the micropropagation of moreira (*Maclura tinctoria*), friable callus and young nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with 7.0 g/L agar and the following combinations of the growth regulators NAA (0; 0.01; 0.1; 0.5; 1.0 and 2.0 mg/L) and BAP (0; 0.5 and 1.0 mg/L). After inoculation, the explants were maintained in a growth room at a temperature of 24°C and light intensity of 13  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  during 30 days. Shoots obtained *in vitro* were inoculated in WPM medium supplemented with 3% sucrose, 0.65% agar and the following concentrations of GA<sub>3</sub>: 0; 1.0; 2.0; 4.0 and 6.0 mg/L. After inoculation, the explants were maintained in a growth room with light intensity of 13  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  and temperature of 24 ± 2°C during 20 days. Independent of the type of explant (shoots or nodal segments) that originated the calli, the same *in vitro* response was observed when the explants were treated with NAA, BAP or GA<sub>3</sub>. The results indicated that maximum shoot production (12 shoots/explant) from friable callus might be obtained using 0.75 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP. Maximum shoot production (5 shoots/explant) from nodal segments can be obtained using 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BAP. *In vitro* shoot growth was observed using 2.0 mg/L GA<sub>3</sub>.

### 3. INTRODUÇÃO

Para se obter a micropropagação de plantas, após o estabelecimento *in vitro* de explantes através da formação de calos, é necessário estabelecer uma metodologia de indução de formação de brotações (parte aérea) e ou raízes.

O processo de organogênese é uma consequência da interação entre os processos de divisão e diferenciação celular. Tais processos dependem de sinais, principalmente fitohormônios, que agindo diretamente ou indiretamente ao nível gênico, desencadeiam processos específicos de síntese protéica, e como consequência, induzem alterações bioquímicas e metabólicas diversas no organismo.

Nos tecidos em cultura, o controle da organogênese é feito através da introdução exógena de reguladores de crescimento. Estas substâncias podem induzir à formação de novas estruturas organizadas, através de um processo morfogênético ou organogenético que ocorra de novo.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para a indução e crescimento de brotações (organogênese) de moreira (*Machura tinctoria*) a partir de segmentos nodais e de calos friáveis obtidos a partir de segmentos nodais.

### 4. REFERENCIAL TEÓRICO

A partir da zonas de atividade meristemática em tecidos de calo e, também, nos explantes primários, as divisões celulares e o padrão de diferenciação podem ocorrer de maneira que conduzam a um grau de organização

morfo-anatômico peculiar, que no caso de caracterizar um órgão definido, constitui-se no processo denominado organogênese (George, 1996).

Assim, num explante ou tecido de calo pode ocorrer a formação de novo (neoformação) de gemas caulinares vegetativas que evoluem para eixos caulinares. Embora gemas adventícias sejam geralmente indesejáveis para a micropropagação, pois podem resultar em variantes somaclonais, em ecossistemas naturais essa variação é fundamental (Preece, 1991).

Em consonância com Stirmart (1986), quando a organogênese ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações dos mesmos, ainda sobre o explante inicial, denomina-se organogênese direta. A via indireta é presente quando a organogênese ocorre a partir de tecidos de calos isolados do explante inicial.

Segundo Kerbauy (1986), nos casos acima mencionados, a neoformação de órgãos decorre de processos de desdiferenciação, divisão celular e organização de novos meristemas ou zonas de atividade meristemática.

Em explantes altamente heterogêneos, os diferentes tipos de células respondem de maneiras diversas às condições de cultura, como, no caso de segmentos de caule de *Petunia*, onde células corticais podem originar a calos e células da região vascular originam tecidos meristemáticos embrionários (Handro et al. 1973).

A indução de processos morfogênicos, na maioria dos casos, requer a adição de reguladores de crescimento aos meios de cultivo.

As citocininas são derivados da purina, e ocorrem naturalmente em plantas superiores e em vários tipos de bactérias. São também conhecidas como "hormônio vegetal de cicatrização". A maior função das citocininas é promover a divisão celular, porém outros efeitos fisiológicos são também atribuídos às

citocininas como desenvolvimento de gemas laterais, estimulador de germinação de sementes e retardante do processo de senescência (Arteca, 1995).

Segundo Aitken-Christie (1992), a utilização da citocinina BAP no meio de cultivo WPM, revelou-se eficiente para a indução de brotações em *Pinus radiata*.

Em geral, apesar de induzir a divisão celular, algumas citocininas como o 2-iP e a cinetina, quando utilizadas em concentrações elevadas, podem causar induções morfogenéticas indesejáveis como brotações mal formadas (George, 1996).

Brotações em espécies lenhosas são mais difíceis de serem obtidas, porém com o uso das citocininas BAP e TDZ, Preece (1991), obte resultados positivos em várias espécies.

Embora as combinações entre auxinas e citocininas são frequentemente utilizados para a indução de brotações, o uso da auxina 2,4-D, induz calogênese na maioria dos casos (George, 1996).

A combinação entre BAP e ANA induzindo organogênese tem sido demonstrado em plantas lenhosas como *Salix spp* (Garton,1993), *Quercus suber* (Declerck e Korban ,1996), *Eucalyptus sideroxylon* (Burger,1987) e *Malus spp.*(Daguin et al,1992).

Segundo Zhang e Stoltz (1991), o uso de reguladores de crescimento em altas concentrações, em particular as citocininas, pode induzir brotações com crescimento reduzido, o que pode ser corrigido através da redução do nível de citocininas utilizadas ou a realização de um subcultivo na presença de GA<sub>3</sub> no meio de cultura.

O GA<sub>3</sub> é um regulador de crescimento que pertencente à classe dos ácidos giberélicos. Entre outros efeitos fisiológicos, este regulador de crescimento induz o processo de alongação celular (Montague,1995).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES A PARTIR DE CALOS FRIÁVEIS

#### 5.1.1 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Foram utilizados fragmentos de calos friáveis de moreira (*Machura tinctoria*), com tamanho de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, formados a partir de segmentos nodais, segundo metodologia descrita no capítulo III.

Os calos foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio WPM (Lloyd e Mc Cown, 1980) (Anexo 2), suplementado com 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e as seguintes combinações de reguladores de crescimento (T<sub>0</sub>= controle; T<sub>1</sub>=0,5 mg/L ANA; T<sub>2</sub>=1,0 mg/L ANA; T<sub>3</sub>=2,0 mg/L ANA; T<sub>4</sub>=0,5 mg/L BAP; T<sub>5</sub>=0,5 mg/L BAP + 0,01 mg/L ANA; T<sub>6</sub>=0,5 mg/L BAP+0,1 mg/L ANA; T<sub>7</sub>=0,5 mg/L BAP+1,0 mg/L ANA; T<sub>8</sub>=1 mg/L BAP; T<sub>9</sub>=1 mg/L BAP+0,01 mg/L ANA; T<sub>10</sub>=1 mg/L BAP+0,1 mg/L ANA; T<sub>11</sub>=1,0 mg/L BAP+1,0 mg/L ANA).

O pH meio de cultura foi ajustado para 6,0 e autoclavado a 120<sup>o</sup>C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 24<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C e sob intensidade luminosa de 13μ mol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> por um período de 30 dias, quando o número de brotações obtidas foi avaliado.

#### 5.1.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo que cada repetição continha um explante.

O número de brotações foi considerado como tendo distribuição Poisson (não-normal), e assim optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (Demétrio, 1993), utilizando a função logística como ligação canônica "η" ou seja :

$$\eta = \ln . \lambda$$



em que " $\lambda$ " é o parâmetro da distribuição Poisson.

O preditor linear " $\eta$ " correspondeu a:

$$\eta = \mu + t_i$$

em que " $\mu$ " é o efeito de uma constante e " $t_i$ " o efeito do tratamento  $i$ . Como os tratamentos são de natureza quantitativa, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão múltipla apropriados (superfícies de resposta), se detectadas diferenças significativas entre tratamentos. A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na qualidade do ajustamento e se possível na ausência de significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de "Deviance" (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que:

$$f(x) = \exp\{f(X_1, X_2)\}$$

em que  $f(x)$  é o modelo de regressão ajustado, que é função de  $X_1$  (concentração de ANA) e de  $X_2$  (concentração de BAP).

## 5.2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS

### 5.2.1 COLETA E ASSEPSIA DOS EXPLANTES

Foram utilizados segmentos nodais (1,5cm de comprimento) como explantes, retirados a partir de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, localizado no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

A desinfestação dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar através de imersão em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 50% durante 10

minutos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada, por três vezes, para remoção do excesso das soluções desinfestantes.

### 5.2.2 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Os explantes foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio WPM (Anexo 2) suplementado com 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e as seguintes combinações de reguladores de crescimento ( $T_0$ = controle;  $T_1$ =0,5 mg/L ANA;  $T_2$ =1,0 mg/L ANA;  $T_3$ =2,0 mg/L ANA;  $T_4$ =0,5 mg/L BAP;  $T_5$ =0,5 mg/L BAP + 0,01 mg/L ANA;  $T_6$ =0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA;  $T_7$ =0,5 mg/L BAP + 1,0 mg/L ANA;  $T_8$ =1 mg/L BAP;  $T_9$ =1 mg/L BAP + 0,01 mg/L ANA;  $T_{10}$ =1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA;  $T_{11}$ =1 mg/L BAP + 1,0 mg/L ANA).

