

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, ANÁLISES
ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE
MURICI-PEQUENO (*Byrsonima intermedia* A.
Juss.)**

RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA

2003

RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, ANÁLISES ANATÔMICAS
E BIOQUÍMICAS DE MURICI-PEQUENO (*Byrsonima*
intermedia A. Juss.)**

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

Orientador

Benedito Paiva, PhD.

LAVRA,

MINAS GERAIS - BRASIL

2003

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

Nogueira, Raírys Cravo

Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) / Raírys Cravo Nogueira. -- Lavras : UFLA, 2003.

89 p. : il.

Orientadora: Renato Paiva
Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia

I. Murici-pequeno. 2. Propagação. 3. Germinação *in vitro*. 4. Brotação. 5. Calogênese. 6. Reprodução assexuada. 7. Curva de crescimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.883214

RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, ANÁLISES ANATÔMICAS
E BIOQUÍMICAS DE MURICI-PEQUENO (*Byrsonima*
intermedia A. JUSS.)**

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

APROVADA em 22 de agosto de 2003

Profa. Patricia Duarte de Oliveira Paiva UFLA

Dr. Marcelo Murad Magalhães UFLA



Prof. Renato Paiva, PhD.

UFLA

(Orientador)



LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A toda minha família e aos amigos do Pará,

OFEREÇO.

Aos meus pais, Nazaré Cravo e RaiNS Nogueira

Ao meu irmão, Rairyson

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora de Nazaré e Jesus Cristo, por estarem sempre comigo em todos os momentos do meu caminho.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo amor e encorajamento e por suportarem, junto comigo, a distância e a enorme saudade.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

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

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, PhD., por toda atenção, apoio e conselhos oferecidos durante estes dois anos de convívio profissional.

Aos membros da banca examinadora: prof. Renato Paiva, profa. Patrícia Paiva, Dr. Marcelo Murad e Dra. Ana Hortência (suplente).

Ao meu orientador dos tempos de iniciação científica, Dr. Osmar A. Lamcira, por me ingressar no ramo da pesquisa.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal: Renato, Ângela, Donizeti, Amauri e Luiz Edson, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao professor Evaristo Mauro, pelo auxílio na parte de Anatomia Vegetal. Ao doutorando Marcelo Cirillo, pela ajuda na parte Estatística.

Aos funcionários técnico-administrativos: Evaristo (principalmente pelos almoços), D'Artagnan e Izoncl, por todo auxílio dado, e a Lena, ao Joel e ao Odorêncio, pela simpatia sempre constante.

Ao laboratorista Mauro Batista, por sua eficiência e boa vontade na ajuda aos companheiros de laboratório.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal, em especial: Breno, Cristiano, Ednabel, Marilza, Andréa Shan, Dani (gaúcha), Anne, Dani (mineira), Sílvia,

Cláudia, Inês, Érico, Guto, Aurélio, Marco, por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

Ao grande amigo GUSTAVO DE ARAÚJO SOARES, por toda ajuda, paciência e atenção.

Aos estudantes de iniciação científica - Fernanda, Patricia, Letícia, Rodrigo e Diogo -, pela amizade e eficiência na condução dos experimentos.

Ao estudante de iniciação científica Carlos Vinício (vulgo Espeto) por sua grande contribuição nos experimentos *in vivo* e nas coletas em campo.

A todos os associados da Fisiologia Vegetal, principalmente pelo comparecimento em todos os eventos sociais, em especial: Evânia, Léo, Juninho, Gabriela e César Brasil, Lúcia, Francine, Jankerle, Luciano Donizete e galera do Brejão.

À minha grande amiga e irmã Ana Carolina (Carol), pela amizade sincera e duradoura; a pessoa que foi meu porto-seguro nos momentos de dificuldades e que, mesmo longe, é sempre lembrada.

À amiga e companheira de república Louise, por todos os maravilhosos pratos preparados e pela ótima convivência.

À galera paraense pai-d'égua de Lavras: Ilmarina e cia., Marquinho e Rejane e cia., Louise, Elisa, Karina, Geórgia, Silvia e Carlinhos, Artiaga e muitos outros que não tive a oportunidade de conviver. Valeu por todo carinho e apoio! Vocês moram no meu coração. ÉGUA!!!!

Aos funcionários da biblioteca da UFLA por todo o auxílio prestado na busca de referências bibliográficas.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

Ráirys Cravo Nogucira, filha de Nazaré da Silva Cravo e Raimundo Nonato de Souza Nogucira, nasceu em Belém, a Cidade das Mangueiras, no dia 13 de fevereiro de 1980. Coursou o ensino fundamental e médio no Colégio Gentil Bittencourt, concluindo o segundo grau em 1996. Em 1997, foi aprovada no vestibular para o curso de Ciências Biológicas – Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará. De 1999 a 2001 foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da EMBRAPA Amazônia Oriental. Em agosto de 2001, graduou-se e iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Dois anos depois, encerra esta etapa profissional com a presente dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 - Introdução geral.....	1
1 Introdução.....	1
2 Referencial teórico.....	2
3 Referências bibliográficas.....	12
→ CAPÍTULO 2 - Germinação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de murici-pequeno.....	16
1 Resumo	16
2 Abstract.....	17
3 Introdução.....	18
4 Material e métodos.....	19
4.1 Germinação <i>in vivo</i>	20
4.2 Germinação <i>in vitro</i>	21
5 Resultados e discussão.....	23
6 Conclusões.....	31
7 Referências bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 3 - Organogênese direta a partir de segmentos nodais de murici-pequeno e aspectos da anatomia foliar.....	34
1 Resumo.....	34
2 Abstract.....	35
3 Introdução.....	36
4 Material e métodos.....	38
4.1 Indução de brotações em segmentos nodais de murici-pequeno.....	38
4.2 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações de murici-pequeno.....	40
4.3 Anatomia de folhas produzidas por cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	40
5 Resultados e discussão.....	41

6 Conclusões.....	52
7 Referências bibliográficas.....	52
CAPÍTULO 4 - Indução de calogênese em explantes foliares de murici-pequeno.....	56
1 Resumo.....	56
2 Abstract.....	57
3 Introdução.....	58
4 Material e métodos.....	60
4.1 Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno através do uso de 2,4-D.....	60
4.2 Efeito da interação de 2,4-D e TDZ ou BAP na calogênese em explantes foliares de murici-pequeno.....	60
5 Resultados e discussão.....	61
6 Conclusões.....	69
7 Referências bibliográficas.....	69
CAPÍTULO 5 - Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos formados a partir de explantes foliares de murici-pequeno.....	72
Resumo.....	72
2 Abstract.....	73
3 Introdução.....	74
4 Material e métodos.....	76
4.1 Curva de crescimento de calos.....	76
4.2 Análises bioquímicas dos calos.....	76
5 Resultados e discussão.....	78
6 Conclusões.....	85
7 Considerações finais.....	85
8 Referências bibliográficas.....	87

RESUMO

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é um arbusto do Cerrado considerado medicinal por sua propriedade adstringente em disenterias. Entretanto, a propagação sexuada desta espécie apresenta baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno. Não foi observado efeito de temperatura e nitrato de potássio na germinação de sementes. Os meios de cultura mais eficientes para a germinação de sementes e embriões foram o MS e o WPM 50% sem a adição de sacarose, respectivamente. O BAP mostrou-se ineficiente para induzir a germinação *in vitro* de embriões. O TDZ e o BAP mostraram-se ineficientes na formação de multibrotações em segmentos nodais. O AIB não foi capaz de induzir a formação de raízes em brotações. As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo*, em comparação com as desenvolvidas *in vitro*, apresentaram o parênquima paliçádico, a epiderme abaxial e a adaxial mais espessos e um sistema vascular mais desenvolvido. Na indução de calogênese em explantes foliares, a maior porcentagem da área coberta por calos foi obtida na concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D na ausência de luz. Teores máximos de aminoácidos e açúcares solúveis totais ocorreram no dia da inoculação e aos 60 e 70 dias de cultivo, respectivamente. Teores máximos de açúcares redutores ocorreram no dia da inoculação. Não houve diferença considerável nos teores de taninos entre as fases linear e estacionária.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Práticia Duarte de Oliveira Paiva (co-orientadora), Ana Hortência Fonseca Castro (co-orientadora).

ABSTRACT

NOGUEIRA, Rairys Cravo. *In vitro* propagation, anatomical and biochemical analysis of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) 2003. 89p. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) is a native plant of cerrado and is considered a medicinal plant used in treatments of diarrhea. Its sexual propagation presents low rate of germination and plant emergency. The objective of this work was to study aspects of the *in vitro* propagation and anatomical and biochemical analysis of murici-pequeno. No effect of temperature and potassium nitrate was observed on seed germination. The most effective culture media used for seed and embryo germination were MS and WPM 50%, respectively. The use of BAP had no effect on *in vitro* embryo germination. TDZ and BAP showed to be inefficient to induce shoot formation from nodal segments. IBA was not effective on inducing root formation in shoots. Leaf structures developed *in vivo* compared with those developed *in vitro* presented palisade parenchyma, thicker abaxial and adaxial epidermis and a more developed vascular system. Higher leaf area with callus formation was observed in the presence of $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D in the dark. Higher levels of amino acids and total soluble sugars were observed at the inoculation day and at 60 and 70 days of culture. Higher levels of reducing sugars were observed at the inoculation day. No differences were observed on the levels of tannins in the linear and stationary phases of callus growth.

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser), Ana Hortência Fonseca Castro (Co-adviser).

CAPÍTULO 1 - Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo e contribui com aproximadamente 23% das espécies de plantas e de animais conhecidos no planeta. Estas espécies encontram-se distribuídas em seis grandes biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Floresta Atlântica, Pantanal Mato-Grossense e pradarias de campo limpo.

Nas áreas de Cerrado, muitas plantas têm sido utilizadas como medicamentos naturais por habitantes da região. Considerando a riqueza da flora brasileira e o emprego difundido de plantas medicinais pela população, esperar-se-ia existirem conhecimentos suficientes para empregar estas informações como ponto de partida na transformação destas plantas em medicamentos adequados. Porém, o que se observa é uma considerável falta de conhecimento e de informações básicas sobre as espécies nativas.

A exploração dos recursos genéticos das plantas medicinais no Brasil está relacionada, em grande parte, à coleta extensiva e extrativista do material silvestre. Este fato se torna mais marcante quando se consideram as espécies nativas, cujas pesquisas básicas ainda são incipientes. Pouquíssimas espécies chegam ao nível de serem cultivadas, mesmo em pequena escala.

A utilização destas plantas coloca em pauta comum os interesses dos países do hemisfério norte, ricos em recursos financeiros e em tecnologia, mas pobres em recursos genéticos, e os países do hemisfério sul, pobres em recursos financeiros e em tecnologia, mas riquíssimos em diversidade biológica. Neste contexto, a biotecnologia pode se tornar uma excelente oportunidade para a caracterização, conservação e utilização desta biodiversidade.

As técnicas de cultura *in vitro* são um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético.

Dentre estas técnicas, a micropropagação tem grande aplicação prática na área de produção comercial vegetal. Sua utilização permite obter plantas de mesmo genótipo em larga escala e em um curto espaço de tempo a partir de pequenos fragmentos de tecidos.

A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss., conhecida popularmente como murici-pequeno, é um arbusto do Cerrado considerado medicinal por sua propriedade adstringente nas diarreias e disenterias. Porém, a propagação por meio de sementes do gênero *Byrsonima* esbarra em problemas como baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas.

Devido à dificuldade de propagação do murici-pequeno em face de seu potencial medicinal, este trabalho teve por finalidade estudar alguns aspectos do cultivo *in vitro* e *in vivo* de murici-pequeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

O gênero *Byrsonima* pertence à família Malpighiaceae e é essencialmente americano, sendo encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do sul (Felicio et al., 1995).

A família Malpighiaceae compreende cerca de 63 gêneros. São plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas ou mais frequentemente trepadeiras com folhas inteiras, de disposição alterna, sem estípulas. As flores são vistosas de coloração em geral amarela ou rosada, cíclicas, hermafroditas, diclamídeas, de simetria zigomorfa, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou

terminais. O cálice apresenta-se caracteristicamente com dez glândulas grandes, localizadas na base externa da sépala, duas em cada sépala (raramente sem glândulas como em *Galphimia*). As pétalas, em geral, são fimbriadas, longipenduculadas. O androceu é formado por dez estames, às vezes alguns estaminodiais. O ovário é súpero, tricarpelar, trilocular com cada lóculo, geralmente, com um óvulo. O fruto é baciforme (*Byrsonima*) ou esquizocárpico, separando-se em frutículos samaroideos com a semente localizada na base da sâmara (*Tetrapteris*, *Banisteria*, *Heteropteris*). Como exemplos brasileiros, ocorrem várias espécies de *Byrsonima* nos campos dos cerrados (Joly, 2002).

A *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Figura 1) é um arbusto, podendo apresentar vários ramos que partem de uma base subterrânea. Possui folhas opostas lanceoladas, glabras; flores em cachos terminais, amarelas, tomando tonalidade alaranjada quando velhas; cálice 5-partido, 10-glanduloso; pétalas unguiculadas; 10 estames, todos férteis e fruto drupa (Ferri, 1969).

Esta espécie é designada vulgarmente de murici-pequeno, possuindo época de florescimento de outubro a dezembro e hábitat de cerrado (Rodrigues & Carvalho, 2001).

Não foram encontrados relatos na literatura quanto à germinação do murici-pequeno. Porém, Lorenzi (2002) menciona taxa de germinação baixa e emergência lenta em outras espécies de *Byrsonima*, como *B. coccolobifolia*, *B. lancifolia*, *B. sericea*, *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbacifolia*.

