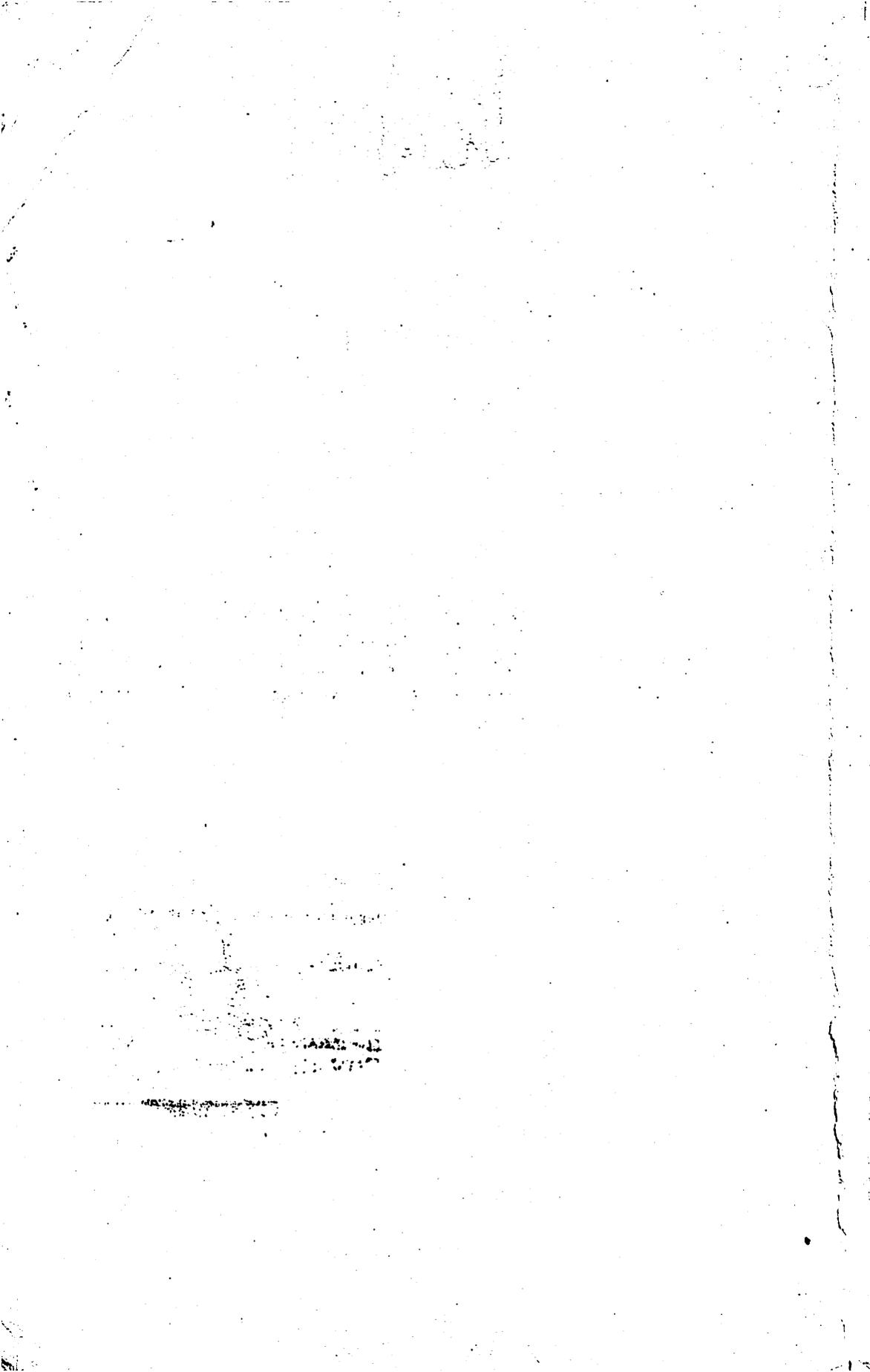


**CONTROLE DA MORFOGÊNESE IN VITRO
EM ALGUMAS ESPÉCIES DE
ANNONACEAE**

JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA

2003



57503

049265

JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA

**CONTROLE DA MORFOGÊNESE IN VITRO EM ALGUMAS
ESPÉCIES DE ANNONACEAE**

Tese 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
"Doutor".

Orientador



Prof. Renato Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA

**CONTROLE DA MORFOGÊNESE IN VITRO EM ALGUMAS
ESPÉCIES DE ANNONACEAE**

Tese 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
"Doutor".

APROVADA em 10 de outubro de 2003

Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos UFAL

Prof. Dr. Moacir Pasqual UFLA

Prof. Dr. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa UFRN

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA



Prof. Dr. Renato Paiva
DBI/UFLA
(Orientador)

LAVRAS - MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus

**Aos meus pais: Edson Ferreira de Santana
Raimunda Martins Perreira**

À minha esposa: Nalva

Aos meus filhos: Hadassa e Daniel

DEDICO

À Flávia, filha biológica,

Aos meus irmãos Edna, Eudaldo, Herman, Alberto, Rondinel e Clériston

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tem sido muito bom para mim em todos os momentos da minha vida, mesmo naqueles em que eu fui um filho rebelde.

Aos meus pais, que apesar de nunca terem freqüentado regularmente uma escola, valorizavam o saber como o grande objetivo a ser perseguido e foram muito além do que suas posses permitiam para que eu meus seis irmãos pudéssemos estudar.

À Universidade Estadual de Feira de Santana e à Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Professor Dr. Renato Paiva pela orientação, amizade, incentivo e por ter se esforçado tanto para tornar minha estadia em Lavra agradável e produtiva.

Ao Professor Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, co-orientador, pelas dicas e sugestões durante o curso.

Ao Professor Dr. Evaristo Mauro de Castro pela ajuda e sugestões na área de Anatomia Vegetal e aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia: Izonel, Evaristo, Dartagnan, Joel, Odorêncio, Maria Helena e Mauro.

Aos amigos Ana Hortência, Breno, Cíntia, Cláudio e Fabiano pela empatia nos momentos difíceis, e a todos os colegas de curso.

Aos alunos de iniciação científica, Patrícia, Fernanda, Rodrigo e Jainir, por estarem sempre dispostos, pela valiosa ajuda na montagem dos experimentos, coleta de dados e análises laboratoriais.

A minha esposa, Nalva, pelo amor, pelo carinho e compreensão, por dedicar sua vida a mim a nossos filhos.

Aos irmãos da Primeira Igreja Batista de Lavras pela amizade sincera e pelas orações.

BIOGRAFIA

JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA, filho de Raimunda Martins Pereira e Edson Ferreira de Santana, nasceu em 16 de outubro de 1969 em Central-BA. Iniciou seus estudos aos 4 anos de idade em escolinhas da zona rural onde morava. Em 1976 matriculou-se no Grupo Escolar Luiz Viana filho, na zona urbana do município, onde permaneceu até a conclusão da 4ª série. Em 1980 foi transferido para o Centro Educacional Cenequista de Central, onde permaneceu até a conclusão do Segundo grau em dezembro de 1986, como técnico em Agropecuária. Em 1997 fez cursinho pré-vestibular no colégio Centro de Ensino Integrado, na cidade Irecê-BA. No início de 1988 foi aprovado no vestibular para Agronomia na Universidade Federal da Bahia (UFBA), concluindo o curso em meados de 1992. Durante o período de realização do curso de graduação desenvolveu projetos de pesquisa, como bolsista de iniciação científica (CNPq – PIBIC), no Departamento de Solos e Nutrição de Plantas. Logo após sua graduação, em março de 1993, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fruticultura Tropical na UFBA, concluindo-o em dezembro de 1995. Em março de 1996 foi aprovado em Concurso Público para o cargo de Professor Assistente em Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana –BA. Em fevereiro de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras-MG, concluindo-o em outubro de 2003. Atualmente é Professor Assistente nível 2 da UEFS.

SUMÁRIO

RESUMO-----	i
ABSTRACT-----	iv
CAPÍTULO I. Introdução Geral -----	1
1. Introdução -----	2
2. Referencial Teórico -----	4
2.1. Aspectos botânicos e econômicos -----	4
2.2. Cultura de tecidos e morfogênese <i>in vitro</i> -----	5
2.3. Propagação <i>in vitro</i> de <i>Annonaceae</i> -----	8
3. Referências Bibliográficas -----	11
CAPÍTULO II. Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Annonaceae</i>, controle de contaminação e oxidação no meio de cultura. -----	15
1. Resumo -----	16
2. Abstract -----	17
3. Introdução -----	18
4. Referencial Teórico -----	19
4.1. Controle de contaminações <i>in vitro</i> -----	19
4.2. Controle da oxidação <i>in vitro</i> -----	20
4.3. Indução de calogênese -----	22
4.4. Indução de organogênese -----	24
4.5. Germinação <i>in vitro</i> -----	26
5. Material e Métodos -----	27
5.1. Meio de cultura, esterilização e condições experimentais -----	27

5.2. Uso de diferentes concentrações de benomyl e de ampicilina em meio de cultura para controlar contaminações em explantes foliares de <i>Annona cauliflora</i> Mart., <i>Annona bahiensis</i> St. Hill. e <i>Annona glabra</i> L. -----	28
5.3. Influência do ácido ascórbico e do PVP no controle da oxidação <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Annona cauliflora</i> Mart. -----	29
5.4. Indução de calogênese em segmentos foliares de <i>Annona bahiensis</i> St. Hill, <i>Annona glabra</i> e <i>Rollinia silvatica</i> St. Hill. -----	30
5.5. Indução de brotações em segmentos nodais de <i>Annonaceae</i> -----	32
5.6. Efeito do substrato na germinação <i>in vitro</i> de <i>Annona cauliflora</i> Mart. -----	33
6. Resultados e Discussão -----	34
6.1. Influência de diferentes concentrações de benomyl e de ampicilina no cultivo <i>in vitro</i> de segmentos foliares de <i>Annona cauliflora</i> Mart., <i>Annona bahiensis</i> St. Hill. e <i>Annona glabra</i> L. -----	34
6.2. Influência do ácido ascórbico e do PVP no controle da oxidação de explantes foliares de <i>Annona cauliflora</i> Mart. -----	39
6.3. Indução de calogênese em segmentos foliares de <i>Annona bahiensis</i> St. Hill., <i>Annona glabra</i> L e <i>Rollinia silvatica</i> St. Hill. -----	41
6.4. Indução de brotações em segmentos nodais algumas espécies de <i>Annonaceae</i> -----	47
6.5. Efeito do substrato na germinação <i>in vitro</i> de <i>Annona cauliflora</i> Mart. -----	50
6.6. Problemas encontrados no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Annonaceae</i> -----	51
7. Conclusões -----	54
8. Referências Bibliográficas -----	55

CAPÍTULO III- Indução de brotações adventícias em folhas de <i>Annona glabra</i> L, <i>Annona bahiensis</i> St. Hill. e <i>Annona squamosa</i> L e em segmentos de hipocótilo e epicótilo de <i>Annona squamosa</i> L. -----	63
1. Resumo -----	64
2. Abstract -----	65
3. Introdução -----	66
4. Referencial Teórico -----	67
5. Material e Métodos -----	68
5.1 Organogênese direta em folhas de <i>Annona glabra</i> L, <i>Annona squamosa</i> L e <i>Annona bahiensis</i> St. Hill. -----	68
5. 2. Indução de múltiplas brotações adventícias em hipocótilo e epicótilo de <i>Annona squamosa</i> L. -----	70
6. Resultados e Discussão -----	71
6.1 Organogênese direta em folhas de <i>Annona glabra</i> L, <i>Annona squamosa</i> L e <i>Annona bahiensis</i> St. Hill. -----	71
6.2 Indução de múltiplas brotações adventícias em hipocótilo e epicótilo de <i>Annona squamosa</i> L. -----	77
7. Conclusões -----	83
8. Referências Bibliográficas -----	83

CAPÍTULO IV- Influência da polaridade do explante na resposta morfogênica de segmentos de hipocótilo e epicótilos de <i>Annona squamosa</i> L. -----	86
1. Resumo -----	87
2. Abstract -----	88
3. Introdução -----	89
4. Referencial Teórico -----	89
5. Material e Métodos -----	90

6. Resultados e Discussão -----	92
7. Conclusões -----	98
8. Referências Bibliográficas -----	98

CAPÍTULO V- Fatores que afetam a morfogênese *in vitro* em segmentos nodais de *Annonaceae*. -----

1. Resumo -----	101
2. Abstract -----	103
3. Introdução -----	105
4. Referencial Teórico -----	106
5. Material e Métodos -----	110
5.1. Material vegetal, assepsia e condições experimentais -----	110
5.2. Efeito comparativo de diferentes tipos e concentrações de citocinina na indução de brotações em segmentos nodais de <i>Annona glabra</i> L.---	111
5.3. Efeito da fonte de carbono na indução de brotações em segmentos nodais de <i>Annonaceae</i> -----	111
5.4. Efeito do tipo de selamento do recipiente de cultura e de diferentes concentrações de carvão ativado e sacarose na indução e crescimento de brotações <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Annona glabra</i> L.-----	112
6. Resultados e Discussão -----	113
6.1 Efeito comparativo de diferentes tipos e concentrações de citocinina na indução de brotações em segmentos nodais de <i>Annona glabra</i> L.-----	113
6.2 Efeito da fonte de carbono na indução de brotações em segmentos nodais de <i>Annonaceae</i> -----	118
6.3 Efeito do tipo de selamento do recipiente de cultura e de diferentes concentrações de carvão ativado e sacarose na indução e crescimento de brotações <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Annona glabra</i> L.-----	125

7. Conclusões -----	145
8. Referências Bibliográficas -----	146

CAPÍTULO VI- Fatores que afetam o enraizamento *in vitro* em brotações e estacas de *Annona glabra* L. -----

1. Resumo -----	152
2. Abstract -----	153
3. Introdução -----	154
4. Referencial Teórico -----	154
5. Material e Métodos -----	158
5.1. Enraizamento de brotações de <i>Annona glabra</i> L. em função de presença de AIB, folhas e tipo de selamento dos tubos -----	158
5.2. Microestaquia -----	160
5.3. Análises estatísticas. -----	161
6. Resultados e Discussão -----	161
6.1. Enraizamento de brotações de <i>Annona glabra</i> L. em função da presença de AIB, folhas e tipo de selamento dos frascos. -----	161
6.2. Microestaquia -----	176
7. Conclusões -----	193
8. Referências Bibliográficas -----	194

CAPÍTULO VII- Aquisição do comportamento autotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L. -----

1. Resumo -----	199
2. Abstract -----	200
3. Introdução -----	201
4. Referencial Teórico -----	202
5. Material e Métodos -----	204

6. Resultados e Discussão -----	205
7. Conclusões -----	215
8. Referências Bibliográficas -----	216

CAPÍTULO VIII- Impacto da aquisição do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* na anatomia e na aclimatização de plantas de *Annona glabra* L. -----

1. Resumo -----	220
2. Abstract -----	221
3. Introdução -----	222
4. Referencial Teórico -----	223
5. Material e Métodos -----	225
5.1. Medições anatômicas -----	225
5.2 Aclimatização -----	226
6. Resultados e Discussão -----	227
6.1 Medições anatômicas -----	227
6.2 Aclimatização -----	231
7. Conclusões -----	234
8. Referências Bibliográficas -----	234

RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A família Annonaceae inclui aproximadamente 130 gêneros. Desses, quatro (*Annona*, *Rollinia*, *Duguetia* e *Asimina*) produzem frutos comestíveis. As espécies com maior importância comercial são propagadas sexual e vegetativamente. A propagação pela via sexual contribui para a produção de plantas heterogêneas, com características agrônômicas indesejáveis. Além disso, os métodos de propagação sexuada podem produzir porta-enxertos com variação na resistência a doenças, no vigor e, conseqüentemente, desuniformidade no crescimento da copa, afetando a produção. Objetivou-se estudar o controle da morfogênese *in vitro* em *A. squamosa* L., *A. glabra* L., *A. coriacea* Mart., *A. cauliflora* Mart., *A. bahiensis* St. Hill. e *Rollinia sylvatica* St. Hill. verificando o efeito do uso de 1) fungicida, antibiótico, antioxidante e absorventes de compostos fenólicos, 2) diferentes fontes de carbono, 3) reguladores de crescimento e, 4) tipos de selamento dos tubos de ensaio, com vistas a implantação de um BAG *in vitro* e obtenção de um protocolo de micropropagação das espécies estudadas. Os resultados mostraram que não foi possível regenerar plantas a partir de segmentos foliares de *R. sylvatica*. O estabelecimento *in vitro* de *A. glabra*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*, *A. bahiensis* e *R. sylvatica* via segmento nodal foi obtido utilizando apenas o BAP como indutor. As folhas cotiledonares apresentaram maior potencial organogênico para a micropropagação de *A. squamosa*. A indução de múltiplas brotações adventícias em hipocótilos e epicótilos de *A. squamosa* foi induzida apenas com o uso do BAP como indutor. O potencial regenerativo do hipocótilo foi maior que o do epicótilo. A polaridade dos explantes afetou a organogênese e o maior número de brotações (8,30 por explante) foi obtido em hipocótilos inoculados na posição vertical normal. A inoculação de segmentos de hipocótilos e epicótilos na orientação vertical constituiu um método eficiente para a regeneração de plantas de *A. squamosa*. A aeração dos recipientes de cultura foi um dos fatores que mais contribuiu na morfogênese *in vitro* de brotações de *A. glabra*, além de controlar a processo de abscisão foliar. A aeração das culturas combinada com uma redução no conteúdo de sacarose no meio de cultura para 58,42 ou 29,21

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Eurico Eduardo Pinto de Lemos - UFAL.

mM trouxe ganhos de 17 e 23 vezes na matéria seca das brotações, respectivamente. A aquisição do comportamento fotoautotrófico em *A. glabra* foi obtido com sucesso durante a fase de enraizamento *in vitro*. O enraizamento de brotações de *A. glabra* em condições fotoautotróficas permitiu desenvolvimento anátomo-fisiológico semelhante àquele observado em condições *ex vitro*, o que tomou a aclimatização mais fácil e rápida, minimizando as perdas nesse processo crucial da propagação *in vitro*.

ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Control of the *in vitro* morphogenesis in some Annonaceae species. 2003. 237 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology)*

The *Annonaceae* includes approximately 130 genera. Four genera (*Annona*, *Rollinia*, *Duguetia* and *Asimina*) produce edible fruits. Most commercially important *Annona* species are propagated through seeds, grafting or budding. However, sexual propagation methods have contributed to produce heterogeneous plants with undesirable agronomic characteristics, furthermore seedling rootstocks produced by sexual propagation methods vary in vigor and disease resistance and the consequent variation in scion growth has major effects on yield. The present work have been developed at the Universidade Federal de Lavras and the objective was to study the control of the *in vitro* morphogenesis of *A. squamosa* L., *A. glabra* L., *A. coriacea* Mart., *A. cauliflora* Mart., *A. bahiensis* St. Hill. and *Rollinia sylvatica* St. Hill. using antioxidant (ascorbic acid), absorbant (PVP and activated charcoal), different carbon sources, growth regulators and types of tube sealing in order to obtain an *in vitro* plant gene bank as well as a protocol for the micropropagation of these species. The results showed that no plant regeneration was obtained from *R. sylvatica* leaf segment explants. The *in vitro* establishment of *A. glabra*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*, *A. bahiensis* and *R. sylvatica* through nodal segment was obtained using BAP as inductor. The cotyledonary leaf explants presented the best organogenic potential for the micropropagation of *A. squamosa*. The induction of adventitious multiple shoots in hypocotyl and epicotyl segments of *A. squamosa* were obtained successful using BAP as inductor. The regenerative potential of the hypocotyl was larger than epicotyl. The explant polarity affected the organogenesis and the largest hypocotyls shoot number (8.3 per explant) was found in explants inserted vertically in the normal position. The incubation of hypocotyl and epicotyl segments in the vertical orientation constituted an efficient system for regenerating plants of *A. squamosa*. Aeration of culture vessel was the factor showing higher contribution to *in vitro* morphogenesis of shoots growth, besides the control of the leaf abscission process. Aeration of cultures combined with a reduction of the sucrose concentration in culture

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Major Professor), Eurico Eduardo Pinto de Lemos - UFAL.

medium to 58.42 or 29.21 mM sucrose, allowed increments of 17 and 23 fold in the dry weight of the shoots, respectively. The methods of tube sealing using cotton tampon or plastic cap without PVC film brought significant gain in percentage of rooting, length and dry weight of roots in *A. glabra* shoots and stem cuttings. The acquisition of the photoautotrophic behavior in *A. glabra* has been obtained with success during the *in vitro* rooting phase. *In vitro* photoautotrophic rooting of shoots stimulated an anatomical and physiological development similar to that observed at *ex vitro* conditions, turning the acclimatization easier and faster minimizing losses at this crucial process of *in vitro* plant propagation.

CAPÍTULO I.

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem, a cada ano, intensificando sua participação no mercado internacional de frutos. A exportação está baseada em frutas exóticas de clima temperado ou tropicais e subtropicais já adaptadas. Não obstante seja elevado o número de espécies autóctones que produzem frutas comestíveis que desde a era pré-colombiana foram conhecidas e utilizadas pelas populações indígenas, quase a totalidade delas permanece silvestre, sendo utilizada pelo extrativismo regional. Muitas dessas espécies têm grande potencial de exportação, tanto para os mercados do sudeste e sul do país quanto para o mercado exterior, ainda inexplorado.

Atualmente, várias espécies estão sob o risco de extinção por diferentes motivos, entre os quais a destruição a ritmo acelerado das vegetações nativas pelo avanço das fronteiras agrícolas e pelo extrativismo. Durante uma parte do ano, inúmeras famílias têm na colheita e venda dos Araticuns uma importante fonte de renda. Entre essas espécies, listam-se algumas pesquisadas neste trabalho: *Annona cauliflora* Mart., *A. coriacea* Mart., *A. glabra* L., *A. bahiensis* St. Hill. (endêmica da região sul da Bahia) e *Rollinia sylvatica* (St. Hill.) Mart.

Além do extrativismo dos frutos destas plantas, existem ameaças que se agravam com a expansão da fronteira agrícola, indústrias madeiras e carvoarias no bioma cerrado, o que coloca em risco espécies como *A. coriacea* e *A. crassiflora* Mart. Na mata atlântica correm risco de extinção espécies endêmicas como *A. bahiensis*, e na caatinga, *R. sylvatica*.

Paralelamente às outras ações conservacionistas, a conservação *in vitro* é uma alternativa que pode ser desenvolvida para espécies dessa família. A base da conservação *in vitro* é o conhecimento da morfogênese que, uma vez entendido, pode ser utilizado para a produção de mudas de qualidade em larga

escala, contribuindo para o aumento de populações degradadas pelo extrativismo.