Após ajustar o pH para 6,0 o meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Foram inoculados três explantes por frasco. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, a 26°C  $\pm$  2°C e intensidade luminosa de 13 $\mu$  mol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> por um período de 20 dias, quando o número de brotações foi avaliada.

### 5.2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento estatístico foi idêntico ao utilizado no experimento anterior (4.1).

## 5.3 CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES

### 5.3.1 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

As brotações obtidas *in vitro* de calos formados a partir de segmentos nodais e também diretamente a partir de segmentos nodais com 20 dias de idade, foram inoculadas em 30ml de meio WPM (Lloyd e Mc Cown, 1980) (Anexo 2), suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e as seguintes concentrações de GA<sub>3</sub> ( T<sub>0</sub>= controle; T<sub>1</sub>= 1 mg/L; T<sub>2</sub>= 2 mg/L; T<sub>3</sub>= 4 mg/L; T<sub>4</sub>= 6 mg/L ).

O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 e autoclavado por 15 minutos a 120°C. Após inoculados, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de 13  $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  à temperatura de 24  $\pm$  2°C durante 20 dias.

### 5.3.2 AVALIAÇÕES

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo 20 repetições por tratamento.

Como os tratamentos foram avaliados visualmente, não foram realizadas análises estatísticas para a determinação da melhor concentração de GA<sub>3</sub>.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES A PARTIR DE CALOS FRIÁVEIS

Não houve formação de brotações em explantes inoculados em meio de cultivo desprovido de reguladores de crescimento ou em meio de cultivo sem a combinação de ANA e BAP, independente da concentração (Figura 9).

Este fato se confronta ao proposto por Handro (1993) em seus estudos com *Petunia*.

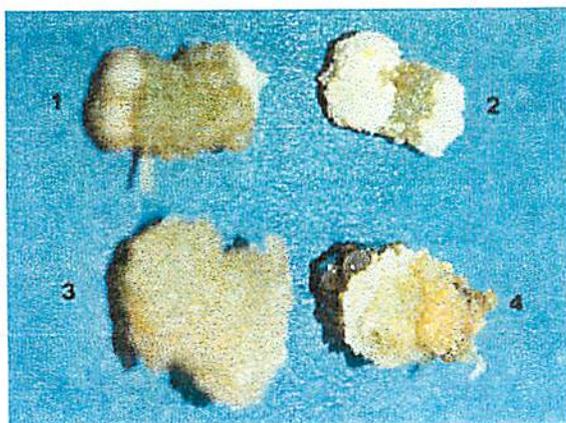


FIGURA 9. Aspecto visual de calos formados a partir de segmentos nodais inoculados em meio WPM na ausência de reguladores de crescimento. (1) e (2) ausência de reguladores de crescimento; (3) presença de ANA; (4) presença de BAP. UFLA, Lavras-MG, 1998.

Segundo Moncousin (1991), para a indução de organogênese, algumas espécies lenhosas necessitam da atuação sinérgica entre várias classes de hormônios vegetais durante algumas de suas fases de desenvolvimento e crescimento.

Hee-Ju Yu (1997), Bergmann (1997) e Remashiree (1997) em seus estudos com *Lithospermum erythrorhizon*, *Paulownia* e *Aristolochi indica*, respectivamente, também observaram a necessidade da combinação entre auxinas e citocininas para a indução de brotações a partir de calos friáveis.

O modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 10), indica que o uso de concentrações superiores a 0,75mg/L de ANA em associação com BAP inibe o processo de formação de brotações. A máxima produção de brotações (12 brot./explante) pode ser obtida com a utilização de 0,75 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP. O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos correspondente (Figura 11).

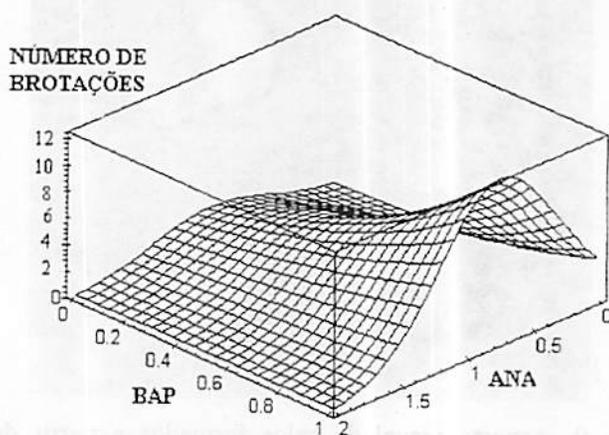


FIGURA 10. Modelo de superfície de resposta ajustada referente ao número de brotações obtidas de moreira (*Machura tinctoria*) a partir de calos friáveis em função de diferentes concentrações de BAP (mg/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 1997.

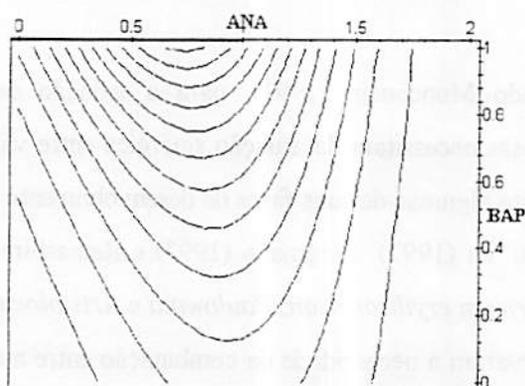


FIGURA 11. Diagrama de contornos correspondente a formação de brotações a partir de calos friáveis de moreira (*Machura tinctoria*) em função de diferentes concentrações de BAP (mg/L) e ANA (mg/L). Ponto de Máximo = 0,75mg/L ANA + 1mg/l BAP. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Segundo a análise de “Deviance” (Tabela 4), ficou evidente a alta qualidade do ajustamento matemático utilizado, o qual apresentou uma “Deviance de Desvios” não significativa.

TABELA 4. Quadro de análise de “Deviance” para o número de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*) formadas a partir de calos de segmentos nodais inoculados *in vitro* na presença de ANA e BAP. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Causas de Variação	GL	"Deviance"
Tratamentos	11	52,6107**
Regressão	6	45,9469**
Desvios	5	6,6638NS
Resíduo	108	45,2831

\*\*significativo a 1% de probabilidade pelo teste qui-quadrado

O tipo de brotações obtidas em calos formados a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) está demonstrado na Figura 12.

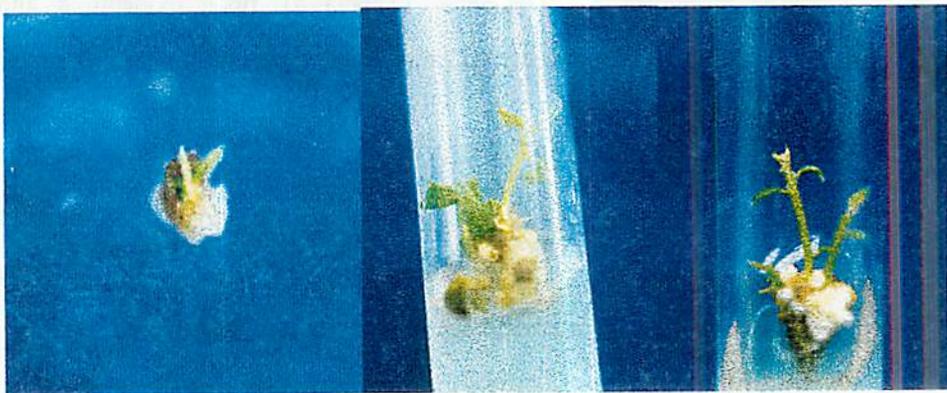


FIGURA 12. Aspecto geral de brotações obtidas *in vitro* a partir de calos oriundos de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*). UFLA, Lavras- MG, 1997.

## 6.2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS

Apesar de apresentarem-se mal formadas, foram observadas brotações em segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) inoculados apenas na presença de ANA. O uso de concentrações superiores a 0,5 mg/L de ANA, causou inibição na formação de brotações e induziu calogênese (Figura 13). Este resultado está em consonância com o proposto por George (1996), o qual afirma que o uso de concentrações elevadas de auxinas não é apropriado para a indução de brotações.

