



**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DO
INGAZEIRO [*Inga vera* WILLD. subsp. *affinis*
(DC.) T.D. PENN.]**

GUSTAVO DE ARAÚJO SOARES

2003

GUSTAVO DE ARAÚJO SOARES

ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DO INGAZEIRO
[*Inga vera* WILLD. subsp. *affinis* (DC.) T.D. PENN.]

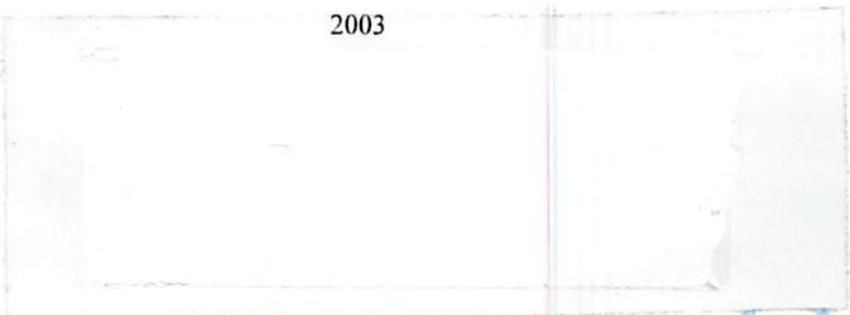
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2003



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

Soares, Gustavo de Araújo

Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*ingá Vera* Willd. Subsp. *Affinis*
(DC.) T.D. Penn.] / Gustavo de Araújo Soares. – Lavras : UFLA, 2003.
90 p. : il.

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

1. Inga. 2. Micropropagação. 3. Anatomia vegetal. 4. Análise bioquímica. 5.
Cultura de tecido. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973321
-583.322

GUSTAVO DE ARAÚJO SOARES

ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DO INGAZEIRO
[*Inga vera* WILLD. subsp. *affinis* (DC.) T.D. PENN.]

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 21 de fevereiro de 2003

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA



Prof. Renato Paiva, PhD.

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

**Aos meus grandes amigos de Lavras e de Belo Horizonte,
por terem se tornado minha segunda família,**

OFEREÇO.

Aos meus pais, Amilton e Maria Amélia,

Ao meu irmão, Amilton Júnior,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço a força enviada todos os dias.

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão, agradeço de coração o apoio constante e incondicional à minha decisão de estudar longe de casa e tudo o que vocês fizeram para eu chegar até aqui.

À Universidade Federal de Lavras e à CAPES, agradeço a oportunidade de realização do curso de mestrado e a concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Renato Paiva, agradeço a orientação, os ensinamentos, a amizade e a confiança.

Aos professores Donizeti, Luiz Edson, Ângela e Amauri, do setor de Fisiologia Vegetal, agradeço os valiosos conhecimentos adquiridos durante o mestrado.

Ao professor Dr. Luciano Vilela Paiva, ao Dr. Leonardo Ferreira Dutra e ao professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, agradeço pelas preciosas contribuições ao trabalho quando da participação destes na banca avaliadora de minha dissertação de mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos: Mauro, José Raniere, Artiaga, Breno, Cíntia, Raírys, Ednabel, Cristiano, Patrícia, Rodrigo e Fernanda, agradeço a amizade, a disposição, a alegre companhia e a paciência para aturar minhas brincadeiras e minha falação.

Aos funcionários amigos, Izonel, Evaristo, Tanhan, Lena, Joel e Odorêncio, agradeço a disponibilidade e o sempre agradável convívio.

Aos grandes amigos da Fisiologia Vegetal, Rúbia, Clara, Jorge, Daniela, Roberto, Cristina, Marina, Lílian, Aurélio, Sílvia, Cláudia, Marco Antônio, Morbeck, Dani, Anne, Peterson, Inês, Patrícia, Érico, Giandrê, Ana Hortência, Soami e Márcio, agradeço a convivência e amizade.

Aos grandes amigos de Belo Horizonte, em especial Cristiano, João, Bruno, Fábio, Alencar, Patrícia, Elias, Lilian, Othon, Rafael e Gustavo, agradeço o apoio e a amizade.

A todos vocês que, de uma forma ou de outra, torceram por mim nesses dois anos, agradeço de coração.

BIOGRAFIA

Gustavo de Araújo Soares nasceu em Belo Horizonte, no dia 27 de maio de 1977. Completou o ensino fundamental e médio no Colégio Santo Antônio e ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em 1995. Quatro anos mais tarde, graduou-se Bacharel, com ênfase em Ecologia e começou a dar aulas de Biologia. Durante o período em que lecionou, voltou à Universidade Federal de Minas Gerais para ampliar sua formação em Ciências Biológicas, graduando-se na modalidade Licenciatura. Em 2001, ingressou no curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, onde conclui, neste momento, seu curso de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 - Introdução geral	3
1 Introdução	3
2 Referencial teórico.....	5
3 Referências bibliográficas.....	23
CAPÍTULO 2 - Indução de brotações <i>in vitro</i> e caracterização anatômica de folhas obtidas por cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de ingazeiro.....	31
1 Resumo	31
2 Abstract.....	32
3 Introdução.....	33
4 Material e métodos	36
4.1 Indução de brotações em segmentos nodais.....	36
4.2 Anatomia de folhas produzidas por cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	38
5 Resultados e discussão.....	39
5.1 Indução de brotações em segmentos nodais.....	39
5.2 Anatomia de folhas produzidas por cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	48
6 Conclusões	54
7 Referências bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 3 - Indução de calos em explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro	59
1 Resumo	59
2 Abstract.....	60
3 Introdução	61
4 Material e métodos	63
5 Resultados e discussão.....	65

6 Conclusões	75
7 Referências bibliográficas.....	75
CAPÍTULO 4 - Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro.	78
1 Resumo	78
2 Abstract.....	79
3 Introdução	80
4 Material e métodos	83
4.1 Curva de crescimento de calos.....	83
4.2 Análises bioquímicas dos calos.....	84
5 Resultados e discussão.....	87
5.1 Curva de crescimento de calos.....	87
5.2 Análises bioquímicas dos calos.....	93
6 Conclusões	103
7 Referências bibliográficas.....	104

RESUMO

SOARES, Gustavo de Araújo. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]. 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

Este trabalho teve por objetivo propor metodologias para indução de brotações e formação de calos em explantes de ingazeiro, além de estudar a curva de crescimento desses calos, caracterizando-a bioquimicamente, e de identificar alterações anatômicas em folhas de plantas obtidas através do cultivo *in vivo* e *in vitro*. A ausência de BAP apresentou os melhores resultados na formação de brotações e no tamanhos dos brotos formados, para os meios de cultura MS e WPM. Concentrações de BAP acima de 3 mg L^{-1} suplementando os meios MS ou WPM proporcionaram o desenvolvimento de calos nos segmentos nodais inoculados. As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* apresentaram os parênquimas paliádico e lacunoso e a epiderme abaxial mais espessos que no cultivo *in vivo*. O sistema vascular *in vivo* mostrou-se mais desenvolvido que o *in vitro*. Na indução de calos em explantes foliares e na porcentagem da área desse mesmo explante ocupada por calos, a concentração 1 mg L^{-1} de 2,4-D foi a que apresentou o melhor resultado para essas variáveis. Na indução de calos em explantes de segmentos internodais, as concentrações 1 e 3 mg L^{-1} de 2,4-D foram as mais eficientes para induzir calogênese. A concentração de 3 mg L^{-1} de 2,4-D proporcionou o melhor resultado para porcentagem da área do explante de segmento internodal ocupada por calos. As curvas de crescimento dos calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais seguem uma curva padrão com cinco fases distintas. Os teores máximos de proteínas e de aminoácidos obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais foram aos 20 e aos 50 dias após a inoculação, respectivamente. Os teores máximos de açúcares solúveis totais obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorreram aos 80 dias após a inoculação. Os teores máximos de açúcares redutores ocorreram aos 60 e aos 80 dias após a inoculação, respectivamente.

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

ABSTRACT

SOARES, Gustavo de Araújo. Aspects of the *in vitro* culture of ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]. 2003. 107p. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The objective of this work was to establish a methodology for shoot induction and callus formation in explants of ingazeiro, to study the callus growth curve through biochemical analysis and to identify anatomical alterations in leaves of plants obtained *in vivo* and *in vitro*. The absence of BAP presented best results for shoot formation and shoot size for both MS and WPM culture medium. BAP concentrations higher than 3.0 mg L⁻¹ in MS or WPM induced callus growth in nodal segments. Leaf structures developed *in vitro* presented palisade and spongy parenchyma and a thicker lower epidermis compared to the *in vivo* culture. The *in vivo* vascular system showed to be more developed than *in vitro*. The use of 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D was the best concentration to induce callus formation in leaf explants. The induction of callus formation in nodal segments was higher with the use of 1.0 and 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D. The use of 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D promoted higher explant area covered with callus. The growth curve of callus formed from nodal segments and leaves showed similar pattern with five distinct phases. Higher levels of proteins and amino acids present on callus formed from leaf and nodal segment explants were observed, respectively, 20 and 50 days after explant inoculation. Higher levels of total soluble sugar present on callus formed from leaf and nodal segment explants were observed 80 days after explant inoculation. Higher levels of reducing sugar on callus formed from leaf and nodal segment explants were observed 60 and 80 days after inoculation, respectively.

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

CAPÍTULO 1 - Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Florestas ciliares compreendem as formações vegetais que ocorrem ao longo dos cursos de água, margeando bacias hidrográficas, reservatórios e nascentes. Desempenham papel de destaque na proteção de recursos hídricos, assegurando a manutenção das nascentes e dos cursos de rios e córregos. Como o ecótono águas interiores/terras está sujeito às influências diretas do corpo d'água adjacente, as matas ciliares tornam-se um dos principais responsáveis na manutenção do ecossistema no qual estão presentes.

Apesar de sua indiscutível importância e da legislação que as protege, as matas ciliares encontram-se extremamente degradadas, principalmente pela ação do homem. Estas atividades têm provocado alterações ambientais, como o assoreamento dos rios e os distúrbios relacionados à diminuição da diversidade e à interação entre flora e fauna presentes nesses ambientes.

Neste contexto, estudos relacionados à preservação ambiental desse ecossistema e à sua revegetação com espécies nativas, são necessários e importantes para o maior entendimento do processo de recomposição de áreas degradadas e, principalmente, para preservação e manutenção das nascentes dos corpos d'água.

O ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.] é uma espécie arbórea, com características de pioneira, freqüentemente presente em matas ciliares. Essa espécie é extremamente abundante nas áreas sazonalmente inundadas das margens dos rios, por apresentar algumas adaptações anatômicas e morfológicas que a fazem suportar submersão do sistema radicular. Este conjunto de características a torna uma ótima espécie para plantios mistos em

recuperação de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios.

O gênero *Inga* produz sementes com elevada porcentagem de germinação, mas difíceis de serem conservadas por longos períodos. Os trabalhos existentes relativos ao comportamento de suas sementes durante o armazenamento e à sua tolerância à dessecação sugerem que o ingazeiro pertence ao grupo das espécies recalcitrantes ou sensíveis à dessecação e com baixa longevidade.

Esse fato tem se mostrado um obstáculo na obtenção de grande número de mudas, durante todo o período do ano, para utilização em trabalhos de revegetação de áreas impactadas.

Desse modo, o estudo das técnicas da cultura de tecidos em espécies como o ingazeiro, cujas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelos métodos convencionais, são indicadas como formas alternativas de propagação.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo induzir brotações e formação de calos em explantes de ingazeiro, além de estudar a curva de crescimento desses calos, caracterizando-os bioquimicamente, e de identificar alterações anatômicas em folhas obtidas por meio do cultivo *in vivo* e *in vitro*.

A partir dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se continuar as etapas da micropropagação, com o intuito de se obter mudas desta espécie, em qualquer época do ano, para os programas de revegetação das áreas de matas ciliares degradadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Descrição da espécie

Inga vera Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. é uma espécie arbórea, pertencente à família Leguminosae, à subfamília Mimosoideae e à tribo Ingae (Maumont, 1993).

Segundo Lorenzi (2002), essa espécie apresenta sinonímia botânica com *Inga affinis* DC., *Inga uruguensis* Hook. e Arn. e *Inga velloziana* Mart., dentre várias outras, e possui vários nomes populares como ingá, ingazeiro, ingá-dobrejo, ingá-de-quatro-quinas, ingá-banana e angá. Essa variedade de nomes científicos e populares atribuídos à mesma espécie dificulta o trabalho de sua descrição.

A tribo Ingae é considerada a mais primitiva dentro da subfamília Mimosoideae, por constituir-se de árvores, pela presença de um número elevado de estames em suas flores e, ocasionalmente, pela presença de carpelos múltiplos (Polhill & Raven, 1981).

* O gênero *Inga* é composto por árvores e arbustos inermes, sendo abundante entre as leguminosas arbóreas dos trópicos úmidos. Compreende cerca de 350 a 400 espécies distribuídas na América Tropical e Subtropical e muitas destas são consideradas úteis para sombreamento em cultivos de café e cacaueteiro, para obtenção de lenha, como fonte alimentar e de fitoterápicos e na formação de florestas heterogêneas voltadas para produção de fitomassa (Pritchard et al., 1995; Correa et al., 1995; Paula & Silva Júnior, 1994; Polhill & Raven, 1981).

Várias espécies apresentam poliembrionia, que são sementes com vários embriões dentro de um único envoltório seminal (Oliveira & Beltrati, 1994). Além disso, em suas sementes, há formação de uma camada de células de Malpighi hipertrofiadas, caracterizando uma polpa macroscopicamente visível

(Maumont, 1993). O gênero produz sementes com elevada porcentagem de germinação, verificando-se, inclusive, viviparidade (Pritchard et al., 1995; Bilia & Barbedo, 1994; Oliveira & Beltrati, 1992; Castro & Krug, 1951). No entanto, estudos referentes ao seu armazenamento têm indicado uma dificuldade em conservá-las por longos períodos. Castro & Krug (1951) verificaram que o armazenamento foi possível por apenas 15 dias após a coleta. Lieberg & Joly (1993) conseguiram armazenar sementes de *I. affinis* por, no máximo, 20 dias, em sacos de papel e à temperatura ambiente, sem que houvesse perda da capacidade germinativa. Barbedo (1997) obteve germinação superior a 60% em sementes de elevada qualidade de *I. uruguensis*, após 40 dias armazenadas hidratadas em câmara fria.

Os dados relativos ao comportamento das sementes durante o armazenamento sugerem que o ingazeiro pertence ao grupo das espécies tropicais consideradas pela literatura como recalcitrantes ou sensíveis à dessecação e com baixa longevidade (Bilia, 1997; Barbedo, 1997; Hanson, 1984; King & Roberts, 1979). Bilia (1997), trabalhando com tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *I. uruguensis*, observou que o limite de tolerância à desidratação e o comportamento desta espécie são característicos de sementes recalcitrantes, confirmando a suspeita.

Essa característica tem se tornado um obstáculo na obtenção de grande número de mudas, durante todo o período do ano, para utilização em trabalhos de revegetação de áreas impactadas.

No Brasil, o ingazeiro ocorre de São Paulo até o Rio Grande do Sul, principalmente na floresta pluvial atlântica. Em Minas Gerais, sua ocorrência é freqüente nas margens dos rios. Sua árvore atinge cinco a dez metros de altura, com tronco de vinte a trinta centímetros de diâmetro. Possui folhas compostas paripinadas, de ráquis alada, com quatro a cinco jugas e folíolos herbáceos. A pubescência é restrita às nervuras e a superfície inferior da folha é de cor mais

clara, com tamanho que varia de quatro a quatorze centímetros de comprimento, por um a quatro centímetros de largura. Esta espécie floresce durante os meses de agosto a novembro e a maturação dos frutos verifica-se nos meses de dezembro a fevereiro. As flores são melíferas, produzindo anualmente grande quantidade de frutos comestíveis. O fruto é uma vagem cilíndrica, com sementes envoltas por polpas carnosas, muito procurado por animais (Lorenzi, 2002) (Figura 1).

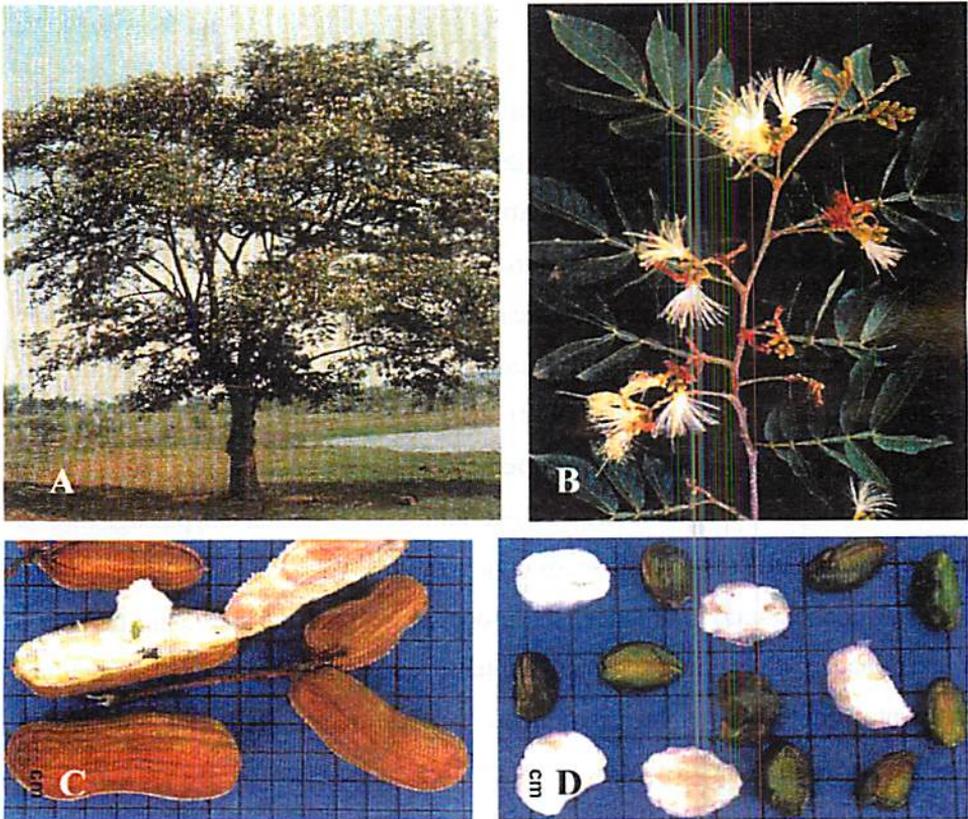


FIGURA 1. Aspecto visual de um planta adulta (A), da inflorescência (B), de frutos (C) e de sementes (D) de ingazeiro. Fonte: Lorenzi, 2002. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A espécie possui madeira moderadamente pesada (densidade 0,85 g cm³), pouco resistente e de baixa durabilidade natural. Pode ser empregada para caixotaria, obras internas e confecção de brinquedos e lápis. Segundo Lieberg & Joly (1993), o ingazeiro possui efeito positivo na recuperação da fertilidade de solos, por meio da fixação de nitrogênio, da adição de carbono (pela grande produção de serrapilheira) e do aumento dos níveis de fósforo, em forma extraível pela planta, na superfície do solo. Pode ser usada como lenha ou carvão e possui sementes que germinam submersas, podendo suas plântulas permanecer nessa condição por até um mês.

Segundo Botelho (1996), para suportar a submersão do sistema radicular, o ingazeiro apresenta algumas características adaptativas anatômicas e morfológicas, como a formação de raízes adventícias e lenticelas hipertrofiadas ou entumecidas, as quais possibilitam o transporte e o armazenamento de oxigênio para as partes submersas (Burdick & Mendelssohn, 1990).