Algumas estratégias de preservação devem ser adotadas para evitar o desaparecimento de diversas espécies de *Annona*. Dentre essas, destacam-se a conservação *in situ* (reservas ambientais) e os bancos de germoplasma. As reservas ambientais são de difícil manutenção devido à falta de fiscalização e à ocupação indevida.

Os bancos de germoplasma podem ser formados pelo armazenamento de sementes, pela multiplicação dos vegetais em sistemas protegidos ou pelo uso de sistemas de micropropagação.

O estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro* baseia-se na utilização de técnicas de cultura de tecidos, sendo indicado para a multiplicação de germoplasmas ameaçados ou que tenham ciclos reprodutivos muito longos. Além disso, um grande número de indivíduos pode ser mantido em ambientes livres de patógenos e protegidos de alterações ambientais (Vilela-Morales et al., 1997).

Essas espécies de inegável potencial na fruticultura carecem de estudos botânicos básicos como fenologia, caracterização morfológica, forma de propagação e estabelecimento de plantas, polinização, fisiologia da germinação e de pós-colheita. Existem alguns poucos trabalhos nessas diferentes áreas em uma ou outra espécie da família (Ribeiro et al., 1981; van der Heijden & Bouman, 1992; Maas & Westra, 1992; Caldas, 1996; Lima et al., 1999; Decetti, 2000).

Diante do exposto, é de grande importância o conhecimento da morfogênese *in vitro* visando a conservação da variabilidade genética por meio de Banco Ativo de Germoplasma (BAG) *in vitro*, o que possibilitará o estudo, a domesticação e a indicação de formas de manejo racional pelas populações que utilizam e dependem destes recursos.

O objetivo deste trabalho foi estudar o controle da morfogênese *in vitro* em *A. squamosa* L., *A. glabra*, *A. coriacea*, *A. cauliflora*, *A. bahiensis* e *R. sylvatica*, verificando o efeito do uso de: 1) antibiótico e fungicida, 2) antioxidante (ácido ascórbico) e absorventes (PVP e carvão ativado), 3) diferentes fontes de carbono, 4) reguladores de crescimento e, 5) tipos de selamento dos tubos de ensaio, com vistas à implantação de um BAG *in vitro* e obtenção de um protocolo de micropropagação das espécies estudadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos e econômicos

A família *Anonaceae* compreende 130 gêneros e cerca de 2300 espécies com distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo. De toda a família *Annonaceae*, apenas quatro gêneros produzem frutos comestíveis com reais possibilidades de aproveitamento comercial: *Annona*, *Rollinia*, *Duguetia* e *Asimina* (Lemos, 2000). Os gêneros *Annona* (que compreende mais de 100 espécies) e *Rollinia*, que compreendem cerca de 44 espécies (Maas & Westra, 1992), são considerados de grande importância hortícola pela abundância de espécies frutíferas e pela qualidade de suas frutas.

No Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo as mais importantes a graviola, a fruta-do-conde, a frutada-condessa, a atemóia, e a cherimóia, por ordem decrescente de área ocupada. No gênero *Rollinia*, algumas espécies apresentam potencial hortícola, especialmente para uso como porta-enxertos para anonas cultivadas, como é o caso de *R. emarginata* Schlecht.

A uma mesma espécie de anonácea frutífera são dados vários nomes vulgares e, por outro lado, o mesmo nome vulgar é aplicado a várias espécies, de acordo com a região do Brasil. Assim, a *A. squamosa* é conhecida como pinha,

fruta de conde, ata, anona, entre outros, dependendo da localidade considerada. Para a *A. muricata* L. são comuns os nomes de graviola, cruazá, coração de rainha, condessa e jaca do pará, entre outros. Dezenas de espécies de anonáceas são conhecidas como “araticuns” e, dependendo da espécie ou região, recebem o complemento “do brejo”, “apé”, “do cerrado”, “cagão”, “patia”, “alvadio”, dentre outros (Hoehne, 1946).

Frutos de plantas dos gêneros *Rolinia* e *Duguetia* são encontrados em feiras livres, chácaras e fundos de quintais do Nordeste e outras regiões do Brasil. O “biribá” (*R. mucosa*), com o seu fruto amarelo claro, muito saboroso, pode ser encontrado em cultivos em quintais de casas no Nordeste. A “pindaíba” (*Duguetia furfuracea*) possui frutos vermelhos que podem ser consumidos frescos ou utilizados em decoração pelo seu apelo ornamental. O gênero *Asimina* (*A. triloba*) é originário da América do Norte e produz frutos bastante apreciados no leste dos Estados Unidos (Callaway, 1992).

2.2 Cultura de tecidos e morfogênese *in vitro*

As técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas principalmente quando a propagação sexuada é insatisfatória, quando a progênie obtida é muito heterogênea (devido a uma forte heterozigose) ou em casos em que a propagação por sementes não ocorre naturalmente. É importante ressaltar a grande utilidade das técnicas de cultura de tecidos em programas de melhoramento. Na multiplicação *in vitro* há grande economia de tempo e possibilidade de produção de clones promissores e livres de patógenos através de cultura de meristema (Pierik, 1990; George, 1993).

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições assépticas em um meio artificial. O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo

vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (Torres et al., 1998).

A cultura de tecidos tem como base os mesmos princípios anatomo-fisiológicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento de qualquer planta sob outras condições. Três processos interagem no desenvolvimento: o crescimento, a diferenciação celular e a morfogênese. O crescimento é o aumento irreversível no tamanho, que pode ou não estar acompanhado de um incremento de massa. A diferenciação celular consiste na transformação de células geneticamente idênticas em células especializadas bioquímica, fisiológica e estruturalmente. A morfogênese pode ser definida como o processo resultante da integração e coordenação da divisão e diferenciação celular (Moore, 1979).

Durante o desenvolvimento de um organismo, o processo de diferenciação celular reflete o efeito de pelo menos três grupos de fatores: o fator genético, as características originadas durante a ontogênese e as características cuja expressão dependem apenas do ambiente (Kerbaudy, 1999).

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento apresenta importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (Kerbaudy, 1999). Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra et al., 1999).

Reguladores de crescimento são usados para suportar um nível de crescimento básico e são igualmente importantes para direcionar a resposta do propágulo ao desenvolvimento. O sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, predominantemente, a formação de

gemas em detrimento da formação de raízes e calos e vice-versa . Em geral, a rizogênese é induzida pela presença isolada de auxina ou em combinação com uma citocinina em baixa concentração.

As diversas técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser divididas em dois grupos: organogênese e embriogênese somática (Pasqual et al., 1997). Este último, que consiste do desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, não será abordado neste trabalho.

A organogênese é definida como a formação de estruturas a partir de tecidos e/ou células, podendo ocorrer por duas vias: via direta, através da regeneração de plantas provenientes de tecidos não meristemáticos, sem passar pela fase de calo, apresentando alta fidelidade genética; e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo. A partir das células do calo surgem gemas adventícias capazes de desenvolverem novas estruturas (parte aérea ou raiz) (Grattapaglia & Machado, 1998).

Após o desenvolvimento das brotações oriundas de gemas cultivadas *in vitro*, essas são repicadas e transferidas para um meio de cultura suplementado com auxina e carvão ativado para favorecer o desenvolvimento do sistema radicular, resultando, assim, na formação de novas plântulas, que seguem para a fase mais crítica do cultivo *in vitro* (aclimatização). 

A aclimatização se caracteriza pela mudança de uma condição heterotrófica para autotrófica. Plântulas oriundas do cultivo *in vitro* podem apresentar algumas deficiências anatômicas, morfológicas e fisiológicas, como a redução no número de estômatos e epiderme com cutícula reduzida. Isto contribui para a rápida desidratação da plântula quando transferida para o ambiente normal, comprometendo, assim, seu estabelecimento *ex vitro* (George, 1993).

A manutenção do crescimento ativo das brotações é importante porque a aclimatização e o desenvolvimento de condições autotróficas dependem do novo crescimento após a transferência para o ambiente. Imediatamente após o

transplante, as plântulas enraizadas devem ser mantidas em alta umidade e gradualmente expostas às condições ambientais para prevenir a desidratação (Zimmerman, 1988).

2.3 Propagação *in vitro* de *Annonaceae*

A consulta bibliográfica efetuada resultou nos trabalhos listados nas tabelas 1 e 2, nas quais é mostrado um resumo dos métodos de cultura de tecidos usados para diferentes espécies de *Annona*, relacionando fonte de explante, espécie ou cultivar, número ou porcentagem de brotações por explantes, porcentagem de enraizamento, meio de cultura, reguladores de crescimento e aditivos para indução de brotações.

Das seis espécies da presente pesquisa, *A. bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. coriacea* e *R. silvatica*, segundo a bibliografia consultada, ainda não foram estudadas sob os aspectos aqui abordados.

TABELA 1- Resumo métodos utilizados na cultura de tecidos de espécies de *Annona* relacionando fonte de explante, espécie ou cultivar, número ou porcentagem de brotações por explante (NBE), porcentagem de enraizamento (ENRAIZ.), meio de cultura (MEIO), reguladores de crescimento e aditivos (mg.L⁻¹) para indução de brotações e referências^z.

Fonte de explante	Espécie ou cultivar	NBE	ENRAIZ	MEIO	Reguladores de Crescimento	Referências
Segmento Nodal	Atemóia (híbrido)	6-7	43	MS	2 BAP + 0,5 cinetina	Nair et al. (1984 a)
	<i>A. cherimola</i>	40 %	*	N	1 BAP + 0,1 ANA	Jordan et al. (1991)
	cv. 'Concha Lisa'					
	'African Pride'	19	40	MS	2 BAP + 0,5 cinetina + 0,1 biotina + 0,1 pantotenato de Ca + 1000 NH ₄ NO ₃	Rasai et al. (1994)
	(híbrido)					
	<i>A. muricata</i>	3,8	**	WPM	2 BAP + 0,1 ANA	Lemos & Blake (1996)
Internó	<i>A. cherimola</i>	1,4	e **	MS	0,25 BAP ou 0,3 Zeatina	Encina et al. (1994)
	cv. 'Fino de Jete'	1,7				
	<i>A. glabra</i>	1,5	90%	MS	Sem regulador	Deccetti (2000)
	<i>A. cherimola</i>	5,8	*	N	2 BAP + 0,5 cinetina + 200 CH + 1000 PVP	Jordan et al. (1991)
Folhas com peciolo	cv. 'Concha Lisa'					
	<i>A. muricata</i>	-	*	N	2 BAP + 0,5 ANA	Lemos & Baker (1998)
	<i>A. squamosa</i>	15,6	10	MS	2 BAP + 0,5 cinetina	Nair et al. (1984 b)
Folhas com peciolo	<i>A. cherimola</i>	100%	Muito baixo	MS	2 BAP + 0,5 ANA + 200 CH	Jordan (1988)
	cv. 'Concha Lisa'					
	<i>A. muricata</i> e <i>A. cherimola</i>	60%	*	N	2 BAP + 0,5 ANA + 200 CH + 1000 PVP	Bridg (1983) ***

^z Adaptado de Rasai et al. (1995); * não estudado; ** o enraizamento foi feito utilizando outro balanço hormonal; *** citado por Rasai et al. (1995); CH = caseína hidrolizada; MS = Murashige e Skoog; N = Nitsch; WPM = Woody Plant Medium.

TABELA 2- Resumo métodos utilizados na cultura de tecidos de espécies de *Annona* relacionando fonte de explante, espécie ou cultivar, número ou porcentagem de brotações por explante (NBE), porcentagem de enraizamento (ENRAIZ.), meio de cultura (MEIO), reguladores de crescimento e aditivos (mg.L⁻¹) para indução de brotações e referências^z.

Fonte de explante	Espécie ou cultivar	NBE	ENRAIZ	MEIO	Reguladores de Crescimento	Referências
Hipócotilo	<i>A. cherimola</i> cv. 'Concha Lisa'	100%	Muito baixo	MS	2 BAP + 0,5 ANA + 1000 PVP	Jordan (1988)
		100%	Muito baixo	N	0,1 BAP + 1 ANA	Jordan (1988)
	<i>A. muricata</i>	4,8	88	MS	2 BAP + 0,1 ANA	Bejoy & Hariharan (1992)
	'African Pride' (híbrido)	12,6	41	MS	2 BAP + 0,5 cinetina + 0,1 biotina + 0,1 pantotenato de Ca	Rasai et al. (1994)
	<i>A. muricata</i>	19	**	WPM	0,5 BAP	Lemos & Blake (1996)
	<i>A. muricata</i>	4,8	*	MS	2 BAP + 0,1 ANA	Bejoy & Hariharan (1992)
Antera	<i>A. squamosa</i>	10%	*	N	2 BAP+ 0,1 ANA	Nair et al. (1983)
Endosperma	<i>A. squamosa</i>	25%	5	N	2 BAP+ 0,5 ANA	Nair et al. (1986)
Embrião (Zigótico)	<i>A. cherimola</i> cv. 'Concha Lisa'	30,8%	*	N	1 BAP+ 0,1 2,4-D	Jordan et al. (1991)

^z Adaptado de Rasai et al. (1995); * não estudado; ** o enraizamento foi feito utilizando outro balanço hormonal; *** citado por Rasai et al. (1995); CH = caseína hidrolizada; MS = Murashige e Skoog; N = Nitsch; WPM = Woody Plant Medium.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEJOY, M.; HARIHARAN, M. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 245-247, Dec. 1992.
- CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo, RJ. **Anais...** Nova Friburgo, 1996. p. 22.
- CALLAWAY, M. B. Current research for the commercial development of pawpaw (*Asimina triloba* L.) **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 2, p. 190-191, Feb. 1992.
- DEC CETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ENCINA, C. L.; PADILA, I. M. G.; CAZORLA, J. M.; CARO, E. Tissue culture in cherimoya. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 497, p. 289-302, 1994.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 - the technology.** 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CBAB 1998. p. 331-353.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.
- HOEHNE, F. C. **Frutas indígenas.** São Paulo: Instituto de Botânica/USP, 1946. 88 p.
- JORDAN, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 53, n. 5, p. 234-237, Sept./Oct. 1988.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, I.; ROVERARO, C.; GOREUX, A. Promotion of *Annona cherimola* *in vitro* morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft*, Stuttgart, v. 56, n. 5, 224-227, Sept./Oct. 1991.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 519-531.

LEMOS, E. E. P. Organogênese e micropropagação em Anonáceas. In: **WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS**, 3., 200, Lavras, MG. *Anais...* Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.

LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 105-112, July 1998.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v. 71, n. 3, p.395-403, May 1996.

LIMA, A. R.; SANTANA, J. R. F. de.; SOUZA, P. B. L.; CREPALDI, I. C. Avaliação do poder germinativo de araticum (*Annonaceae*). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 109, 1999. Suplemento.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. Th. Introduction and morphology. In: _____. **Flora Neotropica, Rollinia**. New York: Published for Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Garden, 1992. p. 1-15. (Monograph 57).

MOORE, T. C. **Biochemistry and physiology of plant hormones**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. 197 p.

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

NAIR, S.; GRUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A F. Haploid plants from *in vitro* anther culture of *Annona squamosa* L. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 2, n. 3, p. 198-200, 1983.

- NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. In vitro propagation of *Annona* hybrid (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* L.). **Indian Journal of Horticulture**, v. 41, n. 2, 160-165, June 1984a.
- NAIR, S.; GUPTA, M. V.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 29-40, 1984b.
- NAIR, S.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. Studies on endosperm culture of *Annona squamosa* L. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 5, n. 2, p. 132-135, 1986.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEP, 1997. p. 7-45.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.
- RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.
- RASAI, S.; KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. The effect of growth regulators, source of explants and irradiance on in vitro regeneration of atemoya. **Australian Journal of Botany**, Collingwood. v. 42, n. 3, p. 333-340, 1994.
- RIBEIRO, J. F.; GONZALES, M. I.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; MELO, J. T. Aspectos fenológicos de espécies nativas do Cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 32., 1981, Teresina. **Anais...** Teresina: Sociedade Botânica do Brasil, 1981. p. 181-198.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.
- Van der HEIJDEN, E.; BOUMAN, F. General annonaceous seed characters. In: MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. Th. **Flora Neotropica, Rollinia**, New York: Published for Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Garden, 1992. p. 36-41. (Monograph, 57).

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-Cenargen, 1997. 78 p.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 227. p. 489-499, 1988.

CAPÍTULO II

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ANNONACEAE E CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO E OXIDAÇÃO NO MEIO DE CULTURA

1 RESUMO

SANTANA, José Ranieri Ferreira de. Estabelecimento *in vitro* de *Annonaceae* e controle de contaminação e oxidação no meio de cultura. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécie de *Annonaceae***, 2003. p.15-62. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG*.

Objetivou-se promover o estabelecimento *in vitro* das espécies de *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona bahiensis* St Hill. e *Rollinia sylvatica* St. Hill., a partir de diferentes fontes de explantes (semente, segmentos foliares, folhas intactas e segmento nodal), estudando o efeito da adição de diferentes substâncias no controle da contaminação (benomyl e ampicilina) e oxidação (PVP e ácido ascórbico) e na promoção de calogênese (AIA, 2,4-D e TDZ) e organogênese (BAP). Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com radiação fotossintética ativa de $45\text{-}56 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{.m}^{-2}$ a $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados indicaram que o uso do benomyl na concentração de 500 mg.L^{-1} foi eficiente para eliminar todos os fungos em segmentos foliares de *A. cauliflora*, *A. bahiensis* e *A. glabra*. O controle da oxidação em segmentos foliares de *A. cauliflora* foi mais eficiente quando os explantes foram mantidos inicialmente no escuro. O PVP, quando adicionado em concentrações maiores que 200 mg.L^{-1} , reduziu a intensidade da oxidação, enquanto o ácido ascórbico foi completamente ineficiente. A indução de calos foi obtida utilizando TDZ ou 2,4-D isoladamente. A combinação de $2,26 \mu\text{M}$ TDZ + $9,04 \mu\text{M}$ 2,4-D produziu 100% de calogênese em *A. bahiensis*. A indução de calogênese em *R. sylvatica* foi obtida utilizando $4,52 \mu\text{M}$ TDZ + $1,13 \mu\text{M}$ 2,4-D. Não foi possível regenerar plantas a partir de segmentos foliares de *R. sylvatica*. Plantas de *A. cauliflora* foram obtidas facilmente por meio da germinação *in vitro* das sementes, utilizando como substrato o plantmax. O estabelecimento *in vitro* de *A. glabra*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*, *A. bahiensis* e *R. sylvatica* via segmento nodal foi obtido utilizando apenas o BAP como indutor.

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. *In vitro* establishment of *Annonaceae* species and control of the contamination and oxidation in culture medium. In: _____. **Control of the *in vitro* morphogenesis in some *Annonaceae* species.** 2003. p. 15-62. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG*.

In order to establish *in vitro* the *Annonaceae* species *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona bahiensis* St Hill. and *Rollinia sylvatica* St. Hill., the effect of the addition of different substances for the control of contamination (benomyl and ampicillin) and oxidation (PVP and ascorbic acid), induction of calogenesis (IAA, 2,4-D and TDZ) and organogenesis (BAP) using different explant sources (seed, leaf segments, intact leaf and nodal segment) was studied. After inoculation, the vessels with explants were maintained in a growth room with photosynthetic active radiation of 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ and temperature of 25 ± 3 °C. Benomyl at the concentration of 500 mg.L^{-1} was efficient to eliminate all the fungi in leaf segments of *A. cauliflora*, *A. bahiensis* and *A. glabra*. Best control of oxidation in leaf segments of *A. cauliflora* was obtained when the explants were maintained initially in the dark. PVP when added in concentrations above 200 mg.L^{-1} , reduced the intensity of the oxidation and in contrast, no effect was observed when the ascorbic acid was used to control the oxidation process. Callus induction can be obtained using TDZ or 2,4-D only. The combination of 2.26 μM TDZ + 9.04 μM 2,4-D produced 100% of calogenesis in *A. bahiensis*. The callus induction in *R. sylvatica* was obtained using 4.52 μM TDZ and 1.13 μM 2,4-D. Nevertheless, no regeneration plant was obtained from *R. sylvatica* leaf segment explants. The plantmax substrate provided the largest rate of *in vitro* germination (65%) of *A. cauliflora* seeds. The *in vitro* establishment of *A. glabra*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*, *A. bahiensis* e *R. sylvatica* through nodal segment was obtained using BAP as inductor.

3 INTRODUÇÃO

Muitas espécies frutíferas da família *Annonaceae* são pouco conhecidas e não têm sido suficientemente exploradas, apesar de apresentarem grande potencial econômico. As *Annonaceae* apresentam dificuldades de multiplicação pelos métodos tradicionais, suas sementes apresentam germinação irregular, rápida perda da viabilidade, a progênie obtida é muito heterogênea, e ainda apresentam certo grau de recalcitrância, o que impede a conservação por métodos convencionais. Neste contexto, a cultura de tecidos oferece novas alternativas para a propagação assexuada dessas espécies.

Apesar de muitas pesquisas com cultura de tecidos serem realizadas em grande número de espécies tropicais, as *Annonaceae* tem recebido pouca atenção e somente limitado sucesso têm sido reportado (Jordan et al., 1991; Nair et al., 1984a; Nair et al., 1984b; Lemos & Blake, 1996a,b; Encina et al., 1994; Deccetti, 2000).

A micropropagação tem se mostrado uma técnica altamente viável na clonagem comercial de muitas plantas lenhosas. Entretanto, em espécies da família *Annonaceae* ela ainda permanece como uma ferramenta tecnicamente viável. O seu uso comercial em larga escala, contudo, necessita de ajustes para reduzir o metabolismo oxidativo dos explantes e a abscisão foliar precoce.

O presente trabalho teve por objetivo promover o estabelecimento *in vitro* de espécie de *Annonaceae*, a partir de várias fontes de explantes; estudando o efeito da adição de diferentes substâncias no controle da contaminação e oxidação e na promoção de calogênese e organogênese.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Controle de contaminações *in vitro*

A aplicação da técnica de propagação vegetativa *in vitro* em espécies arbóreas freqüentemente encontra problemas de contaminação no início das culturas (Murashige, 1977). Esses se agravam nos trópicos úmidos, onde o clima favorece a proliferação de microrganismos (Enjaric et al., 1988).

A contaminação em cultura de tecidos pode originar-se de duas fontes: microrganismos presentes na superfície ou no interior do explante, ou através de falhas nos métodos de assepsia. Assim, o meio de cultura pode desenvolver flora endofítica de diversas espécies que incluem vírus, viróides, procariontes (bactérias) e fungos.

A contaminação por microrganismos endofíticos é o problema mais sério na cultura de tecidos vegetais, especialmente em espécies tropicais (Keifel & Leonhardt, 1992). No estabelecimento da cultura, dependendo do tipo de explante usado, microrganismos superficiais e endofíticos podem ser levados para a cultura *in vitro*. A maioria dos microrganismos pode ser eliminada via cultura de meristema, enquanto, a partir de folhas, pecíolos ou explantes nodais, muitos ou quase todos os microrganismos podem ser levados para a cultura (Cassells et al., 1988).