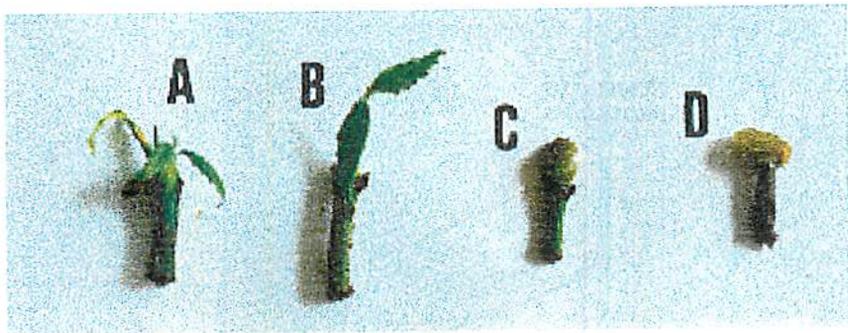


FIGURA 13. Aspecto geral de brotações obtidas a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) inoculados *in vitro* na presença de diferentes concentrações de ANA. (A) e (B) = 0,5 mg/L ANA; (C) = 1,0 mg/L ANA; (D) = 2,0 mg/L ANA. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Nos tratamentos em que o BAP foi o único regulador de crescimento utilizado, não foi observada a formação de brotações. No entanto, em espécies como *Morus australis* (Pattnaik, 1996), *Garrya elliptica* (Woodward, 1996), *Gmelina arborea* (Kannan, 1996) e *Cleistanthus collinus* (Quraishi, 1996), resultados positivos foram observados utilizando-se BAP para a indução de brotações a partir de segmentos nodais.

A produção máxima de brotações (5 brotos/segmento) a partir de segmentos nodais, segundo o modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 14), foi obtida utilizando-se 1,0 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP. O mesmo pode ser observado pelo diagrama de contornos correspondentes (Figura 15).

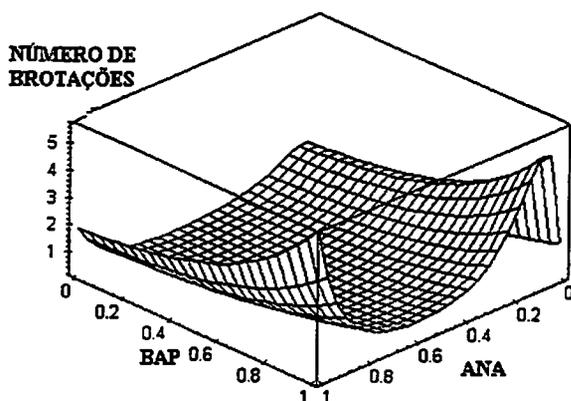


FIGURA 14. Superfície de resposta para o número de brotações formadas a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) em função de diferentes concentrações de BAP (mg/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 1997.

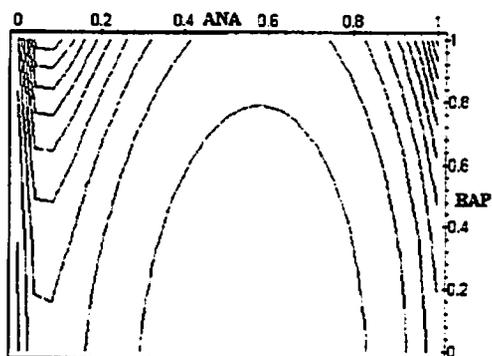


FIGURA 15. Diagrama de contornos correspondente a formação de brotações a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) em função de diferentes concentrações de BAP (mg/L) e ANA (mg/L). Ponto de Máximo = 1,0 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP. UFLA, Lavras-MG, 1997.

As brotações obtidas a partir da combinação entre ANA e BAP apresentaram-se bem formadas conforme se visualiza na Figura 16.

Em *Ficus religiosa*, Deshpande (1998) obteve resultados semelhantes ao observado por Valli Khan (1996), Sánchez-Gras (1996) e Distabanjong (1997) em seus trabalhos com *Syzygium alternifolium*, *Lavandula latifolia* e *Cercis canadensis* respectivamente, ou seja, a necessidade da utilização da combinação entre auxina e citocinina para a indução de brotações nestas espécies foi evidente.

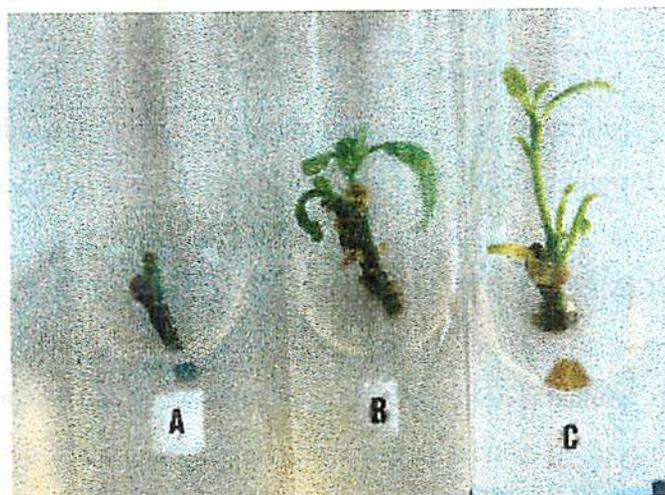


FIGURA 16. Aspecto geral de brotações formadas em segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) inoculadas *in vitro* na presença de BAP e ANA. (A) controle; (B) e (C) ANA+BAP. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Segundo a análise de “Deviance” (Tabela 5), não foi possível encontrar um modelo de regressão múltipla com desvios não significativos.

Entretanto, ficou evidente a alta qualidade do ajustamento considerando a magnitude relativa das "Deviance" (93,74%).

TABELA 5. Quadro de análise de "Deviance" para o número de brotações formadas em segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) inoculadas *in vitro* na presença de BAP e ANA. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Causas de variação	GL	"Deviance"
Regressão	6	108,2208**
Desvio	2	7,2269*

\*significativo a 1% de probabilidade pelo teste qui-quadrado

\*\*significativo a 5% de probabilidade pelo teste qui-quadrado

### 6.3 CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES

Os resultados dos experimentos relativos ao estudo do comportamento *in vitro* de brotações, obtidas a partir de segmentos nodais e de calos, também obtidos a partir de segmentos nodais de moreira, inoculados na presença de ANA e BAP indicaram que o uso de GA<sub>3</sub> favorece o crescimento e desenvolvimento *in vitro* das brotações.

Na ausência ou presença de 1 mg/L de GA<sub>3</sub> não foi observado crescimento das brotações (Figura 17) Na presença de 2 mg/L de GA<sub>3</sub>, as brotações apresentaram um crescimento satisfatório de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, o que tornou possível a sua transferência para o meio de enraizamento.

O uso de 4 mg/L e 6 mg/L de GA<sub>3</sub> também induziu crescimento satisfatório, porém o uso destas concentrações houve a formação de calos na base do explante (Figura 17). Segundo George (1996), a formação de calos na base das brotações é indesejável, pois impede a conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea.

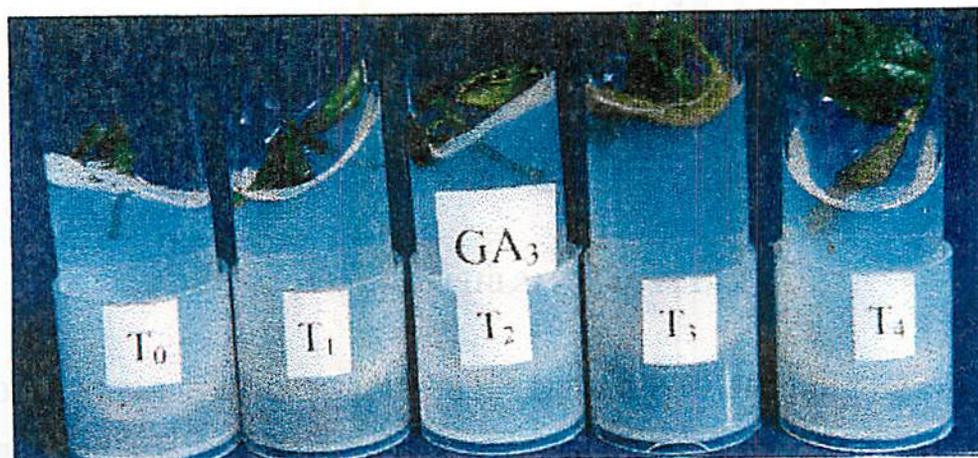


FIGURA 17. Aspecto geral do crescimento de brotações obtidas *in vitro* a partir de segmentos nodais inoculados na presença de GA<sub>3</sub>. (T<sub>0</sub>) controle; (T<sub>1</sub>) 1 mg/L de GA<sub>3</sub>; (T<sub>2</sub>) 2 mg/L de GA<sub>3</sub>; (T<sub>3</sub>) 4mg/L; (T<sub>4</sub>) 6 mg/L GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Resultados semelhantes também foram observados por Pattnaik (1996), o qual obteve crescimento *in vitro* de brotações de *Morus australis* utilizando 1,0 mg/L de GA<sub>3</sub> no meio de cultura. Em *Paulownia*, o alongamento das brotações foi alcançado utilizando-se 1,5 mg/L de GA<sub>3</sub> no meio de cultura (Bergmann, 1997).

## 7. CONCLUSÕES

- A produção máxima de brotações (12 brotações/explante) formadas a partir de calos friáveis pode ser obtida através da utilização de 0,75 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP.

- A produção máxima de brotações (5 brotações/segmento) formadas a partir de segmentos nodais, pode ser obtida utilizando-se 1,0 mg/L de ANA associado a 1,0 mg/L de BAP.