O ingazeiro possui características de espécie pioneira, como adaptação a solos úmidos, sendo extremamente abundante nas áreas sazonalmente inundadas das margens dos rios (Lieberg, 1990). Essa característica a torna uma ótima espécie para plantios mistos em recuperação de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios. Pode também ser usada no paisagismo, já que cresce também em terrenos secos (Lorenzi, 2002).

Ainda segundo este autor, sua propagação se dá normalmente por meio da germinação de sementes, imediatamente após a colheita e sem nenhum tratamento, em canteiros ou diretamente em recipientes individuais contendo substrato argiloso. A emergência ocorre em três a cinco dias e a germinação é de 100%. Quando germinadas em canteiros, as mudas são transplantadas para embalagens individuais, com tamanho entre quatro a seis centímetros. O desenvolvimento das mudas é rápido, estando aptas para serem transplantadas para o local definitivo em três a quatro meses.

Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas em que pequenos fragmentos de tecido vivo (explantos) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indeterminados, em um meio nutritivo semidefinido ou definido e incubado em condições ambientais controladas. Para o caso de tecidos vegetais, esta definição original deve ser ampliada, de modo a incluir toda uma gama de explantes que vai desde plântulas e órgãos a células isoladas e protoplastos (Mroginski & Roca, 1993; Torres & Caldas, 1990).

Dentre as várias aplicações destas técnicas estão a utilidade em programas de melhoramento genético de plantas, o aumento de variabilidade genética para fins de seleção, a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos, a conservação e avaliação de germoplasma e a micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro* (Ferreira et al., 1998; Duval et al., 1998).

Se a cultura de tecidos consiste em cultivar assepticamente diferentes explantes constituídos por frações de um tecido ou órgão que se extrai da planta, a micropropagação é praticamente uma multiplicação massiva *in vitro*, sendo a aplicação mais prática da cultura de tecidos (Mroginski & Roca, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998). Destina-se, principalmente, àquelas espécies cujas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo. Assim, pode-se clonar indivíduos melhorados, produzindo progênies homogêneas (Lameira, 1997).

Um exemplo que justifica o uso da micropropagação é a multiplicação de plantas selecionadas por alta produtividade ou qualidade de frutos superiores. Se as estacas da espécie não enraizam ou possuem baixo percentual de enraizamento, a micropropagação pode representar solução para sua propagação. Outro caso, no qual a multiplicação *in vitro* é vantajosa, surge quando a espécie

é rara, como a pera-do-cerrado (*Eugenia klotzchiana*), ou produz poucas sementes, como a sucupira-branca, e a produção de mudas é insuficiente para atender à demanda. Assim, a multiplicação por cultura de tecidos oferece a possibilidade de produzir dezenas ou centenas de mudas a partir de uma única semente ou matriz selecionada (Melo et al., 1998).

Além disso, a micropropagação tem mostrado importantes vantagens, em comparação com os sistemas convencionais de propagação. O incremento acelerado do número de plantas derivadas de determinado genótipo, a redução do tempo de multiplicação, a possibilidade de multiplicar grandes quantidades de plantas em uma área reduzida a baixos custos, o maior controle sobre a sanidade do material que se propaga e a possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade na qual existam poucos indivíduos são algumas das vantagens apontadas por Mroginski & Roca (1993).

Atualmente, a micropropagação se pratica com êxito em espécies hortícolas, ornamentais e, mais recentemente, em espécies lenhosas. A atividade comercial de micropropagação, hoje, concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas. Em segundo plano, vêm as lenhosas, com destaque para multiplicação de porta-enxertos de frutíferas de clima temperado e de árvores-elite de essências florestais de rápido crescimento. Apesar de ainda não ser difundida a prática de instalar laboratórios junto a viveiros, algumas empresas de reflorestamento têm iniciado, nos últimos anos, a propagação vegetativa *in vitro* de árvores selecionadas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Pierik (1990), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta cinco diferentes estágios. A fase 0 corresponde aos tratamentos dados à planta matriz, de onde são retirados os explantes, os quais tentam manter, o máximo possível, as plantas saudáveis e livres de doenças. A fase 1 representa o momento em que um explante é isolado sob condições estéreis. Nesta, a única exigência importante é

obter crescimento e desenvolvimento sem contaminação. A fase 2 é a fase de propagação, onde se objetiva conseguir a propagação do material vegetal sem a perda da estabilidade genética. A fase 3 envolve a preparação das brotações ou das plântulas, obtidas na fase 2, para a transferência ao solo. Esse processo pode envolver a interrupção da formação de brotos axilares e o início do seu alongamento. Posteriormente, deve-se induzir a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A quarta e última fase é a da transferência das plântulas do tubo de ensaio para o solo e conseqüente estabelecimento.

Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por três maneiras: multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e multiplicação via embriogênese somática.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998) e George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares. O cultivo de segmentos nodais consiste na inoculação de uma gema, juntamente com uma porção do caule, para se obter um broto a partir desta gema. Dessa forma, a indução de brotações envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados (normalmente gemas axilares) e a quebra de dominância apical com aplicação de reguladores de crescimento. As gemas axilares que naturalmente se formam nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas que, por sua vez, repetem o mesmo processo. Cada parte aérea é isolada das demais para a formação de novos explantes. Este é o método mais natural de propagação vegetativa das plantas *in vitro*, já que também pode se aplicar *in vivo* (Pierik, 1990).

A composição do meio de cultura é uma importante variável que determina o sucesso na proliferação das partes aéreas. Diversos meios básicos são utilizados na fase de multiplicação e suas variações mais freqüentes dizem

respeito à composição de macronutrientes. A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido maior atenção (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) é o mais concentrado em termos de micro e macronutrientes e é também o mais empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001; Tisserat, 1985). Já o meio de cultura WPM (Woody Plant Medium - Lloyd & McCown, 1980) é bastante utilizado em plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais.

Uma das diferenças marcantes entre esses dois meios de cultura está na concentração de nitrogênio (N₂). O meio WPM possui um quarto da concentração de íons nitrato e amônia em relação ao MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato (Pasqual, 2001). Além disso, a força iônica total do WPM representa 45% do MS (Nunes et al., 2002). A redução da concentração de nitrogênio na forma amoniacal no meio MS tem sido utilizada como medida para combater a vitrificação das culturas, considerado um dos principais problemas na fase de multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998).

Bertolucci (2000), testando o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de marmelinho (*Tournefortia cf paniculata* Cham.) nos meios MS, MS 50% e WPM, não encontrou diferenças significativas entre os meios de cultura utilizados para o número de brotos formados, nem para seus tamanhos, com 30 e 45 dias após a inoculação. Como o autor observou crescimento vigoroso e incremento de 30% no tamanho das brotações formadas em meio WPM, concluiu que esse meio seria o mais eficiente para o desenvolvimento da plântula.

Outra possibilidade de micropropagação é a multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta. Gemas adventícias são gemas originadas em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. A sua formação ocorre de

maneira direta ou indireta. A organogênese direta refere-se ao surgimento de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vivo*, mas que, em geral, não se expressa. A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo.

O calo é, basicamente, um tecido tumoral, ou seja, uma massa de células que se proliferam desordenadamente, com certo grau de diferenciação, que geralmente surge sobre ferimentos de órgãos e tecidos diferenciados. Os calos se desenvolvem a partir de um fragmento de órgão de determinada planta e possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, regenerando plantas inteiras (Paiva & Paiva, 2001; Pierik, 1990; Torres & Caldas, 1990).

Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, como, por exemplo, genótipo, idade da planta, do órgão ou do tecido e estado fisiológico, pelo meio nutritivo, acrescido ou não de reguladores de crescimento e por fatores físicos externos, como luz e temperatura. Todos esses fatores agem acelerando, retardando ou até mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento de um calo.

Os calos apresentam um padrão típico de crescimento, o qual é caracterizado por meio de fases distintas. O estudo do crescimento dos calos envolve a determinação dos períodos em que ocorrem essas fases, sendo cada uma delas representada por eventos que lhe são peculiares.

As fases de crescimento de calos têm sido caracterizadas no crescimento celular, cujos parâmetros incluem peso da matéria fresca da célula, número de células e proteína celular total, atividades metabólicas e concentrações de nutrientes nos meios de cultura. Os diversos períodos que compõem o crescimento dos calos são a fase lag, fase exponencial ou log, fase de crescimento linear, fase de desaceleração e a fase estacionária.

A fase lag é considerada como produtora de energia e correspondente ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Caracteriza-se pelo número estacionário de células, pelo início da mobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento do calo. A fase exponencial é considerada como biossintética. É nela que se observa o maior crescimento do calo, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. O número de células aumenta, sendo essas pequenas e agregadas em mais de dez células. Na fase linear, ocorre a redução da taxa de crescimento de divisão celular, tornando a divisão uniforme. O que caracteriza essa fase é o crescimento e desenvolvimento celular. Na quarta fase, de desaceleração, devido à diminuição da divisão celular e à expansão da célula, observa-se a desaceleração no crescimento do calo, causada pela redução dos nutrientes no meio de cultura, presença de produtos tóxicos, secagem do ágar e diminuição do oxigênio no interior das células. É nesta fase que o calo deve ser transferido para um meio fresco, possibilitando retomada do crescimento. Na última fase, estacionária, não se observa divisão ou crescimento celular, não há síntese de biomassa, nem aumento no número de células, o que mantém o peso do calo constante. Esta fase caracteriza-se pelo acúmulo de metabólitos secundários nas células (Nakagawa et al., 1986; Lindsey & Yeoman, 1983; Noé et al., 1980; Phillips & Henshaw, 1977).

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

O período de cada fase varia de acordo com a espécie. Serra et al. (2000), por exemplo, observaram que a curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) apresenta um crescimento sigmóide, com cinco fases distintas: lag (do zero ao 30° dia após inoculação), exponencial (30° ao 53° dia), linear (53° ao 60° dia), desaceleração (60° ao 67° dia) e o estacionário (a partir do 67° dia).

Santos (2001) também obteve uma curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de cafeeiro (*Coffea canephora* cv 'Apoatã') com crescimento sigmóide e as fases lag (do zero ao 28° dia após inoculação), exponencial (28° ao 63° dia), linear (63° ao 70° dia), desaceleração (70° ao 77° dia) e o estacionário (a partir do 77° dia).

Altas taxas de multiplicação celular podem levar ao declínio da competência organogenética, à instabilidade genética e à vitrificação do material *in vitro* (Shargool & Ngo, 1994). Quando se observa variação genética no material *in vitro* ou em plantas já regeneradas, utiliza-se o termo variação somaclonal (Pierik, 1990). Além das altas taxas de multiplicação, outros motivos podem levar ao aparecimento de variações somaclonais: tempo de duração da cultura, desordens fisiológicas devido a substâncias mutagênicas (reguladores de crescimento, por exemplo) ou à resposta a algum tipo de estresse, mudanças diretas nos cromossomos, origem do explante, entre outros (Shargool & Ngo, 1994).

Essas mutações são consideradas o maior problema da micropropagação, quando esta tem objetivo de clonar genótipos selecionados. No entanto, a possibilidade que existe de se obter variações genéticas nos descendentes constitui uma vantagem quando se trata de espécies utilizadas para revegetação de áreas, pois garante a biodiversidade.

Entre os princípios nos quais se baseia a cultura de tecidos, os dois mais importantes, sem dúvida, são a totipotencialidade celular e o balanço hormonal (Villalobos & Thorpe, 1993).

Pelo princípio da totipotencialidade das células somáticas vegetais, teoricamente, qualquer célula vegetal viva possui suficiente informação genética para produzir uma planta normal, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas. A cultura de tecidos, dessa forma, pode propiciar a regeneração de uma planta inteira a partir de fragmentos de outra planta (Grattapaglia & Machado, 1998).

No entanto, conforme Pierik (1990), quando uma planta envelhece, sua capacidade regenerativa costuma diminuir. Dessa forma, tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens, especialmente no caso de árvores e arbustos. Os tecidos embrionários geralmente têm alta capacidade regenerativa e, assim, embriões e sementes são utilizados freqüentemente como material experimental para o cultivo de tecidos.

Na maioria dos casos, a principal diferença entre os tipos de cultivo *in vitro* utilizados para propagação de plantas lenhosas e os utilizados para outras espécies é que somente tecidos jovens têm sido utilizados ou têm dado resultados satisfatórios (Bonga & Durzan, 1987).

Os tecidos jovens, não lignificados, em geral são mais apropriados para o cultivo do que os tecidos velhos e lenhosos. Contudo, um grande número de exceções é encontrado na literatura (Pierik, 1990).

Embora os explantes de espécies arbóreas tenham dificuldade de crescer e diferenciar *in vitro*, os primeiros tipos de cultivos foram utilizados experimentalmente com vários graus de sucesso em micropropagação de várias espécies arbóreas (Bonga & Durzan, 1987). Segundo Dunstan & Thorpe (1986), até que os aspectos bioquímicos e fisiológicos da juvenilidade e maturidade

sejam esclarecidas, não será possível elucidar alguns padrões morfogenéticos que são observados na cultura de tecidos em arbóreas.

Um dos fatores mais importantes para se obter calogênese é a escolha do explante (Bonga, 1977), uma vez que o potencial morfogenético dos calos geralmente varia com a origem do explante (Mehra & Mehra, 1974).

Rodrigues (2000) utilizou segmentos nodais, ápices, discos foliares, epicótilos e cotilédones como explantes em trabalho de indução de calos em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willdenow ex Sprengel). Este autor observou que, ao contrário de todos os outros explantes utilizados, os cotilédones foram os mais responsivos à formação de calos. Já Abreu (1998), trabalhando com indução de calos em folhas jovens, gemas apicais e internódios jovens de insulina vegetal (*Cissus sicyoides*) em meio MS, obteve folhas jovens como melhor explante para calogênese.

Nas plantas, naturalmente ocorre a presença de substâncias químicas, que regulam o crescimento e o desenvolvimento. Essas substâncias geralmente são ativas em baixas concentrações e são conhecidas como hormônios. O produto químico sintético com atividade fisiológica similar aos hormônios é denominado de regulador de crescimento. As principais classes de reguladores de crescimento ou hormônios são: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (George, 1996).

Paiva-Neto (1996), trabalhando com tecido foliar e segmentos nodais de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud), observou que a obtenção de calos em explantes oriundos de folhas e segmentos nodais jovens depende da presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo.

As auxinas são incorporadas ao meio de cultura para promover o alongamento e divisão celular, a formação de calos e raízes adventícias, a inibição da formação de brotações axilares e adventícias e, geralmente, embriogênese em culturas de células em suspensão. Podem ser usadas

associadas às citocininas. Das auxinas naturais, o ácido indoil-3-acético (AIA) é o composto de maior utilização. Já entre as sintéticas, o ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D), o ácido indol acético (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA) se encontram amplamente disponíveis e são comumente utilizadas. A escolha da auxina e concentração requerida dependem do nível da auxina endógena do explante, da capacidade do tecido cultivado de sintetizar auxina naturalmente e da interação entre a auxina sintética aplicada e auxina endógena (Krikorian, 1993; George, 1996; Pierik, 1990).

As citocininas produzem pouco efeito quando aplicadas em plantas intactas, mas têm visível efeito para estimular síntese de proteínas. As citocininas promovem a maturação dos cloroplastos e retardam a senescência de folhas destacadas. Os efeitos das citocininas são mais visíveis na cultura de tecidos quando são usadas juntamente com as auxinas, estimulando a divisão celular e controlando a morfogênese. Nos segmentos nodais cultivados *in vitro*, em meio contendo citocininas, estes compostos superam a dominância apical e liberam gemas laterais da dormência. Neste aspecto, possuem um efeito oposto ao das auxinas endógenas. As citocininas de uso mais comuns são a cinetina, o 6-benzilaminopurina (BAP) e o 2-isopenteniladenina (2-iP) (George, 1996; Pierik, 1990).

Para a indução da formação de calos, muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento, sendo que a necessidade do regulador, no que diz respeito ao tipo, concentração, relação auxina/citocinina, depende do genótipo e conteúdo endógeno de hormônio do vegetal (Vietez & San-José, 1996). Dessa forma, o balanço obtido entre os níveis de citocininas e auxinas exógenas e endógenas à planta podem estimular a proliferação celular.

Porém, segundo Ozias-Akins & Vasil (1985), citocininas exógenas nem sempre são necessárias e muitos tecidos desenvolvem-se indefinidamente *in vitro*, apenas com suprimento de auxinas.

Paiva-Neto (1996) obteve formação de calos e raízes em tecidos foliares de moreira, quando acrescentou 2,4-D ao meio de cultura. A combinação deste regulador de crescimento com a citocinina BAP reduziu a porcentagem de explantes com calos, porém, parece ter inibido a rizogênese. A melhor concentração de 2,4-D obtida foi $6,36 \text{ mg L}^{-1}$, tanto aos vinte, quanto aos trinta dias após a inoculação. Nenhuma formação de calos foi obtida na ausência de reguladores.

As giberelinas formam um grupo de reguladores de crescimento, no qual o principal representante é o ácido giberélico (GA_3). Geralmente, esse regulador é utilizado em cultura de tecidos para induzir o alongamento dos internódios da haste e o crescimento dos meristemas, promover floração, induzir frutificação e, também, quebrar dormência de embriões isolados ou sementes. Vários efeitos das giberelinas são causados pelo aumento seletivo ou decréscimo na biossíntese e atividade das enzimas. Muitas vezes, as giberelinas se mostram não essenciais ao cultivo *in vitro* (George, 1996; Picrik, 1990).

O etileno é um regulador de crescimento em forma gasosa, produzido por células vegetais, inclusive quando estão *in vitro*. Esse composto pode influir no padrão de desenvolvimento das culturas, mas a sua síntese, ou melhor, a sua presença nas culturas é normalmente regulada mais pelo tipo de fechamento ou vedação feito nos frascos de cultura do que pela composição do meio (Caldas et al., 1998).

O ácido abscísico é um inibidor de crescimento *in vitro*. No entanto, tem sido bastante utilizado para desenvolvimento normal e maturação de embriões somáticos, evitando germinação precoce dos mesmos, e também para indução de embriogênese em algumas linhagens de milho (Caldas et al., 1998).

Aspectos bioquímicos

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

Os diversos grupos de substâncias presentes nos tecidos vegetais, como proteínas, aminoácidos, açúcares estruturais e não estruturais, açúcares solúveis, açúcares redutores, amido, lipídeos, ácidos orgânicos ácidos nucleicos e pigmentos, podem ser classificados de acordo com seu peso molecular, em macro e micromoléculas.

A determinação do nível de proteínas e aminoácidos em tecidos é uma das análises mais comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). As proteínas são macromoléculas, constituídas basicamente por uma cadeia de aminoácidos.

Todos os aminoácidos têm a mesma estrutura básica, consistindo em um grupo amino, um grupo carboxila, um átomo de hidrogênio e um radical R diferenciado, ligados ao carbono central. Este radical R consiste em um átomo, ou grupo de átomos, que determina a identidade do aminoácido em particular. Existe um conjunto de vinte aminoácidos constituintes de proteínas que variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio e reatividade química (Stryer, 1992).

A análise quantitativa de aminoácidos é importante para a determinação da estrutura de proteínas e de complexos peptídicos similares, os quais são elementares para a determinação química de amostras de moléculas orgânicas.

Serra et al. (2000) observaram um acúmulo nos teores de proteínas e aminoácidos, nos calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira do Brasil, até o 30º dia após a inoculação com posterior redução.