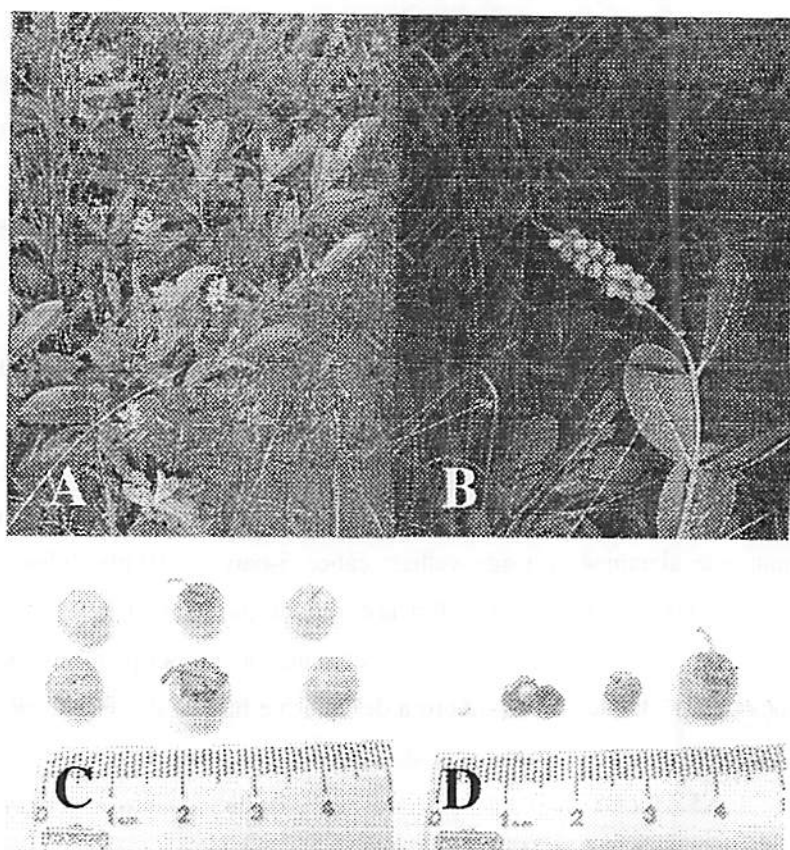


FIGURA 1. Aspecto visual de um planta adulta (A), de frutos (B) e (C), e de sementes, endocarpo e fruto (D) de murici-pequeno. UFLA, Lavras, MG, 2002.

2.2 Propriedades medicinais da espécie

O murici-pequeno é utilizado como adstringente nas diarreias e disenterias. A parte usada é a casca do caule, sendo indicado o preparo e dosagem de 1 xícara de chá da casca picada para 1 litro de água, tomando-se de 3 a 4 xícaras de chá ao dia (Rodrigues & Carvalho, 2001).

Muitas pesquisas têm direcionado seus esforços para descobrir metabólitos secundários em extratos de plantas com atividade biológica. Estudos conduzidos por Alves et al. (2000) revelaram que o extrato de metanol obtido a partir das folhas de *B. intermedia* destacou-se como um candidato promissor ao combate da esquistossomose por sua atividade molusquicida. A esquistossomose, causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, é uma doença endêmica no Brasil e em muitos outros países tropicais (Davis, 1996).

Felício et al. (1995), analisando extrato bruto de folhas secas, concluíram que *B. intermedia* produz lupcol e β -amirina. Segundo Schenkel et al. (2000), lupeol e β -amirina são saponinas do tipo triterpenos pentacíclicos. As saponinas triterpênicas encontram-se predominantemente em dicotiledôneas. A capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre as membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando a sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre as membranas, estão as atividades hemolíticas, ictiotóxica e molusquicida, freqüentemente observadas.

O gênero *Byrsonima* também apresenta casca rica em taninos (Corrêa, 1984). O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que eles estejam envolvidos na defesa química contra o ataque de herbívoros e contra microorganismos patogênicos (Schenkel et al., 2000).

Os taninos estão entre os principais grupos de metabólitos secundários. São compostos fenólicos, em geral polifenóis de alto peso molecular, de

estrutura química variável, com moléculas grandes; por isso não costumam ser absorvidos pelo tubo digestivo. Por terem afinidade e precipitarem proteínas, são empregados na curtição de couros e peles. Possuem atividade antisséptica, antimicrobiana, antihemorrágica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória (Pinto & Bertolucci, 2002).

2.3 Cultura de tecidos vegetais

Biotecnologia é o conjunto de técnicas que utiliza seres vivos, ou parte destes, para produzir ou modificar produtos, aumentar a produtividade de plantas e animais de maneira eficiente ou, ainda, produzir microrganismos para usos específicos (Torres et al., 2000).

Cultura de Tecidos Vegetais, ramo da biotecnologia, é a técnica de crescimento de células, tecidos e órgãos em um meio nutritivo artificial, isolados da planta-mãe (George, 1996). O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos da variação de fatores ambientais, assim como se pode conseguir um maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes. Como resultado, a produção de compostos de valor econômico torna-se viável (Seabrook, 1980).

A propagação de plantas de interesse econômico, por meio da cultura de tecidos, baseia-se no princípio da totipotência, o qual considera que cada célula vegetal tem o potencial para regenerar uma planta inteira. Assim, este princípio pode ser aplicado na regeneração de plantas, a partir de culturas celulares e de tecidos (George, 1996).

A aplicação mais prática da cultura de tecidos é a micropropagação, também denominada de propagação vegetativa *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Os principais benefícios da micropropagação de plantas são: a) a possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas; b) a produção de mudas durante todo o

ano, mesmo em regiões nas quais a planta não apresenta condições para a propagação sexuada; c) a produção de plantas com elevada qualidade sanitária, em geral livres de bactérias, fungos e vírus; d) a possibilidade de conservação de germoplasmas, garantindo a manutenção da biodiversidade e f) auxílio em programas de melhoramento de plantas por meio da associação de métodos de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro* (Echeverrigaray et al., 2001).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), a propagação *in vitro* divide-se basicamente em três estágios: I- seleção e desinfestação de explantes e cultura em meio nutritivo asséptico, II- multiplicação dos propágulos mediante subculturas em meio próprio para a multiplicação e III- transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo. Conforme o explante utilizado, a multiplicação pode ser: a) por meio da proliferação de gemas axilares (órgãos meristemáticos pré-formados), b) mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) e c) por via embriogênese somática direta ou indireta (por calo).

Como a propagação do murici-pequeno através de sementes é limitada devido à baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas, esta técnica torna-se uma importante ferramenta para a determinação de vias alternativas de propagação da espécie.

2.4 Meio nutritivo

O meio de cultura deve suprir os tecidos e os órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento, como sais minerais e carboidrato (Pasqual, 2001). Os estudos da nutrição de plantas provenientes do âmbito da fisiologia vegetal informam que os elementos que compõem o meio nutritivo da cultura *in vitro* devem pertencer à categoria dos essenciais, isto é, a planta não se desenvolve na sua ausência. Existem dois grupos: os macronutrientes

(nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio, enxofre e silício) e os micronutrientes (cloro, ferro, boro, manganês, sódio, zinco, cobre, níquel e molibdênio) (Taiz & Zeiger, 2002).

Entre os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* há o MS, desenvolvido por Murashigue & Skoog (1962) e o WPM, formulado por Lloyd & Mc Cown (1981) (George, 1996).

O melhor crescimento de células e tecidos de plantas em meio MS é, em grande parte, devido à alta concentração de amônio e nitrato. Além do nitrogênio, o potássio encontra-se também em concentrações altas. A alta concentração de sais encontrados neste meio tem proporcionado ganhos significativos no crescimento de diversas espécies *in vitro*. Uma das críticas feitas a este meio refere-se ao baixo nível de fosfato que, para alguns pesquisadores, é insuficiente para sustentar o crescimento das culturas (Pasqual, 2001).

O meio WPM foi desenvolvido para cultura de brotações em plantas lenhosas. Apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de maior concentração de potássio e um alto nível de íons sulfato. É amplamente utilizado na micropropagação de arbustos e árvores (Pasqual, 2001).

Além dos macro e micronutrientes, da água, das vitaminas e mio-inositol, o meio nutritivo é constituído de carboidrato, sendo a sacarose a fonte mais utilizada e, em geral, na concentração de 3%. As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, portanto, apresentam dificuldades de realizar fotossíntese. Sendo assim, os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, e de polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas et al., 1998).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. São cinco as classes de reguladores de crescimento: auxinas, citocininas, giberelinas, inibidores e etileno. Das citocininas comercialmente disponíveis, o 6-benzilaminopurina (BAP) é o regulador de crescimento que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizado em aproximadamente 60% dos meios, seguido da cinetina (KIN) com cerca de 23%. As auxinas mais utilizadas são o ácido indol-butírico (AIB), o ácido naftaleno-acético (ANA) e o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). As duas primeiras são, geralmente, utilizadas na fase de enraizamento e a última na indução de calos e embriogênese somática (Grattapaglia & Machado, 1998).

A formação de raízes adventícias em várias espécies lenhosas tem sido beneficiada pelo uso de carvão ativado no meio de enraizamento. Dotado de uma alta capacidade de adsorção, esta substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presentes no ágar que possam afetar negativamente o crescimento. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado é o favorecimento do processo de enraizamento, devido à redução da intensidade de luz na região de formação de raiz (Assis & Teixeira, 1998).

2.5 Cultura de calos e curva de crescimento

A utilização de técnicas biotecnológicas em plantas pode resolver alguns dos problemas relacionados com a utilização de metabólitos secundários de origem vegetal. Assim sendo, grande parte das pesquisas realizadas no momento objetiva a aplicação dessas técnicas visando ao aumento e ao direcionamento da produção de metabólitos secundários específicos (Echeverrigaray et al., 2001).

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


O crescimento *in vitro* de calos geralmente apresenta fases distintas. Segundo Smith (1992), a fase *lag* se caracteriza como fase de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Ocorre o início da mobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento dos calos. A fase *exponencial* é biossintética. Observa-se o maior crescimento dos calos, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. O número de células aumenta. A *linear* caracteriza-se pela diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular e a fase de *desaceleração* é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Na fase *estacionária*, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários.

2.6 Aspectos bioquímicos

Metabólitos primários

Os aminoácidos, proteínas e os carboidratos são considerados metabólitos primários. São compostos de alto peso molecular que formam e mantêm as estruturas de células e órgãos. Devido à sua frequência, estes apresentam, em geral, baixo valor agregado.

Os aminoácidos são constituídos de um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupamento R diferenciado, todos



ligados a um átomo de carbono. São as unidades básicas das proteínas, as quais participam de variadas funções em um organismo vivo: transporte, catálise enzimática, controle do crescimento e diferenciação (Stryer, 1992).

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

Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são derivados biossintéticos de metabólitos primários, apresentam distribuição limitada na natureza e são restritos a um grupo taxonômico. Desempenham importante função nas relações das plantas com o meio ambiente que as cerca, determinando, em muitos casos, a capacidade de sobrevivência das plantas (Serafini et al., 2001).

A biossíntese de determinados compostos secundários pode ocorrer em todos os tecidos e células de uma dada espécie vegetal devido à totipotência celular. Entretanto, via de regra, a biossíntese é restrita a determinado órgão, tecido e/ou célula especializada e está relacionada com a diferenciação e o desenvolvimento celular (Wiermann, 1981).

A quantificação destas moléculas pode ser utilizada para aprofundar o conhecimento metabólico, bem como detectar, em certo momento, o estado nutricional da planta. No caso da cultura *in vitro* de células, por exemplo, os

calos podem apresentar composição bioquímica e exigências nutricionais distintas em relação ao explante de origem (Phan et al., 1987).

2.7 Aspectos anatômicos

A desordem estrutural e funcional nas plantas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987). Pasqual et al. (1997) afirmam que, durante o processo de transferência para a condição *ex vitro*, a cutícula é frequentemente menos desenvolvida devido à umidade relativa dos frascos ser relativamente alta. Como consequência, ocorre elevada perda de água durante o processo de aclimatização. As modificações manifestadas, principalmente nas folhas, afetam os principais processos executados por estas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas (Deberg & Maene, 1984).

O estudo anatômico de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* pode fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. M. de A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, maio/jun. 2000.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 261-296.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.

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

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF, 1984. v. I-VI.

DAVIS, A. Schistosomiasis. In: COOK, G. C. **Manson's tropical diseases**. London: W. B. Saunders Company, 1996. p. 1413-1456.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to "in vivo" culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

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

FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; LINS, A. L.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M. Triterpenos isolados das folhas de tres espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 62, p. 91-92, jan./dez. 1995.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil – espécies do cerrado**. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 239 p.

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

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

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

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

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

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Textos acadêmicos: Cultura de tecidos - introdução**. Lavras: FAEPE/UFLA, 1997. 159 p.

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

PHAN, C. T.; DO, C. B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of "in vitro" culture of plants; problems and applications, comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. **Experimental Biological**, Quebec, v. 46, n. 3, p. 58, 1987.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169 p.

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

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 2000. p. 597-622.

SEABROOK, J. E. A. Laboratory culture. In: STABA, E. J. (Ed.). **Plant tissue culture as a source of biochemicals**. Boca Raton: CRP Press, 1980. p. 1-20.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindustria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

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

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881p.

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

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

WIERMANN, R. Secondary products and cell and tissue differentiation. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Ed.). **The Biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1981. v. 1, p. 85-115.

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

CAPÍTULO 2 - Germinação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno

1 RESUMO

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Germinação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno. In: _____. Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. p.16-33. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), espécie medicinal do Cerrado, apresenta dificuldade de propagação sexuada devido à baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas em campo. O objetivo do presente trabalho foi estudar aspectos da germinação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno através da avaliação do efeito da temperatura, nitrato de potássio, do uso dos meios de cultura MS e WPM e diferentes concentrações de BAP. Frutos maduros de murici-pequeno foram coletados de populações naturais dos quais, sementes e embriões foram excisados e utilizados como explante. Observou-se que não houve efeito de temperatura e nitrato de potássio na germinação *in vivo* de sementes. Os resultados indicaram que os meios de cultura mais eficientes para a germinação *in vitro* de sementes e embriões são o MS e WPM 50%, sem sacarose, apresentando 60% e 100% de germinação, respectivamente. Observou-se também que não se faz necessária a adição de BAP na germinação *in vitro* de embriões.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Patrícia Duarte de Oliveira (Orientadora), Ana Hortência Fonseca Castro (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

NOGUEIRA, Ráirys Cravo. *In vivo* and *in vitro* germination of murici pequeno. In: _____. *In vitro* propagation, anatomical and biochemical analysis of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. p.16-33. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) is a medicinal plant of cerrado that presents difficulties of sexual propagation due to low rate of seed germination plant emergency in the field. The objective of this work was study aspects of the *in vivo* and *in vitro* germination of murici-pequeno evaluating the effect of temperature, potassium nitrate, the use of MS and WPM culture media and different concentrations of BAP. Mature fruits were collected from native plants and their seeds and embryos excised and used as explants. Temperature and potassium nitrate had no effect on *in vivo* seed germination. The results indicated that the most effective culture media used for the *in vitro* seed and embryo germination were MS and WPM 50%, both with no sucrose, presenting 60 and 100% germination, respectively. The use of BAP is not required for *in vitro* embryo germination.