- O crescimento de brotações formadas *in vitro* é possível através da utilização de 2,0 mg/L de GA<sub>3</sub> no meio de cultura.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J.; DAVIES, H.E.; HOLLAND, L.; KUBOTA, C.; FUJIWARA, K. Effect nutrient media composition on sugar-free growth and chlorophyll fluorescence of *Pinus radiata* shoots *in vitro*. **Acta HortScience**. v.319. p.125-130, 1992.

ARTECA, R. N. **Plant Growth substances: principales and applications**. The Pennsylvania State University. 1995, 331 p.

BERGMANN, B.A. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. **Plant Cell Reports** v. 16, p. 315-319, 1997.

BURGER, D. Rapid micropropagation of *Paulownia tomentosa*. **HortScience** v.20, p.760-761, 1985.

- DAGUIN, F. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. **Physiology Plantarum** v.66, p.94-98,1992.
- DECLERCK, V. ;KORBAN, S.S. Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach. **Journal of Horticultural Science.** v.71,n.1,p.49-55, 1996.
- DEMÉTRIO, C.G.B. Modelos Lineares na Experimentação Agronômica. In: V Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica. 125p. 1993.
- DESHPANDE, S.R.; JOSEKUTTY, P.C. PRATHAPASENAN. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. **Plant Cell Reports**,v.17, p.571-573, 1998.
- DISTABANJONG, K. GENEVE, L.R. Multiple shoot from cotyledonary node segments of Eastern redbud. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.47, p.247-254, 1997.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 - The Technology**, 2 ed Edington: Exegetics Limited, 1996, 1574p.
- HANDRO, W. Effects of some growth regulatros on *in vitro* flowering of *Sterptocarpus nobilis*. **Plant Cell Reports.** v.2, p.133-136, 1993.
- HEE-JU YU, SOO KYUNG OH, DONG-WOOG CHOI, YOUNG MYUNG KWON, and SANG-GU KIM. Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Plant Cell Reports.** v.16. p.261-266, 1997.

- KANNAN, V.R. JASRAI, Y.T. Micropropagation of *Gmelina arborea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.46, p.269-271, 1996.
- KERBAUY, G. B.; PETERS, J. A. & HELL, K. G. Cytokinin autotrophy and differentiation in tissue cultures of haploid *Nicotian tabacum* L. **Plant Science**. v.45, p.125-132, 1986.
- LLOYD, G. Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience** v.15, p.416 (abst. 321), 1980.
- MONCOUSIN, C. Peroxidase as a tracer for rooting improvement and expressing rejuvenation during *in vitro* multiplication of *Cynara cardunculus scolymus* L. **Plant Cell Physiology**, v.39, p.147-148, 1991.
- MONTAGUE, M.J. Inhibition of 2,4-D conjugation to amino acids by cultured soybean cells with cytokinins. **Plant Physiology**. v. 67, p.603-607, 1981.
- PAIVA NETO, V. B. Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de Moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). Tese de Mestrado em Agronomia, Lavras: UFLA, 1996, 39 p.
- PATTNAIK, S.R.; SAHOO, Y. and CHAND, P.K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis*. **Plant Cell Reports** v.15, p.841-845, 1996.
- PREECE, J. E. SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C. & ZIMMERMAN, R. H. (eds).

- Micropropagation: Technology and Application.** London, Kluwer Academic Publishers, p. 70-93, 1991.
- QURAIISHI, A.; KOCHE, V. MISHRA, S.K. *In vitro* micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.45, p.87-91, 1996.
- REMASHIREE, A.B. *In vitro* organogenesis in *Aristolochia indica*. **Phytomorphology**, v.47(2), p. 161-165, 1997.
- SÁNCHEZ-GRAZ, M. CALVO, MARIA del CARMEN. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.45, p.259-261, 1996.
- VALLI KHAN, P.S.; PRAKASH, E. RAO, K.R. *in vitro* micropropagation of an endemic ruit tree *Syzygium alternifolium*. **Plant Cell Reports**, v.16, p.325-328, 1997.
- STIMART, D.P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: Zimmerman et al. (eds) 1986, p. 301-315.
- WOODWARD, S. THOMPSON, R.J. Micropropagation of the silk tassel bush, *Garrya elliptica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.44, p.31-53, 1996.
- ZANG, B. STROLTZ, L.P. *In vitro* proliferation and *in vivo* establishment of *Euphorbia fulgens*. **HortScience**, v. 21, p.859 (abst.),1991.

**CAPÍTULO V. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES  
OBTIDAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE MOREIRA  
(*Maclura tinctoria*)**

**1. RESUMO**

Visando a indução do enraizamento de brotações obtidas a partir de segmentos nodais, estes foram inoculadas *in vitro* em meio WPM 50%, suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e acrescido das diferentes combinações entre o regulador de crescimento AIB (0; 1; 2; 4; 6 mg/L) e o antioxidante carvão ativado (0; 0,5; 1; 2; 4; 6 g/L). Para verificar a influência do pH sobre o enraizamento, três faixas diferentes de pH (5,4; 6,0; 7,0) foram testadas. Após inoculados em câmara de fluxo laminar, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de  $13 \mu \text{ mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  a uma temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 dias. O número máximo de raízes formadas (27 raízes/ explante), segundo o modelo matemático utilizado, pode ser obtido utilizando-se meio WPM com pH ajustado para 7,0 e acrescido de 4,8 mg/L de AIB e 4,7 g/L de carvão ativado.

**2. ABSTRACT**

***In vitro* root formation in shoots obtained from nodal segments of moreira  
(*Maclura tinctoria*)**

With the objective to induce the formation of roots, shoots obtained from nodal segments were inoculated in 50% WPM medium supplemented with

3% sucrose, 0.65% agar and different combinations of the growth regulator IBA (0; 1.0; 2.0; 4.0 and 6.0 mg/L) and activated charcoal (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 6.0 g/L). In order to verify the influence of pH on rooting, three levels of pH (5.4; 6.0 and 7.0) were tested. After inoculation, the explants were maintained in a growth room with light intensity of  $13 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  and temperature of  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  during 30 days. According to the mathematical model used, maximum number of formed roots (27 roots/explant) can be obtained using 50% WPM medium with pH adjusted to 7.0 and supplemented with 4.8 mg/L IBA + 4.7 g/L activated charcoal.

### 3. INTRODUÇÃO

A fase final da micropropagação é a indução de formação de raízes em brotações obtidas *in vitro*.

O processo de enraizamento tanto *in vitro* quanto *in vivo* é fortemente influenciado por fatores ambientais e químicos, os quais necessitam ser otimizados para favorecerem a uma maior formação de raízes. O sucesso desta etapa garante a sobrevivência da plântula *in vitro*.

O objetivo deste estudo foi induzir o enraizamento de brotações obtidas *in vitro* a partir de segmentos nodais de moreira (*Maclura tinctoria*).

### 4. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 4.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

Segundo Moncousin (1986b), o processo de formação de raízes pode ser dividido em 4 fases: indução, iniciação, organização e alongamento. A fase de

indução, inicia-se quando a capacidade para a formação de raízes é determinada. Na fase de iniciação, mudanças citológicas, como o aumento no tamanho de células, são observadas. A fase de organização caracteriza-se pela observação histológica dos primórdios radiculares e na fase de alongação os primórdios radiculares já se encontram em crescimento para a formação do sistema radicular.

Alguns pesquisadores tem atribuído às auxinas a capacidade de induzirem as mudanças intracelulares necessárias para a indução do enraizamento. No entanto, Druart et al.(1982), sugerem que o processo pode ser induzido apenas pela ausência de luz e que as auxinas são necessárias principalmente nas fases subsequentes do enraizamento.

Segundo Kulescha (1986), o nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz a formação de raízes. Geralmente o uso de reguladores de crescimento aceleram consideravelmente o processo de enraizamento e além disso, causam um aumento no número de raízes formadas. Algumas espécies no entanto, induzem o enraizamento sem a necessidade da aplicação de reguladores de crescimento. Por exemplo, brotações axilares de *Acacia aldiba* produziram raízes utilizando-se meio diluído sem adição de reguladores (George, 1996).

A origem das brotações e o tipo de regulador de crescimento utilizado na fase de indução influenciam o processo de enraizamento. Estudos realizados por Ferreira e Handro (1988), mostram que brotações de *Stevia rebaudiana* regeneradas diretamente de folhas inoculadas na presença de 2 mg/L BAP são capazes de induzir o enraizamento através do subcultivo na presença de 0,1 mg/L de AIB. Brotações originadas de calos não necessitam de reguladores para o seu enraizamento.

O número de raízes formadas no explante normalmente aumenta de acordo com o aumento da concentração de auxinas, porém, quando

concentrações elevadas são utilizadas, a formação de calos é verificada (George, 1996). A presença de auxinas é especialmente necessária para a indução do enraizamento, o que pode ocorrer após poucas horas da aplicação (Colletl, 1988).

Segundo McClelland et al. (1990), o uso de concentrações elevadas de auxinas também podem causar necroses nos ápices de brotações.

As lesões causadas durante a preparação das brotações para o enraizamento, induzem um aumento na concentração de compostos fenólicos, e conseqüentemente, proporcionam um aumento nos níveis de AIA livre na base das brotações (Moncousin, 1986c).