Outra classe de biomoléculas que se destaca em tecidos vegetais são os açúcares ou carboidratos, os quais atuam como forma de armazenamento de energia, como importantes constituintes de suporte de tecidos ou também como provedores de esqueletos de carbono para compostos orgânicos sintetizados

pelas células (Serra et al., 2000). Gamborg et al. (1976) classificam os carboidratos como uma das cinco classes de substâncias essenciais requeridas para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Os carboidratos podem ser definidos como sendo polidroxialdeídos ou polidroxicetonas ou, ainda, substâncias que por hidrólise fornecem esses compostos.

Os açúcares solúveis totais representam um conjunto de açúcares metabolicamente ativos, que seriam os açúcares redutores, como glicose e frutose, e formas com função de armazenamento e transporte, as quais seriam melhor representadas pela sacarose, que é um açúcar não-redutor (Lima, 1998; Castro, 1990; Tupy, 1985).

Os açúcares redutores representam o metabolismo ativo das plantas. Aparecem como metabólitos da glicólise, rota das pentoses e ciclo de Krebs, sugerindo que sua quantificação pode representar a capacidade fotossintética da planta ou o nível das taxas metabólicas da mesma.

Estes açúcares são capazes de reagir como agentes redutores, devido à presença, em sua molécula, de grupos aldeído ou cetona livre. As propriedades redutoras desses açúcares podem ser comprovadas pela sua capacidade de reduzir diversos íons metálicos.

A determinação dos níveis de açúcares tem aplicação em vários estudos fisiológicos, já que revela a reserva prontamente disponível para o crescimento (Passos, 1996). Nos cultivos *in vitro*, os açúcares são acrescentados ao meio de cultura como fonte de energia para o desenvolvimento do explante. Esses tecidos apresentam uma taxa fotossintética bastante reduzida, tornando-se praticamente heterotróficos.

Serra et al. (2000) observaram que os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores em calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira do Brasil apresentaram constante redução durante todo período de avaliação. Mesquita et al. (2002) obtiveram aumento gradual nos teores de

açúcares solúveis totais em calos de explantes foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) inoculados em meio MS acrescidos de 2 e 6 mg L⁻¹ de 2,4-D, na presença de luz. No entanto, Santos (2001) observou redução nos teores de açúcares redutores em calos de cafeeiro (*Coffea arabica*) 'Rubi' no 21º dia após a inoculação, com posterior aumento.

Aspectos anatômicos

Segundo Gaspar et al. (1987) e Ziv (1987), as condições para a proliferação de brotos *in vitro* são as principais causas de má formação desses próprios brotos.

As condições ambientais sob as quais ocorre o cultivo *in vitro*, no que se refere à composição do meio de cultura e do ar no interior dos recipientes, bem como quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que a planta proveniente da micropropagação apresente algumas características peculiares. Ainda que haja variação entre as espécies, algumas características são encontradas em praticamente todas as plantas. A descrição dessas características pode ser feita em relação às folhas, às raízes e ao mecanismo de nutrição (George, 1996).

Ainda não se sabe ao certo como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente de plântulas micropropagadas, é afetada pelas condições ambientais de cultivo. Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados principalmente à fotossíntese e às trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984). Especula-se que o ambiente de cultivo possa afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta.

Dessa forma, a avaliação das mudanças estruturais que ocorrem em um tecido ou órgão formado em condições *in vitro* é importante no desenvolvimento

de protocolos de micropropagação de plantas, por ajudar a determinar eficiência do processo organogênético e a funcionalidade do novo órgão.

Santos (2001) observou diferenças nas estruturas das folhas de plântulas de cafeeiro obtidas por propagação *in vitro* e relação às propagadas *in vivo*. As folhas do cultivo *in vitro* apresentaram parênquimas paliçádico e lacunoso mais espessos. Além disso, nas folhas cultivadas *in vivo* não ocorreu presença de esclerênquima e o sistema vascular foi mais desenvolvido. Fidelis (1998) observou um número maior de tricomas simples e secretores nos caules de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.) obtidos *in vitro*.

3 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.

BARBEDO, C. J. **Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn.** 1997. 71p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham.** 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BILIA, D.A.C. **Tolerância à Dessecação e Armazenamento de Sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn.** 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. sob diferentes condições ambientais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 10. Resumos... Sociedade Botânica de São Paulo, 1994. p. 92.

BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. Cell and tissue culture in forestry. Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987.

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

BOTELHO, M.N. Características morfo-anatômicas, fisiológicas e atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de ingá (*Inga vera* Wild), virola (*Virola surinaminensis* (Rol.) Warb.) e seringueira (*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.) submetidas a diferentes níveis e tempos de inundação. 1996. 49p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG..

BURDICK, D.M.; MENDELSSOHN, I.A. Relationship between anatomical and metabolic responses to soil waterlogging in the coastal grass *Spartina patens*. *Journal of Experimental Botany*, v. 41, p. 223-228, 1990.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

CASTRO, P.R.C. Bases fisiológicas da produção e da estimação de *Hevea brasiliensis*. In: BERNARDES, M.S. *Sangria da seringueira*. Piracicaba: ESALQ/USP-FEALQ, 1990. p. 1-25.

CASTRO, Y.G.P.; KRUG H.P. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis* - espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura*, v. 3, n. 4, p. 263-264, 1951.

CORREA, S.M.V.; CONSERVA, L.M.; MAIA, J.G.S. Constituents of roots of *Inga edulis* var. *parviflora*. *Fitoterapia*, v. 66, n. 4, p. 379. 1995.

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

DUNSTAN, D.I.; THORPE, T.A. Regeneration in forest trees. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants. Plants Regeneration and genetic variability**. Florida: Academic, 1986. Cap. 11, v. 3, p. 223-241.

DUVAL, C.M.; CALDAS, L.S.; RESENDE, R.O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. 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.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. 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.

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

GAMBORG, O.L. et al. Plant tissue culture media. **In vitro**, Largo, v. 12, p. 473-478, 1976.

GASPAR, T. et al. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue CCulture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 1, p. 152-166.

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

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.

HANSON, J. The storage of seeds of tropical tree fruits. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p. 53-62.

KING, M.W.; ROBERTS, E.H. The storage of recalcitrant seed - Achievements and possible approaches. **Rome International Board for Plant Genetics Resources**. 1979. 96 p.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura - fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p.19-40.

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.

LIEBERG, S.A. **Tolerância à inundação e aspectos demográficos de *Inga affinis* DC**. 1990. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

LIEBERG, S.A.; JOLY, C.A. ***Inga affinis* DC (Mimosaceae): germinação e tolerância à submersão**. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 16, n. 2, p. 175-179, 1993.

LIMA, D.U. **Avaliação sazonal da produção de borracha e do metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais**. 1998. 71p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LINDSEY, K.; YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, v. 34, n. 145, p. 1055-1065, 1983.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, v. 15, n. 3, p. 416, jun. 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1.386 p.

MAUMONT, S. Seed-coat anatomy of the non-pleurogamic seeds in the tribe Ingeae (Leguminosae, Mimosoideae). **Brittonia**, v. 45, p. 249-259, 1993.

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

MELO, J.T. et al. Coleta propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 195-231.

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

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI L.A. (Ed.). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p. 19-40.

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.

NAKAGAWA, K. et al. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 254-257, 1986.

NOÉ, W.; LANGEBARTELS, C.; SEITZ, H.U. Anthocyanin accumulation in PAL Scarlet rose cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, v. 23, p. 75-91, 1980.

NUNES E.C. et al. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, p. 261-268, 2002.

OLIVEIRA, D.A.C.; BELTRATI, C.M. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga fagifolia* e *I. uruguensis*. *Turrialba*, v. 42, n. 3, p. 306-313, 1992.

OLIVEIRA, D.M.T.; BELTRATI, C.M. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de *Inga fagifolia* Willd. (Fabaceae: Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 54, n. 1, p. 91-100, 1994.

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

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.

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

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

PAULA, J.E.; SILVA JÚNIOR, F.G. Anatomia de madeiras indígenas com vistas à produção de energia e papel. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 12, p. 1807-1821, 1994.

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*, v. 46, n. 3, p. 58, 1987.

PHILLIPS, R.; HENSHAW, G.G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, n. 105, p. 785-794, 1977.

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

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. v. 1, 425 p.

PRITCHARD, H.W. et.al. Comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science & Technology**, v. 23, p. 85-100, 1995.

RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento de eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willdenow ex Sprengel) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius)**. 2000. 60p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estado de São Paulo, Jaboticabal, SP.

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

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.

SHARGOOL, P.D.; NGO, T.T. **Current Topics in Plant Molecular Biology - Biotechnological Applications of Plant Cultures**. Florida: CRC, 1994. 214 p.

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

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

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

TUPY, J. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, p. 51-64, 1985.

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, p. 140-147, July/Sept. 1996.

VILLALOBOS V.M.; THORPE, T.A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura - fundamentos y aplicaciones.** Cali: CIAT, 1993. p. 19-40.

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 - Indução de brotações *in vitro* e caracterização anatômica de folhas obtidas por cultivo *in vitro* e *in vivo* de ingazeiro

1 RESUMO

SOARES, Gustavo de Araújo. Indução de brotações *in vitro* e caracterização anatômica de folhas obtidas por cultivo *in vitro* e *in vivo* do ingazeiro. In: _____. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]**. 2003. p.31-58. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

Este trabalho avaliou o efeito dos meios de cultura MS e WPM e do BAP na indução de brotações em segmentos nodais do ingazeiro e comparou os aspectos morfológicos e anatômicos de suas folhas cultivadas nas condições *in vivo* e *in vitro*. A ausência de BAP proporcionou os melhores resultados na formação de brotações e no tamanho dos brotos formados, para os dois meios de cultura. Concentrações de BAP acima de 3 mg L⁻¹, suplementando os meios MS ou WPM, proporcionaram desenvolvimento de calos nos segmentos nodais. As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* apresentaram os parênquimas paliádico e lacunoso e a epiderme abaxial mais espessos que no cultivo *in vivo* e o sistema vascular *in vivo* é mais desenvolvido que o *in vitro*.

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

2 ABSTRACT

SOARES, Gustavo de Araújo. *In vitro* shoot induction and characterization of leaf anatomy of ingazeiro obtained from the *in vitro* and *in vivo* culture. In: _____ . Aspects of the *in vitro* culture of ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]. 2003. p.31-58. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

This work evaluated the effect of MS and WPM media and BAP on the induction of shoots in nodal segments of ingazeiro and compared morphological and anatomical aspects of its leaves cultivated *in vivo* and *in vitro*. The absence of BAP presented best results for shoot formation and shoot size for both MS and WPM culture medium. BAP concentrations higher than 3.0 mg L⁻¹ in MS or WPM induced callus growth in nodal segments. Leaf structures developed *in vitro* presented palisade and spongy parenchyma and a thicker lower epidermis compared to the *in vivo* culture. The *in vivo* vascular system showed to be more developed than *in vitro*.

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

3 INTRODUÇÃO

O ingazeiro é uma espécie arbórea da família Leguminosae, pertencente ao gênero *Inga*, cuja distribuição estende-se da América Tropical à Subtropical, sendo abundante entre as árvores dos trópicos úmidos (Maumont, 1993).

Estudos comprovam que essa espécie possui efeito positivo na recuperação da fertilidade de solos, por meio da fixação de nitrogênio, da adição de carbono (pela grande produção de serrapilheira) e do aumento dos níveis de fósforo, em forma extraível pela planta, na superfície do solo (Lieberg & Joly, 1993). Possui características de espécie pioneira, sendo extremamente abundante nas áreas sazonalmente inundadas das margens dos rios (Lieberg, 1990). Devido a estas características, a espécie é bastante utilizada na formação de florestas voltadas para produção de fitomassa (Barbedo, 1997) e para recomposição de áreas degradadas pela ação do homem, principalmente matas ciliares e áreas de depleção de reservatórios.

Apesar das sementes das espécies deste gênero apresentarem elevada porcentagem de germinação (Castro & Krug, 1951), estudos referentes ao armazenamento de suas sementes têm indicado grande dificuldade em conservá-las por longos períodos (Castro & Krug, 1951; Lieberg & Joly, 1993). Essa característica tem se tornado um obstáculo na obtenção de grande número de mudas, durante todo o período do ano, para utilização em trabalhos de revegetação de áreas impactadas.

Dessa forma, para espécies como o ingazeiro, cujas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelos métodos convencionais, as técnicas de cultura de tecidos são indicadas como forma de propagação. Dentre estas técnicas, a micropropagação é a mais utilizada com finalidade de multiplicação em larga escala de clones selecionados (Grattapaglia & Machado, 1998).

Micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é a propagação controlada de plantas, *in vitro*, sob condições assépticas. Destina-se principalmente àquelas espécies de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo. Assim, podem-se clonar indivíduos melhorados, produzindo progênes homogêneas (Lameira, 1997).

Segundo George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares. O cultivo de segmentos nodais consiste na inoculação de uma gema, juntamente com uma porção do caule, para obter um broto a partir desta. Este é o método mais natural de propagação vegetativa das plantas *in vitro*, já que também pode se aplicar *in vivo* (Pierik, 1990).

Além da multiplicação, a micropropagação tem por objetivos a eliminação de patógenos, a rápida introdução de novos genótipos, a seleção somaclonal e de variantes e a preservação a longo prazo de germoplasma (Shargool & Ngo, 1994).

A micropropagação se baseia na totipotencialidade das células somáticas vegetais. Isso significa que, teoricamente, qualquer célula vegetal viva possui suficiente informação genética para produzir uma planta normal, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas. A cultura de tecidos, dessa forma, pode propiciar a regeneração de uma planta inteira a partir de fragmentos de outra planta (Grattapaglia & Machado, 1998).

A composição do meio de cultura é uma importante variável que determina o sucesso na proliferação das partes aéreas. A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido grande atenção (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) é o mais concentrado em termos de micro e macronutrientes e é também o mais empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001; Tisserat, 1985). Já o meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) é

bastante utilizado em plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais, representando apenas 45% da força iônica do meio MS (Nunes et al., 2002).

A propagação *in vitro* está basicamente controlada pela inclusão de reguladores de crescimento vegetais no meio de cultura. O balanço entre os reguladores em uma planta pode, entre outras coisas, superar a dominância apical dos ramos, levando ao desenvolvimento dos brotos laterais, e induzir formação de brotações adventícias, levando novamente à produção de mais material vegetal (Shargool & Ngo, 1994).

As citocininas pertencem aos reguladores de crescimento responsáveis por superar a dominância apical e liberar gemas laterais da dormência (George, 1996). O benzilaminopurina (BAP) é, provavelmente, a citocinina mais empregada para indução e alongação de gemas em espécies arbóreas, especialmente espécies tropicais (Pereira-Netto, 1996). Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que o BAP é a citocinina mais potente para promover a proliferação de partes aéreas e é economicamente melhor, por ser mais barato.

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 (Gaspar et al., 1987; Ziv, 1987). As condições da cultura de tecidos, embora promovam um aumento na proliferação de brotações e no crescimento de plântulas, são desfavoráveis à formação normal das folhas.

Ainda não se sabe ao certo como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente de plântulas micropropagadas, é afetada pelas condições ambientais de cultivo. Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e às trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984). Especula-se que o ambiente de

cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta. Algumas respostas comumente assemelham-se a plantas cultivadas sob condições de estresse.

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 deste novo órgão, tornando-se pré-requisito indispensável para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de plantas. Dessa forma, faz-se necessário estudar as mudanças anatômicas de órgãos vegetativos, influenciados pelo ambiente de cultura de tecidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos meios de cultura MS e WPM e do BAP na indução de brotações em segmentos nodais do ingazeiro, assim como comparar os aspectos morfológicos e anatômicos de suas folhas cultivadas nas condições *in vivo* e *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indução de brotações em segmentos nodais

Material vegetal

Plantas matrizes jovens de ingazeiro foram obtidas do viveiro de mudas da Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na Represa de Camargos, município de Itutinga, Minas Gerais. Estas plantas foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas e foram utilizadas como fonte de explantes.

Desinfestação e inoculação do material vegetal

As plantas matrizes, com cerca de 8 meses de idade, foram tratadas com solução de Benlate 0,5% (p/v) e, 24 horas depois, segmentos nodais, com cerca de dois centímetros, foram retirados dos ramos mais jovens. Em seguida, os explantes foram lavados em água com detergente por 20 minutos e, depois, em água corrente por mais 30 minutos. Posteriormente, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, lavados em água destilada e imersos em solução de Benlate 0,3% (p/v), por 30 minutos. Após nova lavagem em água destilada, os segmentos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), onde permaneceram por 20 minutos. Finalmente, em condições assépticas, os explantes passaram por quatro lavagens em água destilada e autoclavada.

Os segmentos nodais, contendo apenas uma gema lateral, foram inoculados em meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980), acrescidos de BAP (benzilaminopurinana) nas concentrações 0; 3; 6; 9 e 12 mg L⁻¹ e 3 g L⁻¹ 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 explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2°C de temperatura, irradiância de 25 μmol s⁻¹ m⁻² e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliados a formação de brotações, o tamanho da brotação formada e a formação de calos, 35 dias após a inoculação.

Delineamento experimental

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

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

Folhas completamente expantidas foram coletadas ao acaso, de ramos do terço superior das plantas matrizes de ingazeiro mantidas em sala de crescimento (*in vivo*) e das brotações induzidas de segmentos nodais inoculados em meio MS sem regulador de crescimento (*in vitro*), conforme resultados do experimento anterior. 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 procedimentos para obtenção das lâminas com os cortes anatômicos das folhas coletadas foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras. Os cortes anatômicos foram efetuados a mão, 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; Sass, 1951). A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada pelo processo de dupla coloração com safranina-azul de astra (Bukatsh, 1972). Finalmente, foram montadas lâminas semipermanentes com água glicerizada do material obtido e lutagem com esmalte.

As lâminas confeccionadas com os cortes anômicos foram utilizadas para realização de medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas esponjoso e paliádico, com auxílio de ocular micrométrica em microscópio de campo claro Carl Zeiss-Amjlival. Posteriormente, estas lâminas foram fotomicrografadas utilizando-se um microscópio Olympus BX 60 e filme ASA 100 colorido.

As medições de espessuras foram analisadas utilizando-se delimitamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três medidas. As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, a 1 e 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de brotações em segmentos nodais

Para as três variáveis avaliadas, não foram encontradas diferenças significativas entre os meios de cultura utilizados, nem na interação entre meio de cultura e concentrações de BAP (Tabela 1).

TABELA 1. Análise de variância para formação de brotações, tamanho da brotação e formação de calos em segmentos nodais de ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	GL	QM		
		Formação de brotações (%)*	Tamanho da brotação (cm)*	Formação de calos (%)*
Meio de cultura	1	0,0274	0,00019	0,1098
BAP	4	0,3277**	0,36415**	0,2205**
Meio de cultura x BAP	4	0,0274	0,00366	0,0283
Erro	90	0,0313	0,02230	0,0351
CV (%)		14,85	13,17	15,31

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

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

Comportamento semelhante ocorreu no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de marmelinho (*Tournefortia cf paniculata* Cham.), quando Bertolucci (2000) testou os meios MS, MS 50% e WPM, todos sem a adição de reguladores de crescimento. O autor não encontrou diferenças significativas para o número de brotos formados, nem para seus tamanhos, entre os meios de cultura utilizados no experimento, em nenhuma de suas avaliações (30 e 45 dias após a inoculação). Como foi observado um crescimento vigoroso e um incremento de 30% no tamanho das brotações formadas em meio WPM, concluiu-se que o meio WPM seria o mais eficiente para o desenvolvimento da plântula. Porém, em ingazeiro, não foi encontrada nenhuma diferença em relação à aparência física das brotações obtidas nos diferentes meios de cultura utilizados.