O descontaminante mais utilizado na cultura de tecidos é o hipoclorito de sódio ou de cálcio, diluído em água com cerca de 1% de cloro ativo. Para melhorar o contato com a superfície do explante, o tratamento com hipoclorito é freqüentemente precedido por uma lavagem em álcool. O etanol remove parcialmente ceras hidrofíticas e resinas que protegem os microrganismos do contato com o descontaminante (Bonga & von Aderkas, 1992).

A descontaminação tradicional, quando ineficiente, pode ser melhorada com o uso de fungicidas e bactericidas. Essas substâncias podem ajudar na desinfestação do explante, apresentando características desejáveis para uso em cultura de tecidos vegetais, tais como: solubilidade, estabilidade, não ser afetada pelo pH e pelo meio de cultivo, efeitos colaterais reduzidos, amplo espectro de ação, passível de combinação, chances reduzidas de resistência e baixo custo. Como é improvável que uma substância possa preencher todos esse critérios (Falkiner, 1988), normalmente utiliza-se a combinação de diferentes substâncias para a assepsia dos explantes.

O benomyl, quando dissolvido em água, não apresenta toxidez e pode ser utilizado em concentrações de 50-1000 mg.L⁻¹, adicionado diretamente no meio de cultura para controlar as contaminações fúngicas endógenas, sem retardamento do crescimento das culturas (Haldeman et al., 1987). O benomyl pode ser autoclavado e durante esse processo ele é desnaturado, mas o produto da quebra, 2-benzimidazole, é o princípio anti-fúngico do benomyl (Haldeman et al., 1987).

A ampicilina não apresenta toxidez em cultura de tecidos quando utilizada em concentrações até 400 mg.L⁻¹ (George, 1993). Com algumas exceções, os antibióticos são termolábeis e devem ser filtrados a frio e adicionados ao meio após esse ser autoclavado. A maioria dos antibióticos se degrada lentamente no meio de cultura durante a incubação (George, 1993).

4.2 Controle da oxidação *in vitro*

Em cultura de tecidos o termo oxidação corresponde à mudança de coloração do meio devido à liberação de compostos fenólicos pelo explante (Gould & Murashige, 1985).

Muitos autores têm descrito esse escurecimento como consequência de oxidações, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos

pelo tecido em resposta à fermentos (Preece & Compton, 1991) e pela oxidação de polifenóis e quininas, os quais são inibidores da formação de calos e do processo de embriogênese (Jordan et al., 1991).

O escurecimento do meio de cultura afeta a propagação vegetativa, limitando o enraizamento de estacas e as respostas morfogênicas em cultura de tecidos (Jordan et al., 1991). Esse problema pode ser resolvido utilizando antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativo, PVP, cisteína, bem como pela incubação no escuro ou frequentes transferências para meio líquido (Bajaj & Hariharan, 1992).

A ocorrência de oxidação pode ser geneticamente correlacionada, pois plantas com maiores teores de tanino ou hidroxifenóis como *Quercus*, *Rhododendron*, sorgo e coníferas apresentam maior tendência à oxidação *in vitro* (George, 1993). De acordo com esse autor, a idade dos explantes também influencia na ocorrência de oxidação e, de um modo geral, explantes mais jovens são menos propícios à oxidação que explantes mais velhos.

A oxidação pode ser prevenida através da redução de fermentos causados ao explante, sendo que discos foliares apresentam maior oxidação do que segmentos nodais por sofrerem mais fermentos (Preece & Compton, 1991) e pela inoculação inicial dos explantes no escuro. A atividade das enzimas ligadas à biossíntese e oxidação de fenóis é estimulada pela luz (Adams et al., 1979). A diminuição dos níveis de ferro e cobre (co-fatores enzimáticos) também pode ser eficiente no controle da oxidação.

Gould & Murashige (1985) sugerem, para o controle da oxidação, a lavagem do explante com antioxidantes, como ácido cítrico ou ácido ascórbico antes da inoculação e a adição de carvão ativo ao meio. O pré-tratamento (lavagem) dos explantes e a adição de substâncias adsorventes ao meio de cultura têm sido utilizados em várias espécies. Os produtos mais utilizados têm sido cisteína, PVP, ácido ascórbico, ácido cítrico e carvão ativado.

A poliamina PVP reage com os exudatos liberados pelo explante, além de adsorver os compostos fenólicos, evitando que estes oxidem e polimerizem. Normalmente é adicionada ao meio de cultura em concentrações entre 0,01 a 4% (George, 1993).

A cisteína e os ácidos ascórbico e cítrico reagem com metais presentes no meio de cultura evitando que estes estejam disponíveis para oxidar. O ácido ascórbico, que normalmente é adicionado ao meio em concentrações entre 10 a 140 mg.L⁻¹, possui também a propriedade de estimular a atividade metabólica dos tecidos (George, 1993).

4.3 Indução de calogênese

Uma das metodologias para a propagação *in vitro* mais aplicadas é a indução de calogênese. Calos são definidos como aglomerados de células parenquimáticas não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas. No entanto, os calos podem se diferenciar em tecidos e órgãos (Torres et al., 1998).

Na cultura de calos distinguem-se três fases: indução, divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, as células preparam-se para a divisão, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante (Aitchison et al., 1977).

Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explantes, a composição do meio de cultura e condições físicas de incubação como luz e temperatura. Os melhores resultados de calogênese são obtidos utilizando tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão do que células adultas. A época do ano em que é feita a coleta de explantes é considerada por Bonga (1987) como fator de grande importância para o sucesso do estabelecimento *in vitro*.

Desdiferenciação, indução e regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo (Grattapaglia & Machado, 1998). Espécies lenhosas, por exemplo, são mais difíceis de se propagarem *in vitro* quando comparadas à espécies herbáceas, por apresentarem maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, menor taxa de multiplicação e maior concentração de fenóis.

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura visa suprir as possíveis deficiências de fitohormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz. As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos. Entretanto, o balanço auxina/citocinina é, na maioria das vezes, determinante na indução de calogênese.

O thiadiazuron (TDZ) é uma feniluréia que exibe o mais alto nível de atividade citocinínica em cultura e regeneração a partir de calos, quando comparado a BAP, cinetina e zeatina (Capelle et al., 1993; Huetteman & Preece, 1993; Lu, 1993).

O uso do TDZ apresenta algumas vantagens, como resistência à degradação por citocinina-oxidase (Mok et al., 1987), sendo muito estável no meio de cultura. De acordo com Lu (1993), o TDZ biologicamente é mais ativo que o BAP ou zeatina e pequenas concentrações são necessárias em cultura de tecidos. O TDZ é mais efetivo na maioria das espécies testadas, particularmente nas lenhosas. Entretanto, seu uso requer cautela, já que problemas como hiper-hidricidade de brotações, folhas com morfologia anormal, brotações curtas e compactas e dificuldades no alongamento e no enraizamento têm sido observados na sua presença (Lu, 1993).

4.4 Indução de organogênese

A partir das zonas de atividades meristemáticas no explante, as divisões celulares e o padrão de diferenciação podem ocorrer de maneira que conduzam a um grau de organização morfo-anatômico peculiar. No caso de caracterizar um órgão definido, este processo é denominado *organogênese* (George, 1993).

Segundo Hicks (1980), a organogênese *in vitro* envolve uma variedade de sequências complexas de desenvolvimento, resultantes da manipulação experimental de partes de uma planta, culminando na formação de primórdios de órgãos ou plantas inteiras.

Quando a organogênese ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações dos mesmos, ainda sobre o explante inicial sem a formação do calo, denomina-se *organogênese direta*. A *via indireta* é caracterizada quando a organogênese ocorre a partir de calos isolados do explante inicial (Stirmart, 1986).

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é largamente utilizado na propagação *in vitro*. Entretanto, para algumas lenhosas, composições mais diluídas em macronutrientes, como o meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), melhoram os processos morfogenéticos (Grattapaglia & Machado, 1998). Para a família *Annonaceae*, a indução de organogênese direta tem sido obtida utilizando os meios MS (Nair et al., 1984a; Rasai et al., 1994; Encina, 1994; Deccetti, 2000), N - meio de Nitsch - (Jordan et al., 1991) e WPM (Lemos & Blake, 1996b) e em segmentos nodais como fonte de explante.

A indução de processos morfogenéticos, na maioria dos casos, requer a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo e, em geral, a indução das brotações está fortemente correlacionada com a concentração de citocinina. O aumento dos níveis de citocinina promove o aparecimento de brotações laterais, mas pode inibir o alongamento das mesmas, sendo necessários ajustes na concentração (Stimart, 1986).

Nair et al. (1984a) obtiveram múltiplas brotações em segmentos nodais de atemóia em meio MS suplementado com 8,87 μM BAP + 2,32 μM de cinetina, resultando em 6 a 7 brotações por explante. Para o alongamento desses brotos, os autores utilizaram o mesmo meio acrescido de 0,44 μM BAP + 0,87 μM de cinetina.

Jordan et al. (1991) observaram organogênese em 40% dos segmentos nodais de *Annona cherimola* cv. 'Concha Lisa' em meio Nitsch, suplementado com 4,44 μM BAP e 0,54 μM ANA. Encina et al. (1994) reportam que brotações axilares foram obtidas de seções nodais das partes superiores e medianas de *seedlings* de cherimola cv. 'Fino de Jete' de 3 meses de idade, utilizando o meio basal MS suplementado com 0,66 μM BAP ou 1,36 μM zeatina, resultando em 1,4 e 1,7 brotações axilares por explante, respectivamente.

Segmentos nodais de graviola (*Annona muricata*) cultivados em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com 8,87 μM BAP + 0,53 μM ANA produziram 3,8 brotos por explante (Lemos & Blake, 1996b).

Além do uso de reguladores de crescimento, outros aditivos tem sido usados no meio de cultura para maximizar o número de brotações por explante. Rasai et al. (1994) mostram que segmentos nodais maduros coletados do último fluxo de crescimento de brotações laterais de atemóia cv. 'African Pride' e cultivados em meio MS suplementado com 8,87 μM BAP, 2,32 μM cinetina, 0,1 mg.L^{-1} biotina, 0,1 mg.L^{-1} pantotenato de cálcio e 1000 mg.L^{-1} NH_4NO_3 produziram 19 brotações por explante. Os autores argumentam que o aumento no número de brotações adventícias de segmentos nodais maduros pode ser devido a alta concentração de nitrato no meio de cultura.

No entanto, em segmentos nodais de *Annona glabra*, a organogênese direta pode ser alcançada sem o uso de qualquer aditivo no meio de cultura. Decchetti (2000) reportou que brotações axilares (máximo de 1,5 por explante) podem ser

obtidas em segmentos nodais de *Annona glabra* em meio MS sem regulador de crescimento.

4.5 Germinação *in vitro*

A germinação é considerada um dos mais críticos estádios do desenvolvimento vegetal, sendo caracterizada por processos fisio-metabólicos de natureza complexa que levam à retomada do crescimento do eixo embrionário da semente e à protrusão da radícula no tegumento (Bewley & Black, 1994). Basicamente, a germinação é composta por três fases: embebição (quando acontece a reativação do metabolismo), indução de crescimento e protrusão da radícula.

A embebição é um conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides e sua dimensão varia com a permeabilidade do tegumento, composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente (Bewley & Black, 1994).

Embora a família *Annonaceae* apresente espécies que produzem sementes viáveis, a taxa de germinação é baixas, mesmo em condições de temperatura, água e oxigênio consideradas adequadas (Lima et al., 1999). Espécies dessa família apresentam, portanto, algum tipo de dormência, o que representa entrave à germinação da semente.

Uma possibilidade para obtenção de plantas matrizes, para serem usadas como fonte de explantes em experimentos *in vitro*, é a germinação *in vitro*. Como substrato, pode ser usado vermiculita, plantmax e ágar. A esse último normalmente são acrescidos sais do meio MS, podendo ainda ser suplementado com sacarose. Entretanto, de acordo George (1993), os meios de cultura são compostos por soluções de sais inorgânicos que, além do efeito nutritivo,

possuem propriedades osmóticas que influenciam o crescimento celular e morfogênese (George, 1993).

Recentemente descobriu-se que açúcares solúveis, tais como glicose e sacarose, agem como moléculas sinalizadoras, que podem regular grande número de processos fisiológicos (Jang & Sheen, 1997; Sheen et al., 1999), incluindo a germinação (Pego et al., 1999). Existem evidências de que a quebra de lipídios em sementes oleaginosas (como as *Annonaceae*) é também regulada por açúcares (Graham et al., 1994). Segundo esses autores, a expressão de pelo menos dois genes envolvidos no metabolismo dos lipídios é regulada por açúcares sendo que a sacarose pode afetar o conteúdo total de lipídios em sementes em germinação. Em *Arabidopsis*, a quebra de lipídios é significativamente retardada durante a germinação, quando as sementes são expostas a glicose exógena (To et al., 2001).

Plantas germinadas *in vitro* podem ser excelentes fontes de explante, especialmente quando o estabelecimento de culturas via material oriundo do campo ou de casa de vegetação traz o problema da contaminação endógena severa.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, em 2001.

5.1 Meio de cultura, esterilização e condições experimentais

O meio de cultura básico utilizado foi o WPM (Lloyd & McCown, 1980). O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da adição do ágar, utilizando-se KOH ou HCl 0,1N.

A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclave, à temperatura de 121°C e à pressão de 1,05 kg.cm⁻², durante 15 minutos; posteriormente à autoclavagem, os tubos foram esfriados com inclinação de 30 a 45°. Dentre os compostos adicionados ao meio de cultura, somente o antibiótico ampicilina foi esterilizado a frio através de filtro de membrana (millipore) e acrescido a cada tubo de ensaio, em processo de resfriamento, na respectiva concentração de cada tratamento, em câmara de fluxo laminar.

O ambiente na sala de crescimento, para todos os experimentos, foi mantido na temperatura de 25 ± 3°C, com fotoperíodo de 16 horas com radiação fotossintética ativa de 45-56 μmol m⁻² s⁻¹ fornecidos por lâmpadas fluorescentes.

5.2 Uso de diferentes concentrações de benomyl e de ampicilina em meio de cultura para controlar contaminações em explantes foliares de *Annona cauliflora* Mart., *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona glabra* L.

Foram utilizadas como fonte de explante folhas jovens completamente expandidas coletadas de plantas de *Annona cauliflora*, *A. bahiensis* e *A. glabra* com três anos de idade, mantidas em casa de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 130-170 μmol m⁻² s⁻¹, obtidos pela combinação de lâmpadas gro-lux e branca fria, fotoperíodo de 16 h, sem controle de temperatura. Os explantes consistiram de segmentos foliares com 1,5 a 2,5 cm de comprimento e 1 cm de largura, seccionados do meio da folha.

A assepsia padrão constou de lavagem das folhas por 10 a 15 minutos com detergente e água corrente. Após, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas em etanol 70% por 30 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) acrescida de 4 gotas de detergente por 100 mL (para quebrar a tensão superficial da gota e melhorar a aderência) por 15 minutos. As folhas foram lavadas cinco vezes em água destilada e autoclavada, seccionadas e os explantes foram então inoculados em meio de cultura.

Como a desinfestação com hipoclorito foi insatisfatória em experimentos preliminares, substâncias antimicrobiais (antibiótico e fungicida) foram incorporados ao meio de cultura.

Após a desinfestação padrão, os explantes foram inoculados no meio WPM solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose e combinações de diferentes concentrações do fungicida benomyl (0; 500; 1000 e 2000 mg.L⁻¹) e o antibiótico ampicilina (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹). O benomyl foi introduzido no meio antes da autoclavagem, enquanto a ampicilina foi esterilizada a frio (Millipore 0.22µm) e introduzida no meio após a autoclavagem (antes da solidificação). Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x4x4 (sendo que 3 representa as espécies, 4 as concentrações de ampicilina, benomyl) com 4 repetições. Cada parcela foi formada por 4 tubos de ensaio (um explante por tubo).

Os resultados foram expressos em porcentagem de explantes sem contaminação, 30 dias após a inoculação.

5.3 Influência do ácido ascórbico e do PVP no controle da oxidação *in vitro* de explantes foliares de *Annona cauliflora* Mart.

Foram utilizadas como fonte de explante folhas jovens completamente expandidas coletadas de plantas de *Annona cauliflora* com três anos de idade. Os explantes foliares foram retirados com auxílio de um vazador, com área de 1 cm². A assepsia seguiu o padrão descrito no item 5.2.

O meio WPM foi suplementado com 3% de sacarose e 250 mg.L⁻¹ de benomyl. O ácido ascórbico e o PVP foram acrescentados ao meio nas seguintes concentrações: ácido ascórbico 0 (T1- controle), 50 (T2) , 100 (T3), 200 (T4), 400 (T5), PVP 50 (T6), 100 (T7), 200 (T8), 400 (T9) e 800 (T10) mg.L⁻¹ e T11

(escuro). Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas nas condições descritas no item 5.1, exceto o tratamento T11 que permaneceu na ausência de luz

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 12 repetições e dois tubos por parcela.

As avaliações foram realizadas 30 dias após a inoculação, observando a intensidade da oxidação. Atribuíram-se notas 0 (zero) para ausência de oxidação, 1 oxidação leve, 2 oxidação moderada e 3 oxidação intensa.

5.4 Indução de calogênese em segmentos foliares de *Annona bahiensis* St. Hill, *Annona glabra* e *Rollinia silvatica* St. Hill.

*5.4.1 Influência do 2,4-D e TDZ na calogênese de *Annona bahiensis* e *Annona glabra*.*

Os explantes foliares foram obtidos a partir de segmentos de aproximadamente 1 cm², excisados de folhas jovens, provenientes de plantas matrizes com 3 anos de idade, mantidas em casa de vegetação.

A desinfestação foi realizada através da lavagem inicial das folhas em água corrente e detergente neutro por 20 minutos. A seguir, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas inicialmente em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) mais gotas de detergente neutro por 15 minutos. Em seguida, as folhas foram lavadas (5 vezes) em água destilada e estéril. A excisão dos explantes foi feita com as folhas imersas em água destilada e estéril para reduzir a oxidação.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (um explante por tubo) contendo 10 mL do meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes combinações entre TDZ (0,00; 2,27; 4,54 e 9,08 µM) e 2,4-D (0,00; 2,26; 4,52 e 9,04 µM).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x4x4 (sendo que 2 representa as espécies, 4 as concentrações de TDZ e 2,4-D), com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 4 tubos. Foi avaliado o percentual de calo formado 45 dias após a inoculação.

*5.4.2 Indução de calos e regeneração de brotações adventícias a partir de folhas de *Rollinia sylvatica*.*

Os explantes primários consistiram de folhas jovens intactas de plantas *Rollinia sylvatica* mantidas em casa de vegetação, sob radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida pela combinação de lâmpadas gro-lux e branca fria, fotoperíodo de 16 h, sem controle de temperatura.

A desinfestação e assepsia dos explantes seguiu o procedimento descrito no item anterior.

Indução de calo. Os explantes primários foram inoculados em frascos (2 a 5 por frasco) contendo 25 mL do meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) contendo 2% de sacarose, 0,7% de ágar, 4,52 μM TDZ e 1,13 μM 2,4-D (com base em experimentos preliminares).

Manutenção, multiplicação do calo e indução à morfogênese . Após 3 a 4 semanas, o calo foi transferido para frascos (um por frasco) contendo o mesmo meio de cultura. Como o crescimento destes foi muito rápido, a primeira repicagem foi aos 30 dias, diretamente para o meio de regeneração. A indução de morfogênese foi realizada em meio WPM acrescido de combinações de TDZ (5 e 10 μM) e AIA (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 μM). O calo foi repicado em explantes secundários (o calo foi subdivididos em pedaços de 5-8 mm) e cada pedaço foi inoculado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x4x4 (2 representa as concentrações de TDZ, 4 as

concentrações de AIA e o número de repetições), sendo cada parcela composta por 5 tubos de ensaio.

As avaliações foram realizadas semanalmente observando a formação de estruturas morfogênicas e a presença de raízes.

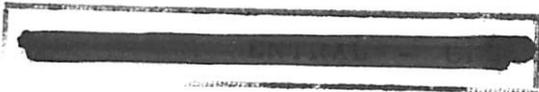
5.5 Indução de brotações em segmentos nodais de algumas espécies de *Annonaceae*

Os explantes foram obtidos a partir de plantas, com três anos de idade, das espécies *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona bahiensis* St.Hill. e *Rollinia silvatica* St. Hill., mantidas em casa de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida pela combinação de lâmpadas gro-lux e branca fria, fotoperíodo de 16 h, sem controle de temperatura.

Secções laterais de hastes caulinares semi-lignificadas foram utilizadas como fonte de explante. Para a desinfestação, os segmentos foram mantidos em água corrente por 20 minutos e lavados com detergente neutro. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram seccionados (1,0-1,5cm) e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de nova imersão em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) e gotas de detergente durante 15 minutos. Finalmente, os explantes foram lavados, por cinco vezes, em água destilada e autoclavada.

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos (um por tubo) contendo 10 mL de meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), solidificado com 0,7% de ágar, suplementado com 3% de sacarose, 8,87 μM BAP e 500 mg.L^{-1} de benomyl.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas condições descritas no item 5.1.



Foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com seis repetições por espécie, sendo cada parcela formada por 10 tubos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Após 40 dias foi observado o número médio de brotações por explante e a porcentagem de explantes responsivos.

5.6 Efeito do substrato na germinação *in vitro* de *Annona cauliflora* Mart.

Sementes de *Annona cauliflora* Mart. foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, foi feita a assepsia através de imersão em álcool 70% por 2 minutos, seguido de imersão em solução de NaOCl (água sanitária comercial com 2-2,5% de cloro ativo) por 15 minutos e várias lavagens em água destilada estéril. Todo o procedimento de desinfestação foi realizado sob capela de fluxo laminar.

Foram utilizados, neste experimento, quatro tipos de substrato para germinação: 1) meio WPM, 2) meio MS, os dois meios com apenas metade da concentração de sais e suplementados com 1% de sacarose, 3) Plantmax e 4) areia lavada. Para os dois últimos substratos, inicialmente determinou-se a capacidade de campo (CC) e em seguida distribuíram-se 50cm³ de cada substrato em frascos grandes (300 mL), aos quais foi acrescentada água destilada até a CC e estes foram autoclavados por 20 minutos.

Foram inoculadas 4 sementes em cada frasco. Nos substratos plantmax e areia lavada as sementes ficaram a uma profundidade aproximada de 5-10 mm. Nos substratos WPM 50% e MS 50%, as sementes ficaram sobre o meio.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, sendo cada parcela formada por 4 frascos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

A porcentagem de germinação acumulada foi avaliada as 60, 90 e 120 dias após a inoculação das sementes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Influência de diferentes concentrações de benomyl e de ampicilina no cultivo *in vitro* de segmentos foliares de *Annona cauliflora* Mart., *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona glabra* L.