Hess (1962), analisando plantas com dificuldades de enraizamento, observou a presença de um cofator fenólico na indução do enraizamento, que atuava de forma sinérgica com as auxinas. Mosella - Chancel (1980), também suportam a hipótese da interação dos compostos fenólicos durante a indução do processo de rizogênese.

Em geral, a indução da formação de raízes adventícias requer uma concentração mínima de citocinina e uma relação favorável entre auxina e citocinina (Skoog e Miller, 1957).

A indução ao enraizamento é geralmente máxima quando as auxinas são aplicadas imediatamente após a separação das brotações (Jarvis et al.;1983, Collet, 1985). Quando as auxinas são adicionadas em baixas concentrações, a rizogênese pode não ser estimulada ou retardada (Moncousin, 1982).

Segundo Kantharaj (1988), um aumento nos níveis de auxinas nos primeiros estágios do processo de indução de enraizamento mostra-se suficiente para iniciar as primeiras divisões celulares que levam ao desenvolvimento dos primórdios radiculares.

O envolvimento das peroxidases no controle do nível interno de auxinas e em processos fisiológicos como lignificação, tem sido observado. A

participação de peroxidases no processo de rizogênese é mencionado por Gaspar (1982), Lewis (1980), Lobarzewshi (1986), Moncousin (1987), Mato (1988) e Berthon (1989).

Flutuações significantes na atividade das peroxidases também tem sido observado durante o enraizamento de explantes de *Prunus* (Quoirin,1974), *Pinus* (Gaspar, 1977), *Malus* (Druart, 1982), *Sequoiadendron* (Berthon, 1987), e *Vitis* (Moncousin, 1986a).

Outro fator que pode influenciar o processo de enraizamento *in vitro* é o pH do meio de cultura. Em geral pH entre 4,5 e 5,5 mostra-se eficiente na indução de enraizamento, porém resultados contraditórios foram observados por Barlass (1980), Sharma (1981), Willians (1984) e Nemeth (1986). Em seus estudos com frutíferas, *Boungainvillea glaba*, *Prostanthera rotundifolia* e lenhosas nativas foi observado que a faixa de pH ideal varia de acordo com a espécie.

#### 4.2 CARVÃO ATIVADO

Além das auxinas, alguns compostos são comumente adicionados ao meio de cultura para indução do enraizamento. O carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% (p/v) é usado para estimular a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Quimicamente, o carvão ativado exerce efeito diluidor, retendo parte dos compostos que compõem o meio. Também atuam fixando citocininas residuais liberados pelos tecidos das plantas ou absorvem compostos tóxicos inibidores do enraizamento.

A fixação de auxinas pelo carvão ativado tem, em geral, uma ação benéfica no alongamento de raízes. As raízes crescem rapidamente, ramificando-se bastante e mantendo uma cor mais clara do que quando expostas à luz.

Para a indução de enraizamento em *Eucaliptus*, *Hevea* e *Sapium*, Mascarenhas et al.(1982), cultivaram brotações em meio MS 50% acrescido de



0,25% de carvão ativado e auxinas. Comparado com os outros dois gêneros, este processo reduziu consideravelmente o tempo gasto para o enraizamento em *Sapium*.

O enraizamento de ramos de goiabeira foi obtido utilizando-se meio MS 50% acrescido de 1,5% de sacarose, 0,1% de carvão ativado e 1 mg/L de AIB e ANA (George, 1996).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

Brotações obtidas a partir de segmentos nodais, com aproximadamente 2 cm de comprimento, foram transferidas para meio WPM 50% (Anexo 2), suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e acrescido das combinações entre o regulador de crescimento AIB (0; 1; 2; 4; 6 mg/L) e o antioxidante carvão ativado (0; 0,5; 1; 2; 4; 6 g/L).

O pH do meio de cultura foi ajustado antes da autoclavagem em três faixas diferentes: 5,4; 6,0 e 7,0. Após o ajuste de pH, os meios de cultura foram autoclavados por 15 minutos a 120°C.

Após inoculados em câmara de fluxo laminar, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de  $13 \mu \text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  a uma temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 dias, quando foi avaliado o número de raízes por brotação.

### 5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo que cada frasco continha um explante.



O número de raízes obtidas por brotação foi considerado como tendo distribuição Poisson (não-normal), e assim optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (Demétrio, 1993), utilizando a função logística como ligação canônica " $\eta$ " ou seja :

$$\eta = \ln . \lambda$$

em que " $\lambda$ " é o parâmetro da distribuição Poisson.

O preditor linear " $\eta$ " correspondeu a:

$$\eta = \mu + t_i$$

em que " $\mu$ " é o efeito de uma constante e " $t_i$ " o efeito do tratamento  $i$ . Como os tratamentos são de natureza quantitativa, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão múltipla apropriados (superfícies de resposta), se detectada diferenças significativas entre tratamentos. A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na qualidade do ajustamento e se possível na ausência de significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de "Deviance" (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que:

$$f(x) = \exp \{ \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_2^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_2^2 \}$$

em que  $f(x)$  é o modelo de regressão ajustado, que é função de  $X_1$  (concentração de AIB) e de  $X_2$  (concentração de carvão ativado).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam que não foi observada a formação de raízes em explantes inoculados na ausência de carvão ativado. Moncousin (1986a), afirma

que a maioria das espécies lenhosas necessitam durante o seu processo de enraizamento, da atuação de compostos antioxidantes, como o carvão ativado, para minimizar os efeitos maléficos dos compostos fenólicos presentes em grande quantidade.

Nos tratamentos desprovidos apenas de auxinas, também não foi observado rizogênese, contradizendo o proposto por Druart (1982), o qual afirma que apenas a ausência de luz seria suficiente para a indução do enraizamento.

A formação de raízes adventícias só foi observada em explantes inoculados em meio de cultura contendo a combinação entre auxina e carvão ativado.

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, o número máximo de raízes, 27 por explantes, é obtido utilizando-se 4,8 mg/L de AIB associado a 4,7 g/L de carvão ativado (Figura 18). O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos (Figura 19).

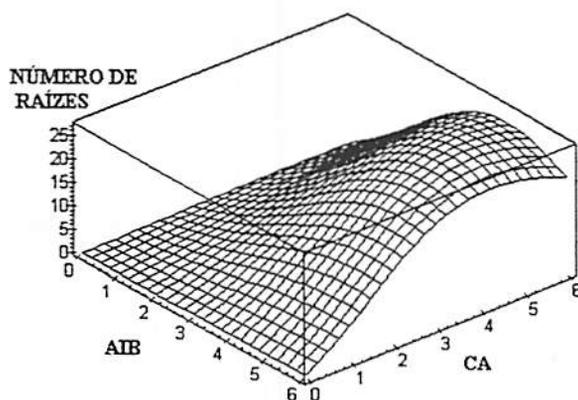
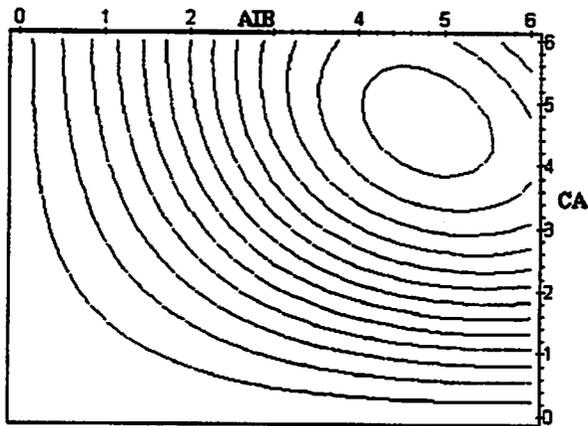


FIGURA 18. Análise de Superfície de resposta para número de raízes formadas *in vitro* a partir de brotações em função de diferentes concentrações de AIB (mg/L) e Carvão Ativado (g/L). UFLA, Lavras-MG, 1998.



**FIGURA 19.** Diagrama de contornos correspondente à formação de raízes *in vitro* a partir de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*) em função de diferentes concentrações de AIB (mg/L) e Carvão Ativado (g/L). Ponto de máximo: AIB = 4,80 e CA=4,70. UFLA, Lavras-MG, 1998.

O aspecto geral das raízes formadas a partir de brotações inoculadas em meio WPM acrescido de 5,0 mg/L de AIB e 4,5 g/L de CA é demonstrado na Figura 20.