Já Ribeiro (2001), trabalhando com segmentos nodais de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) nos meios de cultura MS, Knudson (modificado por Ardite, 1967), WPM e White (1943), todos acrescidos de 3 mg L⁻¹ de GA₃ e 6 mg L⁻¹ de BAP, encontrou diferenças altamente significativas no número total de brotos e no número de brotos maiores que 1 cm, entre os meios utilizados. No entanto, deve ser destacado que tanto o número total de brotos quanto o número de brotos maiores que 1 cm, apesar de terem respondido significativamente melhor nos meios MS e WPM, não apresentaram nenhuma diferença entre si. Esses resultados estão de acordo com os encontrados com ingazeiro no presente experimento.

Trabalhando com indução de brotações em segmentos nodais cotiledonares e de epicótilos de cedro (*Cedrela fissilis* Vellozo), em sete meios de cultura diferentes suplementados com BAP, Nunes et al. (2002) observaram que, para ambos os explantes, os meios MS e WPM estavam entre os que proporcionaram maior porcentagem de iniciação das brotações e maior número e tamanho de brotações por explante.

Da mesma forma, Catapan et al. (2002), apesar de terem obtido 100% de formação de brotos de *Phyllanthus urinaria* para todos os meios estudados, observaram que o tamanho dos brotos formados foram significativamente maiores nos meios MS e WPM. Porém, para número de brotações por segmento nodal, o meio MS foi significativamente superior ao WPM.

As diferenças de comportamento em relação aos meios de cultura podem estar relacionadas a elementos nutricionais presentes de forma diferenciada nos meios. O meio de cultura MS é o mais concentrado em termos de micro e macronutrientes e é também o mais empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001; Tisserat, 1985). Já o meio de cultura WPM é bastante utilizado em plantas lenhosas, por possuir baixas concentrações de íons totais.

Uma das diferenças marcantes entre esses dois meios de cultura está na concentração de nitrogênio (N_2). O meio WPM possui um quarto da concentração de íons nitrato e amônia em relação ao MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato (Pasqual, 2001). Além disso, a força iônica total do WPM representa 45% do MS (Nunes et al., 2002).

Em ingazeiro, contudo, toda essa diferença iônica entre os dois meios parece não ser suficiente para causar alterações no desenvolvimento das gemas axilares em brotos e nem para provocar toxidez.

A menor quantidade de sais utilizados na composição do meio WPM proporciona, conseqüentemente, um menor gasto e maior economia financeira para o laboratório. Dessa forma, pode-se considerar o meio WPM como o mais indicado na indução de brotações do ingazeiro, já que o fator financeiro é bastante considerado dentro de um laboratório de cultura de tecidos.

Em relação às concentrações de BAP acrescidas aos meios de cultura, encontrou-se uma diferença altamente significativa em todas as variáveis avaliadas. Nos tratamentos em que ocorreu o desenvolvimento da gema lateral em broto, houve formação de apenas uma brotação por explante (Figura 2).

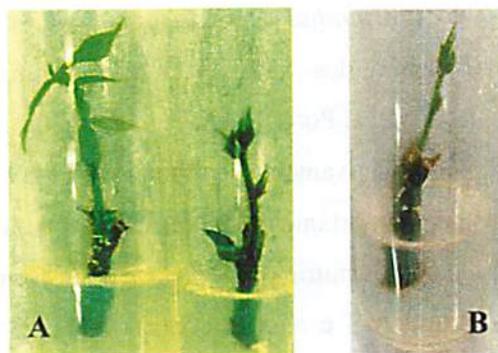


FIGURA 2. Brotações de ingazeiro obtidas de segmentos nodais inoculados em meio WPM (A) e MS (B). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Alguns tratamentos, no entanto, apresentaram formação de calos na extremidade do explante, correspondendo à região na qual foi feito corte (Figura 3).



FIGURA 3. Formação de calos em segmentos nodais de ingazeiro inoculados em meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Para o meio MS, a ausência de BAP foi o tratamento que apresentou significativamente a melhor resposta para formação de brotações (100%) e para tamanho da brotação (0,86 cm). A partir da concentração de 3 até 12 mg L⁻¹ de BAP, as médias observadas para estas duas variáveis foram significativamente menores que o tratamento controle e sem diferença significativa, apresentando uma redução de aproximadamente 60% em ambas. (Figura 4A e B).

No entanto, à medida em que se aumentou a concentração de BAP, estimulou-se a formação de calos. As concentrações de 6, 9 e 12 mg L⁻¹ deste regulador foram as que apresentaram os resultados mais significativos, com 80, 80 e 70% de formação de calos, respectivamente (Figura 4C).

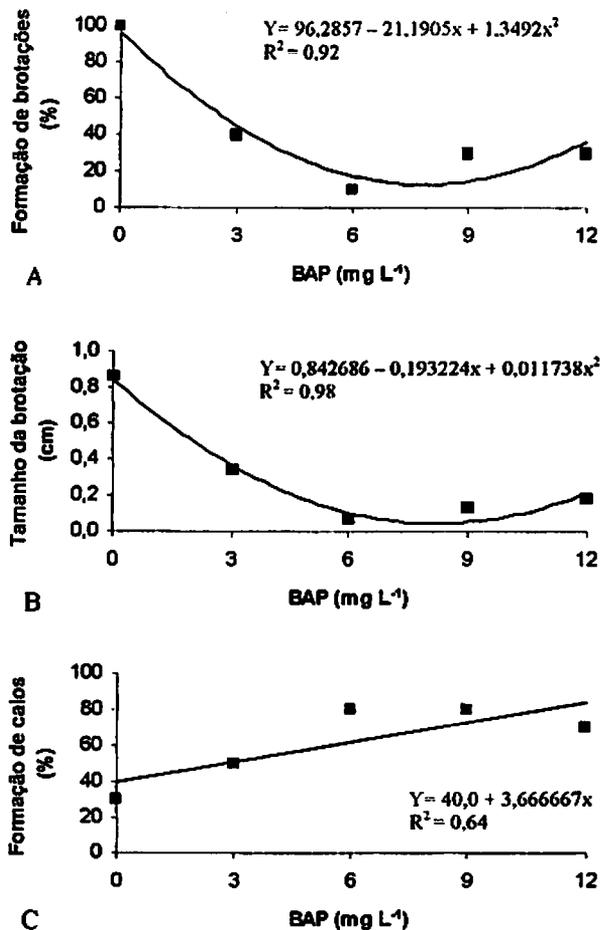


FIGURA 4. Formação de brotações (A), tamanho da brotação (B) e formação de calos (C) em segmentos nodais de ingazeiro, em função da concentração de BAP no meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Já para o meio WPM, as concentrações 0, 3 e 12 mg L⁻¹ de BAP foram as que apresentaram melhores resultados para estimular a brotação das gemas laterais (90, 60 e 60%, respectivamente) (Figura 5A). No entanto, estes brotos tiveram uma média de crescimento significativamente maior (0,97 cm) na

ausência do regulador de crescimento (Figura 5B). Da mesma forma como ocorrido para o meio MS, altas concentrações da citocinina (9 e 12 mg L⁻¹) mostraram-se capazes de levar à formação de calos de forma significativa em segmentos nodais de ingazeiro (80 e 70%, respectivamente) (Figura 5C).

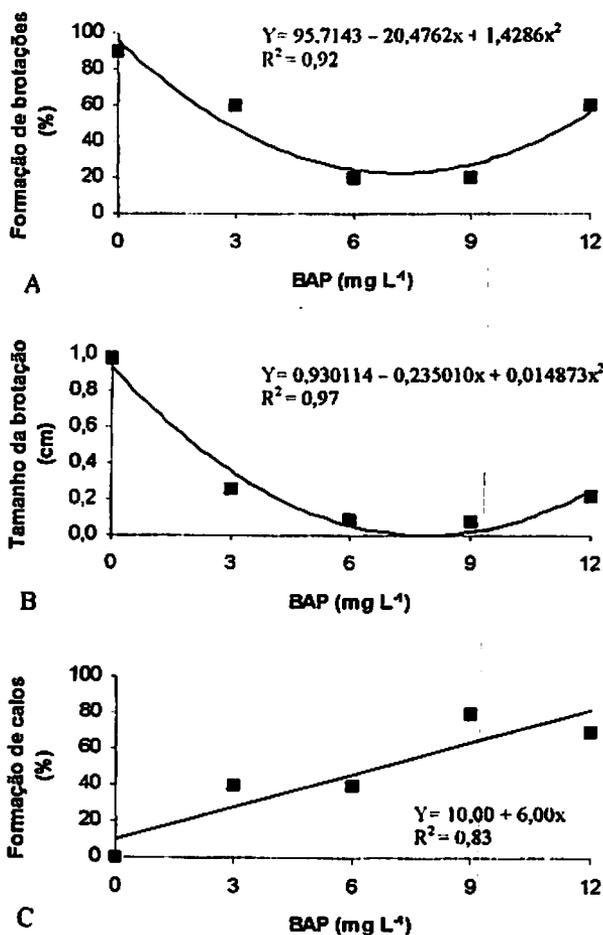


FIGURA 5. Formação de brotações (A), tamanho da brotação (B) e formação de calos (C) em segmentos nodais de ingazeiro, em função da concentração de BAP no meio WPM. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Devem ser ressaltados os resultados obtidos por Fracaro & Echeverrigaray (2001), que apontam o BAP como a principal citocinina para micropropagação de poejo (*Cunila galioides*), quando comparado com cinctina e 2-isopenteniladenina (2-iP). Estes autores obtiveram o número de brotações produzidas proporcionalmente à concentração de BAP até 1,98 mg L⁻¹. A partir deste valor, ocorreu formação de calos, hiperhidricidade e má formação dos brotos, o que os autores consideraram como sendo consequência da toxicidade causada pelo BAP.

Catapan et al. (2002), trabalhando com diferentes concentrações de citocininas na indução de gemas axilares de *Phyllanthus urinaria*, alcançaram o maior número de brotações por explante, utilizando BAP na concentração de 0,28 mg L⁻¹. Concentrações maiores desse regulador de crescimento causaram drástica redução no número de brotações formadas.

Já Bertolucci (2000) mostrou que o BAP foi eficiente para a indução de multibrotações em segmentos nodais de marmelinho. O aumento da concentração do regulador levou também ao acréscimo no número de brotos formados.

Pinto et al. (1994) observaram que as maiores taxas de multiplicação, em segmentos nodais e apicais de *Kielmeyera coriacea* Martius, foram obtidas utilizando-se as concentrações 0,5 e 1 mg L⁻¹ de BAP em segmentos nodais e 0,5 mg L⁻¹ em segmentos apicais.

A combinação entre reguladores de crescimento, geralmente uma auxina com uma citocinina, também é utilizada na tentativa de se obter melhores resultados. Santos (2001) mostrou que, para salix (*Salix humboldtiana* Willd), não há diferenças significativas no desenvolvimento de brotações de segmentos nodais inoculados em meio MS sem regulador de crescimento ou acrescido de BAP ou ácido giberélico (GA₃). Segundo o autor, foi observado desenvolvimento das brotações em todos os tratamentos. Porém, na ausência de

reguladores, o número de brotos por explante foi significativamente inferior a qualquer tratamento.

Silva (2001), trabalhando com diferentes concentrações de BAP e GA₃ em gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.), alcançou o maior número de brotos com 1 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 20 mg L⁻¹ de GA₃. Segundo o autor, o emprego de GA₃, apesar de apresentar resultados contraditórios para algumas espécies, pode estimular a formação de brotos *in vitro*, principalmente em interação com outros reguladores de crescimento. Para a altura média de brotos, os melhores resultados foram obtidos em meios de cultura com altas concentrações de GA₃ e ausência de BAP.

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 mg L⁻¹, ambos na ausência de ácido naftaleno acético (ANA), maximizou a média do número de brotos por segmento nodal. Já Mesquita (1999), trabalhando com lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), obteve desenvolvimento de gemas nos segmentos nodais, independente das concentrações utilizadas dos mesmos reguladores. Porém, houve formação de calos na base dos segmentos, 30 dias após a inoculação.

Para desencadear um processo morfogenético, é necessário, na maioria dos casos, adicionar reguladores de crescimento ao meio nutritivo (Gomes 1999). Porém, o acréscimo de BAP em cultura de segmentos nodais do ingazeiro, apesar de ter propiciado um processo morfogenético (formação de calos), não levou ao incremento no número de brotações nem no seu tamanho.

O crescimento e a morfogênese são fatores controlados pela interação entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e as substâncias de crescimento endógenas ao explante (George, 1996). Certos genótipos de plantas possuem um balanço hormonal satisfatório, o que faz com que as células sejam predeterminadas a se desenvolverem e, sob certas

circunstâncias ainda não totalmente compreendidas, consegue-se regeneração de plantas *in vitro* sem o acréscimo de regulador de crescimento ao meio de cultura.

Em ingazeiro, a ausência de BAP manteve a dominância da gema apical, fazendo-a desenvolver-se em broto. Na medida em que aumentou sua concentração no meio de cultura, a dominância da gema axilar perdeu força, de modo que, com o uso de 3 mg L^{-1} de BAP, não houve mais desenvolvimento de brotos nos segmentos nodais inoculados. Este fato apontou a alta sensibilidade do ingazeiro às alterações no nível de BAP.

É provável que o novo balanço hormonal causado pela citocinina exógena aplicada, além de ocasionar perda da dominância apical, ocasionou também o surgimento de calos.

Para obtenção de multibrotações no ingazeiro, os resultados deste estudo sugerem o uso de concentrações de BAP inferiores a 3 mg L^{-1} , tanto em meio MS quanto em WPM. Esse caminho pode levar a um balanço hormonal interno à planta, favorável ao surgimento das multibrotações, como demonstrado em outros trabalhos citados anteriormente.

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

Nas seções transversais das lâminas foliares de ingazeiro, observou-se que nas folhas formadas *in vitro* e *in vivo* o mesofilo já se encontra diferenciado nos dois tipos de parênquima clorofiliano (o paliádico e o esponjoso ou lacunoso) e nos espaços intercelulares.

A alta proporção de espaços intercelulares é um fator que pode contribuir para a dessecação das mudas em um processo de aclimatização. No entanto, nota-se que não houve alta redução da diferenciação do mesofilo das folhas produzidas *in vitro*, em relação a vários estudos.

Nota-se, ainda, que, em ambas as condições de cultivo, as epidermes abaxial e adaxial são compostas por apenas uma camada de células (epiderme

uniestratificada) revestidas pela cutícula. O mesofilo é dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina (adaxial ou ventral) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial ou dorsal) (Figura 6).

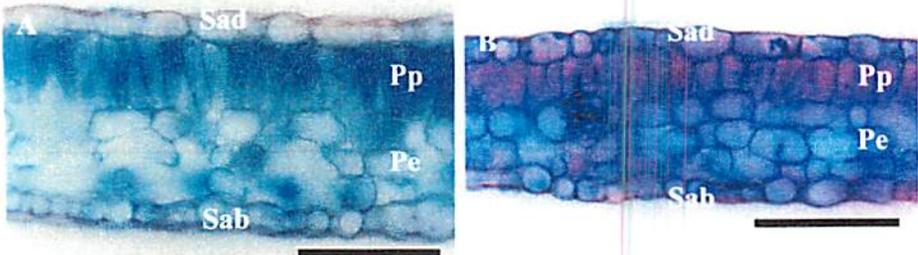


FIGURA 6. Seções transversais de lâminas foliares obtidas de ingazeiro cultivado *in vivo* (A) e *in vitro* (B), evidenciando o parênquima paliçádico (Pp), o parênquima esponjoso (Pe), a superfície adaxial (Sad) e a superfície abaxial (Sab). As barras nas figuras correspondem a 50 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Além da organização anatômica dos tecidos foliares apresentar várias diferenças entre os dois tipos de cultivo, como a forma e o arranjo das células, os espaços intercelulares e a espessura da cutícula, as medidas das espessuras da epiderme abaxial, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso das folhas de ingazeiro diferiram de forma significativa entre os cultivos *in vivo* e *in vitro*. Somente a epiderme adaxial não apresentou diferença significativa (Tabela 2).

TABELA 2. 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* do ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Fontes de variação	GL	QM			
		Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso
Tipo de cultivo	1	0,001920	1,399680**	1074,248*	1393,736*
Erro	28	0,072686	0,249051	1,642971	1,359909
CV (%)		2,35	4,86	4,35	3,15

* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

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

Fidelis (1998) observou que a superfície adaxial das lâminas foliares de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.) obtidas *in vitro* e *in vivo* apresentavam também apenas uma camada de células.

Em relação à epiderme abaxial das lâminas foliares, as folhas obtidas pelo cultivo *in vivo* apresentam uma média de 0,018 μm maior que a de folhas obtidas pelo cultivo *in vitro* (Tabela 3). Provavelmente, esse fato pode estar relacionado à irradiação nas folhas cultivadas nos diferentes ambientes. A maior irradiação nas folhas produzidas *in vivo* ocasionou o aumento na espessura da epiderme abaxial, como forma de minimizar os efeitos negativos do excesso de radiação luminosa na planta.

TABELA 3. Efeito do tipo cultivo na espessura da epiderme abaxial, do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso de lâminas foliares de ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tipo de cultivo	Espessuras médias observadas (μm)		
	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso
<i>In vivo</i>	10,480 a*	35,456 a*	43,840 a*
<i>In vitro</i>	10,048 b	23,488 b	30,208 b

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

Um aspecto visível nas epidermes adaxial e abaxial das folhas produzidas tanto pelo cultivo *in vitro* quanto pelo *in vivo*, é a cutícula. Mesmo esta sendo visualmente mais espessa na folhas produzidas pelo cultivo *in vivo*, sua presença nas folhas obtidas *in vitro* é muito importante. A cutícula, assim como os estômatos, está relacionada à umidade do ambiente. Esta pode evitar a perda excessiva de água pela planta, sendo um fator benéfico para sobrevivência de plântulas produzidas *in vitro* em ambientes com menor umidade (ambiente *ex vitro*, por exemplo).

O parênquima paliçádico das lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vivo* e *in vitro* apresentou, em ambas, apenas uma camada de células. No entanto, o parênquima paliçádico das folhas obtidas *in vivo* foram 0,499 µm mais espessas que o das obtidas *in vitro* (Tabela 3).

A maior espessura do parênquima paliçádico das folhas produzidas *in vivo* é devido às células pertencentes à esta porção do mesófilo serem mais alongadas e mais justapostas, apresentando um menor espaço intercelular.

Santos (2001), trabalhando com lâminas foliares de cafeeiro (*Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã'), obtidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*, observou que, nos dois tratamentos, o parênquima paliçádico das folhas era constituído por apenas uma camada de células na cultivar Rubi e estratificado na cultivar Apoatã. Entretanto, o parênquima paliçádico das folhas obtidas *in vivo* possuíam sempre células maiores que o das folhas obtidas *in vitro*.

O parênquima esponjoso das lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vitro* apresentou de duas a três camadas de células e o das obtidas pelo cultivo *in vivo* três camadas. Contudo, o parênquima esponjoso das folhas obtidas *in vivo* foi 0,568 µm mais espesso que o das obtidas *in vitro* (Tabela 3).