Os resultados revelam considerável variação na taxa de contaminação. Diferenças significativas ($P \leq 0.05$) foram observadas entre espécies (Tabelas 1 e 2, Figura 1). O experimento mostrou que a ampicilina nas concentrações testadas não foi eficiente para eliminar bactérias endógenas de cultivos *in vitro* (Tabela 3).

TABELA 1- Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes sadios e porcentagem de contaminação bacteriana e fúngica em segmentos foliares de *Annona glabra* L., *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona cauliflora* Mart., em diferentes concentrações de ampicilina e benomyl. Lavras – MG, 2001.

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios		
		Explantes sadios (%)	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%) ^z
Espécie (E)	2	48.289,5**	47.972,3**	0,205 ns
Ampicilina (A)	3	43,0 ns	90,7 ns	0,173 ns
Benomyl (B)	3	13.316,6**	9.585,2**	21,832 **
E x A	6	188,8**	202,2**	0,307 ns
E x B	6	4.952,0**	4.679,9**	0,205 ns
A x B	9	333,7**	315,7**	0,173 ns
E x A x B	18	242,1**	252,2**	0,307 ns
Resíduo	144	36,8	46,3	0,777
C.V.(%)		10,1	17,4	65,9

ns - Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x + 1}$.

A ação combinada do fungicida e do antibiótico não foi significativa na redução da contaminação dos explantes. O efeito isolado do benomyl foi efetivo sobre os explantes tratados e todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle, mas não diferiram entre si (Tabela 1). A introdução de ampicilina no meio de cultura não foi eficiente para eliminar contaminantes bacterianos.

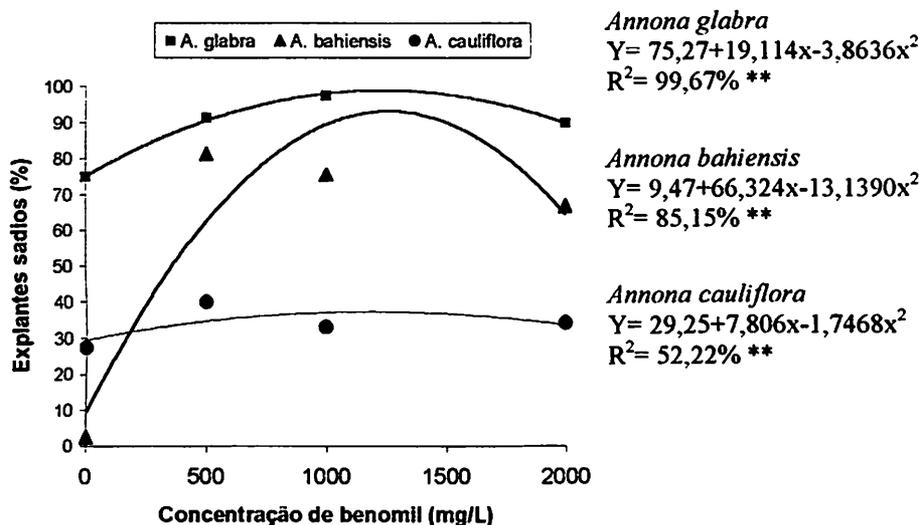


FIGURA 1. Porcentagem média estimada para explantes saudáveis em segmentos foliares de *Annona glabra* L, *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona cauliflora* Mart. em função de diferentes concentrações de benomyl. Lavras – MG, 2001.

A porcentagem de material asséptico variou fortemente com a espécie (Tabela 2) e mudanças fisiológicas do material vegetal parecem ser um fator decisivo na descontaminação. Devido ao rápido crescimento, a parte superior das brotações é menos colonizada por microrganismos, fornecendo explantes com melhores condições assépticas (dados não mostrados).

TABELA 2- Porcentagem de explantes saudáveis em segmentos foliares de *Annona glabra* L, *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona cauliflora* Mart., em diferentes concentrações de benomyl. Lavras – MG, 2001.

Espécie	Concentração de benomyl (g.L ⁻¹)				Média
	0,0	0,5	1,0	2,0	
<i>A. glabra</i>	75,00 a ^z	91,25 a	97,50 a	90,00 a	88,43 a
<i>A. bahiensis</i>	2,50 c	81,25 b	75,62 b	66,87 b	56,56 b
<i>A. cauliflora</i>	27,50 b	40,00 c	34,37 c	33,12 c	33,37 c

^z – Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Estudos realizados em fumo (Shields et al., 1984) com os compostos cabendazime, fenedazole e imazalil forneceram um amplo espectro de atividade antifúngica, sem ser tóxico para o material vegetal (protoplastos, raízes, calos e sementes em germinação). Meristemas de *Camellia sinensis* e *C. japonica* tratados com benomyl e o antibiótico rifampicina por 24 h, após a assepsia inicial em hipoclorito, reduziram a taxa de contaminação e não foram observados efeitos fitotóxicos (Haldeman et al., 1987). Resultados similares foram encontrados por Viana et al. (1997) com rifampicina (50 mg.L⁻¹) em meristemas de mamão. Os autores concluíram que esse antibiótico não modifica o desenvolvimento dos explantes e nenhum efeito tóxico foi observado. Kritzinger et al. (1998) pré-trataram rizomas de *Zantedeschia aethiopica* com uma mistura de fungicidas comerciais de amplo espectro, captab 500 WP (5 g.L⁻¹) e dithane (5 g.L⁻¹), pertencentes ao mesmo grupo de benomyl, e os resultados mostraram que um pré-tratamento com fungicida por pelos menos 24 h é necessário para se obter o controle máximo da contaminação.

O benomyl na concentração de 500 mg.L⁻¹ é capaz de eliminar totalmente a contaminação fúngica (Figura 2). Os fungos endógenos não são eliminados pela desinfestação superficial do material vegetal. O fungicida benomyl, que é do

grupo dos carbomatos, inibe o crescimento de várias espécies de fungos, sem ter efeito inibitório sobre a cultura de tecidos (Shields et al., 1994).

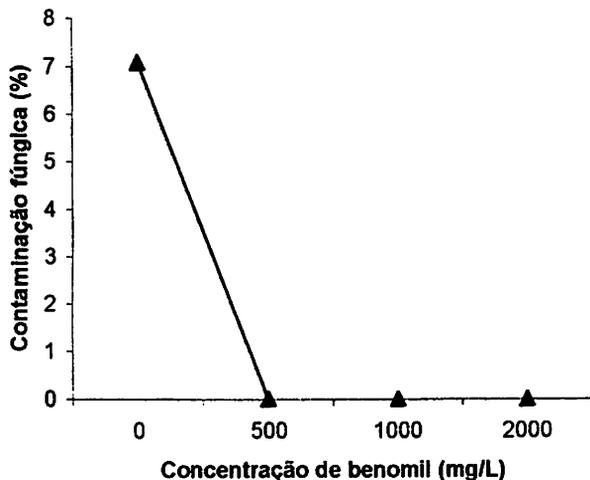


FIGURA 2 - Porcentagem média estimada para explantes com contaminação fúngica em segmentos foliares de *Annona glabra* L, *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona cauliflora* Mart. em função de diferentes concentrações de benomyl. Lavras – MG, 2001.

A idade do tecido foi acompanhada por um incremento na infecção microbiana, frequentemente agravada por ferimentos superficiais. Explantes obtidos de folhas do último surto de crescimento originou mais espécimes sadios do que explantes obtidos de folhas abaixo daquelas do último surto de crescimento (dados não mostrados). Esses resultados confirmam a deterioração do estado sanitário do material vegetal com a idade.

Provavelmente, a concentração máxima de antibiótico usada ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) (Tabela 3) não foi suficiente para desinfetar os explantes. Scortichini & Chiariotti (1988) empregaram três antibióticos, sulfato de estreptomicina, piperacilina e rifampicina (de 25 a 200 mg.L^{-1}), para testar os efeitos antibacteriais e fitotóxicos desse compostos sobre meristemas de *Prunus persica*. Todos os antibióticos apresentaram amplo espectro de ação, eliminando

parcialmente os contaminantes (30% dos explantes sadios), e piperacilina e estreptomicina claramente mostraram fitotoxicidade. Reed et al. (1998) reportaram que bactérias endógenas em cultura de tecidos de avelã foram eliminadas por tratamentos com antibióticos. O uso de um único antibiótico foi ineficiente, mas a combinação de dois ou mais eliminou a maioria dos contaminantes. Streptomicina misturada com timentina ou gentamicina eliminaram todas as bactérias em testes com isolados. Os autores também reportam que, em tecidos vegetais, a concentração de antibiótico necessária para eliminar bactéria endógena é 3-4 vezes mais alta do que aquela efetiva sobre a bactéria isolada.

TABELA 3- Porcentagem de explantes com contaminação bacteriana em segmentos foliares de *Annona glabra* L, *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona cauliflora* Mart., em diferentes concentrações de ampicilina. Lavras – MG, 2001.

Espécie	Concentração de ampicilina (mg.L ⁻¹)				Média
	0,0	1,0	2,0	4,0	
<i>A. cauliflora</i>	60,00 a	71,37 a	64,37 a	63,75 a	64,84 a
<i>A. bahiensis</i>	45,00 b	42,50 b	40,00 b	40,00 b	41,87 b
<i>A. glabra</i>	11,87 c	8,75 c	11,87 c	8,75 c	10,31 c

² – Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Muitos autores têm considerado a origem endofítica da contaminação. Entretanto, o uso de antibiótico para desinfetar as culturas *in vitro* de microorganismos é muito controversa. Alguns autores, tais como, Brown et al. (1982), usaram antibióticos para desinfetar suas culturas; outros autores como Knauss & Knauss (1979), usaram antibiótico mas apresentam certas dúvidas quanto a sua eficácia e observaram fitotoxicidade de algumas substâncias usadas. Por outro lado, Pollock et al. (1983) reportaram que antibióticos não são muito efetivos contra contaminantes e são definitivamente fitotóxicos.

Os resultados deste estudo indicam que é possível atingir a descontaminação fúngica total dos segmentos foliares de *Annonaceae* adicionado 500 mg.L⁻¹ de benomyl no meio de cultura.

Novos estudos para avaliar os efeitos de diferentes concentrações e combinações de antibióticos sobre a regeneração *in vitro* em *Annonaceae* são necessários para esclarecer a relação entre concentração e efeito fitotóxico dos químicos.

6.2 Influência do ácido ascórbico e do PVP no controle da oxidação de explantes foliares de *Annona cauliflora* Mart.

Os resultados observados mostram que houve efeito significativo de tratamentos (Tabela 4). Diferenças na redução da oxidação foram observadas quando se utilizaram concentrações de PVP iguais ou superiores a 200 mg.L⁻¹. Entretanto, a maior concentração de PVP ainda foi incapaz de adsorver os compostos exudados pelo explante. O ácido ascórbico em sua maior concentração só foi capaz de reduzir levemente o processo de oxidação (Tabela 5) e, segundo Fridborg et al. (1975), é incapaz de evitar os efeitos tóxicos dos exudatos do explante.

TABELA 4- Resumo da análise de variância de efeito de diferentes concentrações de PVP e ácido ascórbico no controle ou redução da oxidação de segmentos foliares de *Annona cauliflora* Mart. Lavras – MG, 2001.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tratamentos	10	8,9969 **
Resíduo	121	0,2789
C.V. (%)	25,17	

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

O único tratamento capaz de controlar o processo de oxidação foi o escuro (Tabela 5). Possivelmente a atividade das enzimas ligadas a biossíntese e oxidação de fenóis foi reduzida pela ausência da luz, o que já foi constatado por Adams et al. (1979).

TABELA 5- Intensidade média de oxidação de segmentos foliares de *Annona cauliflora* Mart., em função de diferentes concentrações de PVP e ácido ascórbico. Lavras – MG, 2001.

Tratamento	Intensidade de oxidação
T1 (controle)	3,00 a ^z
T2 (50 mg.L ⁻¹ PVP)	2,83 a
T6 (50 mg.L ⁻¹ Ácido ascórbico)	2,75 a
T7 (100 mg.L ⁻¹ Ácido ascórbico)	2,75 a
T8 (200 mg.L ⁻¹ Ácido ascórbico)	2,50 a
T3 (100 mg.L ⁻¹ PVP)	2,50a
T9 (400 mg.L ⁻¹ Ácido ascórbico)	2,33 a b
T10 (800 mg.L ⁻¹ Ácido ascórbico)	1,67 b c
T4 (200 mg.L ⁻¹ PVP)	1,33 c
T5 (400 mg.L ⁻¹ PVP)	1,08 c d
T11 (ESCURO)	0,33 e

^z Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

6.3 Indução de calogênese em segmentos foliares de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona glabra* L e *Rollinia silvatica* St. Hill.

6.3.1 Influência de 2,4-D e TDZ na calogênese de *Annona bahiensis* e *Annona glabra*.

A calogênese nas duas espécies estudadas foi induzida com sucesso. O teste F mostra que existe variabilidade dentro de espécie para a calogênese (Tabela 6). Os dados obtidos revelam variação considerável entre as duas espécies (Tabela 7), com porcentagem de calos de 65,31 e 41,56 para *A. bahiensis* e *A. glabra*, respectivamente ($P \leq 0,01$).

TABELA 6- Resumos da análise de variância para a indução de calos a partir de segmentos foliares de *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona glabra* L. Lavras – MG, 2001.

Fonte de Variação	GL	QM
Espécie	1	22.652,50 **
TDZ	3	6.421,87 **
2,4-D	3	6.807,29 **
Espécie x TDZ	3	2.572,91 **
Espécie x 2,4-D	3	7.875,00 **
TDZ x 2,4-D	3	2.380,20 **
Espécie x TDZ x 2,4-D	9	954,86 **
Erro	128	376,95
C.V.(%)	36,33	

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

Em várias espécies, tem sido sugerido que diferenças nas respostas *in vitro* entre genótipos podem ser relacionadas a diferenças no conteúdo endógeno de fitorreguladores (Looney et al., 1988; Alvarez et al., 1989; Grönroos et al., 1989;

Péros et al., 1998). A mesma sugestão pode ser aplicada à variabilidade entre as espécies de *Annona*.

TABELA 7- Valores médios para a formação de calos a partir de segmentos foliares de *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona glabra* L., na presença de TDZ e 2,4-D, 60 dias após a inoculação. Lavras – MG, 2001.

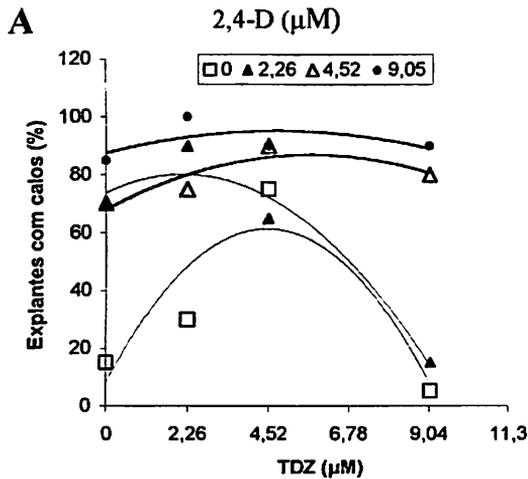
Espécie	% de calos formados
<i>Annona bahiensis</i>	65,31 a ²
<i>Annona glabra</i>	41,56 b

² Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, P≤0,01.

A calogênese foi inexpressiva na ausência de 2,4-D e TDZ, para as duas espécies (Figura 3 A,B). Esses resultados corroboram estudos realizados por Deccetti (2000), que reportam a ausência de calos na espécie *A. glabra*, quando os reguladores 2,4-D e TDZ estavam ausentes. A calogênese na espécie *A. glabra* parece ser mais dependente da adição externa de reguladores de crescimento capazes de promover um balanço interno auxina / citocinina favorável à indução de calos.

Em concentrações altas de TDZ (9,04 µM) e na ausência de auxina, a calogênese foi alta nas duas espécies (80 e 75% para *A. bahiensis* e *A. glabra*, respectivamente) (Figura 4 A, B), indicando que o efeito isolado do TDZ é capaz de induzir a formação de calos nas duas espécies. O efeito isolado do 2,4-D só foi capaz de estimular a calogênese na espécie *A. bahiensis*.

O melhor resultado para a espécie *A. bahiensis* foi obtido quando se utilizou a combinação 2,26 µM TDZ + 9,04 µM 2,4-D, produzindo 100% de calogênese. A interação entre auxina e citocinina para a indução de calos também tem sido reportado para outras espécies lenhosas, como *Lithospermum erythrorhizon* (Hee-Ju et al.,1997), *Jatropha curcas* (Sujatha & Mukta, 1996) e amoreira (Gomes, 1999).



$$Y(\square) = 8,18 + 23,528X - 2,6022X^2$$

$$R^2 = 80,19 \text{ **}$$

$$Y(\blacktriangle) = 73,68 + 6,017X - 1,3893X^2$$

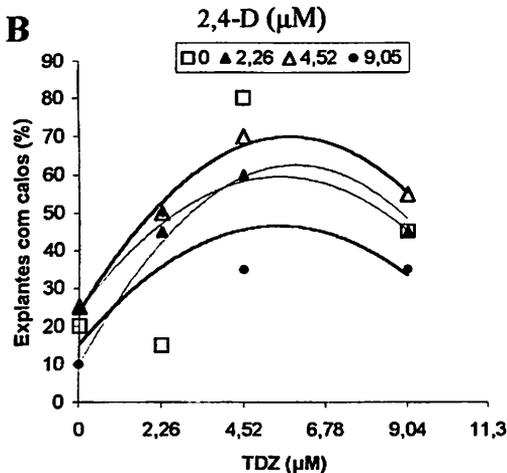
$$R^2 = 94,57 \text{ **}$$

$$Y(\triangle) = 68,09 + 29,900X - 11,8181X^2$$

$$R^2 = 79,74 \text{ ns}$$

$$Y(\bullet) = 87,59 + 3,173X - 0,3308X^2$$

$$R^2 = 79,74 \text{ ns}$$



$$Y(\square) = 9,77 + 17,671X - 1,4775X^2$$

$$R^2 = 51,76 \text{ ns}$$

$$Y(\blacktriangle) = 24,18 + 57,818X - 23,6363X^2$$

$$R^2 = 98,68 \text{ **}$$

$$Y(\triangle) = 23,90 + 72,090X - 28,1818X^2$$

$$R^2 = 98,61 \text{ **}$$

$$Y(\bullet) = 15,31 + 51,681X - 21,3636X^2$$

$$R^2 = 58,10 \text{ *}$$

FIGURA 3- Porcentagem estimada de explantes com calo para as espécies *Annona bahiensis* St. Hill. (A) e *Annona glabra* L. (B) em função de diferentes concentrações de TDZ e 2,4-D. Lavras – MG, 2001.

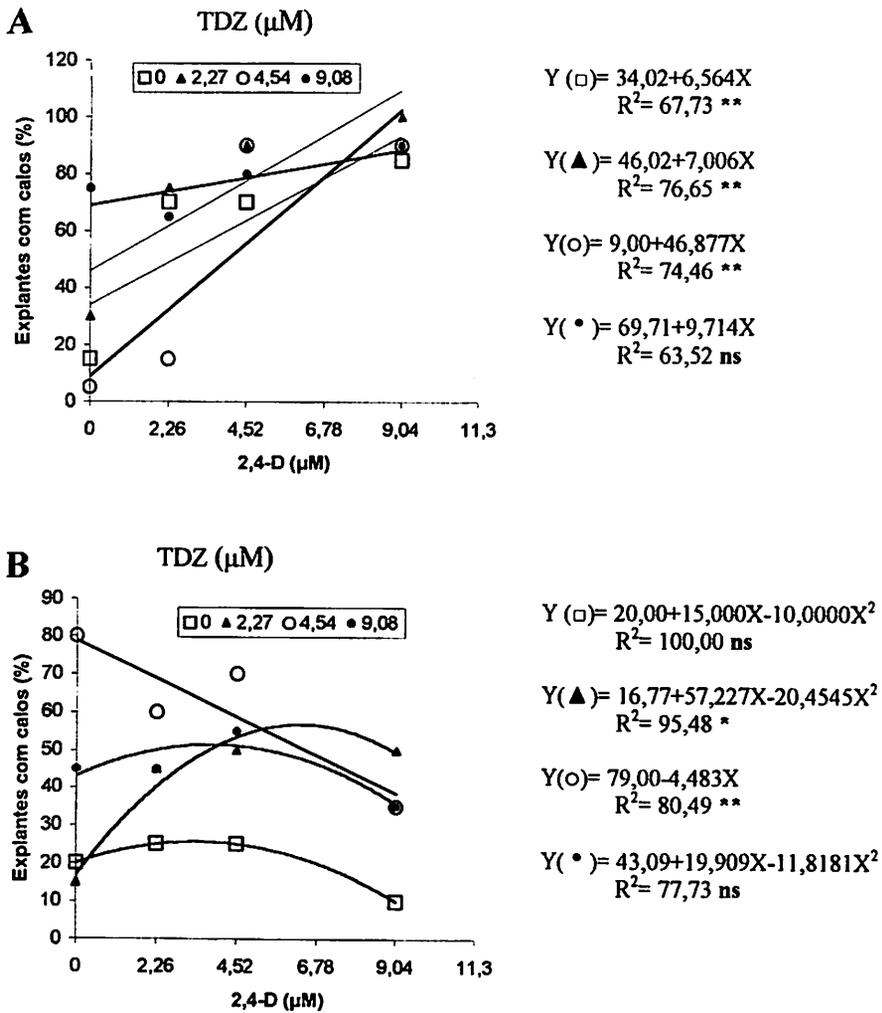


FIGURA 4- Porcentagem estimada de explantes com calo para as espécies *Annona bahiensis* St. Hill. (A) e *Annona glabra* L (B) em função de diferentes concentrações de 2,4-D e TDZ. Lavras – MG, 2001.

6.3.2. Indução de calos e regeneração de brotações adventícias de segmentos foliares de *Rollinia silvatica* St. Hill.

A indução de calogênese em segmentos foliares de *Rollinia silvatica* foi obtida facilmente utilizando 4,52 μM TDZ + 1,13 μM 2,4-D. Após 3 semanas a massa de calo friável foi subdividida e aumentou seu volume rapidamente. Entretanto, após três sucessivas repicagens, os calos tornaram-se compactos e de coloração escura sendo que o processo de regeneração de brotações via organogênese indireta não foi observado em combinação alguma de TDZ e AIA.

O declínio gradual do potencial morfogênico do calo pode ser devido a acumulação de substâncias inibidoras, ao declínio no metabolismo, transporte e interação entre reguladores de crescimento (Hansen et al., 1987; Van Staden & Moony, 1987; Palni et al., 1988) ou ao aumento no número de células poliplóides e aneuplóides no calos devido ao prolongamento das subculturas (Nehra et al., 1990).