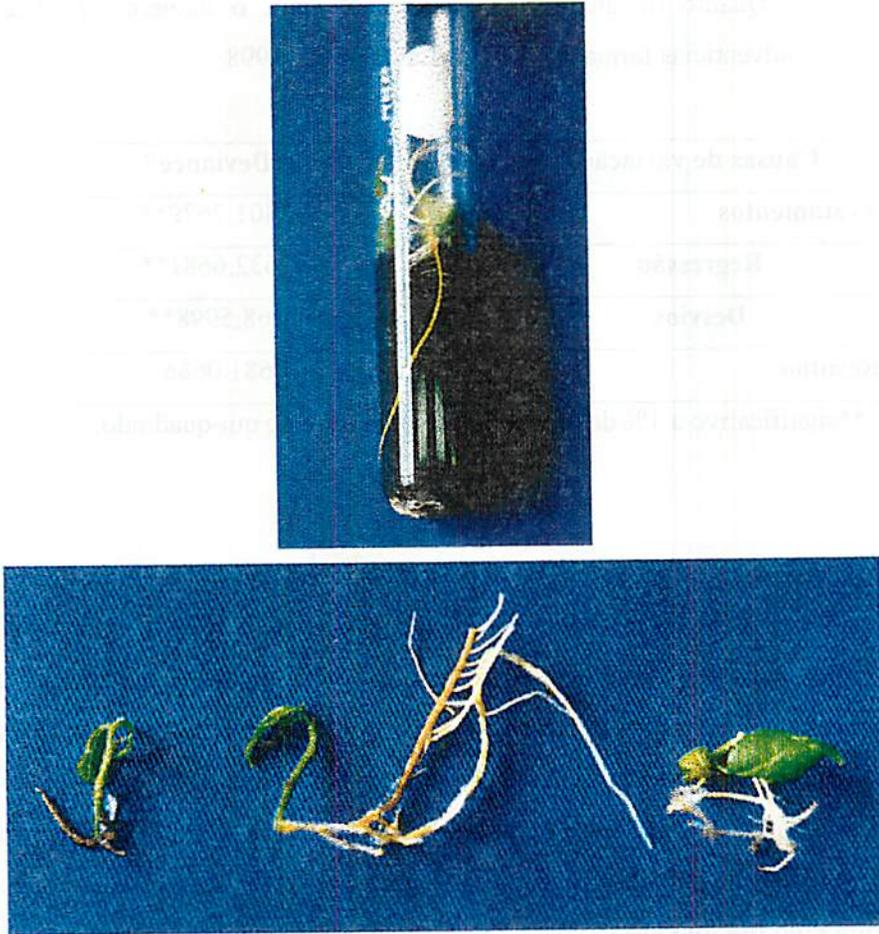


FIGURA 20. Brotações de moreira (*Machuca tinctoria*) enraizadas *in vitro*.  
UFLA, Lavras-MG, 1999.

Segundo a análise de "Deviance" (Tabela 6), não foi possível encontrar um modelo de regressão múltipla com desvios não significativos. Entretanto, ficou evidente a alta qualidade do ajustamento considerando a magnitude relativa das "Deviances". Calculando uma estatística semelhante ao coeficiente de determinação, a razão da "Deviance" de regressão pela de tratamentos, apresenta um alto valor 93,98%.

TABELA 6. Quadro de análise de "Deviance" para o número de raízes adventícias formadas. UFLA, Lavras-MG, 1998.

Causas de variação	GL	"Deviance"
Tratamentos	(29)	2801,2679**
Regressão	8	2632,6681**
Desvios	21	168,5998**
Resíduo	270	681,0686

\*\*significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

A atividade estimulatória do carvão ativado em induzir o enraizamento de brotações também foi reportada por Dumas e Monteuis (1995), em estudos com *Pinus pinaster*. Sanchez e Vilitez (1996), também induziram o enraizamento em brotações de *Quercus robur* e *Querbus rubra* utilizando os efeitos positivos do carvão ativado em conjunto com a auxina AIB.

A indução de rizogênese foi altamente influenciada pelo pH do meio de cultura. A formação de raízes adventícias (Figura 21) só foi observada em meio de cultura cujo pH foi ajustado para 7,0. Segundo McCown (1988), nesta faixa de pH, não ocorre redução da atividade das peroxidases, favorecendo o enraizamento do explante.

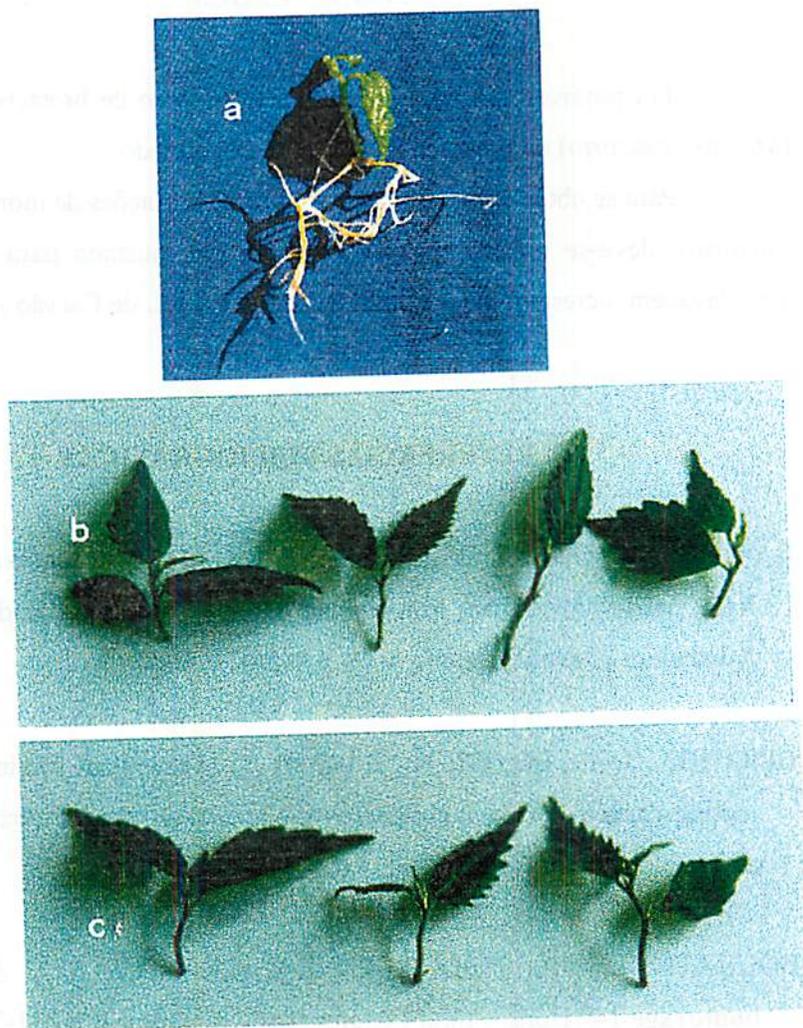


FIGURA 21. Aspecto visual de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*) inoculadas em meio WPM ajustado em diferentes faixas de pH. A) pH=7,0; B) pH=6,0; C) pH=5,4. UFLA, Lavras-MG, 1998.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi possível induzir o enraizamento *in vitro* de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*) na presença de AIB e carvão ativado.

- Para se obter o enraizamento *in vitro* de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*), deve-se utilizar meio WPM com pH ajustado para 7,0 antes da autoclavagem, acrescido de 4,8 mg/L de AIB e 4,7 g/L de Carvão Ativado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARLASS, M.; GRANT, W. J.R.; SKENE, K.G.M. Shoot regeneration *in vitro* from native Australian fruit-bearing trees – quandong and plum bush. **Australian Journal Botanic**. v.28: p.405-411, 1980.

BERTHON, J. Y.; BOYER, N.; GASPARD T. Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. **Plant Cell Report**. v.6: p.341-344, 1987.

BOUILLENNE, R.; BOUILLENNE-WALRAND, M. Auxines et bouturage. 14<sup>th</sup> Horticultural Congress Schweningen v.1: p.231-238, 1955.

COLLET, G. F.; LE, L.C. Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. L1 Enracinement *in vitro* de *Pirus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (a). **HortiScience**, v.20 (2): p.131-138, 1988.

**DEMÉTRIO, C.G.B. Modelos Lineares na Experimentação Agronômica. In: V Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica. 125p. 1993.**

**DRUART,P.; KEVERS, C.; BOXUS, P.; GASPAR, T. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. Pflanzenphysiology.. v.108: p.429-436, 1982.**

**DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant Cell Tissue. Organ and Culture, v.40, p.231-235., 1995.**

**FERREIRA, C. M.; HANDRO, W. Micropropagation of *Stevia rebandiana* through leaf explants from adult plants. Planta Medicinal. v.54, p.157-162, 1988.**

**GASPAR, T.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Univ Genève-Cent Bot. 324p., 1982.**

**GASPAR, T.; SMITH, D.; THORPE, T. A. Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des premières de la rhizogenèse. Comptes Rendus Academic Paris . v.185: p.327-330, 1977.**

**HESS, C. E. A physiological analysis of root incition in easy and difficult-to root cuttings. 16 th Int Hortic Congr Brussels. 4: 375-381, 1962.**

- JARVIS, B. C.; ALI, A. H.N.; SHAHEED, A. I. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. *New Phytology*. v.95: p.509-518, 1983.
- KANTHARAJ, G. R.; MAHADEVAN, S.; PADMANABAN, G. Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*. v.18: p.383-387, 1979.
- KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les végétaux. *Rev Gén Bot*. v.59: p.92-111; 127-157; 195-208; 241-264, 1986.
- LEWIS, D. H. Are there inter-relations between the metabolic role of boron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen? *New Phytology*. 84: 261-270, 1980.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* v.15, p.416 (abst. 321), 1980.
- LOBARZEWSKI, J. Peroxidase role in lignin biotransformation. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Univ Genève. p. 231-246, 1986.
- MASCARENHAS, A. F.; GUPTS, P. K.; KULKARNI, V. M.; MEHTA, V.; IYER, R. S.; KHUSPE, S. S. JAGANNATHAN, V. Propagation of trees by tissue culture. In: RAO, A. N. (ed) 1982 (qv), p. 175-179.