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser), Ana Hortência Fonseca Castro - UFLA (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

São poucos os estudos sobre a germinação de espécies nativas do Cerrado. Com o crescente interesse por parte dos pesquisadores, aos poucos revela-se o potencial dessa vegetação (Coelho, 1999).

No caso do murici-pequeno, não foram encontrados relatos na literatura quanto ao seu processo de germinação. Há, no entanto, em Lorenzi (2002), menção sobre a ocorrência de baixa taxa de germinação e emergência lenta em outras espécies de *Byrsonima*, como *B. coccolobifolia*, *B. lancifolia*, *B. sericea*, *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbacifolia*.

Para que o processo de germinação ocorra, é necessário que as sementes estejam viáveis, que as condições ambientais sejam favoráveis e que as sementes não estejam dormentes. A temperatura é um fator que tem influência sobre o processo de germinação, afetando a velocidade de embebição, sendo a faixa ideal uma característica inerente a cada espécie (Bewley & Black, 1984).

Para diminuir o tempo de germinação e de aparecimento da radícula, certas sementes podem ser submetidas à embebição em soluções contendo compostos com baixo peso molecular, como o nitrato de potássio (KNO_3), para a indução de estresse osmótico (Bewley & Black, 1984).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meio de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 1996).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Com espécies lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos e composições mais diluídas em macronutrientes

apresentam melhor desempenho (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio nutritivo WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981), por exemplo, apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, tendo sido amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (Pasqual, 2001).

Segundo Souza (2003), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Porém, pode ser que ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, consiga-se manter a plântula *in vitro* por um período de tempo maior.

O objetivo do presente trabalho foi estudar aspectos da germinação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Procedência do material vegetal

Frutos maduros e inflorescências de murici-pequeno foram coletados de populações naturais localizadas no município de Ijaci, região sul do estado de Minas Gerais, localizado a 918,0 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

Após a coleta, os frutos passaram por processo de beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Após a secagem, os frutos foram armazenados em sacos de papel a 10°C.

As inflorescências foram utilizadas para a confirmação da espécie e preparo de exsiccata, que se encontra depositada no herbário ESAL do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob registro nº 17.601.

→ 4.1 Germinação *in vivo*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA.

A) Efeito de diferentes temperaturas na germinação de sementes de murici-pequeno

Dos frutos coletados no município de Ijaci, após a retirada da polpa, procedeu-se a abertura dos endocarpos com o auxílio de martelo. Após a retirada das sementes, estas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% de cloro ativo por 5 minutos e lavagem em água destilada.


Posteriormente, as sementes foram transferidas para placas de petri com papel germtest umedecido, testando-se diferentes temperaturas: 25°C (constante), 30°C (constante), 35°C (constante) e 30°C/20°C (dia/noite), em câmaras de germinação do tipo BOD. Cada tratamento foi constituído de 4 placas contendo 25 sementes cada.

Realizaram-se observações diárias, sendo avaliada a porcentagem de germinação após 30 dias.

A detecção de diferenças entre os tratamentos testados foi feita através da análise de “Deviance”.

B) Efeito de nitrato de potássio (KNO₃) na germinação de sementes de murici-pequeno

Sementes obtidas de frutos coletados em Ijaci foram imersas em diferentes concentrações de KNO₃: 0%, 0,25% e 0,50%; com tempo de exposição de 24 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas em placas de petri com papel germitest umedecido.



O experimento foi conduzido em câmara de germinação do tipo BOD na ausência de luz e com temperatura de 30°C diurno e 20°C noturno.

Totalizaram-se 3 tratamentos, sendo cada tratamento constituído de 10 placas (repetições) e cada placa contendo 15 sementes.

Foi avaliado o percentual de germinação após 30 dias de incubação.

A detecção de diferenças significativas foi feita pela análise de “Deviance”.

4.2 Germinação *in vitro*

A) Efeito de diferentes meios de cultura, presença de sacarose e tipo de explante na germinação de murici-pequeno

A abertura dos endocarpos foi realizada manualmente com o auxílio de martelo. Após a retirada das sementes, estas foram imersas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em seguida em solução de NaOCl 0,5% de cloro ativo por 5 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada e tiveram seus tegumentos retirados, de acordo com a necessidade do experimento. Posteriormente, sementes intactas e sem tegumento (embriões) foram novamente imersas em solução de NaOCl 0,5% de cloro ativo por 5 minutos e, ao final deste tempo, lavadas por quatro vezes em água destilada e autoclavada e, em seguida, inoculados em tubos de ensaio contendo os tratamentos.

Foram testados os meios de cultura WPM 100% e 50%, MS 100% e 50%, acrescidos ou não de 3% de sacarose. Em cada um foram utilizados diferentes tipos de explantes: embrião ou sementes. Os meios foram solidificados com ágar 0,7% e o pH foi aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e

temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada após 30 dias de incubação, sendo observado o percentual de germinação.

O experimento foi constituído de três repetições, sendo cada uma composta por cinco tubos de ensaio e cada tubo contendo um explante.

A detecção de diferenças significativas foi feita por meio da análise de "Deviance". Para o ajuste do modelo, considerou-se a transformação denominada como logito para a estimativa da proporção de germinação de sementes e embriões (Demétrio, 1993):

$$\text{logito}(\mu_i) = \ln\left(\frac{\mu_i}{1-\mu_i}\right) = \mu + \delta_i + \alpha_j$$

em que, μ representa a média geral ; δ_i o efeito de sacarose ($i=0, 1$) e α_j efeito do meio de cultura ($j=1,2,3,4$).

B) Efeito da citocinina BAP na germinação *in vitro* de murici-pequeno

O processo de assepsia das sementes foi semelhante ao realizado no experimento anterior. Em câmara de fluxo laminar, efetuou-se a retirada dos tegumentos das sementes.

Foram testados quatro níveis de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) acrescido ao meio de cultura WPM 50% com 3% de sacarose. Os meios foram solidificados com ágar 0,7% e o pH aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada após 45 dias de incubação, sendo observado o percentual de germinação.

O experimento foi constituído de cinco repetições, sendo cada uma composta por cinco tubos de ensaio e cada tubo contendo um explante.

Para cada parcela, realizou-se a contagem de unidades germinadas. A proporção foi obtida em relação ao número total de tubos de ensaio por parcela, isto é, $n = 25$. A detecção de diferenças significativas foi feita por meio da análise de "Deviance".

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação *in vivo*

Não foi observado nenhum efeito da temperatura e de diferentes concentrações de KNO_3 na germinação de sementes de murici-pequeno.

O efeito da temperatura não apresentou resultados satisfatórios, pois as sementes de murici-pequeno não apresentaram protusão de radícula e nem emergência de parte aérea em nenhuma das temperaturas testadas.

Com relação ao nitrato de potássio, não houve efeito na diminuição do tempo de germinação, uma vez que as sementes apresentaram necrose aos 15 dias após a instalação do experimento. A ausência de germinação poderia ser atribuída a uma possível toxidez causada pelo KNO_3 ; entretanto, a testemunha (ausência de KNO_3) também não apresentou germinação.

Os resultados encontrados nos dois experimentos *in vivo* podem estar relacionados com a presença de tegumento nas sementes. Cita-se ainda a possibilidade de excesso ou falta de água durante a condução do experimento.

Almeida (2001), testando diferentes temperaturas na germinação de diásporos (semente + endocarpo) de canela-batalha (*Cryptocarya aschersoniana*), não observou germinação em nenhum tratamento, enfatizando que a retirada do endocarpo era fator essencial para a germinação desta espécie. Entretanto, ao testar diásporos escarificados, observou aproximadamente 70% de germinação na temperatura de 30°C diurno e 20°C noturno. O autor também

testou as mesmas concentrações de KNO_3 deste trabalho e também não observou efeito da aplicação deste composto.

5.2 Germinação *in vitro*

A) Efeito de diferentes meios de cultura, presença de sacarose e tipo de explante na germinação de murici-pequeno

No cultivo de embriões, a máxima porcentagem de germinação (100%) foi obtida quando cultivados em meio WPM 50%, na ausência de sacarose. No cultivo de sementes, a maior porcentagem de germinação também foi obtida em WPM 50%, na ausência de sacarose, ocorrendo aproximadamente 60% de germinação (Figura 2).

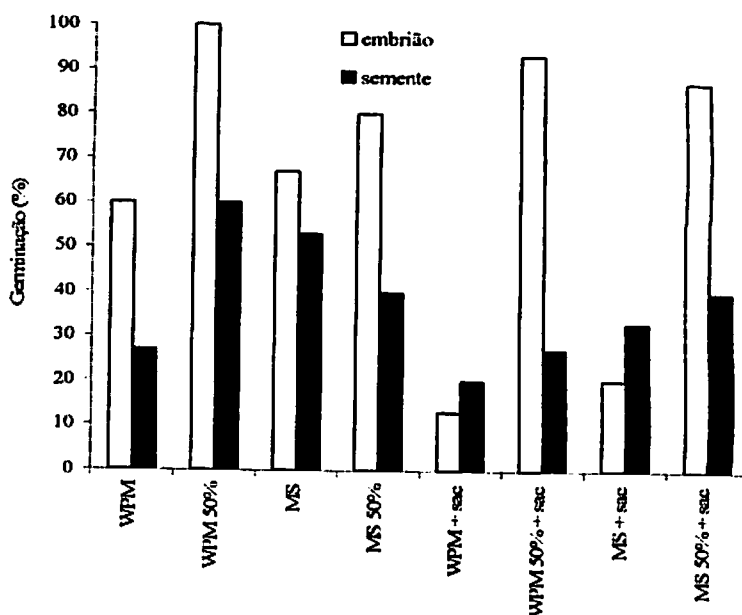


FIGURA 2. Germinação de embriões e sementes de murici-pequeno em diferentes meios de cultura (MS ou WPM), na presença ou ausência de sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Para a indicação do meio de cultura mais apropriado para a germinação de embriões e sementes de murici-pequeno, procedeu-se ao ajuste de um modelo generalizado, segundo Demétrio (1993) (Tabela 1).

TABELA 1. Análise da “Deviance” dos efeitos sacarose (sac) e meio nutritivo para a germinação de embriões e sementes de murici-pequeno. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Variável: Proporção de embriões germinados			
FV	GL	Valor qui-quadrado	p-valor
SAC	1	9.1027	0.0026
MEIO	3	44.4466	0.0001
Variável: Proporção de sementes germinadas			
FV	GL	Valor qui-quadrado	p-valor
SAC	1	2.938	0.0841
MEIO	3	3.7793	0.2863

Os efeitos da sacarose e do meio de cultura foram significativos para a análise de germinação de embriões. Observou-se que o acréscimo de sacarose nos meios testados alterou as porcentagens de germinação. Nos meios WPM, WPM 50% e MS, houve menor porcentagens de germinação, enquanto que no MS 50% houve maior germinação. Entretanto, a presença de sacarose no meio WPM 50%, apesar de ter ocasionado uma diminuição na porcentagem de germinação em comparação com o meio em que não se acresceu a sacarose, ainda ocorreu em valor elevado (95%).

Nos meios WPM e MS, a presença de sacarose ocasionou uma considerável redução na germinação. Provavelmente, a concentração completa dos sais, juntamente com a sacarose, afetou o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo. Entretanto, estes mesmos meios, quando utilizados com metade das concentrações de sais e na presença de sacarose, não apresentaram

mudanças consideráveis na taxa de germinação, chegando esta até a aumentar no meio MS 50%. A redução da concentração dos sais parece ter compensado a adição de sacarose, não afetando assim o balanço osmótico e sendo favorável à germinação.

Os resultados obtidos com embriões foram semelhantes aos encontrados por Souza (2003) que, testando diferentes concentrações do meio MS (completo, 50% e 25%) líquido ou sólido na germinação de embriões de amíca (*Lychnophora pinaster*), observou que o MS 25% sólido foi o meio que proporcionou melhor resultado, aproximadamente 68% de germinação. O MS em sua concentração original apresentou porcentagem de germinação inferior a 50%. A autora também comparou os meios MS 25%, WPM e WPM 50%, todos sólidos, na presença e ausência de sacarose. Os meios MS 25% sem sacarose, MS 25% com sacarose e WPM 50% sem sacarose não diferiram entre si e diferiram dos demais meios de cultura, apresentando as maiores porcentagens de germinação, respectivamente, 79%, 70% e 70%.

Já para o cultivo de sementes, a adição de sacarose nos meios de cultura promoveu uma redução não-significativa na porcentagem de germinação. No meio MS 50%, por exemplo, a porcentagem de germinação praticamente não sofreu alteração em comparação ao mesmo meio acrescido de sacarose.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram, por meio do teste de Razão de Chances, que o meio WPM 50%, preferencialmente na ausência de sacarose, é mais apropriado para germinação de embriões.

TABELA 2. Análise dos coeficientes e razão de chances para embriões de murici-pequeno inoculados em meio MS e WPM na ausência e presença de sacarose (sac). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Parâmetro	GL	Estimativa	Erro padrão	p-valor	Razão de chances
Intercepto	1	1,0319	0,5229	0,0485	
Sac 0	1	1,5452	0,5057	0,0022	4,673
Sac 3%	0	0,0000	0,0000	.	
WPM	1	-2,4337	0,6734	0,0003	0,087
WPM 50%	1	1,8212	1,1433	0,1112	6,122
MS	1	-2,1145	0,6611	0,0014	0,120
MS 50%	0	0,0000	0,0000	.	

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram, por meio da razão de chances, que os meios WPM 50% e MS são os mais apropriados para germinação de sementes, independente da presença ou ausência de sacarose.

TABELA 3. Análise dos coeficientes e razão de chances para a proporção de sementes de murici-pequeno inoculados em meio MS e WPM na ausência e presença de sacarose (sac). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Parâmetro	GL	Estimativa	Erro padrão	p-valor	razão de chances
Intercepto	1	-0,7501	0,4311	0,0819	
Sac 0	1	0,6668	0,3894	0,0868	1,95
Sac 3%	0	0,0000	0,0000	.	
WPM	1	-0,8026	0,5771	0,1643	0,448
WPM 50%	1	0,1409	0,5311	0,7908	11,513
MS	1	0,1409	0,5311	0,7908	11,513
MS 50%	0	0,0000	0,0000	.	