Aspectos da calogênese em segmentos foliares de *Rollinia silvatica* são apresentados na Figura 5.

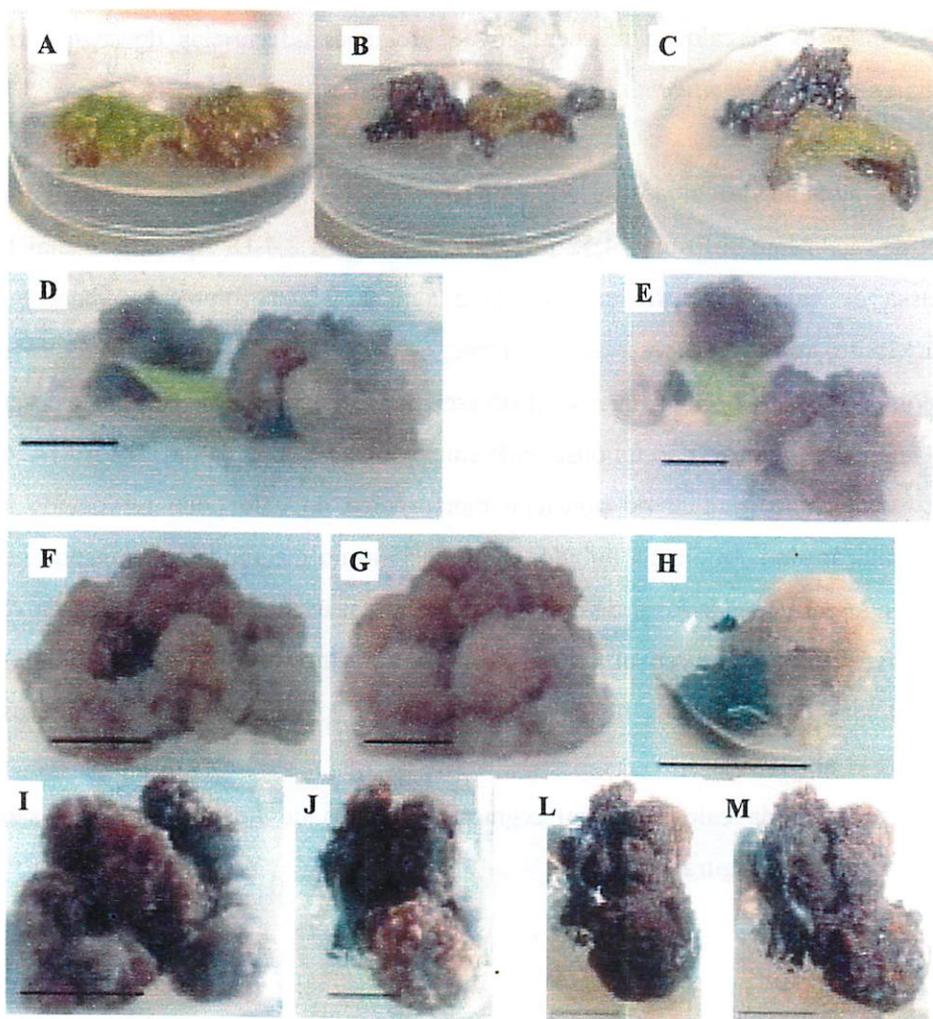


FIGURA 5- Indução de calogênese em *Rollinia sylvatica* St. Hill. a partir de folhas de brotações cultivadas *in vitro*. **A, B, C** calos formados 21 dias após inoculação. **D, E, F, G** calos 30 dias após a primeira repicagem. **H, I** calos 30 após a segunda repicagem. **J, L, M** calos em processo de falência, 45 dias após a terceira repicagem. Lavras – MG, 2001. Barra = 10 mm.

6.4 Indução de brotações em segmentos nodais algumas espécies de *Annonaceae*

De acordo com a análise de variância, foi observado efeito altamente significativo para espécie sobre o número médio de brotações por explante e a porcentagem de explantes responsivos (Tabela 8).

TABELA 8- Resumos da análise de variância para a indução de brotações e porcentagem de explantes responsivos em segmentos nodais em função das espécie *Annona glabra* L, *Annona cauliflora* Mart, *Annona coriacea* Mart, *Annona bahiensis* St.Hill e *Rollinia sylvatica* St. Hill. Lavras – MG, 2001.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio	
		Número de Brotações	Porcentagem de explantes responsivos
Espécie	4	2,4238 **	7.139,54 **
Resíduo	25	0,1122	488,58
C.V.(%)		41,36	39,80

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

As espécies *Annona glabra* e *Annona cauliflora* produziram, respectivamente, 1,50 e 1,49 brotações por segmento nodal (Tabela 9). Esses valores corroboram aqueles reportados por Deccetti (2000) para a espécie *Annona glabra* (1,5) e por Encina et al. (1994) para *Annona cherimola* cv. 'Fino de Jete' (1,4-1,7). Entretanto, estão muito abaixo dos valores encontrados por Nair et al. (1984a) para atemóia (6-7) e por Lemos & Blake (1996b) para *Annona muricata* (3,8 brotações por segmento nodal).

As espécies *Annona coriacea*, *Annona bahiensis* e *Rollinia sylvatica* mostraram-se bastante recalcitrantes *in vitro*. A porcentagem de segmentos nodais responsivos nessas três espécies foi muito baixa (Tabela 9). Diferentes

concentrações e tipos de reguladores de crescimento devem ser testados visando obter uma combinação que aumente o número de brotações em segmentos nodais em *Annona coriacea*, *Annona bahiensis* e *Rollinia silvatica*. A utilização de outras fontes de explante, como segmento internodal, pecíolo, gema apical, hipocótilo e epicótilo, devem ser igualmente testados para essas espécies.

TABELA 9- Resultados médios para número de brotações por explante e porcentagem de explante responsivos para as espécies *Annona glabra* L, *Annona cauliflora* Mart, *Annona coriacea* Mart, *Annona bahiensis* St.Hill e *Rollinia silvatica* St. Hill.Lavras – MG, 2001.

Espécie	Número médio de Brotações / explante	Porcentagem de explante responsivo
<i>Annona glabra</i>	1,50 a ^z	100,00 a
<i>Annona cauliflora</i>	1,49 a	83,35 a
<i>Annona coriacea</i>	0,49 b	44,43 b
<i>Annona bahiensis</i>	0,27 b	22,15 b
<i>Rollinia silvatica</i>	0,27 b	27,76 b

^z Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, P<0,01.

Aspectos gerais da indução de brotações em segmentos nodais de *Annona glabra*, *Annona cauliflora*, *Annona bahiensis* e *Rollinia silvatica* podem ser observados na Figura 7.

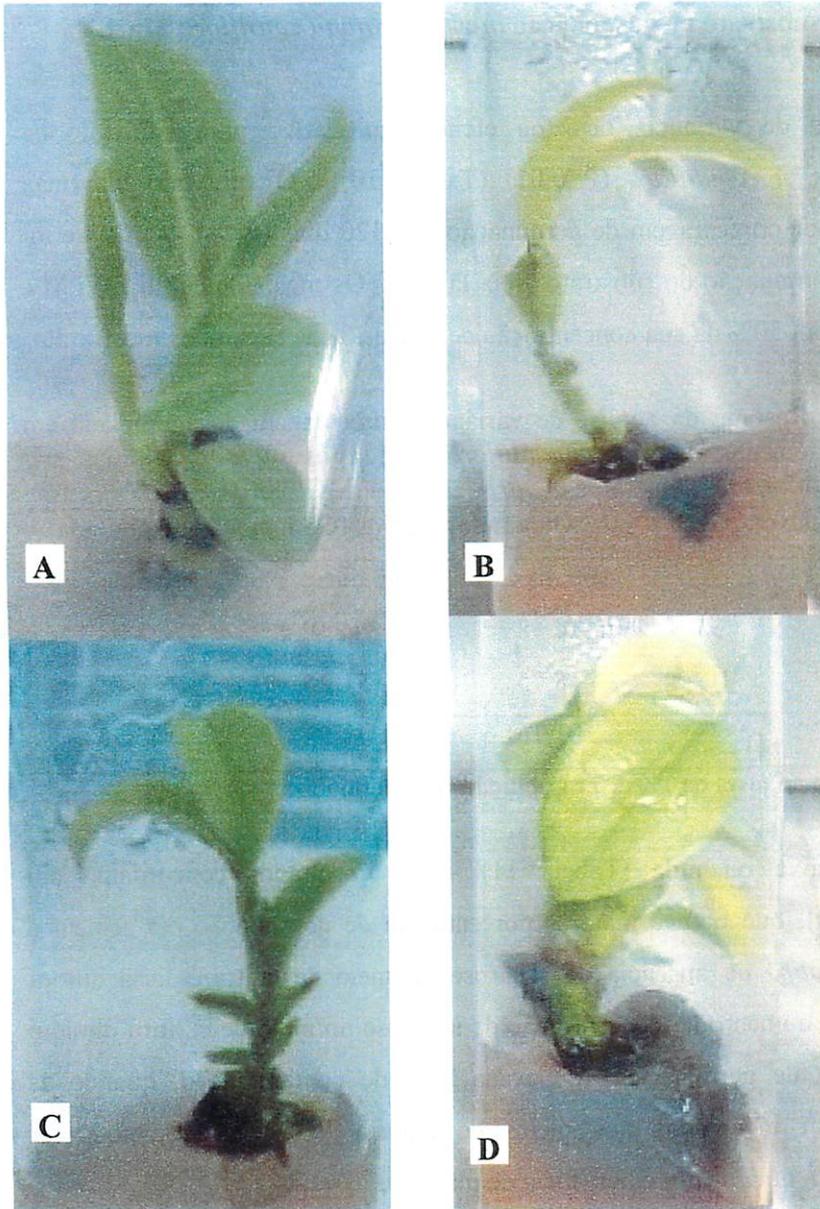


FIGURA 7- Brotações em segmentos nodais de *Annona glabra* L (A), *Rollinia silvatica* St.Hill. (B), *Annona cauliflora* Mart. (C) e *Annona bahiensis* St.Hill. (D) 40 dias após a inoculação. Lavras – MG, 2001.

6.5 Efeito do substrato na germinação *in vitro* *Annona cauliflora* Mart.

A análise de variância detectou efeito significativo para substrato na germinação de *A. cauliflora* ($P \leq 0,01$) (Tabela 10). O substrato plantmax promoveu maior porcentagem de germinação aos 120 dias (65%), bem superior aos 22% de germinação do substrato areia lavada. Os meios de cultura WPM e MS, mesmo com 50% da sua concentração de sais e 1% de sacarose, mostraram

TABELA 10- Resumo da análise de variância porcentagem de acumulada em sementes de *Annona cauliflora* Mart. após 60, 90 e 120 dias, sob diferentes substratos *in vitro*. Lavras – MG, 2001.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios (Germinação acumulada)		
		60 dias	90 dias	120 dias
Substrato	3	124,58 **	2.317,91 **	4.623,33 **
Resíduo	19	18,75	51,25	118,75
C.V. (%)		91,16	48,53	49,53

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

germinação baixa ou nula (Tabela 11). Esses resultados concordam com Deccetti (2000), que obteve maiores porcentagem de germinação em sementes de *Annona glabra* na ausência de sacarose no meio de cultura. Essa autora reportou que o aumento na concentração de sacarose no meio de cultura diminui a porcentagem de germinação. A elevada taxa de contaminação, quando as sementes foram inoculadas nos meios de cultura WPM e MS, pode ter contribuído para uma menor emergência de plântulas.

A pressão osmótica é um fator a ser considerado, uma vez que elevadas pressões reduzem a absorção de água das sementes e afetam o metabolismo celular. Além do mais, é possível que a exposição das sementes de *Annona cauliflora* à sacarose exógena tenha afetado o processo de quebra de lipídios, o que pode ter resultado numa germinação baixa ou nula (To et al., 2001).

TABELA 11- Porcentagem de germinação acumulada em sementes de *Annona cauliflora* Mart. após 60, 90 e 120 dias, sob diferentes substratos *in vitro*. Lavras – MG, 2001.

Substrato	Germinação acumulada (%)		
	60 dias	90 dias	120 dias
Plantmax	10 a ^z	46 a	65 a
Areia lavada	8 b	12 b	22 b
WPM 50% + 1% sacarose	1 c	1 c	1 c
MS 50% + 1% sacarose	0 c	0 c	0 c

^z Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, P≤0,01.

A germinação em plantmax proporcionou a emissão de um sistema radicular desenvolvido e bem ramificado com muitos pelos absorventes. Provavelmente, a maior aeração promovida por esse substrato favoreceu a germinação e o desenvolvimento das plântulas.

6.6 Problemas encontrados no cultivo *in vitro* de *Annonaceae*

Durante o estabelecimento *in vitro*, observaram-se anormalidades como necrose no ápice das brotações, abscisão foliar, com maior ou menor severidade, em todas as espécies estudadas e hiper-hidricidade em *Rollinia silvatica* (Figura 8).

As *Annoanceae* são plantas tropicais com mecanismos fisiológicos de resistência à seca, o que inclui a abscisão foliar. No cultivo *in vitro*, em função do ambiente peculiar, esse fenômeno ocorre rapidamente, o que reduz o crescimento e o vigor do explante e pode até impossibilitar a continuação do processo de micropropagação (Lemos & Blake, 1996a).

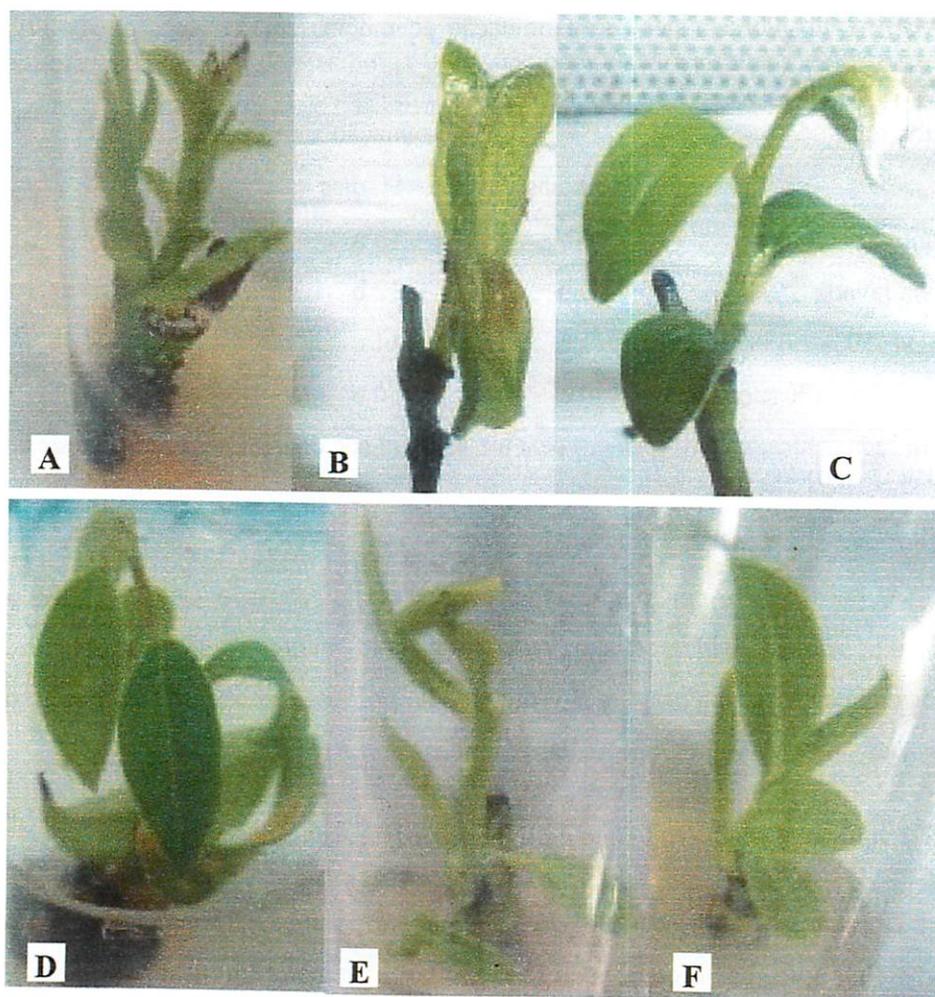


FIGURA 8- Anormalidade observadas durante a indução de brotações em segmentos nodais de *Annonaceae* 40 dias após a inoculação: morte da gema apical em *Annona cauliflora* Mart (A), *Rollinia silvatica* St.Hill. com hiper-hidricidade em tubos completamente vedados (B) e planta normal (C) em tubos com tampa sem a película de PVC, abscisão foliar em *Annona bahiensis* St. Hill. (D) e em *Annona glabra* L (E) em tubos totalmente selados e planta normal de *Annona glabra* L (F) em tubos com tampa e sem a película de PVC. Lavras – MG, 2001.

O etileno está envolvido no processo que regula o fenômeno da abscisão foliar. Nas condições do cultivo *in vitro*, dada a natureza do selamento dos frascos para evitar contaminações e a reduzida evapotranspiração, o etileno produzido pelos tecidos pode se acumular em níveis fisiologicamente ativos (Lemos & Blake, 1996a). Esses autores sugerem que a abscisão foliar pode ser controlado de três maneiras: a) por compostos absorventes do etileno produzidos pelas plantas (permanganato de potássio), b) por compostos inibidores da biossíntese de etileno (cloreto de cobalto, L- α -aminoetoxivinil glicina e ácido amino-oxiacético) e c) por compostos inibidores da ação do etileno (nitrato de prata e tiosulfato de prata). Os autores ainda reportam que compostos à base de nitrato de prata e tiosulfato de prata foram efetivos no controle da abscisão foliar de *Annona squamosa* e produziram efeitos mais duráveis (30 dias).

A necrose de gema apical parece ser uma desordem fisiológica normal encontrada em condições de cultivo *in vitro* (Sha et al., 1985). Várias hipóteses têm sido reportadas, mas a deficiência de boro, e particularmente de cálcio, são as causas mais prováveis. As plantas translocam nutrientes minerais via fluxo de massa através do xilema (Biddulph et al., 1961). Quando a taxa de transpiração é alta, o fluxo de nutriente é grande. A redução no fluxo transpiratório acarreta a deficiência de cálcio, e a morte da gema apical é um sintoma característico. Assim, a melhora nas trocas gasosas, para facilitar a transpiração, pode ser mais efetiva que o aumento nos níveis de cálcio no meio de cultura sugerido por Sha et al. (1985) e Abousalim & Mantell (1994) para resolver o problema.

As características anatômicas e fisiológicas de uma espécie propagada *in vitro* podem refletir a troca gasosa entre o frasco de cultura e o meio (Majada et al., 1998). O grau com que essas plantas se diferem daquelas cultivadas no campo ou em casa de vegetação depende de muitos fatores, incluindo genótipo e variáveis restritas ao ambiente de cultura, como troca gasosa por unidade de tempo e disponibilidade de água (Ziv, 1991). Com base numa faixa de

severidade da anormalidade pode se ter plantas com aparência claramente malformadas, vitrificadas ou, mais apropriadamente, hiper-hidratadas (Debergh et al., 1992).

Plantas hiper-hídricas, quando transferidas para condições *ex vitro*, são mais susceptíveis à dessecação. Essas plantas requerem nebulizações adicionais para reduzir as perdas, o que aumenta o ataque de fungos.

Um possível mecanismo para melhorar as trocas gasosas e o fluxo de vapor de água é a ventilação forçada (Amstrong et al., 1997) ou natural através de selamento dos frascos com membranas (Talavera et al., 2001).

Novos sistemas para controle ambiental dentro do frasco de cultura implicarão em melhorias na qualidade da planta, autotrofia e automação (Kozai e Smith, 1995) e também facilitarão a aclimatização (Majada et al., 2001). Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre o controle do ambiente de cultivo durante a micropropagação e também são bastante escassas as informações sobre as características fisiológicas de plantas produzidas *in vitro* onde o ambiente interno é modificado (Majada et al., 2001)

7 CONCLUSÕES

a) O benomyl, inoculado no meio de cultura, controla 100% das contaminações fúngicas em explantes foliares de *Annona bahiensis* e *Annona glabra*.

b) A manutenção das culturas inicialmente no escuro é o tratamento mais efetivo no controle da oxidação em explantes foliares de *Annona cauliflora*. O PVP em concentrações elevadas (superior a 200 mg.L⁻¹) reduz parcialmente a oxidação das culturas.

c) A calogênese, na espécie *Rollinia sylvatica*, é estimulada utilizando como indutor o TDZ; nas espécies *Annona bahiensis* e *Annona glabra* quando são usados TDZ e 2,4-D combinados ou isoladamente.

d) Segmentos nodais das espécies *Annona glabra* e *Annona cauliflora* são mais responsivos à indução com BAP do que aqueles das espécies *Annona coriacea*, *Annona bahiensis* e *Rollinia sylvatica*.

e) A maior taxa de germinação em *Annona cauliflora* (65%) é obtida utilizando o substrato plantmax.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSALIM, A.; MANTELL, S. H. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot culture of *Pistacia vera* cv. Mateur. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v. 69, n. 2, p. 357-365, Mar. 1994.

ADAMS, R. M.; KOENIGSBERG, S. S.; LANGHANS, R. W. *In vitro* propagation of *Cephalotus follicularis* (Australian pitcher plant). *HortScience*, Alexandria, v. 14, n. 4, p. 512-513, Aug. 1979.

AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A.; YEOMAN, M. N. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). *Plant tissue and cell culture*. 2. ed. California: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 297-306.

ALVAREZ, R.; NISSEN, S. J.; SUTTER, E. G. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole 3-butyric-acid. *Plant Physiology*, Rockville, v. 89, n. 2, p. 439-443, Feb. 1989.

ARMSTRONG, J.; LEMOS E. E. P.; ZOBAY, S. M. A.; JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. A humidity-induced convective through flow ventilation systems benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut calloid. *Annals of Botany*, London, v. 79, n. 1, p. 31-49, Jan. 1997.

BEJOY, M.; HARIHARAN, M. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 245-247, Dec. 1992.

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

BIDDULPH, O.; NAKAYAMA, F. S.; CORY, R. Transpiration stream and ascension of calcium. **Plant Physiology**, Rockville, v. 36, n. 4, p. 429-436, July 1961.

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, 1987. p. 93-108.

BONGA, J. M.; VON ADEKAS, P. *In vitro* culture of tree. The Netherlands: Kluwer Academic Publish, 1992. 236 p. (Forestry Science, v. 38).

BROWN, D. M.; GROOM, C. L.; CVITANIK, M.; BROWN, M.; COOPER, J. L.; ARDITTI, J. Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 165-180, 1982.

CAPELLE, S. C.; MOK, D. W. S.; KIRCHNER, S. C.; MOK, M. C. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of *N*-(-isopentyl) [8-c] adenosine in callus tissue of *Phaseolus lunatus* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, n. 3, p. 796-802, Nov. 1993.