Santos (2001) trabalhou com lâminas foliares de cafeeiro obtidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*. Na cultivar Rubi, a autora observou um parênquima

esponjoso formado de cinco a seis camadas de células nas folhas obtidas *in vitro* e de oito camadas de células nas folhas obtidas *in vivo*. Na cultivar Apoatã, a autora observou o parênquima paliçádico com quatro camadas de células nas folhas obtidas *in vitro* e de nove a dez camadas de células nas folhas obtidas *in vivo*.

Fidelis (1998) observou que o mesofilo de folhas de mama-cadela cultivadas *in vivo* apresentou de três a quatro estratos de células. No entanto, estas não possuíam diferenças no formato, impossibilitando a distinção dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Já nas folhas cultivadas *in vivo*, o autor verificou que o mesofilo apresentava uma camada de células no parênquima paliçádico e duas no parênquima esponjoso.

Percebe-se que as diferenças entre as lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vivo* e *in vitro* foram causadas, principalmente, pela espessura da epiderme abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso e não pelo número de camadas de células do mesofilo. Enquanto apenas o parênquima esponjoso apresentou diferenças no número de camada de células entre os cultivos *in vitro* e *in vivo* (uma camada a mais para o cultivo *in vivo*), as espessuras da epiderme abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso apresentaram sempre significativamente maiores nas lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vivo*. As diferentes condições de umidade relativa, de luz e de assepsia entre os ambientes *in vivo* e *in vitro* podem ter contribuído para as diferenças observadas na lâmina foliar do ingazeiro.

As seções transversais da nervura mediana das folhas obtidas pelo cultivo *in vivo* e *in vitro* apresentaram diferenças no sistema vascular (Figura 7).

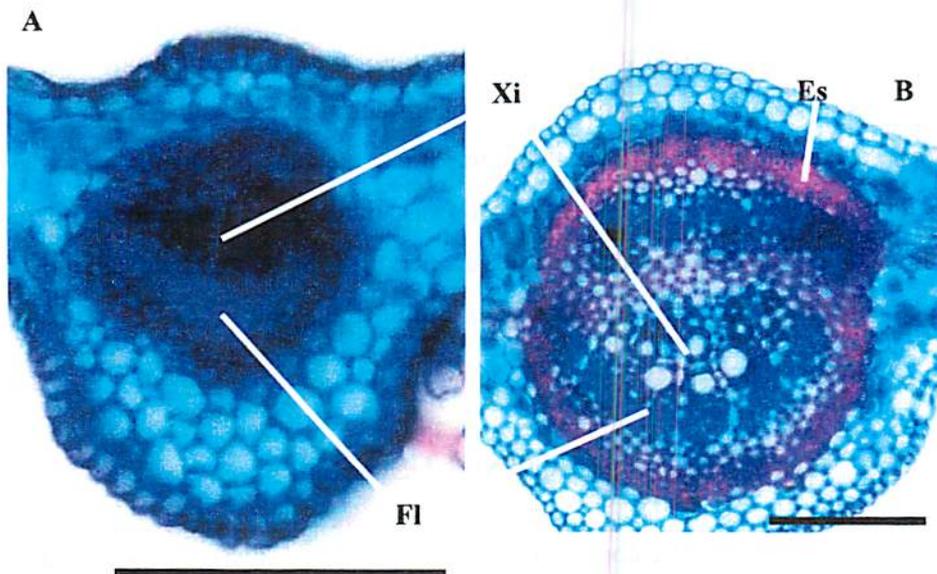


FIGURA 7. Secções transversais da nervura central de folhas de ingazeiro obtidas pelo cultivo *in vitro* (A) e *in vivo* (B), evidenciando o xilema (Xi), o floema (Fl) e o esclerênquima (Es). As barras nas figuras correspondem a 50 μm . UFLA, Lavras, MG, 2002.

Uma das diferenças verificadas entre a região vascular da nervura central das folhas produzidas *in vivo* e *in vitro* é o esclerênquima. Observa-se que este envolveu completamente os feixes vasculares das folhas obtidas pelo cultivo *in vivo*, formando um cordão com grande quantidade de fibras pericíclicas, e esteve ausente nos feixes vasculares das folhas obtidas pelo cultivo *in vitro*. O esclerênquima é um tecido que fica próximo do eixo vascular, responsável por dar maior sustentação para as plantas. Desta forma, a ausência desta estrutura em folhas micropropagadas as torna menos resistentes e com aparência mais frágil.

Outra diferença que se pode observar está nas células dos vasos do xilema. A nervura central de folhas obtidas pelo cultivo *in vitro* apresentou estas células em menor número, tamanho e espessura que as células do xilema da nervura central de folhas cultivadas *in vivo*.

Santos (2001), trabalhando com cortes histológicos da nervura de folhas de cafeeiro ('Rubi') obtidas *in vitro* e *in vivo*, obteve resultado bastante semelhante. Em condições *in vivo*, a autora observou um aumento de células em altura e largura. Pecíolos de plantas de bétulas que se desenvolveram *in vitro* não apresentaram colênquima, quando comparados àquelas de plantas crescidas no campo (Donnelly et al., 1985). Tecidos vasculares das folhas micropropagadas de bétula tinham número reduzido de nervuras, se comparado às folhas de plantas crescidas em casa de vegetação (Smith et al., 1986).

6 CONCLUSÕES

Maior número e comprimento de brotações de ingazeiro são obtidas em meio MS ou WPM na ausência de BAP.

Concentrações de BAP superiores a 3 mg L⁻¹ suplementando os meios MS ou WPM induzem à formação de calos em segmentos nodais de ingazeiro.

As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* apresentam os parênquimas paliádico e esponjoso e a epiderme abaxial mais espessos que no cultivo *in vitro*.

O sistema vascular observado em folhas produzidas *in vivo* é mais desenvolvido que *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedlings. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 54, n. 3, p. 291-298, Mar, 1967.

BARBEDO, C. J. Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. 1997. 71p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BERTOLUCCI, S.K.V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

CASTRO, Y.G.P.; KRUG H.P. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis* - espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura*, v. 3, n. 4, p. 263-264, 1951.

CATAPAN, E. et al. Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 70, p. 301-309, 2002.

COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de Sucupira Branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. 1999. 119p. Dissertação (Mestrado 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, p. 69-75, 1984.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, Dordrecht, v. 4, p. 43-50, 1985.

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

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 64, p. 1-4, 2001.

GASPAR, T. et al. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff. 1987. v. 1, p. 152-166.

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

GOMES, G.A.C. *Propagação in vitro de Moreira (Maclura tinctoria)*. 1999. 92p. 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.

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

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.

LIEBERG, S.A. *Tolerância à inundação e aspectos demográficos de Inga affinis DC*. 1990. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

LIEBERG, S.A.; JOLY, C.A. *Inga affinis DC (Mimosaceae): germinação e tolerância à submersão*. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 16, n. 2, p. 175-179. 1993.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. *HortScience*, v. 15, n. 3, p. 416, jun. 1980.

MAUMONT, S. Seed-coat anatomy of the non-pleurogamic seeds in the tribe Ingeae (Leguminosae, Mimosoideae). *Brittonia*, v. 45, p. 249-259, 1993.

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.

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.

NUNES E.C. et al. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 70, p. 261-268, 2002.

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

PEREIRA-NETTO, A.B. *In vitro* propagation of *Hancornia speciosa*, a tropical fruit tree. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Dordrecht, v. 32, p. 253-256, Oct./Dec. 1996.

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

PINTO, J.E.B.P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 6, p. 867-873, jun. 1994.

RIBEIRO, L.S. Cultura *in vitro* de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SASS, J. *Botanical microtechnique*. Iowa: Iowa College, 1951. 228p.

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

SILVA, A.B. **Multiplicação *in vitro* e aclimatização de Gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.).** 2001. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SMITH, M.A.L.; PALTA, J.P.; MCCOWN, B.H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling and greenhouse-grown Asian white birch. **Journal of American Society for Horticultural Science, Virginia, v. 111, n. 3, p. 437-442, 1986.**

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

WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture,** Lancaster: Costel, 1943. 173p.

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 3 - Indução de calos em explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro

1 RESUMO

SOARES, Gustavo de Araújo. Indução de calos em explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro. In: _____. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]. 2003. p.59-77. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Este trabalho avaliou o efeito de diferentes concentrações do 2,4-D em explantes foliares e de segmentos internodais do ingazeiro. Segmentos internodais e foliares foram retirados de plantas matrizes jovens e inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 2,4-D nas concentrações 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro. Segmentos internodais apresentaram médias de formação de calos e porcentagem da área do explante coberta por calos maiores que as dos segmentos foliares. Em explantes foliares, 1 mg L⁻¹, seguida por 2,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, proporcionaram os melhores resultados na indução de calos. Pela análise de regressão, 1 mg L⁻¹ de 2,4-D também proporcionou a maior área do explante foliar ocupada por calos. Em explantes de segmentos internodais, 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D foram as mais eficientes para induzir calogênese, formando calos em todos os explantes inoculados. Pela análise de regressão, a porcentagem da área do explante de segmento internodal ocupada por calos mostrou uma relação linear em relação às concentrações de 2,4-D. A partir desses resultados conclui-se que, para se obter calos de ingazeiro, sugere-se a utilização de segmentos internodais como explantes.

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

2 ABSTRACT

SOARES, Gustavo de Araújo. Induction of callus in leaf and nodal segments of ingazeiro. In: _____. *Aspects of the in vitro culture of ingazeiro [Inga vera Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn.].* 2003. p.59-77. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras*

This work evaluated the effect of different concentration of 2,4-D in leaf and nodal segment explants of ingazeiro. Leaf and nodal segments were extracted from young matrix plants and inoculated in MS supplemented with the following 2,4-D concentrations (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5). After inoculation the explants were maintained in the dark. Nodal segments presented higher callus formation and explant area covered with callus compared to leaf explants. For leaf explants, the use of 1.0 mg L⁻¹ followed by 2.5 mg L⁻¹ induced higher callus formation. Through the regression analysis, the use of 1.0 mg L⁻¹ also promoted larger leaf area covered with callus. In nodal segments, the use of 1.0 and 3.0 mg L⁻¹ induced calogenesis forming callus in all explants inoculated. Through the regression analysis the percentage of nodal segment area covered with callus showed a liner response with the 2,4-D concentrations. These results suggest the use of nodal segments to induce callus formation in ingazeiro.

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

3 INTRODUÇÃO

A cultura de calos tem tido grande importância para a propagação *in vitro* em larga escala de diversas espécies vegetais. O calo é uma massa de células que se proliferam desordenadamente, formando um tecido mais ou menos organizado, que geralmente surge sobre feridas de órgãos e tecidos diferenciados. Os calos se desenvolvem a partir de um pequeno pedaço de órgão de determinada planta e possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras (Paiva & Paiva, 2001; Pierik, 1990; Torres & Caldas, 1990).

Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, como, por exemplo, genótipo, idade da planta, do órgão ou do tecido e estado fisiológico, pelo meio nutritivo, acrescidos ou não de reguladores de crescimento e por fatores físicos externos, como luz e temperatura. Esses fatores agem acelerando, retardando ou até mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento de um calo.

Um dos fatores mais importantes para se obter calogênese é a escolha do explante (Bonga, 1977), uma vez que o potencial morfogenético dos calos geralmente varia com a origem deste (Mehra & Mehra, 1974).

Teoricamente, para ocorrer a indução de calos, qualquer tecido pode ser utilizado como explante em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que contenham maior capacidade de expressar totipotência (Grattapaglia & Machado, 1998). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de tecidos, por possuírem alta capacidade de regeneração (Pierik, 1990).

Além disso, para a indução da formação de calos, muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento, sendo que a necessidade do regulador, no que diz respeito ao tipo, concentração, relação auxina/citocinina, depende do genótipo e do conteúdo endógeno de hormônio do vegetal (Viêtz & San-José, 1996). Dessa forma, o balanço obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta podem estimular a proliferação celular. Porém, segundo Ozias-Akins & Vasil (1985), citocininas exógenas nem sempre são necessárias e muitos tecidos desenvolvem indefinidamente *in vitro* apenas com suprimento de auxinas.

No entanto, altas taxas de multiplicação celular podem levar ao declínio da competência organogênica, à instabilidade genética e à vitrificação do material *in vitro* (Shargool & Ngo, 1994). Quando se observa variação genética no material *in vitro* ou em plantas já regeneradas, utiliza-se o termo variação somaclonal para designar tal fato (Pierik, 1990). Além das altas taxas de multiplicação, outros motivos podem levar ao aparecimento de variações somaclonais: tempo de duração da cultura, desordens fisiológicas devido a substâncias mutagênicas (reguladores de crescimento, por exemplo) ou à resposta a algum tipo de stress, mudanças diretas nos cromossomos, origem do explante, entre outros (Shargool & Ngo, 1994).

Essas mutações são consideradas como sendo o maior problema da micropropagação, quando esta tem o objetivo de clonar genótipos selecionados. No entanto, a possibilidade que existe de se obter variações genéticas nos descendentes constitui uma vantagem quando se trata de espécies utilizadas para revegetação de áreas, pois garante a biodiversidade.

Uma das espécies utilizadas para recomposição de áreas degradadas nas margens de reservatórios e rios é o ingazeiro. Esta espécie possui características que produzem efeito positivo na recuperação da fertilidade de solos, por meio da fixação de nitrogênio, da adição de carbono (pela grande produção de

serrapilheira) e do aumento dos níveis de fósforo, em forma extraível pela planta, na superfície do solo (Lieberg & Joly, 1993).

Apesar das sementes das espécies deste gênero apresentarem elevada porcentagem de germinação (Castro & Krug, 1951), estudos referentes ao armazenamento de suas sementes têm indicado uma dificuldade em conservá-las por longos períodos (Castro & Krug, 1951; Lieberg & Joly 1993).

Espécies como o ingazeiro, que possuem características de germinação que dificultam a produção de grande número de mudas durante o ano todo, têm, na técnica de cultura de tecidos vegetais, uma aliada para sua propagação. A obtenção de calos pode ser o ponto de partida para futuros trabalhos de embriogênese somática ou de regeneração de plantas saudias com alguma taxa de variabilidade genética.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) em explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro, visando a calogênese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Plantas matrizes jovens de ingazeiro foram obtidas do viveiro de mudas da Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na Represa de Camargos, município de Itutinga, Minas Gerais. Estas plantas foram mantidas em sala de crescimento do Sctor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas, e foram utilizadas como fonte de explantes.

Desinfestação e inoculação do material vegetal

As plantas matrizes, com cerca de 8 meses de idade, foram tratadas com solução de Benlate 0,5% (p/v) e, 24 horas depois, ramos que continham caule e folhas foram retirados. Em seguida, estes ramos foram divididos em segmentos internodais e folhas, passando por lavagem em água com detergente por 20 minutos e, depois, em água corrente por mais 30 minutos. Posteriormente, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, lavados em água destilada e imersos em solução de Benlate 0,3% (p/v), por 30 minutos. Após nova lavagem em água destilada, as folhas e os segmentos internodais foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo para folhas e 2% para segmentos internodais), onde permaneceram por 20 minutos. Finalmente, em condições assépticas, os explantes passaram por quatro lavagens em água destilada e autoclavada.

Segmentos foliares de 1 cm² foram inoculados com a superfície abaxial voltada para o meio de cultura, enquanto os segmentos internodais de 1,5 cm foram inoculados na posição horizontal com pequenos cortes.

Ambos os explantes foram inoculados em meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescidos de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) nas concentrações 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 mg L⁻¹ e 3 g L⁻¹ de sacarose. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e seu pH ajustado em 5,6, antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos no escuro em sala de crescimento a 27 ± 2°C.

A avaliação foi feita 30 dias após a inoculação, observando a presença ou ausência de calos e a porcentagem da área do explante ocupada por estes (0, 25, 50, 75 ou 100%).

Delineamento experimental

Os dados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante. Os valores da variável formação de calos foram transformados para $(Y + 1,0)^{0,5}$ e os valores da variável porcentagem da área do explante coberta por calos foram transformados para $\text{asen}(Y/100)^{0,5}$. Os dados foram analisados por meio de regressão polinomial ou pelo teste de médias Scott-Knott, a 1% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças altamente significativas entre os explantes e concentrações de 2,4-D para ambas as variáveis avaliadas. Porém, a interação explante e concentração de 2,4-D não apresentou diferenças significativas para nenhuma das variáveis (Tabela 4).

TABELA 4. Análise de variância para formação de calos e porcentagem da área do explante coberta por calos em segmentos internodais e folhas de ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	GL	QM	
		Formação de calos (%)*	Área do explante coberta por calos (%)**
Explante	1	0,2402***	9,0780***
2,4-D	6	0,2271***	1,3114***
Explante x 2,4-D	6	0,0229	0,3226
Erro	126	0,0291	0,2085
CV (%)		13,42	73,30

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

** Observações transformadas segundo $\text{asen}(Y/100)^{0,5}$.

*** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

O uso de segmento internodal como explante proporcionou médias de formação de calo e de porcentagem da área do explante coberta por calos significativamente maiores que o explante foliar. As médias de formação de calo e de porcentagem da área do explante coberta por calos em explantes de segmentos internodais foram 35,7 e 160% maiores que em explante foliar, respectivamente (Tabela 5, Figura 8).

TABELA 5. Efeito do tipo de explante na formação de calos e na porcentagem de área do explante coberta por calos em ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Explante	Médias observadas	
	Formação de calos (%)	Área do explante coberta por calos (%)
Folha	0,56 b*	21,43 b
Segmento internodal	0,76 a	55,71 a

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

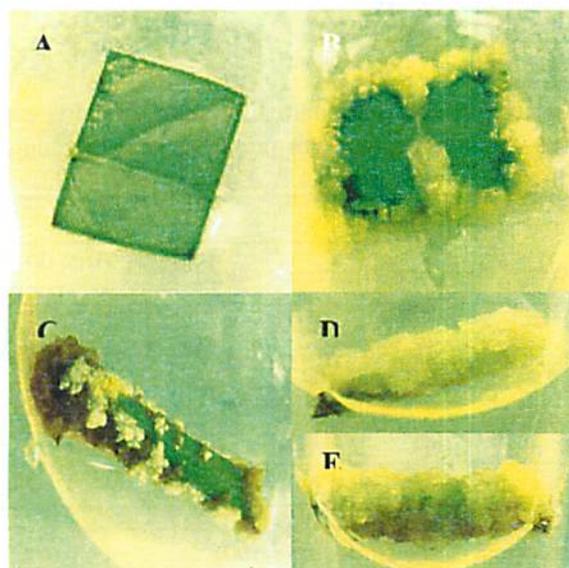


FIGURA 8. Indução de calos em explantes foliares (A e B) e de segmentos internodais (C, D e E) de ingazeiro inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Resultados contraditórios aos apresentados foram encontrados por Abreu (1998). Trabalhando com indução de calos em folhas jovens, gemas apicais e internódios jovens de insulina vegetal (*Cissus sicyoides*) em meio MS suplementado com 2,4-D, a autora observou melhor formação de calos utilizando folhas jovens como explante. Da mesma forma, Cerqueira (1999) observou que o segmento foliar foi o explante mais adequado para indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), em relação aos segmentos caulinares.

Já Rodrigues (2000), utilizando segmentos nodais, ápices, discos foliares, epicótilos e cotilédones como explantes em um trabalho de indução de calos em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willdenow ex Sprengel), chegou à conclusão que, ao contrário de todos os outros explantes utilizados, os cotilédones foram os mais responsivos à formação de calos na presença de 2,4-D. Segundo o autor, seus resultados estavam de acordo com o trabalho de Gill et al. (1994) com a mesma espécie vegetal, no qual também foram obtidos calos de diferentes explantes.