Apesar do meio MS ser mais concentrado que o meio WPM 50%, este apresentou as mesmas chances de germinação. A diferença de concentrações de sais entre estes meios parece não ter afetado o processo germinativo das sementes. Efeitos não-significativos do meio nutritivo para a germinação de sementes também foram observados por Conceição (2000) testando diferentes concentrações do meio MS na germinação de sementes de timbó (*Derris urucu*).

A maior germinação de embriões em meio nutritivo WPM 50% deve-se, provavelmente, à diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de macro e micronutrientes do referido meio, que é menos concentrado em comparação aos outros meios utilizados.

O mesmo pode ser concluído para as maiores chances de germinação de embriões, as quais foram observadas na ausência de sacarose. A presença de sais e de carboidratos possivelmente interferiu na regulação osmótica do meio de cultura e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição na germinação. A ausência de sacarose no meio WPM 50% disponibilizou mais água para o explante, desencadeando o processo de protusão da radícula, devido à retomada do crescimento do embrião acionada pela embebição.

Os valores observados na germinação de sementes de murici-pequeno, podem estar associados ao tegumento, o qual parece retardar o processo germinativo, ocasionando a baixa porcentagem de germinação. Este pode ter servido como uma barreira para a entrada de água e, assim, inibindo a ativação de enzimas responsáveis pela germinação.

Azevedo (2003) obteve maiores porcentagens de germinação *in vitro* em sementes de copaiba (*Copaiba langsdorffii*) em meio de cultura MS na ausência de sacarose. Resultados semelhantes também foram obtidos em sementes de *Annona glabra* (Deccetti, 2000).

Sementes de morceira (*Maclura tinctoria*), no entanto, germinaram em maior porcentagem quando cultivadas em meios com sacarose, porém, em menores concentrações (Gomes, 1999).

B) Efeito da citocinina BAP na germinação de embriões de murici-pequeno

Não foi possível a aplicação de uma análise estatística satisfatória em virtude da ocorrência de calos em todos os tratamentos utilizados (Figura 3) e uma vez que o objetivo do experimento foi estimular a germinação e induzir múltiplas brotações em embriões zigóticos por meio da aplicação de BAP.

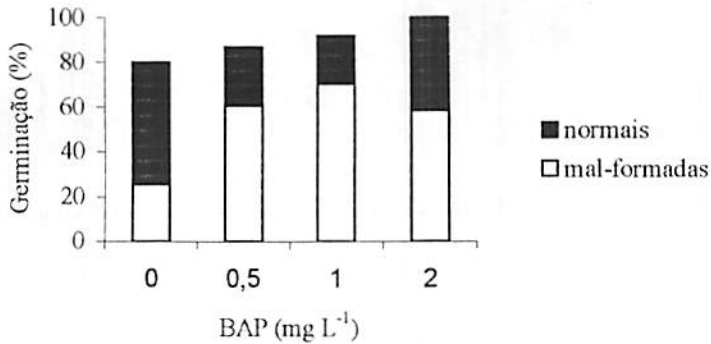


FIGURA 3. Germinação de embriões de murici-pequeno cultivados em meio acrescido de diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Como o objetivo do experimento era a indução de múltiplas brotações em embriões zigóticos, as plântulas mal-formadas foram consideradas as que apresentaram formação de calos e ausência de raiz. As plântulas consideradas

normais foram aquelas que apresentaram comprimento próximo a 1,0 cm e ausência de calos.

Provavelmente, as folhas cotiledonares, ao entrarem em contato com o meio de cultura, foram estimuladas a multiplicar suas células de maneira desorganizada, de forma que o desenvolvimento normal da plântula foi comprometido (Figura 4).

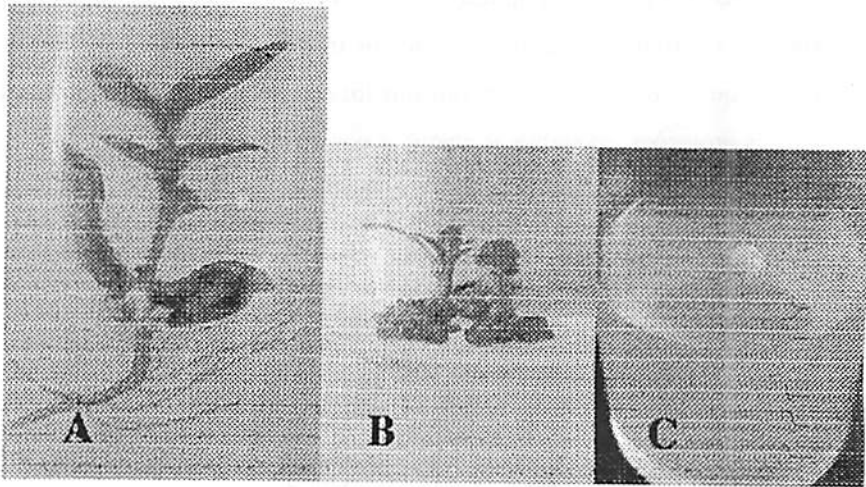


FIGURA 4. Plântula normal (A) e plântula mal-formada (B) obtidas de embriões de murici-pequeno inoculados em diferentes concentrações de BAP (C). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Embora as citocininas sejam indicadas para reduzir a dominância apical, a sua presença no meio de cultura deve ter favorecido a divisão celular, induzindo uma proliferação desorganizada. O BAP parece ter favorecido o balanço hormonal para a formação de calos, em vez de múltiplas brotações, que era o resultado esperado.

Resultados desfavoráveis também foram obtidos na cultura de embriões de coqueiro-anão (*Cocos nucifera*), utilizando diferentes concentrações de BAP

ou a interação BAP x AIA. A inclusão de reguladores no meio de cultura ocasionou o início da germinação, mas com posterior escurecimento e morte dos embriões (Silva, 2002).

Em pesquisa com guarirobeira (*Syagros oleraceae*), testaram-se diferentes níveis do meio MS em combinação com diferentes concentrações de BAP, tendo sido observada uma redução gradativa no número de folhas e peso da peso médio da matéria seca da plântula à medida que a concentração de BAP foi aumentada (Melo, 2000).

Embora a citocinina atue na quebra do efeito do ácido abscísico (ABA), inibidor do processo germinativo, isto não foi observado nos experimentos, uma vez que a presença de BAP não potencializou a germinação.

Os resultados destes experimentos demonstram que a adição desta citocinina não é necessária para a germinação de murici-pequeno, uma vez que pode desencadear processos morfogênicos não-desejáveis, como a formação de calos, constituindo-se um obstáculo para a obtenção de fontes assépticas e com diferentes tipos de explantes para a micropropagação.

6 CONCLUSÕES

Não houve efeito de temperatura e nitrato de potássio na germinação de sementes de murici-pequeno.

Os meios de cultura mais eficientes para a germinação de sementes e embriões são o MS e WPM 50%, sem sacarose.

Não se faz necessária a adição de BAP para germinação *in vitro* de embriões de murici-pequeno.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. P. de. **Germinação, crescimento inicial e anatomia foliar de plantas jovens de *Cryptocarya aschersoniana* MEZ. sob diferentes níveis de radiação.** 2001. 96 p. Dissertação (mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

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

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

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

DEMÉTRIO, C. G. B. **Métodos Lineares na experimentação agrônômica.** In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA A EXPERIMENTAÇÃO AGRÔNOMICA, 5., 1993, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre, 1993. 125 p.

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

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

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

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

MELLO, B. de. **Cultivo de embriões *in vitro* da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart) Becc.]**. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

SILVA, V. dos S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera***. 2002. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-22102002-154541/publico/vanda.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2003.

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

CAPÍTULO 3 – Organogênese direta a partir de segmentos nodais de murici-pequeno e aspectos da anatomia foliar

1 RESUMO

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Organogênese direta a partir de segmentos nodais de murici-pequeno e aspectos da anatomia foliar. In: _____. *Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.)*. 2003. p.34-55. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O arbusto *Byrsonima intermedia* A. Juss., designado popularmente de murici-pequeno, atua como espécie medicinal na forma de adstringente nas diarreias e disenterias. Geralmente, espécies de *Byrsonima* apresentam baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas. A propagação *in vitro*, ou micropropagação, permite a determinação de vias alternativas de reprodução por meio da organogênese ou embriogênese somática. O objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo de micropropagação por organogênese direta a partir de segmentos nodais de murici-pequeno e identificar diferenças anatômicas entre as folhas obtidas no cultivo *in vivo* e *in vitro*. Segmentos nodais contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ e BAP. As brotações obtidas a partir de segmentos nodais *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura WPM 50% contendo diferentes concentrações de AIB. Os resultados indicaram que o TDZ mostrou-se ineficiente na indução de brotações em segmentos nodais de murici-pequeno e que o BAP também não induziu a formação de multibrotações, mas ocasionou o aparecimento de calos. Na indução de rizogênese, o AIB não promoveu a formação de raízes em brotações de murici-pequeno. Quanto ao aspecto da anatomia foliar, as estruturas desenvolvidas *in vivo* apresentaram o parênquima paliádico, a epiderme abaxial e a adaxial mais espessos, além de sistema vascular mais desenvolvido que *in vitro*.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva - UFLA (Co-orientadora), Ana Hortência Fonseca Castro (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Direct organogenesis from nodal segments of murici-pequeno and aspects of leaf anatomy. In: _____. *In vitro* propagation, anatomical and biochemical analysis of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. p.34-55. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Byrsonima intermedia A Juss, known as murici-pequeno, is considered a medicinal plant used in treatments of diarrhea. In general, the species of *Byrsonima* present low germination and slow plantlet emergency. The *in vitro* propagation or micropropagation allows the determination of propagation alternatives with the use of organogenesis or somatic embryogenesis. The objective of the present work was to determine a procedure of propagation through direct organogenesis from nodal segments of murici-pequeno and to identify anatomical differences of leaves obtained through *in vivo* and *in vitro* culture. Nodal segments containing up to two buds were inoculated in MS supplemented with different concentrations of TDZ and BAP. Shoots obtained from nodal segments cultivated *in vitro* were inoculated in WPM 50% containing different concentrations of AIB. The results indicated that both TDZ and BAP were inefficient to induce shoots in nodal segments although callus was observed in the presence of BAP. The use of IBA had no effect on root formation. The leaf anatomy analysis showed that the palisade parenchyma and the abaxial and adaxial epidermis developed *in vivo* were thicker with the vascular system more developed than *in vitro*.

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser), Ana Hortência Fonseca Castro - UFLA (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

O crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (George, 1996). Os principais grupos destas substâncias são: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e alongação celular e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical. O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (Pasqual, 2001).

A micropropagação pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática. A organogênese envolve a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. Frequentemente, as brotações são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas e, subsequentemente estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina. A micropropagação via embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* (Ahuja, 1992). De acordo com George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotações axilares.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP), é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios, seguida da cinetina (KIN) com cerca de 23%.

O thiadiazuron (TDZ) foi registrado inicialmente como desfolhante na cultura de algodão com o nome comercial "Dropp". Sua alta atividade

citocinínica foi posteriormente demonstrada. Em algumas plantas, ele é mais eficiente que outros reguladores de crescimento para induzir a regeneração de brotações adventícias (Pasqual, 2001).

Quanto ao enraizamento, as auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA) (Assis & Teixeira, 1998). As respostas às auxinas não são universais. Certas espécies enraízam com dificuldade, ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas, e algumas espécies até dispensam o uso de auxinas no seu enraizamento (Rohr & Hanus, 1987).

De acordo com Assis & Teixeira (1998), a formação de raízes adventícias em várias espécies lenhosas tem sido beneficiada pelo uso de carvão ativado. Este composto apresenta duas funções: escurecimento do meio, impedindo a incidência de luz na base do explante e reduzindo a oxidação e, ainda, atua absorvendo os compostos tóxicos presentes no ágar ou formados durante a oxidação de compostos fenólicos. O fornecimento de carboidratos é quase sempre necessário durante o enraizamento, uma vez que a rizogênese é um processo que requer energia e a fotossíntese realizada pelo explante é relativamente baixa.

A proliferação de brotos *in vitro* requer condições especiais, como alta umidade, superfluxo de fatores nutricionais (minerais e carboidratos), alto nível de reguladores de crescimento e baixa intensidade de luz. Porém, essas mesmas condições são as principais causas de má formação de brotos (Ziv, 1987). Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e às trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984).

A avaliação das mudanças estruturais que ocorrem em um tecido ou órgão formado em condições *in vitro* é de grande valia para se descobrir a real eficiência do processo organogenético e a funcionabilidade do novo órgão,

tornando-se pré-requisito indispensável para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de plantas (Soares, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo de micropropagação por organogênese direta a partir de segmentos nodais de murici-pequeno, bem como comparar as características anatômicas de folhas obtidas *in vitro* com as folhas mantidas em condições *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indução de brotações em segmentos nodais de murici-pequeno

A) Efeito de thidiazuron (TDZ) na indução de brotações em segmentos nodais de murici-pequeno

Plântulas obtidas de prévia germinação *in vitro* (capítulo 2) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Os segmentos nodais, contendo até duas gemas laterais, foram inoculados em meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes concentrações de TDZ (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e tiveram seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2°C de temperatura, irradiância de 25 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliados o número de brotações, nós e folhas, o comprimento de brotações e a presença de calos aos 35 dias após a inoculação.

O experimento foi instalado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta

por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados das variáveis avaliadas foram transformados para $(Y + 1,0)^{0,5}$ e analisados por meio de regressão polinomial ou pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

B) Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações em segmentos nodais de murici-pequeno

Plântulas obtidas da germinação *in vitro* (capítulo 2) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Os segmentos nodais contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e tiveram seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliados o número de brotações, nós e folhas, o comprimento de brotações e a presença de calos aos 35 dias após a inoculação.

Os resultados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados das variáveis avaliadas foram transformados para $(Y + 1,0)^{0,5}$ e analisados por meio de regressão polinomial ou pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

4.2 Enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas a partir de segmentos nodais *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1981) com 50% de sua concentração original e contendo diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e tiveram seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2°C de temperatura e na ausência de luz. Trinta e cinco dias após a inoculação, foram avaliados o número e o comprimento de raízes.