CASSELLS, A. C.; HARMEY, M. A.; CARNEY, B. F. Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic culture of *Pelargonium domesticum*: the use of *Xantomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plant. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 225, p. 153-162, 1988.

DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; von ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 135-140, Aug. 1992.

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

ENCINA, C. L.; PADILA, I. M. G.; CAZORLA, J. M.; CARO, E. Tissue culture in cherimoya. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 497, p. 289-302, 1994.

ENJARIC, F.; CARRON, M. P.; LARDET, L. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 57-65, 1988.

FALKINER, F. R. Strategy for selection of antibiotics for use against common bacterial pathogens and endophytes of plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 53-56, 1988.

FRIDBORG, G.; PEDERSON, M.; LANDSTROM, L. E.; ERIKSSON, T. The effects of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites, inhibition of morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 34, n. 4, p. 306-308, 1975.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 - the technology.** 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p

GOMES, G. A. C. **Propagação de moreira (*Maclura tinctoria*).** 1999. 91 p. Dissertação . (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GOULD, J. H.; MURASHIGE, T. Morphogenic substances released by plant tissue cultures. I. Identification of berberine in *Nandina* culture medium, morphogenesis and factors influencing accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 29-42, 1985

GRAHAN, I. A.; DENBY, K. J.; LEAVER, C. J. Carbon catabolite repression regulated glyoxylate cycle gene expression in cucumber. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 761-772, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.

GRÖNROOS, L.; KUBÁT, B.; VON ARNOLD, S.; ELIASSONE, L. Cytokinin contents in shoot cultures of four *Salix* clones. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 135, n. 2, p150-154, Oct. 1989.

HALDEMAN, J. H.; THOMAS, R. L.; MCKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinesis* and *C. japonica*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 2, p. 306-307, Apr. 1987.

HANSEN, C. E.; MEINS, F.; AEBI, R. Hormonal regulation of zeatine-riboside accumulation by tobacco cells. **Planta**, Berlin, v. 172, n. 4, p. 520-525, Dec. 1987.

HEE-JU, Y. U.; SOO KYUNG, O. H.; DONG-WOONG, CHOI; YOUNG MYUNG, KWON; SANG-GU, KIM. Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 5, p. 261-266, Feb. 1997.

HICKS, G. S. Patterns of organ developmental in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, New York, v. 46, n. 1, p. 1-23, Mar. 1980.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 105-119, May 1993.

JANG, J. C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 208-214, June 1997.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, I.; ROVERARO, C.; GOREUX, A. Promotion of *Annona cherimola in vitro* morphogenesis as influenced by antioxidants. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 56, n. 5, 224-227, Sept./Oct. 1991.

KNAUSS, J. F.; KNAUSS, M. E. Contamination in plant tissue cultures. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, Orlando, n. 92, p. 341-343, 1979.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gran-positive and gran-negative bacteria from plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 139-144, May 1992.

KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. Environmental control in plant tissue culture. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 301-318.

KRITZINGER, E. M.; JANSEN van VUUREN, R.; WOODWARD, B.; RONG, I. H.; SPREETH, M. H.; SLABBERT, M. M. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, n. 1/2, p. 61-65, 1998.

LE MOS, E. E. P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 5, p. 721-728, Sept. 1996a.

LE MOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, Sept. 1996b.

LIMA, A. R.; SANTANA, J. R. F. de.; SOUZA, P. B. L.; CREPALDI, I. C. Avaliação do poder germinativo de araticum (*Annonaceae*). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 109, 1999. Suplemento.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 415, 1980. (Abst. 321).

LOONEY, N. E.; TAYLOR, J. S.; PHARIS, R. P. Relationship of endogenous gibberellin and cytokinin levels in shoot tips to apical form in four strains of McIntosh apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 3, p. 395-398, May 1988.

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 29, n. 2, p. 92-96, Apr. 1993.

MAJADA, J. P.; CANTENO, M. L.; FEITO, I.; FERNÁNDEZ, B.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Stomatal and cuticular traits on carnation tissue culture under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulators**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 113-121, July 1998.

MAJADA, J. P.; SIERRA, M. I.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Air exchange rate effects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 87, n. 1/2, p. 121-130, Jan. 2001.

MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E.; MUJER, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, 1194-1197, Dec. 1987.

MURASHIGE, T. Plant cell culture as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 78, p. 17-30, 1977.

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

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona* hybrid (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* L). **Indian Journal of Horticulture**, v. 41, n. 2, 160-165, June 1984a.

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 29-40, 1984b.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plants from immature leaf-derive callus of strawberry (*Fragaria x Ananassa*). **Plant Science**, Limerick, v. 66, n. 1, p. 119-126, 1990.

PALNI, L. M. S.; BURCH, L.; HORGAN, R. The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. **Planta**, Berlin, v. 174, n. 2, p. 231-234, May 1988.

PEGO, J. V.; WEISBEEK, P. J.; SMEEKENS, S. C. M. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 3, p. 1017-1023, Mar. 1999.

PÉROS, J. P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability of *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 49, n. 319, p. 171-179, Feb. 1998.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 2, n. 1, p. 36-39, 1983.

PREECE, F. F.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In BAJAJM Y. P. S. **High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 168-189. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17)

RASAI, S.; KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. The effect of growth regulators, source of explants and irradiance on in vitro regeneration of atemoya. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 42, n. 3, p. 333-340, 1994.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, n. 1/2, p. 67-70, 1998.

SCORTICHINI, M.; CHIARIOTTI, A. *In vitro* culture of *Prinus persica* var. Laevis Gray (Nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 225, p. 109-113, 1988.

SHA, L.; McCOWN, B. H.; PETERSON, L. A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 5, p. 631-634, Sept. 1985.

SHEEN, J.; ZHOU, L.; JANG, J. C. Sugar as signaling molecules. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 2, n. 5, p. 410-418, Oct. 1999.

SHIELDS, R.; ROBINSON, S. R.; ANSLOW, P. A. Use the fungicides in plant tissue culture. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 33-36, 1984.

STIMART, D. P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: ZIMMERMAN, R. H. et al. (Ed.). **Tissue culture as a plant production systems for horticultural crops**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p. 301-315.

SUJATHA, M.; MUKTA, N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 135-141, Feb. 1996.

TALAVERA, C. R.; ESPADAS, F. L.; AGUILA, M. L.; MAUST, B. E.; OROPEZA, C. M.; SANTAMARÍA, J. M. The control of leaf water loss by cocunut plants cultured *in vitro* depends on the type of membrane used for

ventilation. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 5, p. 569-574, Sept./Oct. 2001.

TO, J. P. C.; REITER, W. D.; GIBSON, S. I. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. **BMC Plant Biology**, 2001. Disponível em: <<http://www.biomedcenter.com/1471-2229/2/4>>. Acesso em: 15 out. 2003.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. 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. 11-20.

van STADEN, J.; MOONY, P. A. The effect of IAA on the metabolism of kinetin by *Catharanthus roseus* crown gall callus. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 131, n. 3/4, p. 297-303, Dec. 1987.

VIANA, G. R.; COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A. B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explants de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 249-254, 1997.

ZIV, M. Ventilation: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

CAPÍTULO III

**INDUÇÃO DE BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS EM FOLHAS
DE *ANNONA GLABRA* L, *ANNONA BAHIENSIS* ST. HILL. E
ANNONA SQUAMOSA L E EM SEGMENTOS DE
HIPOCÓTILO E EPICÓTILO DE *ANNONA SQUAMOSA* L.**

1 RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Indução de brotações adventícias em folhas de *Annona glabra* L, *Annona bahiensis* St. Hill. e *Annona squamosa* L e em segmentos de hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. p. 63-85 Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG*.

O trabalho teve como objetivos avaliar, sob condições *in vitro*, o potencial regenerativo de folhas das espécies *Annona squamosa* L, *Annona glabra* L e *Annona bahiensis* St. Hill. e de segmentos de hipocótilo e epicótilo de *A. squamosa*. No primeiro estudo, a organogênese foi induzida através da inoculação de folhas de *A. squamosa*, *A. bahiensis* e *A. glabra* em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (2,22; 4,44; 8,88 e 17,76 μM) e ANA (0,00; 1,34; 2,68 e 5,37 μM). No segundo estudo, segmentos de hipocótilo e epicótilo de *A. squamosa* foram inoculados em meio WPM suplementado com BAP (0,00; 2,22; 8,87; 17,74 e 35,48 μM) e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a 25 \pm 3 °C. A análise dos resultados mostrou que a organogênese em folhas de *Annona* é dependente do tipo de explante utilizado e do balanço auxina-citocinina. As folhas cotiledonares apresentaram maior potencial organogênico para a micropropagação de *A. squamosa*. A indução de múltiplas brotações adventícias em hipocótilos e epicótilos de *A. squamosa* foi induzida apenas com o uso do BAP como indutor. O potencial regenerativo do hipocótilo foi maior que o do epicótilo. As maiores brotações em segmentos de hipocótilo (26,4 mm) e epicótilo (14,0 mm) foram obtidas com a menor concentração de BAP (2,22 μM).

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Induction of adventitious shoots in leaves of *Annona glabra* L., *Annona bahiensis* St. Hill. and *Annona squamosa* L. and in hypocotyl and epicotyl segments of *Annona squamosa* L. In: **Control of the *in vitro* morphogenesis in some Annonaceae species.** 2003, p.63-85. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The regeneration potential of leaf explants of the species *Annona squamosa* L., *Annona glabra* L. and *Annona bahiensis* St. Hill. and in hypocotyl and epicotyl segments of *A. squamosa* was evaluated under *in vitro* conditions. In the first study, the organogenesis was induced through the inoculation of leaf explants of *A. squamosa*, *A. bahiensis* and *A. glabra* in WPM medium supplemented with different concentrations of the growth regulators BAP (2.22; 4.44; 8.88 or 17.76 μM) and NAA (0.00; 1.34; 2.68 or 5.37 μM). In the second study, *A. squamosa* hypocotyl and epicotyl segments were inoculated in WPM medium containing different concentrations of BAP (0.00; 2.22; 8.87; 17.74 or 35.48 μM). After inoculation, the vessel with explants were maintained in a growth room under photosynthetic active radiation of 45-56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ and temperature of 25 ± 3 °C. Results showed that the organogenesis in leaves of *Annona* was dependent of explant type and auxin-cytokinin ratio. The cotyledonary leaf explants presented the best organogenic potential for the micropropagation of *A. squamosa*. The induction of adventitious multiple shoot in hypocotyl and epicotyl segments of *A. squamosa* was successfully using BAP as inductor. The regenerative potential of the hypocotyl was larger than epicotyl. The largest shoots in hypocotyl (26.4 mm) and epicotyl (14.0 mm) segments were obtained with the smallest concentration of BAP (2.22 μM).

3 INTRODUÇÃO

Atualmente, muitas espécies da família *Annonaceae* apresentam riscos consideráveis de extinção devido, principalmente, à destruição das vegetações nativas.

O conhecimento da morfogênese *in vitro* pode facilitar os processos de melhoramento (ainda inexistentes) através da multiplicação de plantas elite ou espécies com sério risco de extinção, além de facilitar a troca de material entre centros de pesquisa.

A conservação *in vitro* de espécies ameaçadas, pela regeneração a partir de folhas derivadas de *seedlings* germinados *in vitro*, apresenta vantagens quando comparada aos métodos que envolvem a cultura de meristema apical ou gemas laterais. A utilização de *seedlings*, como fonte de tecidos, propicia a representação de maior variabilidade genética, especialmente de espécies como a *Annona squamosa*, que tem base genética estreita. A desinfestação do explante não é requerida e, finalmente, o uso de tecidos jovens pode reduzir a frequência de variação somaclonal (Mercier & Kerbauy, 1993).

O trabalho teve como objetivos avaliar, sob condições *in vitro*, o potencial de regeneração de folhas das espécies *Annona squamosa* L., *Annona glabra* L. e *Annona bahiensis* St. Hill. e de segmentos de hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O emprego das técnicas de cultura de tecidos, especialmente na micropropagação, tem sido amplamente utilizado, principalmente quando a propagação generativa é insatisfatória, quando a progênie obtida é heterogênea, devido à heretorigose, ou em casos em que a propagação por sementes não

ocorre naturalmente. Por outro lado, é importante ressaltar sua grande utilidade em programas de conservação e /ou melhoramento, dada a economia de tempo na multiplicação de variedades, assim como na produção de clones promissores e livres de patógenos.

Várias pesquisas utilizando meristemas, gemas ou segmentos nodais têm sido realizadas objetivando a propagação de frutíferas (Jordan, 1988). De acordo com esse autor, os processos de organogênese e embriogênese têm sido induzidos diretamente em muitas espécies herbáceas. Entretanto, trabalhos visando induzir a regeneração de brotações em folhas em espécies lenhosas, em especial as Anonáceas, ainda são raros (Nair et al., 1984; Rasai et al., 1994). Estudos mostram que a adição de BAP e ANA é essencial na indução de organogênese. Por exemplo, Jordan (1988) induziu brotações em 100% de explantes foliares de *A. cherimola* cv. 'Concha Lisa' em meio MS suplementado com 8,87 μM BAP, 2,68 μM ANA e 200 mg.L^{-1} de caseína hidrolizada.

O sucesso da cultura de tecidos e a morfogênese dependem do tipo, do tamanho, da idade do explante e das condições *in vitro*. As taxas de sobrevivência, de crescimento e de multiplicação nos mais variados tipos de explantes dependem do tamanho do explante inicial (Murashige, 1977; Tisserat, 1985). Explantes muito pequenos apresentam baixa sobrevivência em cultura e os maiores são de difícil descontaminação (Murashige, 1977).

Explantes de tecidos novos, ainda sob divisão celular, em geral formam calo mais prontamente do que as partes mais velhas da planta, havendo maior probabilidade de que este seja organogênico. Explantes retirados de órgãos novos também possuem maior capacidade de induzir organogênese direta (George, 1993).

Em plantas lenhosas, os tecidos jovens são usados predominantemente como fonte de explantes devido a seu grande potencial regenerativo. A

organogênese a partir de explantes oriundos de plântulas tem sido reportado em *Citrus* spp (Barlass & Skene, 1982) e carambola (Litz & Conover, 1980).

A organogênese em *Annonaceae* tem recebido pouca atenção e somente um limitado sucesso tem sido reportado na literatura. Rasai et al. (1994) reportaram a indução de brotações múltiplas de hipocótilo excisado de plântulas de atemóia cv “African Pride”. O número máximo de brotações por explante foi obtido quando se utilizaram secções da parte distal (próximo a raiz) do hipocótilo. Em *Annona cherimola* cv “Concha Lisa”, Jordan (1988) também reportou a formação de brotações múltiplas a partir de segmentos do hipocótilo. As brotações adventícias ocorrem sem a passagem pela fase de calos. A espécie *Annona muricata* foi micropropagada com sucesso por Lemos & Blake (1996), utilizando como fonte de explante segmentos nodais e hipocótilo de plântulas obtidas através de sementes germinadas *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Organogênese direta em folhas de *Annona glabra* L, *Annona squamosa* L e *Annona bahiensis* St. Hill.

5.1.1 Assepsia e obtenção dos explantes.

As sementes de *Annona squamosa* foram descontaminadas, conforme procedimento descrito no item 5.6 do capítulo II e a assepsia dos segmentos nodais de *A. bahiensis* e *A. glabra* seguiram o procedimento descrito no item 5.5 do referido capítulo.

Sementes de *Annona squamosa* foram germinadas *in vitro* em meio WPM suplementado com 10 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25° ± 3 °C sob baixa radiação fotossintética ativa (2-5 μmol. m⁻².s⁻¹) por um período de 15 dias após a germinação. Foram

utilizados como explantes folhas definitivas e folhas cotiledonares. Cada folha constituiu um explante.

Os explantes das espécies *A. bahiensis* e *A. glabra* foram obtidos a partir de brotações *in vitro* de segmentos nodais, mantidos em tubos de ensaio completamente vedados durante 5 semanas, em meio WPM suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 8,88 µM BAP, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os segmentos nodais foram mantidos sob radiação fotossintética ativa de 45-56 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecidos por lâmpadas fluorescentes frias, fotoperíodo de 16h e temperatura de 25 ° ± 3 °C.

5.1.2 Meio básico e condições de incubação.

Os explantes, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio WPM enriquecido com 30 g.L⁻¹ de sacarose e diferentes combinações de BAP e ANA e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecidos por lâmpadas fluorescentes frias, fotoperíodo de 16h e temperatura de 25 ° ± 3 °C.

A organogênese foi induzida através do efeito de diferentes combinações de BAP (2,22; 4,44; 8,88 e 17,76 µM) x ANA (0,00; 1,34; 2,68; 5,37 µM) em folhas definitivas de *A. squamosa*, *A. bahiensis* e *A. glabra*, totalizando 36 tratamentos com 8 repetições, sendo cada repetição constituída de um tubo (um explante / tubo).

Foi avaliado também o efeito do tipo de explante sobre a organogênese, inoculando-se folhas definitivas e cotiledonares de *A. squamosa* em diferentes combinações de BAP (2,22; 4,44; 8,88 e 17,76 µM) e ANA (0,00; 1,34; 2,68;

5,37 μM). Cada tratamento era formado por 8 repetições, cada uma constituída por um tubo (um explante / tubo).

Foram avaliadas as percentagens de calos e brotações induzidas. A calogênese foi avaliada aos 30 dias após a inoculação e as brotações adventícias, aos 30 e 60 dias após a inoculação.

5.2 Indução de múltiplas brotações adventícias em hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L.

5.2.1 Assepsia e obtenção dos explantes.

As sementes de *Annona squamosa* foram descontaminadas e inoculadas no substrato Plantmax® da Eucatex, conforme procedimentos descritos no item 5.6 do capítulo II.

Após a germinação, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob baixa radiação fotossintética ativa ($2\text{-}5 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante 15 dias. O hipocótilo foi decapitado exatamente abaixo do primeiro par de folhas cotiledonares e acima da radícula e dividido em segmentos com comprimento entre 15 e 20 mm. O epicótilo foi excisado acima das folhas cotiledonares e exatamente abaixo do primeiro par de folhas definitivas e dividido em segmentos com comprimento entre 10 e 15 mm.

5.2.2 Meio básico e condições de incubação.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio WPM enriquecido com 30 g.L^{-1} de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0,00; 2,22; 8,87; 17,74; 35,48 μM) e solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas sob radiação fotossintética ativa de $45\text{-}56 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecidos por lâmpadas fluorescentes frias, fotoperíodo de 16h e temperatura de $25^\circ \pm 3^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo em fatorial 2 x 5 (em que 2 representa os tipos de explantes utilizados e 5 as concentrações de BAP), com 5 repetições, sendo cada repetição formada por 4 tubos (um explante / tubo).

Foram avaliados a porcentagem de calos e brotações formadas, o número médio de brotações, o tamanhos e o número de entrenós da maior brotação, aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Organogênese direta em folhas de *Annona glabra* L, *Annona squamosa* L e *Annona bahiensis* St. Hill.

Os explantes de *Annona squamosa* e *Annona bahiensis* apresentaram organogênese direta sem formação de calos e em algumas combinações de BAP e ANA houve formação de calos na base do explante. Em todas as combinações, observou-se que o fator genótipo teve a maior contribuição na indução de brotações adventícias. Nenhuma combinação entre BAP e ANA foi capaz de induzir brotações em folhas definitivas de *A. glabra* (Tabela 1).

A proliferação de gemas adventícias foi evidente na base dos explantes foliares 20-30 dias após a inoculação. Brotações originaram-se diretamente das protuberâncias formadas na base da folha e não foi observada a fase intermediária de calo (Figura 1).

As folhas de *Annona glabra* apresentaram incapacidade para a produção de brotações adventícias e trinta dias após a inoculação os explantes estavam completamente amarelados. Os explantes utilizados eram provenientes de brotações com cinco semanas de idade, mantidas em tubos totalmente vedados. Nessas condições, provavelmente, para essa espécie, o processo de senescência já estava desencadeado e as células já não estavam mais competentes.

TABELA 1- Efeito de interação BAP e ANA sobre a porcentagem de calos aos 30 dias (C), porcentagem de brotações, 30 (B1) e 60 dias (B2) após a inoculação, em folhas intactas de *Annona squamosa* L. ⁽²⁾, *Annona bahiensis* St. Hill. ^(y) e *Annona glabra* L. ^(x). Lavras – MG, 2002.

Espécie	BAP (μM)											
	2,22			4,44			8,88			17,76		
	C	B1	B2	C	B1	B2	C	B1	B2	C	B1	B2
	0,00 μM ANA											
<i>A. squamosa</i>	100	50	50	50	-	-	50	-	-	100	-	-
<i>A. bahiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. glabra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,34 μM ANA											
<i>A. squamosa</i>	50	50	50	87	-	-	50	-	-	100	-	-
<i>A. bahiensis</i>	-	-	50	-	-	-	-	-	50	-	-	50
<i>A. glabra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,68 μM ANA											
<i>A. squamosa</i>	37	50	50	50	-	-	50	-	-	100	-	-
<i>A. bahiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	100
<i>A. glabra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5,37 μM ANA											
<i>A. squamosa</i>	50	62	100	62	-	-	100			100	-	-
<i>A. bahiensis</i>	-	-	50	-	-	50	-	-	50	-	-	100
<i>A. glabra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^(x) Explantes provenientes de plantas germinadas *in vitro*.

^(y) e ^(z) Explantes provenientes de brotações *in vitro* de segmentos nodais.