Segundo Pierik (1990), o material vegetal por si só pode influenciar no crescimento e no desenvolvimento *in vitro*. Dentre os vários aspectos apontados pelo autor, destacam-se a idade do órgão ou do tecido inoculado, o tamanho do explante e o tipo de lesão, os quais explicam as diferenças obtidas no presente experimento.

Os tecidos jovens, não lignificados, geralmente são mais apropriados para o cultivo *in vitro* que os tecidos velhos e lenhosos. Conforme envelhece o órgão do qual se retira o explante, o número de divisões celulares e a capacidade de regeneração diminuem (Pierik, 1990). Além disso, um explante com células jovens (meristemáticas) apresenta um grande potencial para iniciar a proliferação celular rapidamente, quando comparada com tecidos onde há presença de células diferenciadas. Dessa forma, o ingazeiro apresentou mais

eficiência na formação e proliferação de calos em explantes de segmentos internodais, possivelmente por esse tipo de explante possuir maior número de células indiferenciadas em relação aos explantes foliares. Mesmo que, por observação visual, as folhas pareçam menos lignificadas, nessa espécie esse fato parece ser menos importante que a possível presença de um grande número de células jovens indiferenciadas com alto potencial de reprodução para formação de calos.

Em relação ao tamanho do explante, em termos gerais, pode-se dizer que é mais trabalhoso induzir o crescimento em explantes menores que em explantes maiores. Todo segmento inoculado de uma planta tem sua própria porção de reservas e hormônios, que varia com seu tamanho. Dessa forma, quanto maior for o fragmento vegetal, mais fácil fica para induzir o crescimento e a regeneração (Pierik, 1990). A diferença existente tanto na área quanto no volume dos explantes foliares e de segmentos internodais utilizados em ingazeiro realmente pode ser uma das causas que influenciaram os resultados encontrados. Segmentos internodais possuem área e volume consideravelmente maiores que os dos segmentos foliares inoculados.

Vale lembrar ainda que, no momento da inoculação, foram feitos pequenos cortes apenas na superfície dos segmentos internodais. Os resultados apresentados pelos explantes foliares, cujas lesões foram apenas nas laterais cortadas, podem ter sido prejudicados justamente por possuir poucos ferimentos. Pierik (1990) afirma que a superfície do tecido lesionada pode ser de grande importância. Um aumento nessa superfície eleva a possibilidade de absorção de nutrientes e reguladores. Tal fato proporciona um aumento na produção de etileno. Ao mesmo tempo, as feridas ou lesões podem romper barreiras anatômicas, facilitando a formação de calos.

Analisando separadamente cada tipo de explante utilizado neste trabalho, quase todas as variáveis apresentaram diferenças significativas entre os valores

obtidos para as concentrações do regulador utilizado. Para o explante foliar, todos os tratamentos que continham 2,4-D foram significativamente iguais entre si, mas superiores à testemunha, na indução de calos. A concentração 1 mg L⁻¹, seguida por 2,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, foi a que apresentou maiores resultados para essa variável, 90 e 80%, respectivamente. Por outro lado, na ausência do regulador não houve formação de calos (Figura 9).

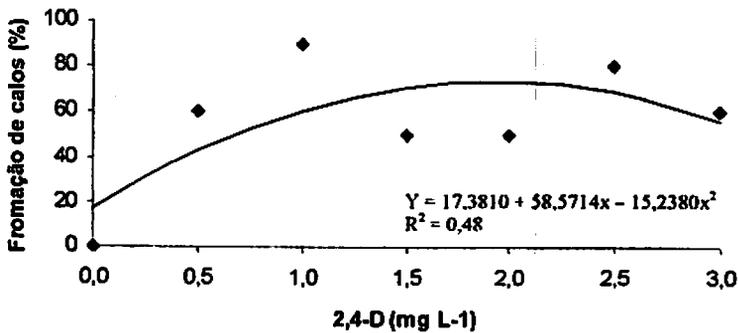


FIGURA 9. Formação de calos em explantes foliares de ingazeiro tratados com 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Pela análise de regressão, pode-se observar que o 2,4-D, também na concentração de 1,0 mg L⁻¹, apresentou a melhor resposta (40%) na porcentagem da área do explante coberta por calos. Novamente, a concentração 2,5 mg L⁻¹ foi a segunda melhor, juntamente com 2,0 mg L⁻¹, atingindo, ambas, 27,5% da área do explante com formação de calos (Figura 10).

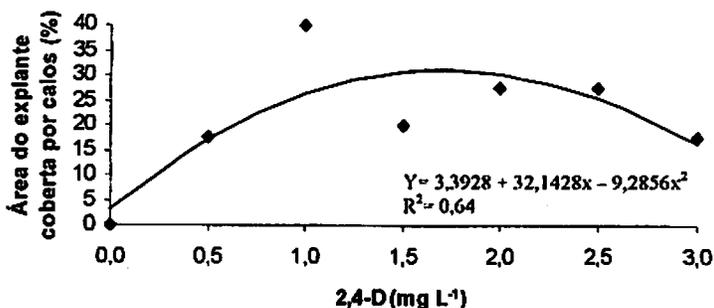


FIGURA 10. Porcentagem da área do explante foliar de ingazeiro ocupada por calos em resposta ao tratamento com 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Derivando-se a equação obtida pela análise de regressão, obtém-se o valor de 1,73 mg L⁻¹ como ponto de máximo da curva. Isso significa ser esta a concentração exata de 2,4-D, na qual se obtém a máxima porcentagem de área do explante foliar ocupada por calo.

Curiosamente, os explantes foliares apresentaram um padrão de médias observadas em resposta ao 2,4-D bastante semelhante nas duas variáveis analisadas, percebendo-se apenas pequena alteração na concentração 2 mg L⁻¹. Esse fato indica a íntima relação que há entre a formação do calo e o seu crescimento. Na verdade, o fator que está relacionado a essas duas variáveis é a capacidade das células do explante se dividirem em resposta à concentração da auxina utilizada. De acordo com a concentração de 2,4-D presente no meio, as células podem ser estimuladas a se dividirem em maior ou menor intensidade ou, então, podem até mesmo ser inibidas. Essa divisão estimulada leva à formação de uma massa de células jovens pouco diferenciadas, ou seja, o calo.

Abreu (1998), trabalhando com indução de calos em explantes foliares de insulina vegetal em meio MS suplementado com 2,4-D, obteve calos em

todas concentrações utilizadas (0,09; 0,48; 0,97 e 1,99 mg L⁻¹), com exceção do controle. Porém, a autora recomenda a concentração de 0,09 mg L⁻¹, por apresentar calos com maior ganho de peso e ausência de sinais de necrose.

Da mesma forma, Fortes (1992) obteve menor porcentagem de formação de calos nas culturas com macieira (*Malus spp*) quando não acrescentou 2,4-D ao meio de cultura. A melhor concentração de 2,4-D para a variável avaliada foi cerca de 2 mg L⁻¹, dependendo da cultivar.

Paiva-Neto (1996) obteve formação de calos e raízes em tecidos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) quando acrescentou 2,4-D ao meio de cultura. A combinação deste regulador de crescimento com a citocinina benzilaminopurina (BAP) reduziu a porcentagem de explantes com calos, inibindo a rizogênese. A melhor concentração de 2,4-D obtida foi 6,36 mg L⁻¹, tanto aos 20 quanto aos 30 dias após a inoculação. Nenhuma formação de calos foi obtida na ausência de 2,4-D ou BAP.

Em alguns trabalhos, os autores acrescentam dois reguladores de crescimento ao meio de cultura, com o intuito de obter um balanço hormonal favorável à obtenção de calos. Como exemplo, Santos (2001) interagiu duas auxinas, o 2,4-D e o ácido indol acético (AIB), em um experimento de indução de calos em explantes foliares de cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em meio MS 50%. Neste caso, a interação entre os reguladores de crescimento não influenciou nos resultados, já que a produção máxima de calos obtida foi com 1 mg L⁻¹ apenas de 2,4-D para as cultivares 'Rubi' e 'Topázio' e em 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D para a cultivar 'Apoatã'.

A formação de calos pode ser obtida também interagindo uma auxina com uma citocinina. Cerqueira (1999) obteve maior indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro utilizando 2 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) combinado com 2 mg L⁻¹ de BAP, obtendo 100% da área do explante coberta por calos.

Nos explantes de segmento internodal houve formação de calos em todos os tratamentos utilizados, inclusive na ausência de 2,4-D (Figura 11). A ausência e a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D não apresentaram diferenças significativas. Da mesma forma ocorreu entre as concentrações 0,5; 1; 2; 2,5 e 3 mg L⁻¹, porém, foram significativamente melhores que os dois primeiros. Nas concentrações 1 e 3 mg L⁻¹ ocorreram formações de calos em todos os explantes inoculados, enquanto que, na concentração 2 mg L⁻¹, esse valor foi de 90%. O tratamento controle, no qual não se utilizou 2,4-D, proporcionou 30% de explantes com calos formados.

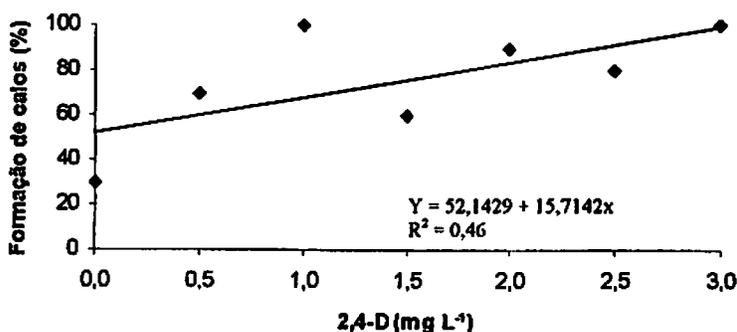


FIGURA 11. Formação de calos em segmentos internodais de ingazeiro tratados com 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A porcentagem da área do explante ocupada por calos tem relação linear em relação à concentração de 2,4-D no meio de cultura. Assim, a concentração de 3 mg.L⁻¹ foi a que apresentou o melhor resultado para essa variável, alcançando 80% da área do explante com calos (Figura 12).

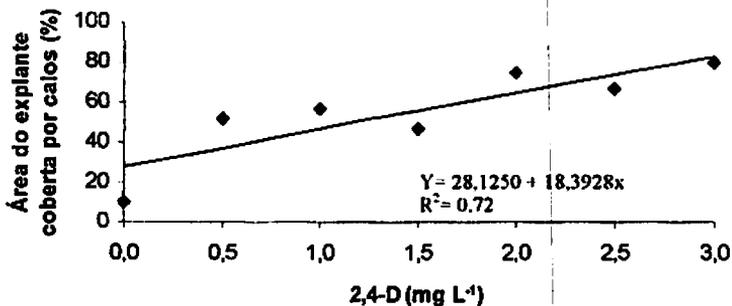


FIGURA 12. Porcentagem da área do explante do segmento internodal de ingazeiro ocupada por calos em resposta ao tratamento com 2,4-D. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Novamente, o padrão das médias observadas em resposta ao 2,4-D obtidos para formação de calos se repete na porcentagem da área do explante coberta por calos. A explicação para este fato ocorrido em explantes de segmentos internodais é a mesma dada para explantes foliares. Ou seja, existe uma íntima relação entre a formação do calo e o seu crescimento, já que o fator que está relacionado a essas duas variáveis é a capacidade das células do explante se dividirem. Dessa forma, a sua repetição dá maior credibilidade à explicação proposta.

Paiva-Neto (1996), trabalhando com explantes de segmentos nodais de moreira, obteve formação de calos em todas as concentrações de 2,4-D utilizadas. Somente no controle não ocorreu calogênese. Esses resultados, associados aos obtidos com segmentos foliares já apresentados, levaram o autor a concluir a necessidade de uso de 2,4-D para indução de calogênese nessa espécie.

Comparando a utilização de 2,4-D e do ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico (dicamba) para indução de calos em cupuaçu, Rodrigues (2000)

comprovou a maior eficiência do 2,4-D. Explantes de discos foliares jovens obtiveram 50% de formação de calos, na presença de 7 mg L⁻¹ de 2,4-D. Por outro lado, em cotilédones, o ponto ótimo para obtenção de calos situou-se entre as concentrações 3 e 7 mg L⁻¹. Santos (2001) obteve melhor formação de calos em explantes nodais de cafeeiro com 2,4-D, independente de sua concentração em relação ao AIB.

Já Cerqueira (1999) induziu calogênese em explantes de segmentos caulinares de erva-de-touro combinando os reguladores de crescimento ANA e BAP. Segundo a autora, o melhor resultado foi obtido com 1 mg L⁻¹ de ANA, combinado com 2 mg L⁻¹ de BAP, o qual proporcionou 75% de área coberta com calos.

Quando comparam-se os valores obtidos para cada variável entre os dois tipos de explantes, percebe-se que as médias alcançadas pelos segmentos internodais são sempre maiores ou iguais às dos segmentos foliares. A formação de calos em todos os tratamentos e a presença de tratamentos onde se observou 100% de calos formados comprovam a superioridade dos explantes de segmentos internodais em relação aos explantes foliares. Além disso, a menor porcentagem atingida pelos explantes de segmento internodal na presença de 2,4-D (60% utilizando 1,5 mg L⁻¹) só foi inferior às duas maiores porcentagens obtidas para segmentos foliares (90 e 80%, utilizando 1 e 2,5 mg L⁻¹, respectivamente).

Essa superioridade se confirma para a porcentagem da área do explante ocupada por calos. Dessa vez, a menor porcentagem obtida pelos explantes de segmento internodal na presença de 2,4-D (47,5% utilizando 1,5 mg L⁻¹) foi superior à maior porcentagem obtida para segmentos foliares (40% utilizando 1 mg L⁻¹).

Características internas aos explantes, como, por exemplo, a idade do órgão ou do tecido inoculado, o tamanho do explante e o tipo de lesão, podem

acarretar uma maior ou menor multiplicação celular, levando a um ritmo maior ou menor no crescimento do calo. Esse fato pode explicar o melhor desempenho obtido com explantes de segmentos internodais em relação aos foliares.

6 CONCLUSÕES

Segmentos internodais são mais eficientes que os segmentos foliares para a formação de calos em ingazeiro.

Explantos de segmentos foliares apresentam maior porcentagem de formação de calos e porcentagem da área do explante coberta por calos na presença 1 mg L^{-1} de 2,4-D.

Segmentos internodais apresentam 100% de formação de calos na presença 1 e 3 mg L^{-1} de 2,4-D. Para a porcentagem da área do explante coberta por calos, o explante responde linearmente em relação à concentração de 2,4-D.

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.

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

CASTRO, Y.G.P.; KRUG H.P. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis* - espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura*, v. 3, n. 4, p. 263-264, 1951.

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

FORTES, G.R.L. Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. 1992. 163p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de Viçosa, Viçosa, MG.

GILL, M.I.S. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour. X *Citrus deliciosa* Tenora). *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v. 69, n. 2, p. 231-236, 1994.

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.

LIEBERG, S.A.; JOLY, C.A. *Inga affinis* DC (Mimosaceae): germinação e tolerância à submersão. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 16, n. 2, p. 175-179, 1993.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 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, R.; PAIVA, P.D.O. *Textos acadêmicos: cultura de tecidos*. Lavras: FAEPE/UFLA. 2001. 97 p.

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.

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

RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento de eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willdenow ex Sprengel) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius).** 2000. 60p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estado de São Paulo, Jaboticabal, SP.

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

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

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1990. 433 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, p. 140-147, July/Sept. 1996.

CAPÍTULO 4 - Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro

1 RESUMO

SOARES, Gustavo de Araújo. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro. In: _____. *Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [Inga vera Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn.]*. 2003. p.78-107. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Este trabalho determinou a curva de crescimento de calos originados de explante foliares e de segmentos internodais de ingazeiro e analisou bioquimicamente, através da determinação dos teores de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, os seus crescimentos. Segmentos internodais e foliares foram retirados de plantas matrizes jovens. As curvas de crescimento dos calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro seguem uma curva padrão com cinco fases distintas. Os teores máximos de proteínas e de aminoácidos obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorreram aos 20 e aos 50 dias após a inoculação, respectivamente. Os teores máximos de açúcares solúveis totais obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorreram ambos aos 80 dias após a inoculação. Os teores máximos de açúcares redutores obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorreram aos 60 e aos 80 dias após a inoculação, respectivamente.

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

2 ABSTRACT

SOARES, Gustavo de Araújo. Growth curve and biochemical analysis of callus formed in leaf and nodal segments of ingazeiro. In: _____. *Aspects of the in vitro culture of ingazeiro [Inga vera Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn.]*. 2003. p.78-107. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

This work determined the growth curve of callus formed from leaf and nodal segments of ingazeiro and biochemically analyzed its growth by determining the levels of proteins, amino acids, and total soluble and reducing sugars. The growth curve of callus formed from nodal segments and leaves showed similar pattern with five distinct phases. Higher levels of proteins and amino acids present on callus formed from leaf and nodal segment explants were observed, respectively, 20 and 50 days after explant inoculation. Higher levels of total soluble sugar present on callus formed from leaf and nodal segment explants were observed 80 days after explant inoculation. Higher levels of reducing sugar on callus formed from leaf and nodal segment explants were observed 60 and 80 days after inoculation, respectively.

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

3 INTRODUÇÃO

O calo é uma massa de células que se prolifera desordenadamente, mais ou menos organizado, que geralmente surge sobre feridas de órgãos e tecidos diferenciados (Pierik, 1990). Assim como as plantas superiores, os calos apresentam um padrão típico de crescimento, o qual é caracterizado por meio de fases distintas.

O estudo do crescimento dos calos envolve a determinação dos períodos em que ocorrem essas fases, sendo cada uma delas representada por eventos que lhe são peculiares.

Segundo Santos (2001), as fases de crescimento de cultura de calos têm sido caracterizadas no crescimento celular, cujos parâmetros incluem peso da matéria fresca da célula, número de células e proteína celular total, atividades metabólicas e concentrações de nutrientes nos meios de cultura. Os diversos períodos que compõem o crescimento dos calos são a fase lag, fase log ou exponencial, fase de crescimento linear, fase de desaceleração e a fase estacionária.

A fase lag é considerada como produtora de energia e correspondente ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Caracteriza-se pelo número estacionário de células, pelo início da imobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Esta fase resulta em um pequeno crescimento do calo. A fase exponencial é considerada como biossintética. É nessa fase que se observa o maior crescimento do calo, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. O número de células aumenta, sendo essas pequenas e agregadas em mais de dez células. Na fase linear, ocorre a redução da taxa de crescimento de divisão celular, tornando a divisão uniforme. O que caracteriza essa fase é o crescimento e desenvolvimento celular. Na quarta fase,

de desaceleração, devido à diminuição da divisão celular e à expansão da célula, observa-se a desaceleração no crescimento do calo, causada pela redução dos nutrientes no meio de cultura, presença de produtos tóxicos, secagem do ágar e diminuição do oxigênio no interior das células. É nesta fase que o calo deve ser transferido para um meio fresco, possibilitando retomada do crescimento. Na última fase, estacionária, não se observa divisão ou crescimento celular, não há síntese de biomassa, nem aumento no número de células, o que mantém o peso do calo constante. Esta fase caracteriza-se pelo acúmulo de metabólitos secundários nas células (Nakagawa et al., 1986; Lindsey & Yeoman, 1983; Noé et al., 1980; Phillips & Henshaw, 1977).