Os resultados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três tubos de ensaio, cada um contendo uma brotação. Os dados das variáveis avaliadas foram transformados para (Y + 1,0)^{0,5} e analisados por meio de regressão polinomial ou pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

— ➤ 4.3 Anatomia de folhas produzidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*

Folhas completamente expandidas foram coletadas ao acaso de ramos do terço superior das plantas de murici-pequeno encontradas no município de Ijaci e das brotações induzidas *in vitro* de segmentos nodais inoculados em meio MS em diferentes concentrações de BAP, conforme o experimento I deste capítulo. As folhas foram fixadas em FAA (formaldeído + ácido acético + álcool etílico) 70% (v/v) e conservadas em álcool etílico 70% (v/v), segundo metodologia descrita por Johansen (1940).

Os cortes anatômicos das folhas coletadas foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras. Estes foram efetuados à mão livre, com auxílio de lâmina.

Posteriormente, sucedeu-se a clarificação em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de três a cinco minutos e três lavagens em água destilada. Em seguida, o material foi neutralizado com solução de ácido acético 1% (v/v) por um minuto, repetindo-se as lavagens com água destilada (Johansen, 1940). A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada pelo processo de dupla coloração com safranina-azul de astra (Bukatsh, 1972). Finalmente, foram montadas lâminas semi-permanentes com água glicerizada do material obtido e lutagem com esmalte.

As lâminas confeccionadas com os cortes anatômicos foram utilizadas para realização de medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas esponjoso e paliádico, com auxílio de ocular micrométrica. Posteriormente, estas lâminas foram fotomicrografadas utilizando-se um microscópio Olympus BX 60 e filme ASA 400 colorido.

As medições de espessuras foram analisadas utilizando-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três medidas. As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Indução de brotações em segmentos nodais de murici-pequeno

Não houve efeito favorável pelo uso de TDZ. Ocorreu necrose dos explantes ou estes não apresentaram nenhuma brotação. Um indicio de regeneração foi observado apenas na ausência deste regulador (Figura 5).

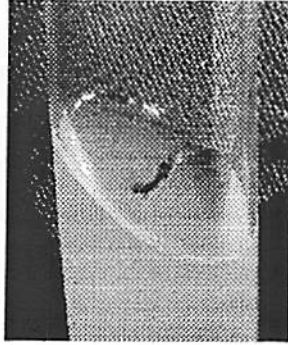


FIGURA 5. Aspecto de segmento nodal de murici-pequeno aos 35 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Com relação ao uso do BAP, houve formação de brotações em todos os tratamentos testados (Figura 6).



FIGURA 6. Aspecto de brotações de murici-pequeno obtidas de segmentos nodais inoculados em meio MS contendo BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Para todas as variáveis avaliadas (número de brotações, nós e folhas, comprimento de brotos e presença de calos) foram encontradas diferenças significativas para as diferentes concentrações de BAP (Tabela 4).

TABELA 4. Análise de variância para número de brotações, nós e folhas, comprimento de brotações e ocorrência de calos em segmentos nodais de murici-pequeno inoculados em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

QM						
Fontes de variação	GL	Brotações*	N.nós*	N. folhas*	Comp. brot.*	Presença calos *
BAP	5	0,2554**	0,5020**	3,1493**	0,1457**	0,2104**
Erro	54	0,1059	0,1538	0,8812	0,4905	0,0279
CV (%)		23,09	26	42,86	17,41	13,41

* Observações transformadas segundo $(X + 1)^{0,5}$.

** Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Para número de brotações, nós e folhas, os tratamentos não diferiram entre si, somente da testemunha (ausência de BAP). Para estas variáveis, a maior média observada foi de 1,5 brotação para explantes cultivados na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 2,0 nós na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP (Figura 7A) e 7,4 folhas na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (Figura 7B).

Para comprimento de brotos, os níveis de 0,5; 1,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP não diferiram entre si, mas diferiram dos níveis 0,0; 2,0 e 8,0 mg L⁻¹. O maior comprimento de brotações foi obtido na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Enquanto que, para a variável ocorrência de calos, as doses de 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹ não diferiram entre si, somente das doses 0,0 e 0,5 mg L⁻¹ (respectivamente, 0% e 20%). A concentração de 8,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior ocorrência de calos, aproximadamente 90%. Assim, a formação de calos foi estimulada à medida que se elevaram as concentrações de BAP. Na testemunha, não houve a formação de calos (Figura 7C).

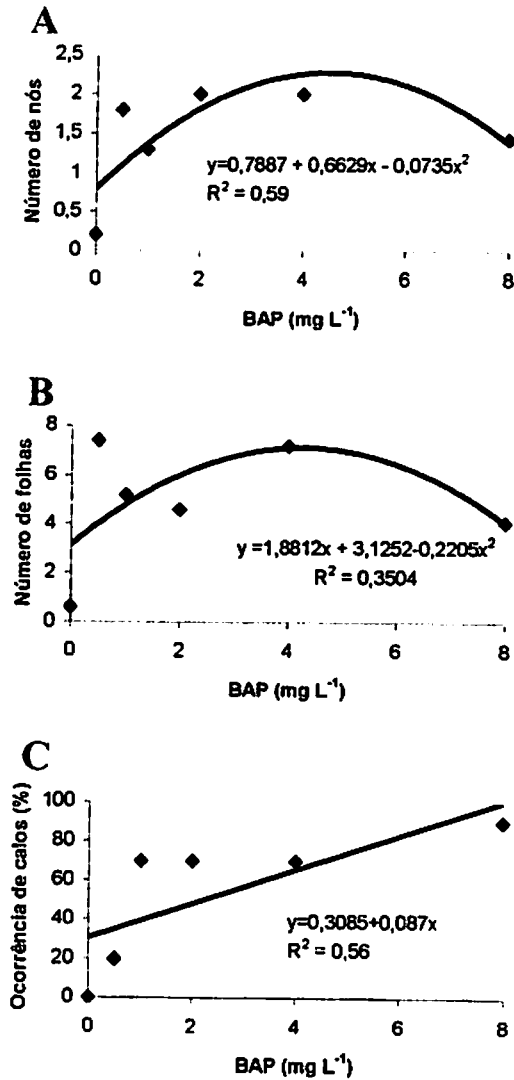


FIGURA 7. Número de nós (A), folhas (B) e ocorrência de calos (C) em segmentos nodais de murici-pequeno inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

O BAP não foi eficiente na indução de múltiplas brotações em segmentos nodais de murici pequeno, uma vez que, em nenhuma das concentrações testadas, o máximo obtido foi de 1,5 brotação por explante, na dose de 0,5 mg L⁻¹. Resultados semelhantes foram encontrados por Deccetti (2000). Trabalhando com segmentos nodais de *Annona glabra*, a autora testou diferentes combinações de BAP e ANA, com ou sem GA₃ e constatou não ser necessária a adição de regulador de crescimento para induzir a proliferação de brotações, formando, em média, 1,5 brotação por segmento nodal.

Concentrações acima de 4,0 mg L⁻¹ de BAP não se mostraram eficientes, pois a tendência foi de redução nos valores das variáveis citadas. A ocorrência de calos apresentou-se diretamente proporcional aos níveis de BAP, ou seja, à medida que se aumentou a concentração do regulador de crescimento, aumentou-se a presença de calos nos explantes. Testando-se diferentes concentrações de citocininas na indução de gemas axilares de *Phyllanthus urinaria*, alcançou-se o maior número de brotações por explante, utilizando BAP na concentração de 0,28 mg L⁻¹. Acima desta concentração, houve redução no número de brotações formadas (Catapan et al., 2002).

Em pesquisa com *Inga vera* subsp. *affinis*, também se observou que à medida que se aumentou a concentração de BAP, estimulou-se a formação de calos em segmentos nodais. As concentrações de 6, 9 e 12 mg L⁻¹ deste regulador foram as que apresentaram os resultados mais significativos, entre 70% e 80% de formação de calos (Soares, 2003).

A possível hipótese para a resposta obtida na presença de TDZ pode estar relacionada à toxidez das concentrações utilizadas deste regulador de crescimento, que desencadeou a morte ou ausência de brotações nos explantes.

No entanto, Gomes (1999) trabalhou com segmentos nodais de moreira (*Machura tinctoria*) inoculados em meio WPM contendo combinações de BAP e ANA e observou que os tratamentos constituídos apenas de ANA apresentaram

brotações mal-formadas. Os que continham somente BAP não apresentaram formação de brotações. A produção máxima de brotações foi obtida utilizando-se $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA associado a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (5 brotações/segmento).

Estudando o efeito do BAP e do TDZ em explantes nodais em meio MS, Conceição (2000) também concluiu que as concentrações de citocininas usadas não foram eficientes para promover a proliferação de brotações em timbó (*Derris urucu*). Acima de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ, houve um declínio no número e tamanho de brotações. Utilizando BAP, o número de brotações apresentou aumento até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e, para tamanho das brotações, o maior valor foi encontrado entre $0,0$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Comparando o efeito do BAP e TDZ em doses de $0,2$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ adicionadas em meio MS, também se constatou que o BAP proporcionou melhores resultados na fase de multiplicação de macieira (*Malus domestica*) (Quezada, 1996). O mesmo foi observado por Del Pontes (1999), em trabalho com *Eucalyptus globulus*.

Em sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.), Coelho (1999) observou que o uso de BAP no meio MS, nas concentrações $1,126$ e $0,563 \text{ mg L}^{-1}$, ambos na ausência de ácido naftaleno acético (ANA), maximizou a média do número de brotações por segmento nodal.

Entretanto, Arello e Pinto (1993), trabalhando com segmentos nodais de plântulas de pau-santo (*Kielmeyra coriacea*), promoveram o desenvolvimento de gemas com o uso das combinações entre ANA e BAP, independente das concentrações utilizadas.

5.2 Enraizamento *in vitro* de brotações de murici-pequeno

As doses de AIB utilizadas não proporcionaram a formação de raízes. O AIB não exerceu efeito positivo na indução de rizogênese e os níveis internos de auxinas não foram suficientes para desencadear este processo morfogênico.

Embora utilizando diferentes concentrações de AIB, Deccetti (2000) concluiu que o melhor enraizamento de segmentos nodais de *Annona glabra* é obtido na ausência deste regulador, em plantas cultivadas na presença de luz.

A testemunha (ausência de AIB) também não promoveu o enraizamento. É possível que a espécie apresente concentrações endógenas de citocininas residuais dos experimentos de multiplicação, que podem ter desfavorecido o balanço hormonal para a emergência de raízes. Concentrações maiores de AIB, ou o uso de outro tipo de auxina como o ANA, podem estimular a rizogênese em explantes de murici-pequeno. Lopes (2000) e Andrade et al. (2000) observaram que o ANA era mais eficiente no enraizamento de brotos de mogno (*Swietenia macrophylla*) e arocira (*Myracrodruon urundeuva*) obtidos *in vitro*, respectivamente.

Em *Coffea arabica* e *C. canephora*, no entanto, maior número de raízes foi observado em explantes cultivados com 6,0 mg L⁻¹ de AIB (Santos, C., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos com o uso de 4,0 g L⁻¹ de carvão ativado associado a 3,0 mg L⁻¹ de AIB para estimular a rizogênese em segmentos nodais de salix na presença de luz (Santos, B., 2001). Em moreira (*Machura tinctoria*), também se obteve enraizamento em WPM 50% em pH 7,0 acrescido de 4,8 mg L⁻¹ de AIB e 4,7 g L⁻¹ de carvão ativado na presença de luz (Gomes, 1999).

O efeito favorável do AIB também foi obtido por Bonilla (2002) e Del Ponte (1999) em estudos com tangará-açu (*Rudgea viburnoides*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

5.3 Anatomia de folhas produzidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*

Nas seções transversais das nervuras centrais de folhas de murici-pequeno, observou-se diferença anatômica entre os tecidos. As folhas do cultivo *in vitro* apresentaram feixes vasculares pouco desenvolvidos, ao contrário do

cultivo *in vivo*, no qual foram identificados o floema, o xilema e o esclerênquima. Este último tecido é responsável por proporcionar maior sustentação à planta, encontrando-se ao redor do feixe vascular (Figura 8A).

Quanto às seções transversais das lâminas foliares, nos dois tipos de cultivo (*in vivo* e *in vitro*), observou-se que o mesófilo apresentou o tecido clorofiliano diferenciado em dois tipos: o paliçádico e o esponjoso (ou lacunoso). O primeiro tipo era constituído de uma única camada no cultivo *in vitro*, enquanto que no *in vivo* havia duas camadas. Nota-se ainda que, em ambas as condições de cultivo, as epidermes abaxial e adaxial são compostas por apenas uma camada de células revestidas pela cutícula, sendo esta mais espessa nas folhas de plantas cultivadas *in vivo*. O mesófilo é dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina foliar (adaxial ou ventral) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial ou dorsal) (Figura 8B).

In vitro

In vivo

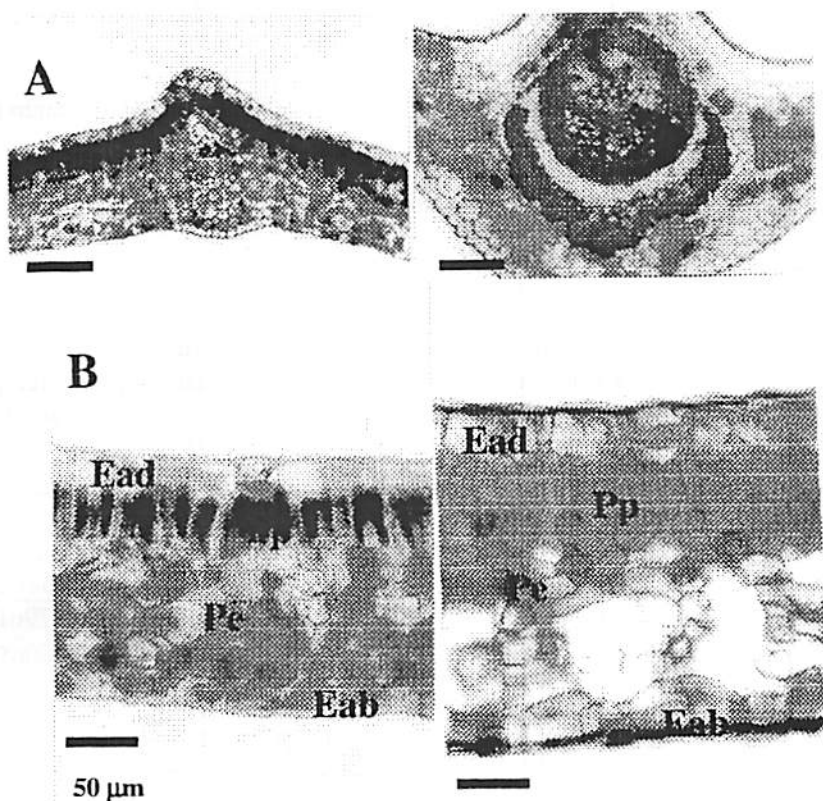


FIGURA 8. Seções transversais da nervura central (A) e lâminas foliares (B) obtidas de folhas de murici-pequeno cultivado *in vitro* e *in vivo*, evidenciando parênquima paliçádico (Pp) e esponjoso (Pe), epiderme adaxial (Ead) e abaxial (Eab). UFLA, Lavras, MG, 2002.