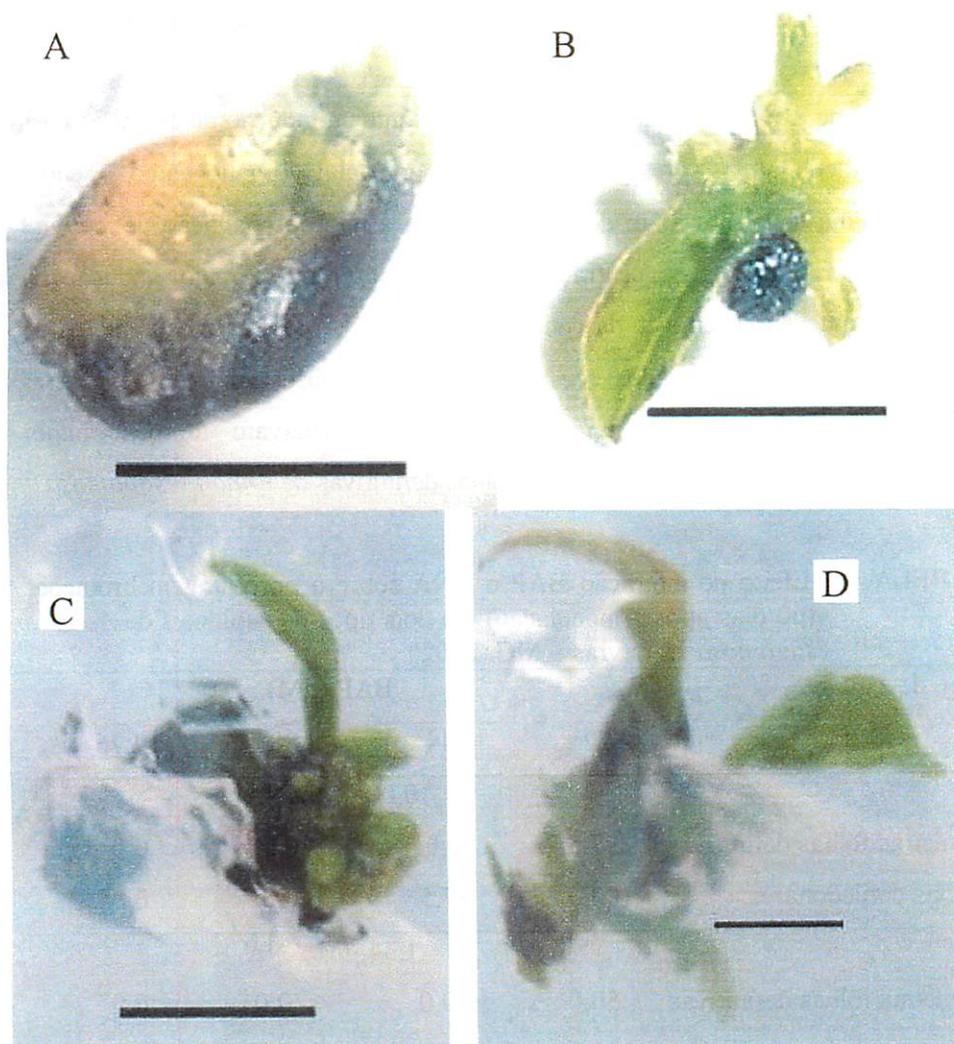


FIGURA 1- Aspectos da indução de brotações adventícias em folhas definitivas de *Annona bahiensis* St. Hill. (A, B) e *Annona squamosa* L. (C, D) 120 dias após a inoculação. Lavras – MG, 2002. Barra = 10mm.

A citocinina e a auxina agem sinergisticamente para produzir brotações vigorosas em *A. squamosa* e *A. bahiensis* *in vitro*. A resposta morfogênica de explantes foliares, para diversas combinações de BAP e ANA, tem sido descrita

em *Annona squamosa* por Nair et al. (1984) e Lemos & Blake (1996) em meio MS, que obtiveram múltiplas brotações em explantes foliares estimulados por BAP e cinetina.

O tipo de explante usado é um fator importante na indução de brotações. As folhas cotiledonares apresentaram maior potencial organogênico, sendo, portanto, uma excelente fonte de explantes para a micropropagação de *Annona* (Tabela 2). Em baixas concentrações de BAP observou-se maior indução de brotações, independentemente da concentração de ANA. Os maiores números de gemas (dados não mostrados) e brotações foram observados em explantes oriundas de folhas cotiledonares, as quais apresentavam também maior capacidade organogênica em relação às folhas definitivas de *Annona squamosa*

TABELA 2- Efeito de interação BAP e ANA sobre a porcentagem brotações (60 dias após a inoculação) em dois tipos de explantes de *Annona squamosa* L. Lavras – MG, 2002.

Tipo de explante	BAP (μM)			
	2,22	4,44	8,88	17,76
	0,00 μM ANA			
Primeiras folhas definitivas	37,5	0,0	0,0	0,0
Folhas cotiledonares	100,0	87,5	0,0	0,0
	1,34 μM ANA			
Primeiras folhas definitivas	50,0	0,0	0,0	0,0
Folhas cotiledonares	100,0	100,0	100,0	0,0
	2,68 μM ANA			
Primeiras folhas definitivas	37,5	50,0	0,0	0,0
Folhas cotiledonares	100,0	100,0	100,0	87,5
	5,37 μM ANA			
Primeiras folhas definitivas	100,0	0,0	0,0	0,0
Folhas cotiledonares	100,0	100,0	100,0	100,0

(Tabela 2). Entretanto, na ausência ou em baixas concentrações de ANA (1,34 μM), a capacidade organogênica das folhas cotiledonares foi fortemente influenciada pelo BAP. As folhas definitivas não apresentaram um padrão de resposta às combinações entre ANA e BAP (Tabela 2), indicando a necessidade de repetição do experimento para que sejam feitas melhores inferências. As condições de cultivo das plântulas doadoras de explantes devem ser mais estudadas.

Os resultados aqui obtidos são relevantes, considerando que algumas espécies de *Annona* apresentam dificuldade de regeneração *in vitro*. A indução de organogênese foi conseguida com sucesso em folhas de *Annona squamosa* e *Annona bahiensis*.

Com o processo de regeneração descrito nesse trabalho, dependendo do balanço entre o BAP e ANA, a produção de gemas e brotações adventícias na região do pecíolo das folhas de *A. squamosa* atingiu 100%. Esses resultados corroboram aqueles reportados por Nair et al. (1984) para a espécie *A. squamosa*. De acordo com esses autores, a porção da folha utilizada como explante é um fator muito importante na formação de brotações, sendo a base da folha com o pecíolo a região mais responsiva na indução de brotações. Os valores encontrados aqui são maiores quando comparados com outras espécies. Hervé et al. (2001) reportam que apenas 10% das folhas de um clone elite de *Eucaliptus gunnii* produziram gemas adventícias.

O processo de organogênese nas espécies *A. squamosa* e *A. bahiensis* ocorre de maneira semelhante (Figura 2). Inicialmente, uma protuberância é formada próximo ao pecíolo da folha, seguida de iniciação das gemas na superfície da mesma. Os tipos de células presentes nessas protuberâncias não foram identificadas nesse estudo.



FIGURA 2- Aspectos da indução de brotações adventícias em folhas cotiledonares de *Annona squamosa* L. 120 dias após a inoculação. Lavras – MG, 2002. Barra = 10mm.

A perspectiva fisiológica dos processos celulares associados à morfogênese não foi tema de estudo neste trabalho mas, diante de respostas pouco homogêneas observadas para as três espécies, torna-se relevante reportar a

literatura sobre estes processos, para melhor entendimento das variações observadas.

O aparecimento de gemas adventícias é explicado por Van Arnold & Hawes (1989) como decorrente de meristemóides originados pela diferenciação de tecidos epidérmicos e sub-epidérmicos, ocasionado pela ação de citocininas.

Somente células com receptores específicos são capazes de ligar-se ao BAP recebendo, assim, o estímulo para disparar o processo de morfogênese (Osborne, 1984). Estas células existem em diferentes níveis de competência, requerendo períodos variados de exposição para que o agente regulador possa ser reconhecido.

Componentes de meio de cultura, tipos, tamanho e idade dos explantes ou da cultura podem contribuir para alterações do material genético. O processo de regeneração de organogênese direta em folhas de *A. squamosa* e *A. bahiensis* descrito nesse trabalho é o primeiro passo para estudos posteriores de análise da integridade genética e molecular dessas espécies.

6.2 Indução de múltiplas brotações adventícias em hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L.

Brotações adventícias formaram-se diretamente em toda a extensão do hipocótilo, enquanto no epicótilo, as brotações ocorreram somente na extremidade apical do explante. Houve formação de 100% de calos na base de ambos os tipos de explantes, em todas as concentrações de BAP utilizadas. Embora não tenha sido observado formação de calos na ausência de BAP, este afetou diretamente o tamanho e número de entrenós das brotações. O aumento na concentração de BAP reduziu o tamanho e o número de entrenós das brotações, sendo que as maiores brotações (28,5mm) foram obtidas com a menor concentração de BAP (Tabela 3).

TABELA 3- Porcentagem de calos, comprimento e número de entrenós da maior brotação em hipocótilo (H) e epicótilo (E) de *Annona squamosa* L em função da concentração de BAP utilizada. Lavras – MG, 2002.

BAP (μ M)	Calos na base do explante (%)		Comprimento da maior brotação (mm)		Nº de entrenós da maior brotação	
	H	E	H	E	H	E
2,22	100,0	100,0	28,4	14,0	4,6	3,0
8,87	100,0	100,0	25,0	13,4	3,6	3,0
17,74	100,0	100,0	21,4	9,8	3,2	2,4
35,48	100,0	100,0	8,0	8,6	2,0	2,0
0,00	0,0	0,0	8,0	2,4	1,8	0,8

Verificou-se, para os dois tipos de explantes, uma correlação direta entre concentração de BAP e o tamanho do calo formado (dados não mostrados), sendo detectado um aumento do tamanho do calo com o incremento na dose do regulador.

O número de brotações formadas no hipocótilo foi sempre menor que o número de gemas induzidas e em muitos explantes as gemas não desenvolveram. A produção de gemas que originaram brotações foi mais alta nas concentrações mais baixas de BAP (dados não apresentados).

O número de brotações formadas no epicótilo aumentou com o incremento na concentração de BAP. Para a regeneração a partir do hipocótilo, a concentração de 8,87 μ M BAP induziu o maior número de brotações (4,47) e diferiu significativamente do controle e da concentração 2,22 μ M BAP (Tabela 4).

A comparação dos dois tipos de explantes mostra que o potencial regenerativo do hipocótilo é maior que o do epicótilo. Quando induzidos com 8,87 μ M BAP, os segmentos de hipocótilo produziram 4,47 brotações por

TABELA 4- Dados cumulativos do número de brotações em hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L em função da concentração de BAP utilizada e da fonte de explante. Lavras – MG, 2002.

BAP (μM)	Dias após a inoculação			
	30	45	60	Média
	<u>Hipocótilo</u>			
8,87	4,20	4,20	5,00	4,47 a ^z
17,74	3,40	3,40	3,40	3,40 ab
35,48	2,40	2,80	3,40	2,87 abc
2,22	2,40	2,40	2,20	2,33 bc
0,00	1,60	1,60	1,60	1,60 c
	<u>Epicótilo</u>			
35,48	2,00	2,40	3,20	2,53 a ^z
17,74	2,00	2,40	3,00	2,47 a
8,87	1,80	1,80	2,40	2,00 a
2,22	1,40	1,60	1,60	1,53 a
0,00	0,80	0,80	0,80	0,80 a

^z Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, para cada tipo de explante, não difere entre si pelo teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

explante contra 2,0 do epicótilo, diferenciando de maneira significativa ($P \leq 0,05$) (Tabela 5).

Pelo menos para os segmentos de hipocótilo, observou-se uma tendência à redução no número de brotações por explantes quando a concentração de BAP foi superior a 8,87 μM .

A obtenção de múltiplas brotações adventícias, via organogênese direta, através da utilização de segmentos de hipocótilo e epicótilo de *A. squamosa*, pode ser facilmente induzida com o BAP (Figura 3). Os resultados encontrados corroboram Rasai et al. (1994), que reportaram a indução de múltiplas brotações

em hipocótilos excisados de atemóia cv. 'African Pride'. O número máximo de gemas verificadas nessa cultivar foi de 12,6 por explante na parte distal do hipocótilo inoculado em meio MS suplementado com 8,87 μM BAP e 0,46 μM cinetina e o incremento do nível de BAP acima 8,87 μM decresceu o número de gemas, o comprimento das brotações e o peso fresco das brotações. A formação de múltiplas brotações em segmentos de hipocótilo sem passar pela fase de calo

TABELA 5- Dados cumulativos do número de brotações em hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L em função da fonte de explante e das concentrações de BAP utilizadas. Lavras – MG, 2002.

Tipo de explante	Dias após a inoculação			
	30	45	60	Média
<u>0,00 μM BAP</u>				
Hipocótilo	1,60	1,60	1,60	1,60 a ²
Epicótilo	0,80	0,80	0,80	0,80 a
<u>2,22 μM BAP</u>				
Hipocótilo	2,40	2,40	2,20	2,33 a
Epicótilo	1,40	1,60	1,60	1,53 a
<u>8,87 μM BAP</u>				
Hipocótilo	4,20	4,20	5,00	4,47 a
Epicótilo	1,80	1,80	2,40	2,00 b
<u>17,74 μM BAP</u>				
Hipocótilo	3,40	2,60	3,80	3,60 a
Epicótilo	2,00	2,40	3,00	2,47 a
<u>35,58 μM BAP</u>				
Hipocótilo	2,40	2,80	3,40	2,87 a
Epicótilo	2,00	2,60	3,20	2,60 a

² Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, para cada concentração de BAP, não diferem entre si pelo teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

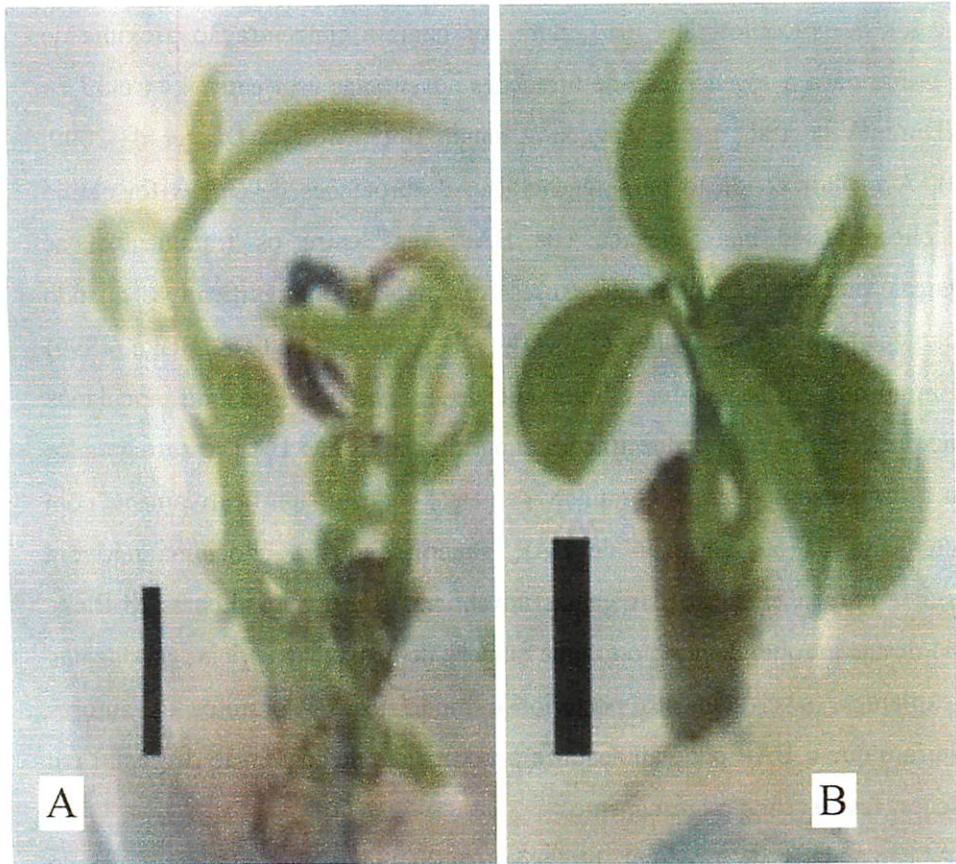


Figura 3. Aspectos morfológicos de brotações adventícias em segmentos de hipocótilo (A) e epicótilo (B) de *Annona squamosa* L. 45 dias após a inoculação. Barra = 10 mm.

também foi reportada por Jordan (1988) e as maiores percentagens de brotações adventícias foram obtidas em meio MS suplementado com os reguladores BAP e ANA (8,87 e 2,68 μM , respectivamente).

A formação de brotações na extremidade apical dos segmentos de epicótilo está diretamente relacionada com a concentração de BAP. Houve benefício de altas concentrações desse fitorregulador sobre o número de brotações em

segmentos de epicótilos de *Citrus*, para os quais a concentração próxima do nível ótimo para a regeneração de brotações adventícias está entre 4,44 e 17,76 μM (Durán Vila et al., 1989; Maggon & Singh, 1995; Moreira-Dias et al., 2000, 2001). A melhor condição para regeneração de brotações de *Citrus* foi obtida nas concentrações mais elevadas de BAP, mas entre os tratamentos, as diferenças, embora aparentemente expressivas, não foram significativas quando comparadas pelo teste de Tukey (Tabela 4). Entretanto, Lemos & Blake (1996) reportaram que em segmentos e hipocótilo de *A. squamosa*, quando inoculados em meio de cultura com concentrações superiores a 35 μM BAP, esse regulador inibiu a formação de gemas. O número de gemas reduziu significativamente com o incremento da concentração de BAP, sugerindo que a citocinina não era necessária para a iniciação das gemas adventícias. Entretanto, Lemos & Blake (1996) destacam que, devido ao grande número de gemas adventícias produzidas nos explantes, o crescimento posterior é muito lento. Portanto, os autores concluíram que o BAP pode aumentar a porcentagem de conversão de gemas em brotações, favorecendo o crescimento.

A capacidade de produzir brotações regeneradas que enraízam quando excisadas é um fator primário para a micropropagação. O tamanho das brotações em segmentos de hipocótilo e epicótilo foi inversamente proporcional à concentração de BAP utilizada. As maiores brotações em hipocótilo (26,4 mm) e epicótilo (14,0 mm) foram obtidas com o menor nível de BAP (2,22 μM) (Tabela 3). Em *Citrus*, o tamanho das brotações formadas é um fator limitante na micropropagação (Durán Vila et al., 1989). Em adição ao efeito do BAP (Tabelas 3 e 4), o comprimento das brotações adventícias nas seções de hipocótilo parece ser limitado pelo suplemento nutricional, já que esse parâmetro é inversamente relacionado com o número de brotações.

Futuros trabalhos devem ser conduzidos para determinar o comprimento ideal das brotações a serem utilizadas com sucesso para a indução do enraizamento.

7 CONCLUSÕES

a) As folhas cotiledonares apresentam maior potencial organogênico para a micropropagação de *Annona squamosa*.

b) O uso de folhas jovens intactas mostrou-se promissor com fonte de explante para proliferação de brotações adventícias, sem a passagem pela fase de calo, para as espécies *Annona squamosa* e *Annona bahiensis*, embora haja necessidade de aprimoramento da técnica.

c) O potencial regenerativo do hipocótilo é maior que o do epicótilo e as brotações formadas nos hipocótilo são mais vigorosas.

d) Brotações adventícias formam-se diretamente em toda a extensão dos segmentos de hipocótilo, enquanto, nos segmentos de epicótilo, ocorrem somente na extremidade apical, quando esses são induzidos com uma pequena concentração de BAP (2,22 μ M).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARLASS, M.; SKENE, K. G. M. *In vitro* plantlet formation from Citrus species and hybrids. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 333-341, 1982.

DURÁN VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of three Citrus species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 16, n. 2, p. 123-133, 1989.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. part 1. the technology.** 2. ed. Edington: Exergetics, 1993. 574 p.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 4, p. 645-653, Sept. 2001.

JORDAN, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 53, n. 5, p. 234-237, Sept./Oct. 1988.

LE MOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p.395-403, May 1996.

LITZ, R. E.; CONOVER, R. A. Partial organogenesis in tissue culture of *Averrhoa carambola*. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 735, Dec. 1980.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Kew Botanic Gardens: Micropropagation News**, Kew, v. 1, n. 6, p. 70-72, 1993.

MOGGON, R.; SINGH, B. D. Promotions of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 63, p. 123-128, 1995.

MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and their response to light. **Annals of Botany**, London, v. 85, n. 1, p. 103-110, Jan. 2000.

MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Toyer citrange **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 87, n. 4, p. 275-290, Mar. 2001.

MURASHIGE, T. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 17-30, 1977.

NAIR, S.; GUPTA, M. V.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 29-40, 1984.

OSBORNE, D. J. Concepts of target cells in plant differentiation. **Cell Differentiation**, Clare, v. 14, n. 3, p. 161-169, 1984.

RASAI, S.; KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. The effect of growth regulators, source of explants and irradiance on *in vitro* regeneration of atemoya. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 42, n. 3, p. 333-340, 1994.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant Regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture - a practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p. 79-106.

van ARNOLD, S.; HAWES, C. Differentiation of bud meristems and cataphylls during adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, n. 2, p. 422-428, Feb. 1989.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DA POLARIDADE DO EXPLANTE NA RESPOSTA MORFOGÊNICA DE SEGMENTOS DE HIPOCÓTILO E EPICÓTILOS DE *ANNONA SQUAMOSA* L.

1 RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Influência da polaridade do explante na resposta morfogênica de segmentos de hipocótilo e epicótilos de *Annona squamosa* L. In: _____. Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae*. 2003. p. 86-99. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O trabalho teve como objetivos avaliar, sob condições *in vitro*, a influência da polaridade de explantes na resposta morfogênica. Segmentos de hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L. foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido de 8,87 μM BAP e 250 mg.L^{-1} de benomyl nas seguintes orientações: horizontalmente sobre a superfície do meio de cultura, verticalmente no meio na posição normal ou na posição invertida (somente hipocótilo), em tubos de ensaio fechados com tampa plástica (selada ou não com a película de PVC) e tampão de algodão. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a 25 \pm 3 °C. A análise dos resultados mostrou que polaridade dos explantes afetou a organogênese e o maior número de brotações (8,30 por explante) foi obtido em hipocótilos inoculados na posição vertical normal. Não houve influência significativa da forma de fechamento dos tubos na resposta morfogênica dos explantes. A inoculação de segmentos de hipocótilos e epicótilos na orientação vertical constituiu um método eficiente para a regeneração de plantas de *A. squamosa*.

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Influence of the explant orientation on morphogenic response of hypocotyl and epicotyl segments of *Annona squamosa* L. In: _____. **Control of the *in vitro* morphogenesis in some *Annonaceae* species.** 2003. p. 86-99. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

In this work, the influence of explant orientation on the *in vitro* morphogenic response of *Annona squamosa* L was evaluated. Hypocotyl and epicotyl segments were inoculated in WPM medium supplemented with 8.87 μM BAP and 250 mg.L^{-1} benomyl in three orientations: placed horizontally on the medium surface, inserted vertically in the normal position and planted vertically in the inverted position (hypocotyl segments only) into test tubes closed with normal transparent plastic cap (sealed or not with PVC film) or cotton tampon. After inoculation, the tubes with explants were maintained in a growth room under photosynthetic active radiation of 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ and temperature of 25 ± 3 °C. Results showed that the explant polarity affected organogenesis and the largest hypocotyls shoot number (8.3 per explant) was found in explants inserted vertically in the normal position. No influence was observed of different vessel sealing on morphogenic response of explants. The incubation of hypocotyl and epicotyl segments in the vertical orientation constituted an efficient system for regenerating plants of *A. squamosa*.

3 INTRODUÇÃO

A posição do explante sobre o meio de cultura parece desempenhar função importante na calogênese e organogênese. Os explantes inoculados *in vitro* normalmente exibem uma acentuada polaridade na proliferação celular e na morfogênese. Isso pode está relacionado com a posição e/ ou orientação que órgão ou pedaço de tecido tem na planta intacta e também com sua orientação dentro do recipiente de cultivo. A polaridade de regeneração varia com o genótipo (até entre variedades dentro de uma mesma espécie) e pode, às vezes, ser revertido pelo tratamento com reguladores de crescimento (George, 1993).