- MATO, M. C.; RUA, M. L.; FERRO, E. Change in levels of peroxidases and phenolics during root formation *in Vitis* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**. v.72: p.84-88, 1988.
- MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A . The germination of seeds. Londres: Pergamon Press, 1978. 192 p.
- Mc. CLELLAND, M. T. & SMITH, M. A L. Vessel type, closure and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**. v.25, p.797-800, 1990.
- McCOWN, B. H. 1988 Adventitious rooting of tissue cultured plants. In **Adventitious Formation in Cuttings**. Eds. T. M. Davis, B. H. Haissig and N. Sankla. Discorides Press, Portland, OR, pp 247-260
- MONCOUSIN, C. Biochemical events in mono-nodal stem cuttings of *Vitis* hybrid during *in vitro* adventitious rooting . Minneapolis: IAPTC Congr, , p. 148, 1986 a.
- MONCOUSIN, C. Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative et accélérée en culture *in vitro*. Thèse Doct Ingénieur, Univ Paris-Sud, Cent Sci d'Orsay, 237p, 1982.
- MONCOUSIN, C. Evolution de ÁIA, des composés phénoliques, de l'activité spécifique des peroxydases et de la production d'éthylène, au cours de la rhizogenèse, sur des microboutures de Vigne (*Vitis riparia*

- Michx. x *V. rupestris* Scheele). Thèse Doct d'Etat, Biol Physiol végétale. Univ Nancy, 164p., 1987.
- MONCOUSIN, C. Evolution du contenu auxinique endogène au cours de l'enracinement *in vitro* de boutures de *Malus*. Clloq arbres fruitiers et Biotechnol, Moët-hennessy, Paris, p. 61, 1986c.
- MONCOUSIN, C. Peroxidase as a marker for rooting improvement of clones of *Vitis* cultured *in vitro*. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPARD, T. **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. Univ Genève, p 379-385, 1986b.
- MONCOUSIN, C. Peroxidase as a tracer for rooting improvement and expressing rejuvenation during *in vitro* multiplication of *Cynara cardunculus scolymus* L. p.147-148. 1991.
- MOSELLA-CHANCEL, L.; MACHEIX, J. J.; JONARD, R. Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persica* Batsch.): influences combinées de certaines substances de croissance et de divers composés phénoloques. **Physiologie Végétale**. v.18: p.597-608, 1980.
- NEMETH, G. Induction of rooting. In: In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture na Forestry I : trees I**. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, p 49-64, 1986.
- QUOIRIN, M.; BOXUS, P.; GASPARD, T. Root incition and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* Plants. **Physiologie Végétale**. v.12: p.165-174, 1974.

SANCHEZ, M. C.; VILITEZ, A. M. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. **Tree Physiology**. v.16, p.673-680, 1996.

SHARMA, A. K.; PRASAD, R. N.; CHATURVEDI, H.C. Clonal propagation of *Boungainvillea glabra* Magnifica through shoot apex culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.1: p.33-38, 1981.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Biology** v.11: p.118-131, 1957.

WILLIAMS, R. R.; TAJI A.A. BOLTON, J. A. *In vitro* propagation of *Dampiera diversifolia* and *Prostanthera rotundifolia*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.3, p.273-281, 1984.

# **CAPÍTULO VI. ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MOREIRA (*Maclura tinctoria*) OBTIDAS *IN VITRO***

## **1. RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para a aclimatação de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) obtidas *in vitro*. As plântulas foram transferidas para caixas tipo gerbox contendo vermiculita e envolvidas por um saco plástico para a formação de uma câmara úmida. Em seguida estas foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de  $24 \pm 2$  C° onde permaneceram sob sombrite 70%, 50% e 30%. Os resultados indicaram que a aclimatação de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) pode ser obtida através do aumento progressivo na intensidade luminosa através do uso de sombrite. O uso de sombrite 70% por sete dias, seguido de sombrite 50% e sombrite 30% também por sete dias proporcionou uma taxa de sobrevivência de plântulas de 97%.

## **2. ABSTRACT**

**Acclimatization of plantlets of moreira (*Maclura tinctoria*) obtained *in vitro*.**

The objective of this work was to establish a methodology for the acclimatization of plantlets of moreira (*Maclura tinctoria*) obtained *in vitro*. Plantlets were transferred to boxes containing vermiculite and surrounded with a plastic bag in order to form a humid environment. The plantlets were maintained in a growth room at a temperature of  $24 \pm 2$ °C under 70, 50 and 30% light screen. The results indicated that acclimatization of moreira plantlets can be

obtained through the progressive increase of light intensity using light screens. The use of 70% light screen for 7 days followed by the use of 50 and 30% light screen also for 7 days each provided 97% plantlet survival.

### 3. INTRODUÇÃO

Existem relativamente poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplante e aclimação, as dificuldades e as soluções encontradas durante este processo. Embora existam algumas regras gerais, a experiência individual, a familiarização com a cultura, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores que determinam a otimização desta fase.

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.

As modernas abordagens e progressos nessa área, dentre elas a utilização do controle de ambiente e da automação, ressaltam a importância de se aproximar as condições de cultura das plantas *in vitro* ao cultivo das plantas em condições autotrófica, visando aumentar as chances de sobrevivência após a fase de transferência para o solo.

O objetivo desse estudo foi determinar as condições adequadas para transferência para o campo de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) produzidas *in vitro*.

#### 4. REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo Ziv (1995), a multiplicação *in vitro* em larga escala depende da suplementação de carboidratos os quais exercem função de fonte de energia tanto para o estabelecimento dos explantes, quanto para os estádios sucessivos de multiplicação. O ambiente *in vitro*, no entanto, pode afetar a morfogênese dos explantes levando, algumas vezes, a conseqüências negativas ao crescimento e ao desenvolvimento das culturas, comprometendo assim a obtenção de taxas de estabelecimento e de multiplicação satisfatórias.

A anatomia interna e a ultraestrutura das plantas regeneradas *in vitro* são, geralmente, diferentes daquelas encontradas em plantas cultivadas em casa de vegetação (Wetzstein et al., 1981). Comparativamente às plantas desenvolvidas *in vivo*, em geral, as plantas micropropagadas apresentam-se pouco lignificadas, com células de paredes pouco espessadas, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, e reduzida quantidade de tecidos de sustentação (esclerênquima e colênquima) (Donnelly et al., 1985). Sabe-se ainda que, as raízes adventícias desenvolvidas em meio de cultura contendo ágar possuem sistema vascular pouco desenvolvido e no caso de plantas lenhosas e semi-lenhosas, o crescimento secundário não é observado. Como conseqüência, somente uma pequena porcentagem dessas raízes sobrevive à aclimação.

Wardle et al., 1979 ressaltam que o acúmulo de grandes reservas de amido nas folhas de plantas propagadas *in vitro* é um fator necessário para a sobrevivência das plântulas durante as duas primeiras semanas *in vivo*. Além do aparelho fotossintético ineficiente, as folhas das plântulas produzidas *in vitro* também possuem menor quantidade de cera epicular do que as plântulas cultivadas em casa de vegetação. Tal fato é responsável pela transpiração

excessiva que, aliada à redução no número de estômatos, ao mal funcionamento no mecanismo de abertura e fechamento estomático e à má estruturação do clorênquima, levam ao dessecamento e murchamento das folhas. Esses fatores são considerados como as causas mais comuns da baixa sobrevivência pós-transplântio.

Diante desses fatos, as plantas provenientes da cultura *in vitro* necessitam passar por um período de aclimação antes de serem transferidas para o solo (Deng e Donnely, 1993).

Entretanto, a aclimação pode apresentar custo e tempo elevados, limitando a micropropagação em escala comercial.

O sucesso da técnica de propagação *in vitro* requer que as plantas que se desenvolvem heterotroficamente, sob condições de alta umidade (90-100%), posteriormente se adaptem, tomando-se a ser autotróficas e cresçam sob condições de moderada ou baixa umidade. Tradicionalmente a aclimação *ex vitro* das plantas micropropagadas é realizada através do incremento progressivo na irradiância mantendo-se, inicialmente, alta umidade relativa após o transplântio, com gradativa redução da mesma, até que a fase de endurecimento se complete.

Brainerd e Fuchigami (1981) foram capazes de aumentar a sobrevivência de espécies lenhosas simplesmente abrindo as tampas dos frascos, ainda em sala de crescimento, durante 4 a 5 dias antes do transplântio e submetendo as plantas a umidade relativa de 30 a 40%. Esta pré- aclimação resultou numa adaptação mais rápida dos estômatos do que em plantas diretamente aclimatadas em condições de casa de vegetação.