O parênquima esponjoso das lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vitro* apresentou de três a quatro camadas de células e o das obtidas pelo cultivo *in vivo*, de quatro a seis camadas.

As medidas das espessuras da epiderme adaxial e abaxial e parênquima paliçádico das folhas de murici-pequeno diferiram de forma significativa entre os cultivos *in vivo* e *in vitro*. Somente o parênquima esponjoso não apresentou diferença significativa (Tabela 5).

TABELA 5. Análise de variância para espessura da epiderme adaxial, epiderme abaxial, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso de folhas formadas por cultivo *in vitro* e *in vivo* de murici-pequeno. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	GL	QM			
		Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Epiderme abaxial
Tipo de cultivo	1	0,538240*	2,209*	0,014440	0,479610*
Erro	8	0,000595	0,002545	0,006445	0,000650
CV (%)		2,46	3,12	2,14	3,17

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

As epidermes adaxial e abaxial das folhas de plantas cultivadas *in vitro* apresentaram espessura significativamente menor em comparação com as oriundas de cultivo *in vivo*. O parênquima paliçádico das lâminas foliares coletadas de plantas mantidas na condição *in vivo* foi significativamente mais espesso quando comparados com a condição *in vitro*, apresentando uma diferença de 0,94 μm . O parênquima esponjoso, nos dois tipos de cultivo, obteve médias de espessuras semelhantes (Tabela 6).

TABELA 6. Efeito do tipo de cultivo (*in vivo* e *in vitro*) sobre a espessura da epiderme adaxial, do parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial de lâminas foliares de murici-pequeno. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tipo de cultivo	Espessuras médias observadas (µm)			
	Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Epiderme abaxial
<i>In vivo</i>	1,2220 a*	2,0880 a*	3,3680 a	1,0220 a*
<i>In vitro</i>	0,7580 b	1,1480 b	3,2920 a	0,5840 b

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Entretanto, folhas de amica (*Lychnophora pinaster*) oriundas de cultivo *in vivo* apresentaram-se menos espessas que as cultivadas *in vitro* e aclimatizadas (Souza, 2003).

Observaram-se diferenças nas estruturas das folhas de plântulas de cafeeiro obtidas por propagação *in vitro* e relação às propagadas *in vivo*. Nas folhas cultivadas *in vitro* não ocorreu presença de esclerênquima. A nervura central de folhas obtidas pelo cultivo *in vitro* também apresentou células do xilema em menor número, tamanho e espessura que as células do xilema da nervura central de folhas cultivadas *in vivo* (Santos, 2001).

A presença de cutícula no cultivo *in vitro* é fator importante na micropropagação, uma vez que evita a perda excessiva de água da planta para o ambiente e, conseqüentemente, favorece a sobrevivência das plântulas micropropagadas durante o processo de aclimatização na condição *ex vitro*. Mesmo que aparentemente, a cutícula apresentou-se mais espessa em relação ao cultivo *in vivo*, por diferença de umidade, quando comparado ao ambiente *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

O TDZ não induziu brotações em segmentos nodais de murici-pequeno.

A utilização de BAP não apresentou resposta eficiente na indução de multibrotações em segmentos nodais de murici-pequeno e ainda proporcionou a formação de calos.

O AIB não induz à formação de raízes em brotações de murici-pequeno.

As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* apresentam o parênquima paliádico, a epiderme abaxial e a adaxial mais espessos em comparação às oriundas do cultivo *in vitro*.

Folhas de cultivo *in vivo* possuem sistema vascular mais desenvolvido que *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. London: Kluwer Academic Publishers, 1992. v. 41, 507 p.

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

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 261-296.

ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*. I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 25-31, jan. 1993.

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

BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. *Microkosmos*, Stuttgart, v. 16, p. 255, 1972.

CATAPAN, E.; LUÍS, M.; SILVA, B. da; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 301-309, Sept. 2002.

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

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

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to "in vivo" culture of plant. *Parasitica*, Gembloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

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

DEL PONTES, E. M. Micropropagação de *Eucalyptus globulus*. 1999. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture. Part 1 - The technology*. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

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

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

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 433 p.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOPES, S. da C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2000. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, MG.

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

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

QUEZADA, A. C. **Micropropagação da macieira (*Malus domestica* Borkh) cv. Fred Hough**. 1996. 82 p. Tese (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Foresty Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, May 1987.

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

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

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

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

CAPÍTULO 4 - Indução de calogênese em explantes foliares de murici-pequeno

1 RESUMO

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Indução de calogênese em explantes foliares de murici-pequeno. In: _____. *Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.)*. 2003. p.56-71. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O gênero *Byrsonima* apresenta casca rica em taninos, um metabólitos secundários utilizado no tratamento de diarreia. A fim de desenvolver uma via alternativa de propagação de murici-pequeno, o presente trabalho avaliou o efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D e das citocininas TDZ e BAP na calogênese em explantes foliares. Os resultados demonstraram que na ausência de 2,4-D não ocorreu formação de calos. O meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D é eficiente para a indução e proliferação de calos em explantes foliares de murici-pequeno na ausência de luz.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-orientadora), Ana Hortência Fonseca Castro - UFLA (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Induction of callus in leaf explants of murici-pequeno. In: _____. *In vitro* propagation, anatomical and biochemical analysis of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. p.56-71. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The genus *Byrsonima* presents husk rich in tannins, a secondary metabolite used in treatments of diarrhea. With the objective to develop an alternative method of propagation of murici-pequeno, this work evaluated the effect of different concentrations of the auxin 2,4-D and the cytokinins TDZ and BAP on callus induction in leaf explants. The results indicated no formation of callus in the absence of 2,4-D. Higher callus formation was observed in dark using MS medium supplemented with 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D.

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser), Ana Hortência Fonseca Castro - UFLA (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é um arbusto do Cerrado com propriedade medicinal por sua atividade adstringente nas diarreias e disenterias. Entretanto, a exploração dos recursos genéticos das plantas medicinais no Brasil está relacionada, em grande parte, à coleta extrativista do material silvestre (Rodrigues & Carvalho, 2001).

Lorenzi (2002) menciona que o gênero *Byrsonima* apresenta taxa de germinação baixa e emergência lenta da plântula, dificultando a sua propagação sexuada.

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação, tem como principais vantagens o aumento rápido do número de indivíduos e a possibilidade de conservação de germoplasmas, garantindo a manutenção da biodiversidade (Echeverrigaray et al., 2001).

A multiplicação do material vegetal por meio da micropropagação pode ser: a) por meio da proliferação de gemas axilares, b) mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) e c) por via embriogênese somática direta ou indireta (formando calo) (Grattapaglia & Machado, 1998).

Calo é um grupo ou massa de células vegetais com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000). Desenvolve-se em resposta a injúrias físicas ou químicas (George, 1996).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. Pierik (1990) comenta que explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais

apropriados para a cultura de tecidos por possuírem alta capacidade de regeneração. A cultura de calos pode ser derivada de diferentes órgãos da planta (raiz, segmentos caulinares, folhas) ou de células específicas (endosperma, pólen).

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta pode estimular a proliferação celular. Porém, Ozias-Akins & Vasil (1985) mencionam que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas. Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos destacam-se o 2,4-D, ANA e, mais recentemente, o TDZ.

A calogênese depende de fatores importantes, como a seleção do explante, meio de cultura adequado e condições ambientais. O meio nutritivo deve conter sais, fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento em concentrações adequadas a calogênese. Quanto às condições da cultura, a temperatura pode ser entre 25°C e 30°C e pode ocorrer na luz, no escuro ou em baixa irradiância. A cultura é geralmente feita em meio sólido e a textura do calo pode variar de compacta a friável. A cultura de calos pode ser utilizada para estudar: isolamento de protoplastos, tipos de células, seleção celular, embriogênese somática, organogênese e a produção de metabólitos secundários (Pinto & Lameira, 2001).

A fim de desenvolver uma via alternativa de propagação de murici-pequeno, o presente trabalho avaliou o efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D e a interação com as citocininas TDZ e BAP na calogênese em explantes foliares de murici-pequeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno através do uso de 2,4-D na presença e ausência de luminosidade

As plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* (capítulo 2) serviram como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos foliares de tamanho de 0,25 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Antes da inoculação, foram efetuados cortes na superfície adaxial do explante, a qual ficou em contato com o meio nutritivo. A incubação foi realizada no escuro ou na luz (fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e em temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A avaliação foi feita 30 dias após a inoculação, observando-se a porcentagem da área do explante ocupada por calos.

Os resultados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio contendo um explante por tubo.

4.2 Efeito da interação de 2,4-D e as citocininas TDZ ou BAP na calogênese em explantes foliares de murici-pequeno

As plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* (capítulo 2) foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Segmentos foliares de 0,25 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com

a auxina 2,4-D (0,0 ou 1,0 mg L⁻¹) em combinação com diferentes concentrações (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) das citocininas BAP ou TDZ e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Antes da inoculação, foram efetuados cortes na superfície adaxial do explante. A superfície abaxial ficou em contato com o meio nutritivo. A incubação ocorreu no escuro e em temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os dados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três tubos de ensaio contendo um explante por tubo. Os valores da variável porcentagem da área do explante coberta por calos foram transformados para $(Y + 1,0)^{0,5}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno pelo uso de 2,4-D, diferenças significativas na área do explante coberta por calos foram encontradas em função da exposição em luz ou escuro, das concentrações de 2,4-D e da interação destes fatores (Tabela 7).

TABELA 7. Análise de variância para formação de calos e porcentagem da área do explante coberta por calos em explantes foliares de murici-pequeno inoculados na presença de 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	GL	QM
		Área do explante coberta por calos (%)*
Luminosidade	1	2,005 *
2,4-D	4	12,107 *
Luminosidade x 2,4-D	4	3,145 *
Erro	40	0,325
CV (%)		30,6

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Na luz, os tratamentos seguiram uma tendência linear, sendo que as doses de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram as maiores médias de porcentagem de área coberta por calo (91 e 93%, respectivamente). Estas diferiram das doses 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, que também não diferiram entre si, mas forneceram valores abaixo de 50% de área coberta. A ausência de 2,4-D não promoveu a formação de calos (Figura 9).

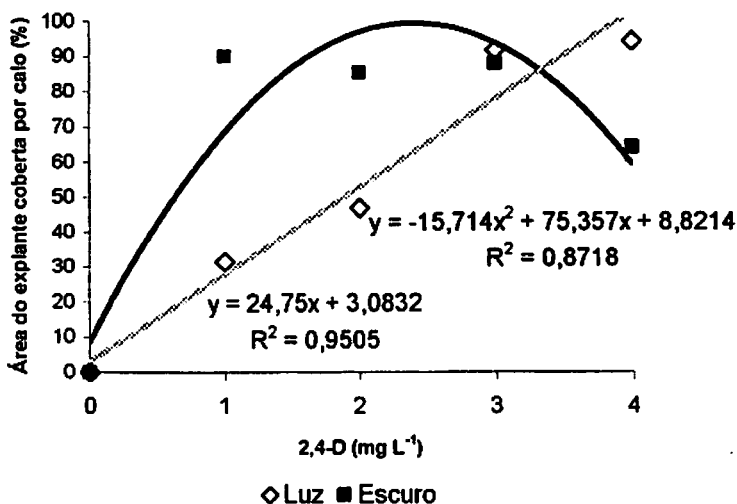


FIGURA 9. Porcentagem da área do explante foliar de murici-pequeno ocupada por calo em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de 2,4-D na luz e no escuro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

No escuro, os níveis de 2,4-D não diferiram entre si, somente da testemunha (ausência de 2,4-D), a qual não formou calos. A dose de 1,0 mg L⁻¹ apresentou maior porcentagem de área coberta por calos (90%), enquanto que o menor valor para a variável em questão foi obtida com 4,0 mg L⁻¹ (64%) (Figura 10).

A concentração de 2,4 mg L⁻¹ de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, onde a cobertura máxima por calo atingiu 99,18%, de acordo com a equação derivada. O comportamento quadrático apresentado indicou que doses acima e abaixo de 2,4 mg L⁻¹, tiveram a tendência de redução da porcentagem de área coberta.

A aparência do explante inicial e dos calos obtidos na luz e no escuro é apresentada na Figura 10.

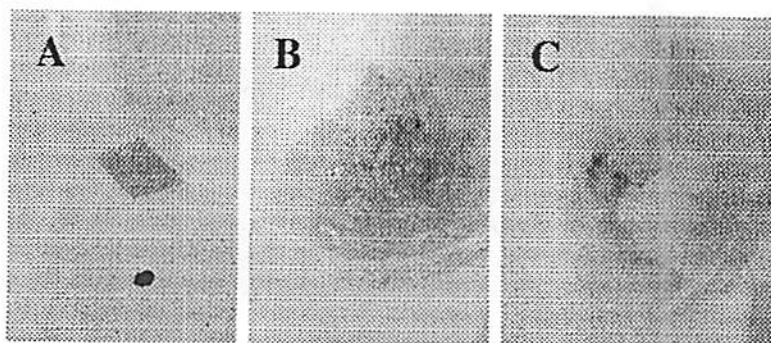


FIGURA 10. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D: A) explante inicial, B) calos obtidos na luz e C) calos obtidos no escuro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

O 2,4-D é a auxina mais frequentemente usada na indução de calos e, no caso do murici-pequeno, os explantes foliares responderam positivamente à sua presença. As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular. George (1996) comenta que o 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas requisitadas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada.

O crescimento de tecidos vegetais organizados *in vitro* geralmente não é inibido pela luz. Entretanto, divisões celulares iniciais do explante e o crescimento de calos são algumas vezes inibidos pela presença de luz (George, 1996). No caso do murici-pequeno, a menor concentração de 2,4-D ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) promoveu a formação de calos em 90% de área foliar na condição de escuro, enquanto que na luz atingiu somente 30%. Vale ressaltar que a adição de 2,4-D

numa concentração quatro vezes maior ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi necessária para proporcionar resposta semelhante (93%) quando na presença de luz.