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

Segundo Phan et al. (1987), os calos podem apresentar composição bioquímica e exigências nutricionais distintas, em relação ao explante de origem. As determinações quantitativas e qualitativas de macro e micromoléculas, que constituem os tecidos vegetais, podem auxiliar na determinação das diferentes fases da vida de um vegetal, de acordo com o aumento ou diminuição dos níveis de compostos essenciais (Santos, 2001).

Para a determinação do teor de substâncias presentes nos tecidos vegetais, como proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, existem diversos métodos, os quais são baseados em reações químicas específicas do reagente com a estrutura desses compostos. Essas reações podem ser quantificadas por meio de métodos colorimétricos.

A determinação do nível de proteínas e aminoácidos em tecidos é uma das análises mais comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). As proteínas são macromoléculas que podem apresentar funções enzimática e estrutural. Estudos fisiológicos e bioquímicos envolvendo sua quantificação, localização e determinação de atividade enzimática *in vitro* devem ser estimulados.

Outra classe de biomoléculas que se destaca em tecidos vegetais são os açúcares, os quais atuam como forma de armazenamento de energia, como importantes constituintes de suporte de tecidos ou também como provedores de esqueletos de carbono para compostos orgânicos sintetizados pelas células (Serra et al., 2000). Gamborg et al. (1976) classificam os carboidratos como uma das cinco classes de substâncias essenciais requeridas para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

A determinação dos níveis de açúcares tem aplicação em vários estudos fisiológicos, já que revela a reserva prontamente disponível para o crescimento (Passos, 1996). Nos cultivos *in vitro*, os açúcares são acrescentados ao meio de cultura como fonte de energia para o desenvolvimento do explante. Esses tecidos apresentam uma taxa fotossintética bastante reduzida, tornando-se praticamente heterotróficos.

O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos originados de explante foliares e de segmentos internodais de ingazeiro e analisar bioquimicamente, por meio da determinação dos teores de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, o seu crescimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Curva de crescimento de calos

Para obtenção da curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro, foram utilizadas plantas matrizes jovens obtidas do viveiro de mudas da Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na Represa de Camargos, município de Itutinga, Minas Gerais. Estas plantas foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Antes da inoculação, as plantas matrizes, com cerca de onze meses de idade, passaram por um processo de desinfestação, no qual foram tratadas com solução de Benlate 0,5% (p/v) e, 24 horas depois, ramos que continham caule e folhas foram retirados. Em seguida, esses ramos foram divididos em segmentos internodais e folhas, passando por lavagem em água com detergente por 20 minutos e, depois, em água corrente por mais 30 minutos. Posteriormente, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, lavados em água destilada e imersos em solução de Benlate 0,3% (p/v), por 30 minutos. Após nova lavagem em água destilada, as folhas e os segmentos internodais foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo para folhas e 2% para segmentos internodais), onde permaneceram por 20 minutos. Finalmente, em condições assépticas, os explantes passaram por quatro lavagens em água destilada e autoclavada.

Segmentos foliares de 1 cm^2 de área foram inoculados com a superfície abaxial voltada para o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 1 mg L^{-1} de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) e 3 g L^{-1} de sacarose.

Segmentos internodais com 1,5 cm de comprimento foram inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3 g L⁻¹ de sacarose, na posição horizontal e com pequenos cortes na região do caule.

As concentrações de 2,4-D utilizadas são as mais indicadas para calogênese, conforme resultados apresentados no Capítulo 3.

Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e seu pH ajustado em 5,6 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos no escuro em sala de crescimento, com temperatura regulada para 27 ± 2°C.

Para se determinar a curva de crescimento dos calos, foram feitas pesagens do material inoculado a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 90º dia para explantes foliares e até o 110º dia para explantes de segmentos internodais, com intervalos de 10 dias. Antes da pesagem, cada calo era limpo cuidadosamente com papel absorvente.

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

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

sendo *Pi* = peso inicial e *Pf* = peso final de calos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo a pesagem correspondente a cada tempo composta pela média de 10 repetições.

4.2 Análises bioquímicas dos calos

Análises dos teores de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores foram realizadas de calos obtidos a partir de explantes

foliares e de segmentos internodais de plantas jovens de ingazeiro, com cerca de onze meses de idade, inoculados em meio MS suplementados com 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente. Calos formados a partir de explantes foliares foram coletados, em intervalos de 10 dias, até 90° dia após a inoculação, enquanto que calos formados a partir de explantes de segmentos internodais foram coletados, também com intervalo de 10 dias, até o 110° dia após a inoculação. Os calos, após pesados (300 mg), foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer à temperatura de -80°C para, posteriormente, procederem-se às extrações dos extratos e as leituras.

A obtenção do extrato dos calos foi baseada na metodologia descrita por Lemos (1996). As amostras de 300 mg de calos foram homogeneizadas em gral com 3 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 e, posteriormente, centrifugadas a 10.000g, durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado do “pellet” e armazenado a 4°C, para ser utilizado na quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos. O “pellet” foi ressuspendido em 3 mL de NaOH 0,1N e centrifugado novamente a 10.000g, durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada ainda à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi armazenado a 4°C para posterior quantificação de proteínas.

Análise de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), o qual se baseia no princípio da associação entre proteína e corante. Às alíquotas de 0,4 mL dos extratos, foram adicionadas 0,6 mL de água destilada e 5,0 mL do reagente Commassie Blue, constituído de 0,01% de Commassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em agitador, para posterior leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores foram expressos em µg proteína g⁻¹ de matéria fresca, com

base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soroalbumina bovina (BSA).

Análise de aminoácidos

Para determinação dos teores de aminoácidos foi utilizado o método da ninhidrina, descrito por Stein & Moore (1948). Às alíquotas de 0,005 mL do extrato de calos formados em explantes foliares e de 0,01 mL do extrato de calos de segmentos internodais foram adicionados, respectivamente, 0,995 e 0,99 mL água destilada. Em ambas as alíquotas, foi adicionado também 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). Posteriormente, as misturas foram agitadas e levadas a um banho-maria a 100°C, durante 20 minutos. Para leitura a 570 nm em espectrofotômetro, foi adicionado 1,3 mL de etanol 60% (v/v). A quantificação dos aminoácidos baseou-se na curva padrão obtida por meio de diferentes quantidades do aminoácido glicina.

Análise de açúcares solúveis totais

Utilizou-se a metodologia descrita por Yemm & Willis (1964), 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 obtida a partir de diferentes quantidades de glicose.

Análise de açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi feita por meio da metodologia descrita por Miller (1959), que utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Às alíquotas de 0,6 mL do extrato de calos formados em explantes foliares e de 0,4 mL do extrato de calos de segmentos internodais foram adicionados, respectivamente, 0,9 e 1,1 mL de 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 obtida a partir de diferentes quantidades de glicose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento de calos

As curvas de crescimento dos calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro, inoculados em meio MS acrescido de 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente, seguem uma curva padrão com cinco fases: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (Figura 13).

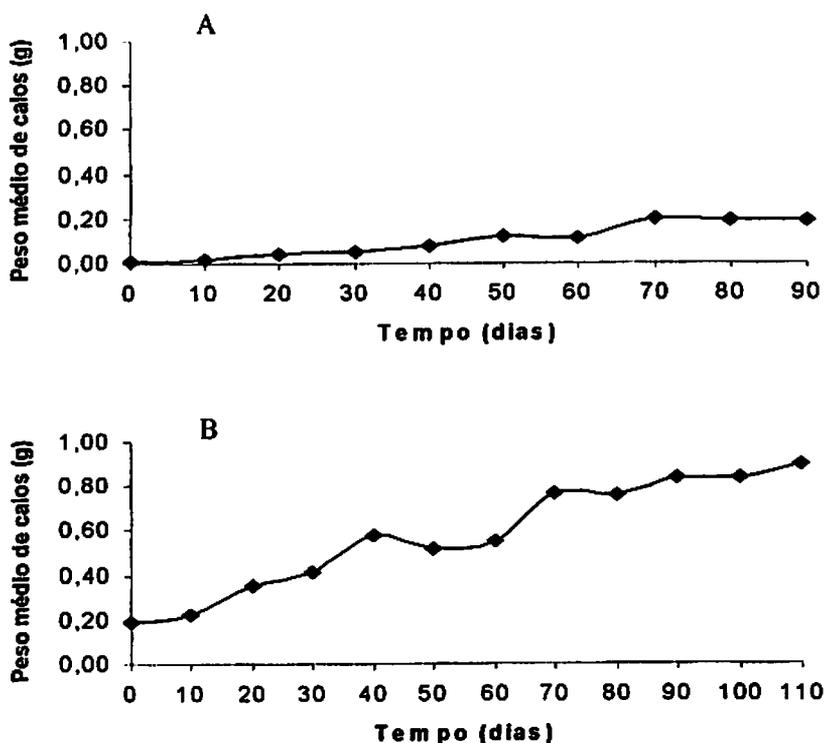


FIGURA 13. Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares (A) e de segmentos internodais (B) de ingazeiro, inoculados em meio MS suplementados com 1,0 e 3,0mg L⁻¹ de 2,4-D durante 90 e 110 dias, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2002.

O crescimento de calos formados em explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro seguiu uma curva sigmoideal, com tendência de ganho de matéria fresca ao longo do tempo.

A fase lag, momento em que as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia, acumulando matéria fresca e seca, ocorreu até o 10º dia após a inoculação, apresentando 43% de crescimento, para os explantes foliares. Os explantes de segmentos internodais passaram por essa fase

também nos 10 primeiros dias após a inoculação, porém, esses atingiram um crescimento bem menor, 13%. Mezzetti et al. (1991), avaliando o crescimento de calos obtidos a partir de segmentos foliares de kiwi (*Actinidia deliciosa*), observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30º dia após a inoculação. Já Santos (1998) obteve a fase lag até o 9º dia após a inoculação com calos provenientes de rizomas de japecanga (*Smilax japecanga* Grisebach). Santos (2001) verificou que, para calos obtidos a partir de segmentos nodais de cafeeiro (*Coffea canephora* e *C. arabica*) 'Apoatã', a fase lag ocorreu até o 49º dia após a inoculação, com 67% de crescimento. Enquanto que, para 'Rubi', essa fase ocorreu até o 28º dia após a inoculação, com 39% de crescimento e para 'Topázio' a fase lag ocorreu até o 42º dia após a inoculação, com 52% de crescimento.

A fase log ou período de crescimento exponencial é o momento de máxima divisão celular. Segundo Shimizu et al. (1977) e Scragg & Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia e a fase log como biossintética. Em ingazeiro, essa fase ocorreu entre o 10º e o 30º dia após a inoculação para os dois tipos de explantes. No entanto, explantes foliares apresentaram 40% de crescimento, enquanto que explantes de segmentos internodais 41%. Desta vez, o crescimento relativo dos explantes foliares foi menor que os de explantes internodais, com uma pequena diferença de 1%. Landa et al. (2000) verificaram que, para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), a fase exponencial ocorreu entre o 7º e o 35º dia após a inoculação. Santos (2001) observou que, para calos obtidos a partir de segmentos nodais de cafeeiro 'Apoatã', a fase exponencial ocorreu entre o 49º e o 63º dia após a inoculação, apresentando 79% de crescimento.

A fase de crescimento linear, na qual os calos diminuem a divisão celular e as células crescem, aumentando a área, foi observado entre o 30º e o

60° dia após a inoculação em explantes foliáres, com 9% de crescimento. Em explantes de segmentos internodais, essa fase estendeu-se 20 dias a mais, durando do trigésimo ao octogésimo dia, com 21% de crescimento. Novamente, a porcentagem de crescimento atingida por explantes de segmentos internodais foi maior que a atingida por explantes foliares. Serra (2000) observou que, em calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), o período de crescimento linear foi entre o 53° e o 60° dia após a inoculação, com 35% de crescimento. Santos (2001) obteve, em calos formados de segmentos nodais de cafeeiro 'Topázio', a fase linear entre o 77° e o 84° dia após a inoculação, com 12% de crescimento.

Nos explantes foliares, a fase de desaceleração do crescimento se deu entre o 60° e o 70° dia após a inoculação dos explantes foliares, com 3% de crescimento. Essa fase atingiu 2% de crescimento nos explantes de segmentos internodais e foi do 80° ao 90° dia após a inoculação. 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). Assim, a repicagem dos calos provenientes de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro para um novo meio de cultura deve ser feita aos 60 e aos 80 dias, respectivamente, início da fase de desaceleração. Em lechicira (*Litchi chinensis* Sonn.), verificou-se que, na curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares, a fase de desaceleração ocorreu entre o 63° e o 77° dia após a inoculação (Mesquita, 1999). Em calos obtidos a partir de segmentos nodais de cafeeiro 'Rubi', o intervalo de desaceleração do crescimento deu-se entre o 63° e o 77° dia após a inoculação, apresentando apenas 14% de crescimento (Santos, 2001).

A última fase de uma curva de crescimento ou fase estacionária, na qual ocorre o menor crescimento celular, iniciou em explantes foliares a partir do 70° dia após a inoculação, sendo observada a manutenção do peso alcançado na fase

anterior e em explantes de segmentos internodais a partir do 90° dia, alcançando 1% de crescimento. Abreu (1998) verificou que, para calos obtidos a partir de segmentos foliares de insulina vegetal (*Cissus sicyoides*), a fase estacionária ocorreu a partir do 27° dia após a inoculação. Landa et al. (2000) verificaram a ocorrência dessa fase a partir do 46° dia após a inoculação, em calos obtidos de segmentos foliares de pequizeiro.

Comparando-se os resultados das curvas de crescimento citadas anteriormente com os das curvas de crescimento de calos de ingazeiro, observa-se que o crescimento desses tecidos na espécie em estudo é bastante lento, o que pode estar relacionado a um ciclo celular também lento. O ciclo celular é composto por várias fases, sendo a intérfase (fase onde ocorre a duplicação do DNA), a mais demorada. A sequência das fases do ciclo celular é governada por um sistema-controle em que participam complexos de proteínas.

A partir da duração das fases e dos valores relativos de crescimento alcançados pelos dois tipos de explantes, podem-se fazer observações interessantes numa comparação entre as duas curvas. A fase responsável pela menor duração da curva de crescimento de calos a partir de explantes foliares foi a de crescimento linear, pois essa foi a única fase que teve menor duração (20 dias a menos) em relação à mesma fase da curva de crescimento de calos provenientes de segmentos internodais. Todas as outras fases tiveram a mesma duração para os dois tipos de explantes.

Em relação às porcentagens de crescimento alcançadas em cada fase da curva de crescimento, as fases que apresentaram maiores diferenças entre os explantes foram a lag, com diferença de 30% a favor do explante foliar, e a linear, com diferença de 12% a favor do explante de segmento internodal. Para as outras três fases, essa diferença foi de apenas 1%.

A alta porcentagem de crescimento apresentada pelos calos de explantes foliares, durante a fase lag, é bastante favorável, porém, além de sua duração de

10 dias ser muito curta, seu peso inicial foi muito pequeno. Dessa forma, os calos de explantes foliares começaram a crescer mais rápido, mas o ritmo de crescimento era logo alcançado pelos calos de segmentos internodais.

Além da diferença encontrada entre as porcentagens de crescimento, na fase linear, das curvas de crescimento dos dois explantes, vale lembrar que foi exatamente esta fase a responsável pela maior duração da curva dos explantes de segmentos internodais, com 20 dias a mais. Esses dois aspectos, juntos, sugerem que essa fase seja o principal período responsável pelas diferenças encontradas entre o crescimento de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais.

No entanto, deve-se considerar que essas porcentagens representam valores relativos, ou seja, quanto foi o ganho do peso em relação ao peso inicial (ponto 0). Assim, em uma determinada fase, o crescimento relativo de um explante mais pesado pode ser menor em relação a um explante mais leve, porém, seu crescimento absoluto nessa mesma fase pode ser maior. Dessa forma, como os explantes de segmentos internodais inoculados (tempo 0) eram bem mais pesados que os explantes foliares (mais de 21x), mesmo apresentando um crescimento relativo, em algumas fases, menor que os explantes foliares, o seu crescimento absoluto foi sempre maior. De acordo com esse fato, se fossem inoculados explantes foliares e de segmentos internodais com mesmo peso inicial, para obtenção da curva de crescimento, os calos formados a partir de explantes foliares, além de atingirem a fase de desaceleração mais rápido, poderiam também apresentar um peso final maior em relação aos calos formados a partir de segmentos internodais.

Esses dados podem parecer contraditórios aos apresentados no capítulo 3, em que os explantes de segmentos internodais foram estatisticamente melhores para calogênese que explantes foliares. Como não há possibilidade de se obter explantes foliares com pesos muito maiores aos apresentados, os

explantes de segmentos internodais continuam sendo melhores para se obter uma boa massa de calos em ingazeiro. Como discutido no Capítulo 3, o tamanho do explante parece ser o fator primordial que afeta os resultados da curva de crescimento. Explantes maiores têm maior porção de reservas e hormônios em relação aos explantes menores (Picrik, 1990), além de, possivelmente, maior número total de células jovens e indiferenciadas para multiplicação.

5.2 Análises bioquímicas dos calos

Os teores de proteínas apresentados pelos explantes e calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro seguem um padrão semelhante de acúmulo durante o período inicial, seguido de redução nos dias posteriores (Figura 14).

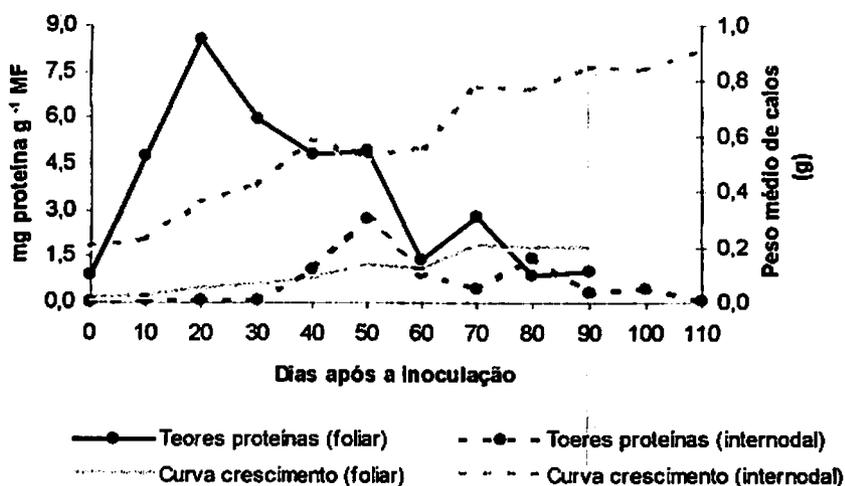


FIGURA 14. Teores de proteínas dos explantes e de calos de ingazeiro formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 90 e 110 dias, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Observa-se que, em quase todos os dias avaliados, os teores apresentados pelos calos formados a partir de explantes foliares foram bastante superiores aos obtidos em calos formados a partir de explantes de segmentos internodais. A única exceção foi no 80º dia, quando a diferença foi de apenas 0,57 mg g⁻¹ MF em favor de explantes de segmentos internodais. As diferenças favoráveis aos explantes foliares são bastante acentuadas e visíveis no dia da inoculação (tempo 0) e no 10º, 20º, 30º e 40º dias após a inoculação, com diferenças de 2.861, 9.443, 24.613, 8.291 e 338%, respectivamente. A partir do 50º dia, essa diferença reduz um pouco, aumentando no 70º dia (529%).