O crescimento e o desenvolvimento das plantas em cultura de tecidos pode não se expressar plenamente, não em decorrência da composição dos nutrientes do meio, mas por limitações impostas pela atmosfera do frasco

(Buddendorf-Joosten e Woltering, 1994). A redução do crescimento das plantas cultivadas *in vitro* também tem sido explicada através de fatores como baixa capacidade fotossintética, em função de uma rápida queda na concentração de CO<sub>2</sub> no recipiente (Fujiwara et al.,1987), pela baixa irradiância (Lakso,1986), pelos altos níveis de açúcar do meio (Grout,1988), pela alta umidade relativa (Ziv, 1986 e Ziv, 1995) e pela ação do etileno, gerado no interior do frasco (Buddendorf-Joosten e Woltering, 1994).

Alta umidade relativa, pode condicionar a planta regenerada a reduzir a formação de cera cuticular e epicuticular (Brainerd e Fuchigami et al.,1981), e também afeta o controle da abertura e fechamento dos estômatos em razão da baixa absorção de cálcio (Cassels e Walsh, 1994).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

As plântulas obtidas *in vitro* a partir e de segmentos nodais foram transferidas para caixas tipo gerbox contendo vermiculita (Figura 22).



FIGURA 22. Aspecto visual de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) obtidas *in vitro* e transferidas para caixas tipo gerbox. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Após a transferência, as caixas foram envolvidas por um saco plástico transparente (Figura 23), para criar um ambiente saturado de umidade.

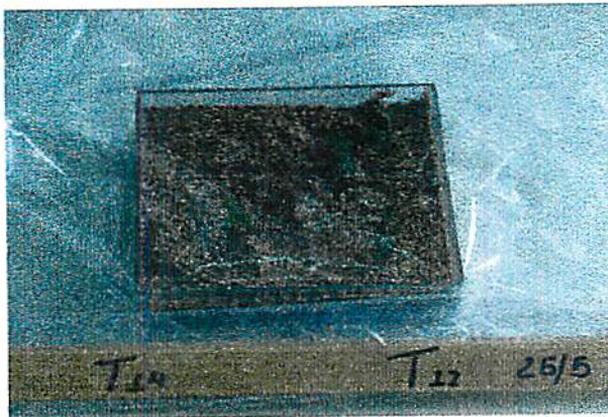


FIGURA 23. Caixa tipo gerbox contendo plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) envolvidas por saco plástico. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Em seguida, as caixas foram transferidas para sala de crescimento a uma temperatura de  $24 \pm 2 \text{ C}^\circ$  onde permaneceram por 7 dias sob um sombrite 70% (Figura 24), o qual permitiu que as plântulas recebessem uma intensidade luminosa de  $14 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ . Após este período, o sombrite 70% foi substituído por um sombrite 50%, o que permitiu que a intensidade luminosa aumentasse para  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ .

Na intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ , as plântulas também permaneceram por um período de 7 dias, após o qual o sombrite 50% foi substituído por um sombrite 30%, proporcionando uma intensidade luminosa de  $75 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ .

Concomitantemente, ao final de cada semana, foram feitas aberturas, em uma das extremidades do saco, de forma a incrementar as trocas de água e gases.

Após 7 dias, o sombrite 30% e o saco plástico foram retirados e as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (3L) contendo terra, areia, esterco na proporção 3:2:1, onde permaneceram até o plantio definitivo no campo.



FIGURA 24. Aspecto geral da aclimação de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) mantidas em sala de crescimento sob sombrite 70%.  
UFLA, Lavras-MG, 1998.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estes estudos indicaram que 15 dias após o início do processo de aclimação, as plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) apresentavam o seu número inicial de folhas duplicado e um sistema radicular funcional. Após este período, foi observado que as folhas apresentavam recobertas por ceras epicuticulares e com o aparato fotossintético funcional. Segundo Brassard (1996), estas características são fundamentais para a sobrevivência da plântula no ambiente *ex vitro* (Figura 25).

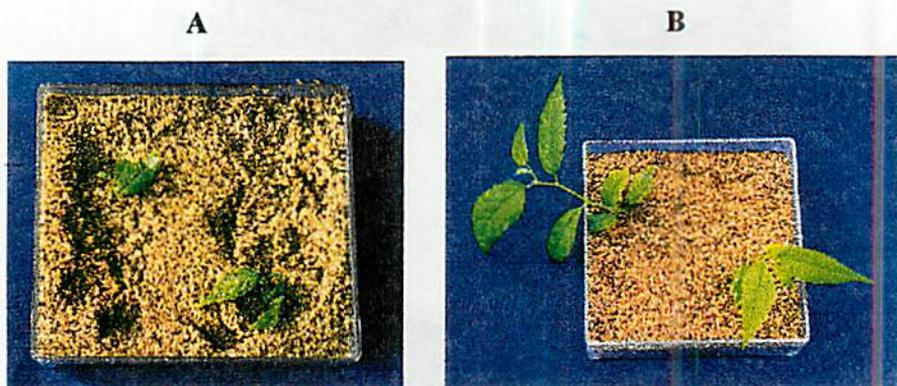


FIGURA 25. Aspectos visuais de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) obtidas *in vitro* a partir de segmentos nodais, antes e após o início do processo de aclimação. A) antes da aclimação; B) após aclimação UFLA, Lavras, MG, 1998.

O período de 15 dias, para que as plantas passem para uma condição autotrófica também é sugerido por Ziv (1995).

A taxa de sobrevivência das plântulas de Moreira (*Maclura tinctoria*) após o transplante para vasos plásticos foi de 97% (Figura 26). Segundo Pereira Pinto\*, uma taxa de perda durante o processo de aclimação de até 4% é considerada admissível.

\*Pereira Pinto, J.E.B. (UFLA-MG) Comunicação pessoal, 1998.



FIGURA 26. Plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) aclimatadas e transplantadas para vasos. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Taxas de sobrevivência semelhantes também foram observadas por Pattnaik, Sahoo e Chand (1996), durante a aclimação de plântulas de *Morus acidosa* e *Morus australis*. Já Deshpande, Josekutty e Prathapasanen (1998) obtiveram 100% de sobrevivência após aclimação de plântulas de *Ficus religiosa*.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi possível a aclimação de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) produzidas *in vitro* a partir de segmentos nodais.

- Recomenda-se para a aclimação de plântulas de moreira o uso de sombrite 70% por 7 dias seguido de sombrites de 50 e 30 % também por 7 dias, cada.

- A taxa de sobrevivência de plântulas alcançada com este procedimento foi de 97%.

## 8. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- BRAINERD, K. E. FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal American Society. Horticultural. Science.* v.106: p. 515-518, 1981.
- 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.* v. 44, p. 37-44, 1996.
- BUDDENDORF-JOOSTEN, J. M. C. WOLTERING, E. J. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro.* *Plant Growth Regulation.* V.15:p. 1-16, 1994.
- CASSELLS, A. C.; WALSH, C. The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* v.37: p.171-178, 1994.
- DESHPANDE, S.R.; JOSEKUTTY, P.C. PRATHAPASENAN. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. *Plant Cell Reports* v.17, p.571-573, 1998.
- DENG, R.; DONNELLY, D. J. *In vitro* hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Canadian Journal of Plant Science.* v.73: p.1105-1113, 1993.

- DONNELLY, D. J. VIDAVER, W. E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**. v.109: p.177-181, 1984.
- FUJITWARA, K.; KOZAL, T.; WATANABE, I. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue culture plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. **Journal. Agronomic Meteorologic**. v.43: p.21-31, 1987.
- GROUT, B. W. W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplanting. **Acta HortScience**. v.230, p.129-135, 1988.
- LAKSO, A. N.; REISH, B. I.; MORTENSEN, J.; ROBERTS, M. H. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro* propagated grapevines after transfer from culture. **Journal of the American Society of Horticultural**, v.11: p.634-638, 1986.
- PATTNAIK, S.R.; SAHOO, Y.; CHAND, P.K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* **Plant Cell Reports** v.15, p.841-845, 1996.
- WARDLE, K.; QUINIAN, A.; SIMPKINS, I. Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. Botrytis regenerated through apical meristem culture. **Annual of Botanic**. v.43; p.745-752, 1979.

- WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E.; BROWN, C. L.; VINES, H. M.**  
**Anatomical changes in tissue cultured sweet gum leaves during hardening off period. HortScience. v.16: p.290, 1981.**
- ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T. SMITH, M. L. A. (eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 493-516, 1995.**
- ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A ALDERSON, P. G. (eds). Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. London: Butterworths, p. 187-196, 1986.**

## ANEXO

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

SAIS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{H}_3\text{BO}_3$	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
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	37,2
MIO-INOSITOL	100
TIAMINA.HCI	1,0
PIRIDOXINA.HCI	0,5
ÁC.NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0

TABELA 2. Composição básica do meio de cultura Wood Plant Medium (Lloyd e McCown, 1980).

SAIS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,20
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{.EDTA}$	37,2
MIO-INOSITOL	100
TIAMINA.HCl	0,50
PIRIDOXINA.HCl	0,50
ÁC.NICOTÍNICO	0,50
GLICINA	2,00