A luz pode ter favorecido a produção de compostos fenólicos, os quais interferiram na atividade do regulador de crescimento e refletiram em maior concentração deste para atingir a porcentagem obtida no escuro. A auxina natural (AIA) presente no tecido vegetal também pode ter sofrido fotodegradação, diminuindo as quantidades de auxinas totais que desencadeariam o processo de formação de calos.

Os resultados deste trabalho são semelhantes aos obtidos por Soares (2003), trabalhando com segmentos foliares de ingazeiro (*Inga vera* subsp. *affinis*). O autor constatou que na condição de escuro, as concentrações $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D foram as que proporcionaram maiores resultados para a variável área coberta por calo, 90% e 80%, respectivamente.

Trabalhando com indução de calos em diferentes explantes de *Cissus sicyoides* em meio MS suplementado com 2,4-D, observou-se melhor formação de calos utilizando folhas jovens como explante (Abreu, 1998).

A produção máxima de calos em explantes foliares de *Coffea arabica* também foi obtida com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e para $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para *C. canephora* (Santos, C., 2001). Explantes foliares de timbó (*Derris urucu*) proporcionaram melhor resposta em $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D em meio MS (Conceição, 2000).

Em trabalhos com tangará-açu (*Rudgea viburnoides*), os resultados encontrados por Bonilla (2002) também são semelhantes aos aqui apresentados. A dose de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D na ausência de luz foi a mais eficiente na indução de calos em explantes foliares, enquanto que o uso de ANA foi eficiente somente em explantes caulinares e em presença de luz.

Santos (2001) recomenda o uso de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana*) para a produção de calos friáveis.

Entretanto, Sahoo et al. (1997), testando doses de 0,5 a 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, observaram que os explantes foliares não formaram calos em amoreira (*Morus indica*).

Quanto ao efeito da interação de 2,4-D e das citocininas TDZ e BAP na calogênese em explantes foliares de murici-pequeno, foram observadas diferenças significativas na área do explante coberta por calos para 2,4-D (presença ou ausência) e para interação entre 2,4-D e TDZ ou BAP e para interação 2,4-D e diferentes concentrações de TDZ ou BAP (Tabela 8).

TABELA 8. Análise de variância para porcentagem da área do explante coberta por calos em segmentos foliares de murici-pequeno inoculados na presença ou ausência de 2,4-D em interação com TDZ ou BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	GL	QM
		Porcentagem da área do explante coberta por calos
2,4-D	1	192,05 *
TDZ/BAP	1	25,00
Concentração	3	8,06
2,4-D x TDZ/BAP	1	118,49 *
2,4-D x concentração	3	26,61 *
TDZ/BAP x concentração	2	2,90
2,4-D x TDZ/BAP x concentração	2	-1,20 x 10 ⁻³
Erro	42	7,39
CV (%)	58	

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

O tipo da citocinina (TDZ/BAP), as concentrações testadas (de TDZ/BAP) e a interação auxina x citocinina x concentração não apresentaram diferenças significativas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

As maiores porcentagens de área coberta por calo foram obtidas em explantes foliares inoculados na presença de 2,4-D, formando aproximadamente 93,4%. A interação de 2,4-D e BAP seguiu uma tendência linear, em que a área do explante coberta com calos diminuiu à medida que se aumentou a concentração de BAP (Figura 11).

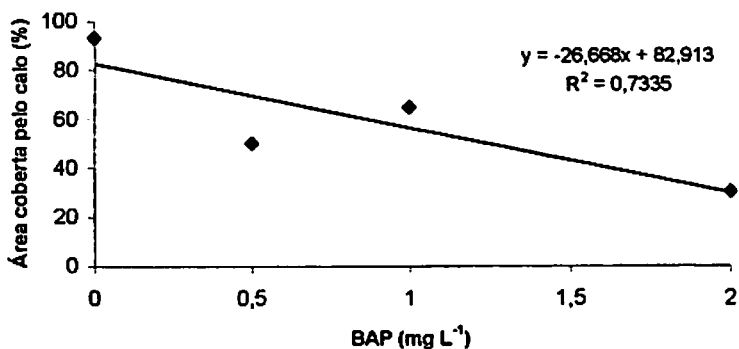


FIGURA 11. Porcentagem da área do explante foliar de murici-pequeno ocupada por calo em resposta ao tratamento com 2,4-D em combinação com BAP, para explantes mantidos no escuro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A presença ou ausência do TDZ não proporcionou diferenças significativas e não houve efeito sinérgico com o 2,4-D na proliferação de calos.

Como a indução de calos é dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocinias, no caso do murici-pequeno, provavelmente, o fornecimento da auxina no meio de cultura foi suficiente para balancear-se com o conteúdo endógeno de citocininas do explante.

Pode-se inferir que a citocinina presente no meio nutritivo (BAP), juntamente com a citocinina endógena do segmento foliar, proporcionou uma elevada concentração em relação à auxina, ocasionando uma diminuição na ocorrência de calos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Paiva-Neto (1996). O autor constatou que o uso isolado de 2,4-D na concentração de 6,36 mg L⁻¹ em segmentos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*) promoveu a calogênese e rizogênese. Já a combinação 2,4-D e BAP reduziu a porcentagem de explantes com calos e também inibiu a rizogênese.

Entretanto, Cerqueira (1999) obteve maior indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando 2,0 mg L⁻¹ de ANA combinado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, obtendo 100% da área do explante coberta por calos.

Em copaiba (*Copaifera langsdorffii*), Azevedo (2003) somente obteve calogênese utilizando 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP em meio MS na presença de luz.

Santos (2001) testou em salix os efeitos isolados do uso de ANA e BAP e de suas combinações. Isoladamente, ANA e BAP induziram alta porcentagem de rizogênese em calos obtidos de segmentos foliares. A combinação destes reguladores induziu calogênese apenas em concentrações inversas, ou seja, em alta dose de BAP, a dose de ANA deve ser baixa e vice-versa.

Os resultados obtidos no experimento de indução de calos a partir de segmentos foliares de murici-pequeno pelo uso de 2,4-D foram confirmados pelos resultados obtidos no experimento testando 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D no escuro em interação com TDZ ou BAP, onde não se potencializou a calogênese; ao contrário, a tendência foi a redução da formação de calos.

Assim, os resultados indicam que a máxima porcentagem de calos em segmentos foliares de murici-pequeno é obtida em meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e na ausência de luz.

6 CONCLUSÕES

Na ausência de 2,4-D não ocorre formação de calos em murici-pequeno.

Não se faz necessária a adição de BAP ou TDZ no processo de calogênese.

Recomenda-se o uso de MS acrescido 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D para a indução e proliferação de calos em explantes foliares de murici-pequeno, mantendo-os em condição de escuro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. 1998. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

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

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

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

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

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

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.

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

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

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Textos acadêmicos: micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais.** Lavras: FAEPE/UFLA. 2001. 101 p.

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 5 - Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos obtidos a partir de explantes foliares de murici-pequeno

1 RESUMO

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos obtidos de explantes foliares de murici-pequeno. In: _____. *Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.)*. 2003. p.72-89. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos está na determinação do momento de repicagem dos calos para um meio fresco e a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais. O objetivo do presente trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos obtidos de explantes foliares de murici-pequeno, bem como realizar análise bioquímica por meio da determinação dos teores aminoácidos, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e taninos. A curva de crescimento de calos obtidos apresentou padrão sigmóide, com seis fases distintas de crescimento. Teores máximos de aminoácidos e açúcares solúveis totais obtidos de calos ocorrem no dia da inoculação e aos 60 e 70 dias de cultivo, respectivamente. Teores máximos de açúcares redutores ocorrem somente no dia da inoculação. Quanto à quantificação de taninos, não houve diferença considerável nos teores obtidos entre as fases linear e estacionária da curva de crescimento.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva - UFLA (Co-orientadora), Ana Hortência Fonseca Castro (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

NOGUEIRA, Rairys Cravo. Growth curve and biochemical analysis of callus obtained from leaf explants of murici-pequeno. In: _____. *In vitro* propagation, anatomical and biochemical analysis of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. p.72-89. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The establishment of the callus growth curve permits to determine the exact moment for the medium change and its use in suspension cells for the production of secondary metabolites of medicinal plants. The objective of the present work was to determine the callus growth curve obtained from leaf explants of murici-pequeno and analyze it biochemically by determining the levels of amino acids, total soluble and reducing sugars and tannins. The callus growth curve presented a sigmoid shape with six distinct phases. Higher levels of amino acids and total soluble sugars were observed at the inoculation day and at 60 and 70 days of culture, respectively. Higher levels of total reducing sugars were observed at the inoculation day. No differences were observed on the levels of tannins in the linear and stationary phases of callus growth.

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser), Ana Hortência Fonseca Castro - UFLA (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

A importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento. A partir desse estudo, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um meio fresco ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (Soares, 2003).

O crescimento *in vitro* de calos geralmente apresenta fases distintas. Segundo Smith (1992), a fase *lag* se caracteriza como fase de maior produção de energia, correspondendo ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Ocorre o início da mobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento dos calos. A fase *exponencial* é biossintética. Observa-se maior crescimento dos calos, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. O número de células aumenta. A fase *linear* caracteriza-se pela redução da divisão celular e aumento de volume celular; a fase de *desaceleração* é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Na fase *estacionária*, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários.

Os aminoácidos, proteínas e os carboidratos são considerados metabólitos primários. Os aminoácidos são constituídos de um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupamento R diferenciado, todos ligados a um átomo de carbono. São as unidades básicas das proteínas, as quais participam de várias funções em um organismo vivo como transporte, catálise enzimática, controle do crescimento e diferenciação (Stryer, 1992).

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

O gênero *Byrsonima* apresenta casca rica em taninos (Corrêa, 1984). Os taninos são metabólitos secundários fenólicos, em geral, polifenóis de alto peso molecular e estrutura química variável. Possuem atividade anti-séptica, antimicrobiana, antihemorrágica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória (Pinto & Bertolucci, 2002).

O estudo do crescimento dos calos, além de envolver a determinação dos períodos em que ocorrem estas fases, pode envolver a determinação do teor de substâncias presentes nos tecidos vegetais, como metabólitos primários e secundários. Estas substâncias podem ser quantificadas por métodos colorimétricos (Passos, 1996).

O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos obtidos de segmentos foliares de murici-pequeno e determinar os teores de aminoácidos, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e taninos durante o período de cultivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Curva de crescimento de calos

Plântulas obtidas por meio de germinação *in vitro* (capítulo 2) foram utilizadas como fonte de explantes foliares. Segmentos foliares de 0,25 cm² de área foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. A incubação foi realizada na ausência de luz e temperatura de 27 ± 2°C.

Para a determinação da curva de crescimento dos calos, foram feitas pesagens do material inoculado a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 120º dia de cultivo, em intervalos de 10 dias.

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

4.2 Análises bioquímicas dos calos

Duas amostras de 500 mg de calos coletados em intervalos de 10 dias foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer à temperatura de -80°C para futuras extrações e quantificações.

O extrato vegetal foi obtido por homogeneização em graal com 4 mL de água, banho-maria a 40°C por 30 minutos e posterior centrifugação a 4.800 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado em freezer -20°C para ser utilizado na quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos e taninos.

a) Análise de açúcares solúveis totais

A metodologia descrita por Yemm & Willis (1954) foi utilizada para determinar o teor de açúcares solúveis totais. Às alíquotas de 0,01 mL dos extratos foram adicionadas 0,99 mL de água destilada e 2 mL do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5 mL de água destilada e 10 mL de H₂SO₄ concentrado). Após agitação, os tubos foram aquecidos a 100°C, por cinco minutos. As amostras foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 620 nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão de glicose.

b) Análise de açúcares redutores

Por meio da metodologia descrita por Miller (1959), realizou-se a determinação dos açúcares redutores. Às alíquotas do extrato de calos formados em explantes foliares foram adicionados água destilada e 1 mL do reagente DNS. A mistura formada foi homogeneizada em agitador e levada ao banho-maria a 100°C por cinco minutos, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. As amostras foram levadas à leitura em espectrofotômetro a 540 nm e a quantificação baseou-se na curva padrão de glicose.

c) Análise de aminoácidos

Para determinação dos teores de aminoácidos foi utilizado o método da ninhidrina, descrito por Stein & Moore (1948). Adicionou-se, em tubos de ensaio, uma alíquota do extrato, juntamente com 1,7 mL do reagente A+B+C (A - tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,0; B - reagente de ninhidrina 5% em metilcelosolve e C - KCN 2% em metilcelosolve). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 100°C, durante 20 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado 1,3 mL de etanol 60% (v/v) em cada tubo. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 570 nm. Foram realizadas duas

leituras por repetição. A quantificação dos aminoácidos baseou-se na curva padrão obtida por meio de diferentes quantidades do aminoácido glicina.

d) Análise de taninos

Para a determinação dos teores de taninos, coletaram-se calos em desenvolvimento nas fases linear e estacionária da curva de crescimento. As quantificações foram realizadas no Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA-UFLA), utilizando-se o método colorimétrico de Folin-Dennis (Swain & Hillis, 1959). Erlenmeyer contendo 0,5 g de matéria fresca de calos e 50 ml de etanol 80% foi colocado em chapa aquecedora por 15 minutos em refluxo e, posteriormente, o seu conteúdo foi filtrado. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Na última secagem em chapa aquecedora, quando o volume chegou a 0,5 ml, completou-se para 20 ml com água destilada. Adicionou-se a 0,1 ml do extrato obtido, 8,4 ml de água destilada + 1,0 ml do corante Folin- Dennis + 0,5 ml de carbonato de sódio. Após 30 minutos, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento de calos

O crescimento dos calos seguiu uma curva do tipo sigmóide, com seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e de declínio (Figura 12).