Os teores de proteínas apresentados pelos calos formados em explantes foliares iniciaram com um acúmulo durante os 20 primeiros dias, quando este chegou a atingir o pico máximo (8,58 mg g⁻¹ MF). Posteriormente, com o aumento de dias após a inoculação, o teor de proteínas sofreu sucessivas quedas, aumentou no 70º dia e estabilizou em, aproximadamente, 0,93 mg g⁻¹ MF, valor pouco maior que o teor apresentado pelo explante foliar no tempo zero (período em que ainda não havia formação de calo).

Os teores de proteínas obtidos de calos formados em explantes de segmentos internodais só foram apresentar um aumento mais substancial a partir do 20º dia após a inoculação. Até então, os teores apresentados nas três primeiras avaliações variaram por volta de 0,04 mg g⁻¹ MF. O crescimento no teor de proteínas aumentou até o 50º dia, alcançando pico em 2,70 mg g⁻¹ MF e sofreu uma pequena redução que se acentuou a partir do 80º dia após a inoculação.

Apesar de apresentar um padrão semelhante aos teores de calos de explantes foliares, os calos formados a partir de explantes de segmentos internodais só foram apresentar ganhos e perdas nos teores de proteínas tardiamente, o que acentuou muito as diferenças nos teores de proteínas dos dias iniciais.

Aumento inicial com posterior redução nos teores de proteínas também foi observado por Sachi et al. (1995), em calos de kiwi. Santos (2001) observou acúmulo nos teores de proteínas em calos de cafeeiro 'Apoatã' até o 63º dia após a inoculação.

Já Paiva-Neto (1996) obteve aumento nos teores de proteínas, em calos formados de explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*), até o 20º dia após a inoculação. Mesquita et al. (2002), trabalhando com calos de lechicira formados a partir de segmentos foliares, obtiveram teor máximo de proteínas no 42º dia após inoculação, para explantes inoculados em meio MS acrescido com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, e no 70º dia, para explantes inoculados em meio MS acrescido com 6 mg L⁻¹ de 2,4-D, ambos na presença de luz.

Relacionando os teores de proteínas encontrados nos calos de explantes foliares às fases da sua curva de crescimento, percebe-se que o ganho inicial nos teores de proteínas atravessou a fase lag, chegando ao máximo no meio da fase exponencial. A partir deste ponto, os teores de proteínas começaram a decrescer até terminar a fase de crescimento linear, quando ocorreu um pequeno acúmulo na fase de desaceleração e posterior consumo e estabilização na estacionária.

Os teores de proteínas nos calos de explantes de segmentos internodais mantiveram-se baixos e constantes durante as fases lag e exponencial. Somente ocorreu acúmulo de proteínas a partir da fase linear, porém, na segunda metade desta fase observou-se consumo de grande quantidade da proteína acumulada. Nas fases de desaceleração e estacionária, o consumo continuou sendo superior à produção, o que fez com que os teores nestas fases continuassem em queda.

Em relação aos teores de aminoácidos nos calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais, o padrão apresentado pelos calos dos dois explantes seguiu padrões distintos (Figura 15).

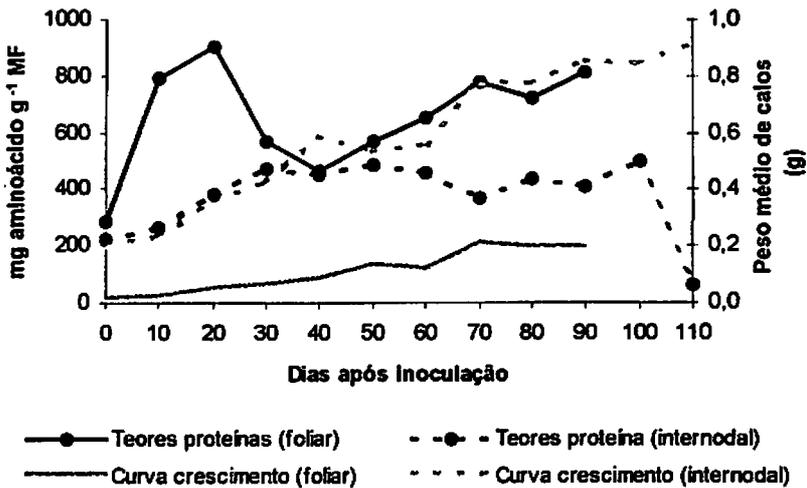


FIGURA 15. Teores de aminoácidos dos explantes e de calos de ingazeiro formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 90 e 110 dias, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Desta vez, os teores de aminoácidos obtidos nos calos de explantes foliares foram maiores em todos os dias após a inoculação. A diferença entre os teores apresentados pelos calos dos diferentes explantes aumentou logo no início, atingindo o maior valor já no 10º dia após a inoculação (199%) e diminuiu um pouco no 20º dia (137%). Após esse dia, essa diferença continuou reduzindo, porém, de forma abrupta, observando-se apenas 2% no 40º dia. A partir desse ponto, a diferença voltou a aumentar, atingindo 111% no 70º dia, diminuindo novamente nos dias posteriores.

Os teores de aminoácidos obtidos de calos formados em explantes foliares do ingazeiro mostrou um acúmulo até o 20º dia após a inoculação, quando atingiu o valor máximo de 900,16 mg g⁻¹ MF. Do 20º ao 40º dias, o teor de aminoácido reduziu até o menor valor encontrado, excetuando-se o ponto 0 (463,07 mg g⁻¹ MF). Curiosamente, até esse dia, os padrões das curvas de aminoácido e de proteínas foram bastante semelhantes para calos de explantes foliares, divergindo nos dias posteriores. Do 40º dia em diante, os calos voltaram a acumular aminoácidos, chegando a 815,91 mg g⁻¹ MF no 90º dia após a inoculação.

Nos calos formados a partir de explantes de segmentos internodais, houve acúmulo nos teores de aminoácidos nos 30 primeiros dias, quando esses atingiram 468,77 mg g⁻¹ MF. Durante os 30 dias seguintes, esse teor se manteve mais ou menos constante, com o pico no 50º dia (482,71 mg g⁻¹ MF). Posteriormente, houve uma pequena queda no 70º dia, logo recuperada nos dias posteriores, chegando ao maior valor encontrado no teor de aminoácidos no 100º dia (502,34 mg g⁻¹ MF). Contrastantemente, 10 dias depois observou-se o menor valor no teor de aminoácidos (59,55 mg g⁻¹ MF).

Paiva-Neto (1996) 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 por Sacchi et al. (1995), em calos de kiwi.

Serra (2000) observou um acúmulo nos teores de proteínas e aminoácidos, nos calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira-do-brasil, até o 30º dia após a inoculação com posterior redução.

Relacionando os teores de aminoácidos encontrados nos calos de explantes foliares às fases da sua curva de crescimento, percebe-se que,

semelhantemente às proteínas, ocorreu acúmulo inicial de aminoácidos durante a fase lag até a metade da fase exponencial. A partir deste ponto, os teores de aminoácidos começaram a decrescer até os 10 primeiros dias da fase linear, quando voltou novamente a ocorrer acúmulo de aminoácidos até a fase estacionária.

Nos calos de explantes de segmentos internodais, ocorreu um acúmulo contínuo nos teores de aminoácidos durante as fases lag e exponencial. Nas fases linear e de desaceleração esse teor manteve-se praticamente constante, com pequenas oscilações, ocorrendo queda brusca nos 10 últimos dias de avaliação (meio da fase estacionária).

A elevação nos teores de proteínas e aminoácidos nos calos formados a partir dos dois tipos de explantes, logo no início, coincidindo com a fase lag e início da exponencial, provavelmente expressa a síntese de novas proteínas e aminoácidos formados a partir da degradação de carboidratos. Esta degradação é necessária para a produção de energia a ser utilizada na fase log de crescimento, na qual ocorre uma maior divisão celular e, conseqüentemente, maior taxa de crescimento (Serra et al., 2000).

Além disso, o aumento no teor de proteínas e aminoácidos obtidos pode ser devido a uma absorção considerável do íon amônio e da glicina do meio de cultura. Segundo George et al. (1988), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais são produzidos utilizando-se energia liberada no catabolismo dos carboidratos.

Os teores de açúcares solúveis totais (AST) presentes nos calos formados a partir de explantes foliares apresentaram um acúmulo crescente com o tempo, até se estabilizarem, enquanto que os presentes em explantes de segmentos internodais mostraram uma queda nos dias intermediários. Com exceção do tempo 0 e do 20º dia após a inoculação, os teores apresentados por calos de

explantes foliares foram sempre maiores que os apresentados por calos de segmentos internodais (Figura 16).

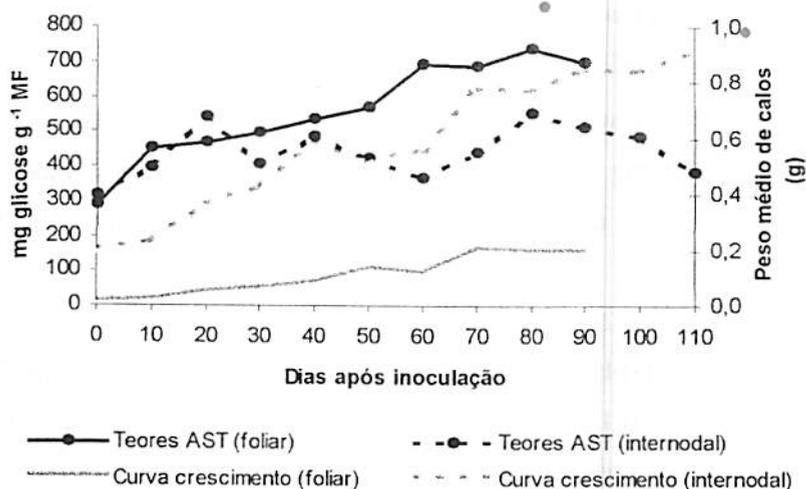


FIGURA 16. Teores de açúcares solúveis totais dos explantes e de calos de ingazeiro formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 90 e 110 dias, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A diferença encontrada entre os teores de AST obtidos para calos formados a partir de explantes foliares e de explantes de segmentos internodais aumentou substancialmente do 40º ao 60º dia (valor máximo) com diferenças de 10, 35 e 88%. Com o passar dos dias, a diferença diminuiu aos poucos, até alcançar o valor de 36% no 90º dia após a inoculação.

Os teores de AST em calos formados a partir de explantes foliares teve o menor valor no ponto 0 (288,92 mg glicose g⁻¹ MF). Desde o início, houve acúmulo de AST, chegando ao valor de 691,18 mg glicose g⁻¹ MF, no 60º dia. A partir de então, esse teor se manteve relativamente constante, ocorrendo um leve

acréscimo no 80º dia após a inoculação, o que levou ao registro do maior teor de AST encontrado nos calos (736,84 mg glicose g⁻¹ MF).

Já para calos formados a partir de explantes de segmentos internodais, o teor de AST aumentou até o 20º dia, quando atingiu 542,51 mg glicose g⁻¹ MF. Do 20º ao 60º dias após a inoculação, o valor reduziu para 366,93 mg glicose g⁻¹ MF, quando voltou a aumentar novamente até o 80º dia, chegando ao valor máximo com 552,29 mg glicose g⁻¹ MF. A partir do 80º dia, os calos voltaram a parar de acumular AST, tendo seus níveis reduzidos a 383,51 mg glicose g⁻¹ MF no último dia de análise.

Mesquita et al. (2002) também obtiveram aumento gradual nos teores de AST em calos de explantes foliares de lechiera inoculados em meio MS acrescidos de 2 e 6 mg L⁻¹ de 2,4-D, na presença de luz. Já Serra et al. (2000) obtiveram resultados completamente opostos com calos formados a partir de segmentos foliares de castanheira-do-brasil. Os teores de AST apresentaram constante redução durante todo período de avaliação. Da mesma forma, Paiva-Neto (1996) também observou degradação dos AST, após o 12º dia de inoculação, em segmentos foliares de morcira.

Relacionando os teores de AST encontrados nos calos de explantes foliares às fases da sua curva de crescimento, percebe-se uma produção de AST superior ao consumo durante as fases lag, exponencial e linear. Esse fator é evidenciado pelo constante acúmulo nos teores de AST durante essas fases iniciais. Posteriormente, nas fases de desaceleração e estacionária, esse teor se estabilizou, mantendo-se nessas condições com pequenas oscilações.

Nos calos de explantes de segmentos internodais, percebe-se ganho inicial nos teores de AST durante a fase lag e metade da fase exponencial. Deste ponto até a primeira metade da fase linear, ocorreu consumo de AST, com posterior acúmulo na segunda metade desta fase. Na fase de desaceleração, os

teores de AST voltaram a diminuir e mantiveram-se em queda na fase estacionária.

Nos teores açúcares redutores (AR) foi observado um padrão bem definido apenas para calos formados a partir de explantes foliares. Os calos formados de segmentos internodais variaram muito com o tempo (Figura 17).

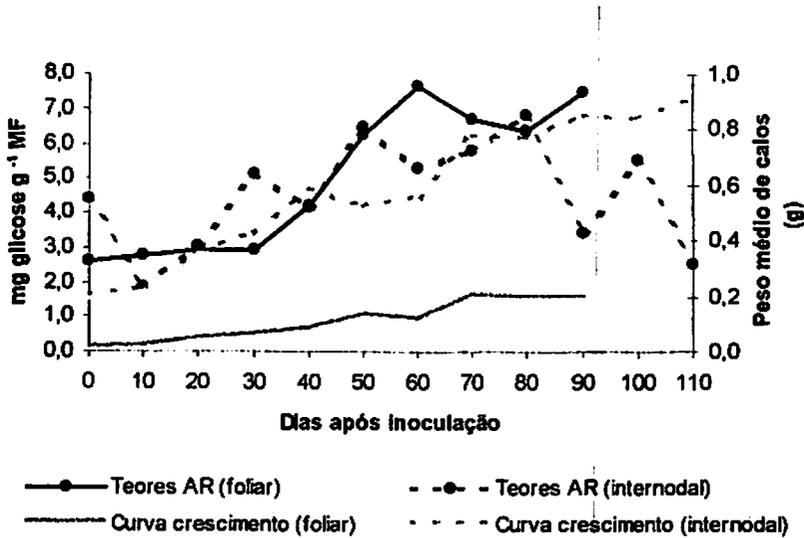


FIGURA 17. Teores de açúcares redutores dos explantes e de calos de ingazeiro formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais inoculados em meio MS, suplementado com 1 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 90 e 110 dias, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2002.

No geral, não houve predominância de nenhum tipo de explante em relação aos teores de AR. Calos formados a partir de explantes foliares apresentaram maiores teores de AR no 10º, 40º, 60º, 70º e 90º dias após a inoculação, enquanto que calos formados a partir de explantes de segmentos internodais apresentaram maiores teores no tempo 0, 20º, 30º, 50º e 80º dias após a inoculação. A maior diferença observada entre os teores de AR em calos de explantes foliares e de segmentos internodais foi no 90º dia, com 119% de

vantagem para calos formados de explantes foliares. No tempo 0, 10°, 30° e 60° dias após a inoculação, essas diferenças foram cerca de 45%, ora para calos formados a partir de explantes foliares, ora para calos formados a partir de segmentos internodais. •

Os teores de AR obtidos para calos formados a partir de explantes foliares mantiveram-se praticamente constantes até o 30° dia (2,93 mg glicose g⁻¹ MF). Nos 30 dias subsequentes, ocorreu um acúmulo de AR, chegando ao teor máximo de 7,66 mg glicose g⁻¹ MF, com posterior diminuição gradativa para 6,36 mg glicose g⁻¹ MF no 80° dia após a inoculação. No 90° dia, esse valor aumentou novamente para 7,52 mg glicose g⁻¹ MF.

Para calos formados a partir de segmentos internodais, os teores de AR variaram muito ao passarem os dias após a inoculação. Os teores iniciaram com uma queda bruta logo no 10° dia (de 4,41 mg glicose g⁻¹ MF para 1,87 mg glicose g⁻¹ MF) e posterior acúmulo até 6,50 mg glicose g⁻¹ MF no 50°. Antes de atingir o valor máximo de 6,80 mg glicose g⁻¹ MF no 80° dia, houve mais uma redução no 60° dia. A partir desse ponto, o teor de AR reduziu no 90°, aumentou no 100° e voltou a reduzir novamente no 110° dia.

Ao contrário dos resultados obtidos, Serra et al. (2000) verificaram o teor máximo de AR no dia da inoculação de explantes de segmentos foliares de castanheira-do-brasil e o teor mínimo no último dia de avaliação (60° dia). Da mesma forma, Santos (2001) observou redução nos teores de AR em calos de cafeeiro 'Rubi' no 21° dia após a inoculação, com posterior aumento desse teor. Segundo as autoras desses dois trabalhos, a redução dos AR nos dias iniciais coincide com a fase lag de crescimento dos calos, o que, possivelmente, ocorreu para produzir energia a ser utilizada na fase exponencial de crescimento.

Serra et al. (2000) ainda citam que a redução nos teores de AST e AR sugere que os explantes não absorveram a fonte de carboidrato (sacarose) presente no meio de cultura, podendo, assim, ser excluída de tal meio.

Relacionando-se os teores de AR encontrados nos calos de explantes foliares às fases da sua curva de crescimento, percebe-se que esses teores se mantiveram constantes durante as fases lag e exponencial. Na fase linear ocorreu acúmulo crescente de AR nos calos e na fase de desaceleração e início da estacionária observou-se pequena queda, com posterior acúmulo nos 10 dias finais de avaliação.

Nos calos de explantes de segmentos internodais, percebe-se consumo inicial de AR na fase lag. Durante as fases exponencial e linear, os teores de AR se recuperaram e mostraram tendência de crescimento com o tempo, mesmo havendo algumas avaliações em que o consumo foi superior à produção. Durante a fase de desaceleração ocorreu consumo acentuado de AR, com posterior produção e consumo na fase estacionária.

6 CONCLUSÕES

Curvas de crescimento dos calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais de ingazeiro apresentam padrão sigmóide, com cinco fases distintas de crescimento.

A repicagem dos calos para novo meio de cultura deve ser realizada aos 60 e 80 dias após a inoculação para explantes foliares e de segmentos internodais, respectivamente.

Teores máximos de proteínas totais e de aminoácidos obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorrem aos 20 e aos 50 dias após a inoculação, respectivamente.

Teores máximos de açúcares solúveis totais obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorrem ambos aos 80 dias após a inoculação.

Teores máximos de açúcares redutores obtidos de calos formados a partir de explantes foliares e de segmentos internodais ocorrem aos 60 e aos 80 dias após a inoculação, respectivamente.

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.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248-254. 1976.

GAMBORG, O.L. et al. Plant tissue culture media. *In vitro*, Largo, v. 12, p. 473-478, 1976.

GEORGE, E.F.; PUTTOCK, J.M.; GEORGE, H.J. *Plant culture media: commentary and analysis*. England: Exegetics, 1988. 420p.

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 pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. Edição Especial.

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

LINDSEY, K.; YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, v. 34, n. 145, p. 1055-1065, 1983.

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.

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

MEZZETTI, B.; CONTE, L.S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 26, p. 153-160, 1991.

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.

NAKAGAWA, K. et al. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, v. 3, p. 254-257. 1986.

NOÉ, W.; LANGEBARTELS, C.; SEITZ, H.U. Anthocyanin accumulation in PAL Scarlet rose cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, v. 23, p. 75-91, 1980.

PAIVA-NETO, V.B. Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de mofeira (*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.

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**, v. 46, n. 3, p. 58, 1987.

PHILLIPS, R.; HENSHAW, G.G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, n. 105, p. 785-794, 1977.

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

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

SANTOS, M.R.A. Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

SHIMIZU, T. et al. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, p. 125-129, 1977.

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

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

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