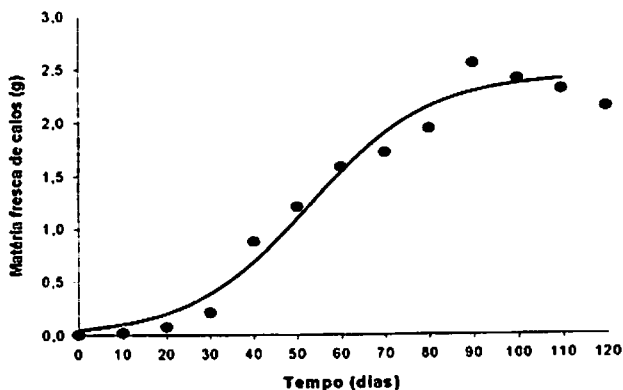


FIGURA 12. Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de murici-pequeno, inoculados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D durante 120 dias de cultivo no escuro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A fase lag ocorreu até o 20º dia após a inoculação, apresentando 95% de crescimento. A segunda fase, exponencial, estendeu-se do 20º ao 40º dia de cultivo, com 88% de crescimento. A fase linear, com 51% de crescimento, foi observada entre o 40º e o 60º dia de cultivo. Entre o 60º e o 80º dia após a inoculação, ocorreu a fase de desaceleração, apresentando 22% de crescimento. As culturas, nesse período, devem ser transferidas para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (Smith, 1992). Conceição (2002) e Lameira (1997) comentam que é nesta fase que pode ocorrer o acúmulo de metabólitos secundários. A partir do 100º dia, a cultura entrou na fase de declínio.

A curva de crescimento poderia ser dividida em três fases: fase de crescimento lento (do dia da inoculação até 20º dia), fase de crescimento ativo (do 20º dia até o 80º dia) e fase de estabilização (do 80º dia em diante), sendo indicada a repicagem entre o 30º dia e o 50º dia.

A curva de murici-pequeno pode ser comparada às curvas de crescimento de outras espécies lenhosas: *C. canephora* (Santos, 2001), *D. urucu* (Conceição, 2000), *L. chinensis* (Mesquita, 1999), *B. excelsa* (Serra et al., 2000), *C. brasiliense* (Landa, et al., 2000), *R. virbunoides* (Bonilla, 2000) e *I. vera* subsp. *affinis* (Soares, 2003) (Figura 13).

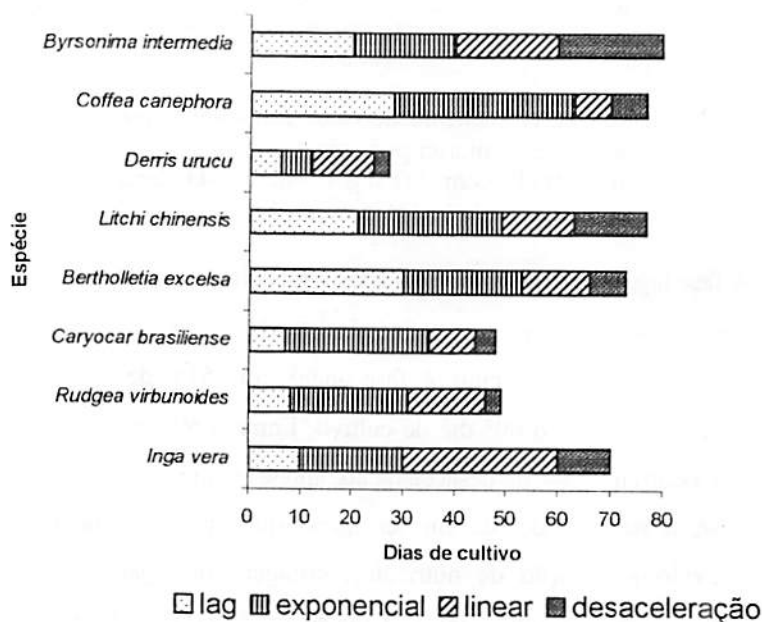


FIGURA 13. Curva de crescimento de calos de murici-pequeno em comparação com outras espécies. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Observa-se que a curva de murici-pequeno assemelha-se à curva obtida em *Inga vera* subsp. *affinis* (Soares, 2003) e *Litchi chinensis* (Mesquita, 1999), em que os intervalos das fases coincidem bastante.

5.2 Análises bioquímicas dos calos

Os teores de aminoácidos obtidos nos calos de explantes foliares de murici-pequeno apresentaram concentrações elevadas no dia de inoculação e aos 60 dias de cultivo. Após os 80 dias de cultivo, observou-se uma tendência de declínio nos níveis de aminoácidos (Figura 14).

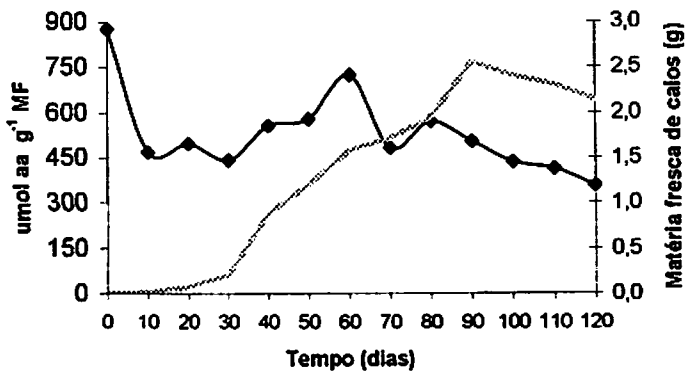


FIGURA 14. Teores de aminoácidos de calos de murici-pequeno formados a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 120 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Soares (2003) observou que os teores de aminoácidos obtidos de calos formados em explantes foliares do ingazeiro mostraram um acúmulo até o 20º dia após a inoculação. Do 20º ao 40º dias, o teor de aminoácido reduziu.

Paiva-Neto (1996) também observou acúmulo de aminoácidos em calos formados de segmentos foliares de moreira até o 12º dia após a inoculação, seguido de redução até o 30º dia. Esse aumento inicial e posterior redução no teor de aminoácidos também foram detectados em calos de kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Sacchi et al., 1995).

Os valores elevados na quantificação de aminoácidos refletem o estado nutricional da fonte de explante na época da excisão. No entanto, os valores

também elevados aos 60 dias de cultivo podem estar relacionados com a presença de glicina no meio de cultura e da maior absorção de amônio pelo explante, o que teria favorecido a síntese de aminoácidos.

Observou-se ainda que a concentração elevada de aminoácidos aos 60 dias de cultivo coincide com a fase de desaceleração, época indicada para a repicagem de calos e transferência para novo meio nutritivo.

Quanto aos teores de açúcares solúveis totais (AST) presentes nos calos formados a partir de explantes foliares, a tendência geral da curva foi de declínio, apresentando dois períodos de maior quantidade. A elevada concentração de AST aos 70 dias de cultivo também coincide com a fase de desaceleração e, conseqüentemente, com a época de repicagem dos calos (Figura 15).

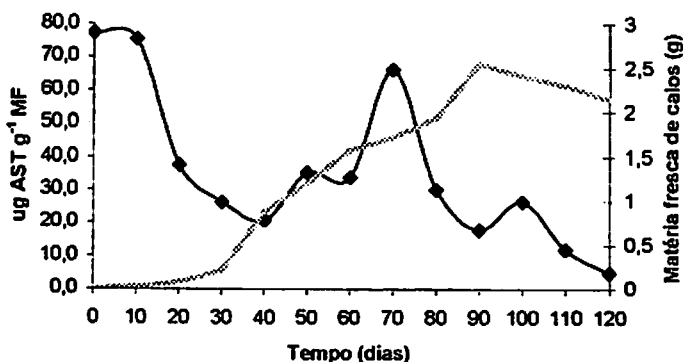


FIGURA 15. Teores de açúcares solúveis totais de calos de murici-pequeno formados a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, durante 120 dias. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Os teores de AST apresentaram maiores níveis no dia da inoculação. A partir de então, esses teores declinaram, ocorrendo um incremento no 70º dia após a inoculação, seguido novamente de declínio.

Ao contrário dos resultados aqui observados, em ingazeiro (*Inga vera*), os teores de AST em calos formados a partir de explantes foliares apresentaram o menor valor no período de inoculação (Soares, 2003).

Serra et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes com calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira-do-brasil. Os teores de AST apresentaram constante redução durante todo período de avaliação. Paiva-Neto (1996) também observou degradação dos AST, após o 12º dia de inoculação, em segmentos foliares de moreira.

A maior quantidade de AST registrada no dia de inoculação pode estar associada à quantidade de AST já existente no explante. O aumento aos 70 dias, no entanto, está mais relacionado ao requerimento das células para a divisão celular, o que coincidiu com 10 dias antes do aumento do teor de aminoácidos nos calos.

Quanto aos teores de açúcares redutores (AR), foi observado um declínio que se estendeu desde o dia da inoculação até 120 dias de cultivo (Figura 16).

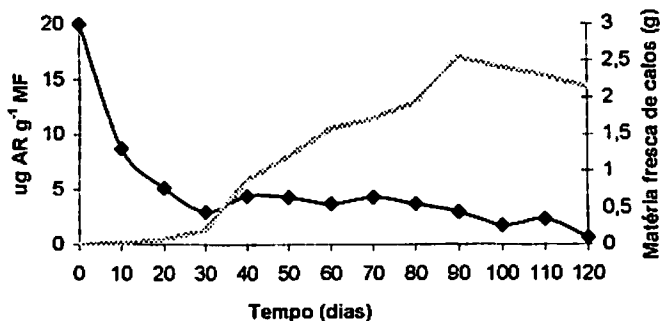


FIGURA 16. Teores de açúcares redutores de calos de murici-pequeno formados a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 120 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Este decréscimo constante sugere que os calos de murici-pequeno utilizaram somente a reserva de AR contida no explante no dia da inoculação, originada da planta-mãe. Serra et al. (2000), em trabalhos com castanheira-do-brasil, citam que a redução nos teores de AR indica que certos explantes possivelmente apresentam dificuldades de absorver a fonte de carboidrato presente no meio de cultura.

Com relação à quantificação de taninos, foram observados teores de 142 e 133 mg/100g de matéria fresca de calos para as fases linear e estacionária, respectivamente. Apesar de ser considerada uma quantidade baixa, é importante frizar que o meio de cultura pode ser otimizado para a produção em larga escala deste composto, uma vez que foi obtido *in vitro* a partir de segmentos foliares e, na forma convencional, é extraído a partir da casca da planta *in vivo*.

A falta de produção destes compostos está relacionada com a alta atividade metabólica direcionada pela mitose. A diferenciação destas células, assim como, a desaceleração da atividade mitótica, progressivamente, permite o acúmulo dos metabólitos secundários (Lameira, 1997; Conceição, 2000; Pinto & Lameira, 2001, Botta, 2001).

Yazaki & Okuda (1993) testando 2,4-D e ANA na produção de taninos em calos de *Cornus officinalis*, concluíram que explantes cultivados em presença de 2,4-D produziram as maiores quantidades de taninos.

6 CONCLUSÕES

Curva de crescimento dos calos formados a partir de explantes foliares de murici-pequeno apresenta padrão sigmóide, com seis fases distintas de crescimento.

Teores máximos de aminoácidos obtidos de calos formados a partir de explantes foliares ocorrem no dia da inoculação e aos 60 dias de cultivo.

Teores máximos de açúcares solúveis totais obtidos de calos formados a partir de explantes foliares ocorrem no dia da inoculação e aos 70 dias após a inoculação.

Teores máximos de açúcares redutores obtidos de calos formados a partir de explantes foliares ocorrem no dia da inoculação.

Não houve diferença considerável nos teores de taninos entre as fases linear e estacionária.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas realizadas até o momento com o gênero *Byrsonima* são reduzidas e, em se tratando do murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*), uma promissora espécie medicinal do Cerrado, menos estudos foram conduzidos.

A germinação *in vivo* é um entrave na propagação do murici-pequeno e, por isso, foram avaliados diferentes meios nutritivos para o cultivo *in vitro*. Concluiu-se que os meios mais eficientes foram o MS e o WPM 50% sem sacarose, para sementes e embriões, proporcionando 60% e 100% de germinação, respectivamente. A utilização de BAP em diferentes concentrações em WPM 50% foi efetuada visando a avaliação do comportamento do embrião *in vitro* quanto à indução de múltiplas brotações. Entretanto, não houve perfilhamento nas dosagens testadas, mas ocorreu o aparecimento de calos.

Além disso, testaram-se dosagens de TDZ e BAP na indução de multibrotações em segmentos nodais de murici-pequeno em meio MS, contudo, não houve efeito positivo dos reguladores de crescimento testados. Somente foi observado um aumento linear na ocorrência de calos à medida que se aumentou a concentração de BAP. No enraizamento *in vitro*, não ocorreu formação de raízes em nenhuma das concentrações de AIB utilizadas. Quanto aos aspectos da anatomia foliar, observaram-se diferenças entre o cultivo *in vivo* e *in vitro*, enfatizando a importância de um processo de aclimatização para a micropropagação do murici-pequeno.

O meio MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e na ausência de luz foi eficiente na indução de calos a partir de segmentos foliares de murici-pequeno. Com a determinação do meio apropriado para a calogênese, partiu-se para o estudo da curva de crescimento e análises bioquímicas com a quantificação de aminoácidos, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e taninos. Vale ressaltar que, apesar da quantidade de taninos encontrada em calos ser relativamente pequena, como estes metabólitos secundários são extraídos a partir da casca da planta em campo, a obtenção *in vitro* a partir de segmentos foliares é um indicio de que o meio de cultura pode ser otimizado para a produção em larga escala deste composto medicinal.

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, a escassez de informações biotecnológicas e a possibilidade da maior utilização dos princípios ativos do murici-pequeno como adstringente e molusquicida, sugere-se que novas linhas de pesquisas sejam direcionadas para esta espécie.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BOTTA, B.; SILVESTRINI, A. MONACHE, G. D. Cultura de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da Química Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354-379.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.

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

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

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF, 1984. v. I-VI.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LANDA, F.S.L. et al. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. Edição Especial.

MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: uma introdução à Engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto: sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.

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

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

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

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

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

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: Cultivo e processamento de plantas medicinais.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169 p.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Textos acadêmicos: Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais.** Lavras: FAEPE/UFLA. 2001. 101 p.

SACCHI, G.A.; MORGUTTI, S.; ABRUZZESE, A. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in Kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Berkeley, v. 106, n. 1, p. 107-113, Mar. 1995.

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

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

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

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

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881p.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The fenolic constituents of *Prunus domestic*. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 10, p. 135-144, 1959.

YAZAKI, K.; OKUDA, T. *Cornus officinalis*: *in vitro* culture and production of gallotannins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**, Berlim: Springer-Verlag, 1993. v. 21, p. 104-114.

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