Uma explicação geral para a polaridade é que quando um segmento de tecido é cortado, a unidade fisiológica é perdida. Isso pode causar a redistribuição de algumas substâncias, provavelmente auxinas, o que explica as respostas diferentes no crescimento (Hartmann et al., 1997).

O trabalho teve como objetivos avaliar, sob condições *in vitro*, à influência da polaridade de explantes de hipocótilo e epicótilo de *Annona squamosa* L na resposta morfogenética.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Quando um órgão completo é seccionado em pedaços, os vários segmentos diferem na sua capacidade morfogênica. Existe, freqüentemente, um gradiente na morfogênese nas segmentos progressivas. Por exemplo, segmentos de 5 mm do meio do hipocótilo de *Helianthus annuus* são os melhores explantes para se obter calo capaz de regenerar brotações adventícias (Grecco et al., 1984). Em *Citrus sinensis* 'Valencia', a capacidade morfogênica do epicótilo decresce à medida que se afasta do cotilédone (Burger & Hackett, 1986).

Em macieira cv. “Delicious”, maior produção de brotações axilares foi verificada quando os explantes foram posicionados na forma invertida, no meio de cultura, do que na posição correta (Zimmerman & Fordhan, 1989). Segundo Byeong et al. (1987), o posicionamento horizontal do explante no meio de cultura aumentou significativamente o número total de brotações. A regeneração *in vitro* a partir de hipocótilo tem sido reportado em algumas espécie de *Annona* (Rasai et al., 1995) e em outras frutíferas, como os *Citrus* (Garcia-Luiz et al., 1999).

A polaridade natural de eventos regenerativos é normalmente atribuída ao movimento de substâncias reguladoras do crescimento no interior da planta, principalmente o transporte polar da auxina AIA. A adição de auxinas e citocininas no meio de cultura pode reforçar a polaridade normalmente observada no explante, induzindo regeneração de partes não responsivas de órgão ou conduzindo ao desaparecimento ou reversão da tendência polar (George, 1993).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Assepsia e obtenção dos explantes.

As sementes de *Annona squamosa* foram descontaminadas e inoculadas no substrato Plantmax® da Eucatex, conforme procedimentos descritos no item 5.6 do capítulo II.

Após a germinação, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob baixa radiação fotossintética ativa ($2-5 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante 15 dias. O hipocótilo foi decapitado exatamente abaixo do primeiro par de folhas cotiledonares e acima da radícula e dividido em segmentos com comprimento entre 15 e 20 mm. O epicótilo foi excisado acima das folhas cotiledonares e

exatamente abaixo do primeiro par de folhas definitivas e dividido em segmentos com comprimento entre 10 e 15 mm.

5.2 Meio básico e condições de incubação.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM, enriquecido com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 8,87 µM BAP, 250 mg.L⁻¹ de benomyl e solidificado com 7 g.L⁻¹ ágar. O pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação dos explantes, as culturas foram mantidas sob radiação fotossintética ativa de 45-56 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecidos por lâmpadas fluorescentes frias, fotoperíodo de 16h e temperatura de 25 ° ± 3 °C.

Em um primeiro experimento, segmentos de hipocótilo com comprimento entre 10 e 15 mm foram inoculados no meio de cultura em três orientações: 1) horizontalmente sobre a superfície do meio de cultura, 2) verticalmente na posição normal, com a extremidade basal do segmento inserido no meio de cultura a uma profundidade de 2-3 mm e a extremidade apical protrundindo 7-12 mm e 3) introduzido verticalmente no meio na posição invertida, com a extremidade apical inserida no meio de cultura a uma profundidade de 2-3 mm com a extremidade basal protrundindo 7-12 mm.

No segundo experimento foram comparados segmentos de hipocótilo e epicótilo com comprimento entre 10 e 15 mm, os quais foram inseridos no meio nas seguintes posições: 1) horizontalmente sobre a superfície do meio de cultura e 2) verticalmente na posição normal, com a extremidade basal do segmento inserido no meio de cultura a uma de profundidade 2-3 mm de e a extremidade apical protrundindo 7-12 mm.

Para os dois experimentos, avaliaram-se também três tipos de fechamento dos tubos de ensaio: tampa plástica com a película de PVC, tampa plástica sem a película de PVC e tampão de algodão.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. No primeiro experimento foi utilizado um esquema fatorial 3x3 (em que 3 representa os tipos de orientações e de selamento dos tubos) com 4 repetições, sendo cada parcela formada por quatro tubos (um explante/ tubo). No segundo, o arranjo fatorial 2x2x3 (em que 2 representa os tipos de explante e de orientações e 3, os tipos de selamento) com 2 repetições, sendo cada parcela formada por 4 tubos (um explante/ tubo).

Foram avaliados o número de brotações por explante e a percentagem de explantes resposivos, 45 dias após a inoculação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação “orientação dos explantes x tipos de selamento” foi significativa para a percentagem de explantes resposivos ($P \leq 0,05$). O efeito isolado da orientação dos explantes foi altamente significativo para o número de brotações ($P \leq 0,01$) e percentagem de explantes resposivos ($P \leq 0,01$) (Tabela 1). Os segmentos de hipocótilo inseridos verticalmente no meio na orientação normal emitiram maior número de brotações adventícias (8,30 por explante) e a maior percentagem de explantes resposivos (72,25), diferindo significativamente dos segmentos inoculados na posição horizontal (Tabela 2). Observou-se que, em qualquer orientação dos segmentos, a formação das gemas e brotações adventícias ocorreu ao longo do segmento.

Nos segmentos inseridos verticalmente no meio na orientação invertida, verificou-se que a extremidade apical, em contato com o meio, formou um calo não friável e vigoroso, embora o número de gemas tenha sido menor (dados não mostrados). Todavia, o número de brotações não diferiu estatisticamente de segmentos inoculado verticalmente na orientação normal. O menor número de

brotações (4,49 por explante) e a menor percentagem de explantes responsivos (44,44) foram verificados em explantes inoculados horizontalmente (Tabela 2).

TABELA 1- Resumo da análise de variância para número médio de brotações e percentagem de explantes responsivos provenientes hipócotilos de *Annona squamosa* L., em diferentes tipos de orientações e selamentos. Lavras - MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Número de brotações ^z	Explantes responsivos ^z
Orientação explante (A)	2	1, 5104 **	14,3114 **
Tipo de selamento (B)	2	0,1479 ns	0,9852 ns
A x B	4	0,0954 ns	5,3171 *
Resíduo	27	0,1452	1,2988
C.V. (%)		14,31	14,86

ns - Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x + 1}$.

TABELA 2- Número médio de brotações e percentagem de explantes responsivos provenientes de hipócotilos de *Annona squamosa* L., em diferentes tipos de orientações . Lavras - MG, 2002.

Tipo de orientação	Número médio brotações	Explantes responsivos (%)
Vertical	8,30 a ^z	72,25 a
Horizontal	4,49 b	44,44 b
Invertido	6,11 a	63,91 a

^z - Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Não houve diferença significativa entre os três tipos de selamentos no número de brotações e na percentagem de explantes responsivos (Tabela 3). Entretanto, o tampão de algodão promoveu maior evaporação do meio de cultura, o que ocasionou redução no potencial hídrico do substrato e, conseqüentemente, diminuição no tamanho das brotações (dados não mostrados).

TABELA 3- Número médio de brotações e percentagem de explantes responsivos provenientes de hipócotilos de *Annona squamosa* L., em diferentes tipos de selamentos . Lavras - MG, 2002.

Tipo de selamento	Número médio de brotações	Explantes responsivos (%)
Tampa plástica sem PVC	6,80 a ²	61,13 a
Tampa plástica com PVC	6,44 a	58,34 a
Tampão de algodão	5,66 a	61,13 a

² – Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com relação à origem do explante, a interação dupla “origem do explante x orientação do explante” foi altamente significativa para número de brotações por explante ($P \leq 0,01$). A interação tripla “origem do explante x orientação do explante x tipos de selamentos” foi significativa para percentagem de explantes responsivos ($P \leq 0,05$). Para os dois parâmetros avaliados (número de brotações por explante e percentagem de explantes resposivos) não foi verificado efeito isolado de tipos selamento, enquanto os fatores origem e orientação dos explantes isoladamente foram altamente significativos (Tabela 4).

Os segmentos de hipocótilo mostraram-se com maior capacidade organogênica, independentemente do tipo de orientação, do que aqueles de epicótilo. O maior valor para hipocótilo (8,30) foi superior a seis vezes aquele

TABELA 4- Resumo da análise de variância para número médio de brotações e da percentagem de explantes responsivos hipocótilos e epicótilos provenientes de *Annona squamosa* L., em diferentes tipos de orientações e selamentos. Lavras - MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Número de brotações ^z	Explantes responsivos (%) ^z
Origem do explante (A)	1	16,8695 **	27,7063 **
Orientação explante (B)	1	1,4138 **	56,6411 **
Tipo de selamento (C)	2	0,0367 ns	0,1351 ns
A x B	1	1,6019 **	0,0785 ns
A x C	2	0,1300 ns	3,5173 ns
B x C	2	0,1134 ns	23,8401 **
A x B x C	2	0,0559 ns	11,1168 *
Resíduo	36	0,1353	3,1871
C.V. (%)		17,68	26,54

ns - Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

encontrado para os segmentos de epicótilo (1,27), quando inoculados na posição vertical (Tabela 5). A percentagem de explantes responsivos de hipocótilos não diferiu entre os tipos de selamento, dentro de cada tipo de orientação. Na comparação de tipos de explantes, os resultados mostram que os segmentos de hipocótilo são mais responsivos que os de epicótilo, independentemente da orientação do explante ou do tipo de selamento dos tubos (Tabela 6).

Tecidos oriundos de *seedlings* de *A. cherimola* mostram grande potencial regenerativo (Tazzari et al., 1990). A regeneração de brotações de hipocótilo tem

TABELA 5- Número médio de brotações provenientes de hipócotilos e epicótilos de *Annona squamosa* L., em diferentes tipos de orientações do explante . Lavras - MG, 2002.

Origem de explante	Orientação do explante	
	Vertical	Horizontal
Hipocótilo	8,30 A ^z a ^y	4,49 B a
Epicótilo	1,27 A b	1,36 A b

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 6- Percentagem de explantes responsivos provenientes de hipócotilos e epicótilos de *Annona squamosa* L., em função da origem e da orientação do explante e dos tipos de selamento . Lavras - MG, 2002.

Origem de explante	Orientação do explante					
	Vertical			Horizontal		
	Tampa com PVC	Tampa sem PVC	Tampão de algodão	Tampa com PVC	Tampa scm PVC	Tampão de algodão
Hipocótilo	83,35a ^z A ^y	75,00 aA	66,70 aA	41,62 aA	50,00 aA	58,35 aA
Epicótilo	66,67 aA	66,70 aA	24,97 bB	24,97 aA	16,65 aB	24,97 aB

^z - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, dentro de cada tipo de orientação, não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

sido reportado para espécies de *Annona*. Rasai et al. (1994) mostraram que a formação de múltiplas brotações, sem a passagem pela fase de calo, foi possível em segmentos de hipocótilo de *A. cherimola* cv. 'Concha Lisa' (Jordan, 1988) e *A. squamosa* (Lemos & Blake, 1996), *A. muricata* (Bejoy & Hariharan, 1992) e

atemóia cv. 'African Pride' (Rasai et al., (1994). O número médio de brotações por explante (6,80) é superior àquele encontrado por Bejoy & Hariharan (1992). Esses autores reportaram que uma média de 4,8 brotações por explante foi alcançada em meio MS suplementado com 8,87 μM BAP e 0,54 μM ANA. Em concentrações superiores, de acordo com os mesmos autores, houve indução de poucas brotações.

Nos segmentos de epicótilos, observou-se que quanto mais próximo do nó cotiledonar, maior o número de gemas e brotações (dados não mostrados). Essa correlação inversa entre distância do nó cotiledonar e número de gemas também foi verificado em "Troyer citrange" por Moreira-Dias et al. (2001). A razão para essa perda na regeneração à medida que se distancia do nó cotiledonar até o momento não foi determinada. Gunkel et al. (1972) demonstraram a importância do transporte de fitorreguladores no tecido vascular ao anular a polaridade com a adição de reguladores de crescimento no meio. Com base nessas informações, pode-se inferir que a influência da polaridade no potencial morfogênético é um fenômeno provavelmente ligado ao transporte de fitorreguladores.

Até o momento, os estudos aqui reportados referem-se ao primeiro trabalho que descreve a regeneração de brotações adventícias a partir de segmentos de epicótilos de *Annona*. Em outras espécies, principalmente em *Citrus*, a regeneração de brotações em epicótilos, sem a passagem pela fase de calo, já foi reportado (Garcia-Luis, et al., 1999).

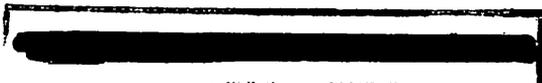
Em resumo, esse trabalho demonstra que a inoculação de segmentos de hipocótilos e epicótilos na orientação vertical, constituindo um método eficiente para a obtenção de brotações adventícias em segmentos de hipocótilos de *A.squamosa*. Adicionalmente, esse procedimento de regeneração de brotações a partir de segmentos de hipocótilos e epicótilos constitui mais uma fonte para a micropropagação de espécies de *Annona*, principalmente aquelas com base genética estreita.

7 CONCLUSÕES

A melhor resposta morfogênica é obtida quando os segmentos de hipocótilos de *Annona squamosa* são inoculados na orientação vertical normal, independentemente do tipo de selamento dos tubos de ensaio. A inoculação dos explantes na posição horizontal reduz à metade a expressão do potencial organogênico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEJOY, M.; HARIHARAN, M. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 245-247, Dec. 1992.
- BYEONG, W. Y.; ZIMMERMAN, R. H.; FORHHAN, I.; KWANG, C. Influence of photoperiod, apical meristem and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 3, p. 588-592, May 1987.
- BURGER, D. W.; HACHETT, W. P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and roots sections of *Citrus*. **Plant Science**, Limerick, v. 43, n. 3, p.229-232, 1986.
- GARCIA-LUIS, A.; BORDON, Y.; MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; GUARDIOLA, J. L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 6, p. 715-723, Dec. 1999.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. part 1. the technology.** 2. ed. Edington: Exergetics, 1993. 574 p.
- GRECO, B.; TANZARELLA, O. A.; CARROZZO, G.; BLANCO, A. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus*). **Plant Science Letter**, Limerick, v. 36, n. 1, p. 73-77, 1984.



HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

JORDAN, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 53, n. 5, p. 234-237, Sept./Oct. 1988.

KUNKEL, J. E.; SHARP, W. R.; WILLIAMS, B. W.; WEST, W. C.; DRINKWATER, W. O. Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variations. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 133, n. 3, p. 254-262, 1972.

LEMONS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, May 1996.

MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Toyer citrange **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 87, n. 4, p. 275-290, Mar. 2001.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.

RASAI, S.; KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. The effect of growth regulators, source of explants and irradiance on in vitro regeneration of atemoya. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 42, n. 3, p. 333-340, 1994.

TAZZARI, L.; PESTELLI, P.; FIORINO, P.; PARRI, G. Propagation techniques for *Annona cherimola* Mill. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 275, p. 315-321, 1990.

ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.1, p.34-38, 1985.



CAPÍTULO V

**FATORES QUE AFETAM A MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM
SEGMENTOS NODAIS DE *ANNONACEAE***

1. RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Fatores que afetam a morfogênese *in vitro* em segmentos nodais de *Annonaceae*. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. p. 100-150. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O trabalho teve por objetivo determinar os fatores que afetam a indução, crescimento e desenvolvimento de brotações em segmentos nodais de *Annonaceae*. No primeiro experimento, segmentos nodais de *Annona glabra* L. foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações (17,76 e 36,52 μM) e tipos (BAP, TDZ e cinetina) de citocininas. No segundo, segmentos nodais de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., e *Rollinia sylvatica* St. Hill. foram inoculados em meio WPM acrescido de 8,87 μM de BAP, 250 mg.L^{-1} de benomyl e 87,64 mM de diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose, galactose, sorbitol e maltose). No último experimento, segmentos nodais de *A. glabra* foram inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0,00; 29,21; 58,63 e 116,84 mM) e carvão ativado (0,0 e 2,0 g.L^{-1}) e 250 mg.L^{-1} de benomyl e foram avaliados também dois tipos de fechamento dos tubos de ensaio (tampa com película de PVC e tampão de algodão). Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a 25 ± 3 °C. Os resultados mostraram que entre as citocininas testadas, o BAP é o que promoveu as melhores respostas na indução de brotações em segmentos nodais de *A. glabra*. O TDZ induziu brotações em forma de roseta, sendo inadequado para a espécie em questão. O aumento na concentração de citocinina de 17,76 para 35,62 μM no meio de cultura teve um efeito negativo sobre o comprimento das brotações e sobre a porcentagem de explantes responsivos. A fonte de açúcar influenciou as variáveis: número de folhas, comprimento e matéria seca das brotações das espécies *A. bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*, *A. glabra* e *R. sylvatica*. A aeração dos recipientes de cultura foi um dos fatores que mais contribuiu na morfogênese *in vitro* na indução e crescimento de brotações de *A. glabra*. A mudança do modo tradicional de fechamento dos tubos para o selamento alternativo contribuiu com acréscimos significativos no crescimento das brotações, além de controlar a processo de abscisão foliar. A aeração das culturas, combinada com uma redução no conteúdo de sacarose no meio de cultura para 58,42 ou 29,21 mM, trouxe ganhos de 17 e 23 vezes na matéria seca das brotações, respectivamente. Os benefícios encontrados com o uso do tampão de algodão no fechamento dos recipientes de cultura foram

similares àqueles obtidos com o uso de ventilação forçada ou com a adição no meio de cultura de compostos inibidores da ação do etileno. Esse trabalho forneceu uma contribuição original para a micropropagação de *Annonaceae* com importância econômica; foi apresentada uma alternativa acessível e economicamente viável para resolver o problema da abscisão foliar precoce, principal problema ligado à propagação *in vitro* de várias espécies dessa importante família.

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Factors affecting *in vitro* morphogenesis in *Annonaceae* nodal segments. In: _____. **Control of the *in vitro* morphogenesis in some *Annonaceae* species.** 2003. p. 100-150. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

This study was performed in order to determine the factors that influence shoot induction, growth and development from nodal segments of *Annonaceae*. In a first experiment, *Annona glabra* L. nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with different concentrations (17.76 or 36.52 μM) and types (BAP, TDZ, kinetin) of cytokinins. In the second experiment, *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart. and *Rollinia sylvatica* St. Hill. nodal segments were inoculated in WPM enriched with 8.87 μM BAP, 250 mg.L^{-1} benomyl and 87.64 mM of different carbon sources (glucose, sucrose, fructose, galactose, sorbitol and maltose). In the last experiment, *A. glabra* nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with different sucrose concentrations (0.00; 29.21; 58.63 or 116.84 mM), activated charcoal (0.0 or 2.0 g.L^{-1}) and 250 mg.L^{-1} benomyl into test tubes sealed with plastic cap, PVC film or cotton tampon. After inoculation, the tubes with explants were maintained in a growth room under photosynthetic active radiation of 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ and temperature of 25 ± 3 °C. The results showed that the cytokinin BAP produced the largest number of shoots in *A. glabra* nodal segments. TDZ induced shoots with a rosette shape shown to be inadequate for shoot induction in nodal segments of *A. glabra*. The increase of cytokinin concentrations from 17.76 to 35.62 μM in culture medium had a negative effect on shoot and percentage of responsive explants. The source of carbon influenced all the evaluated variables (length of the shoots, number of expanded leaves, length of the leaf more developed and the dry weight of the shoots) of *A. bahiensis*, *A. cauliflora*, *A. coriacea*, *A. glabra* e *R. sylvatica* species. Among the factors activated charcoal, sucrose and the form of sealing the vessel, *in vitro* morphogenesis was markedly affected by the latter factor. The change from traditional way (plastic cap with PVC film) of sealing test tubes to the use of cotton tampon, contributes with significant increments in shoot growth, besides the control of the leaf abscission process. Aeration of cultures combined with the reduction of sucrose concentration in culture medium to 58.42 or 29.21 mM, allowed increments of 17 and 23 fold in the dry weight of the shoots, respectively. The benefits found with the use of the cotton

tampon in sealing culture vessels were similar to those obtained with the use of forced ventilation or with the addition of ethylene action inhibitors in the culture medium. This work contributed to the micropropagation of *Annonaceae* with economical importance. It was presented an accessible and economically viable alternative to solve the problem of precocious leaf abscission, a main problem to *in vitro* culture of several species of the *Annonaceae* family.

3 INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma ferramenta tecnicamente viável para a propagação de *Annonaceae* com importância econômica. Contudo, a multiplicação em forma massiva necessita de um melhor conhecimento dos fatores que controlam a morfogênese *in vitro*, principalmente a abscisão precoce das folhas em algumas espécies importantes, o que limita a taxa de multiplicação e o enraizamento.

Sistemas convencionais de indução de respostas morfogênicas podem ser melhorados manipulando *in vitro* os fatores que as determinam. Comumente, os níveis de reguladores de crescimento têm sido bastante estudados em plantas lenhosas e a variação somaclonal decorrente do uso desses químicos tem sido reportado com frequência. Entretanto, outros fatores como fontes e concentrações de carbono no meio, presença de carvão ativado e o tipo de fechamento dos recipientes de cultivo são igualmente importantes. Esses fatores são mais fáceis e seguros de serem manipulados, contudo em *Annonaceae* têm recebido pouca atenção.

O presente trabalho teve por objetivo determinar os fatores que afetam a indução, crescimento e desenvolvimento de brotações em segmentos nodais de *Annonaceae*. Os efeitos de tipos de citocininas, fontes de carbono, aeração das culturas, sacarose e carvão ativado na morfogênese *in vitro* foram avaliados através do estudo do efeito de diferentes concentrações de BAP, TDZ e cinetina na indução e regeneração de plantas em segmentos nodais, do efeito de diferentes fontes de carbono na indução de brotações em segmentos nodais de *Annonaceae* e da influência da forma de fechamento dos tubos, das concentrações de sacarose e de carvão ativado na indução, crescimento e desenvolvimento de brotações *in vitro* de segmentos nodais de *Annona glabra*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

A composição e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Entretanto, a necessidade dessas substâncias varia consideravelmente com o tecido e o nível endógeno do regulador no explante. Entre as principais classes de reguladores de crescimento utilizados *in vitro* estão as citocininas.

Existem diferenças entre as diversas citocininas; porém, na regeneração das *Annonaceae*, o BAP (benzilaminopurina) tem sido o mais empregado (Rasai et al., 1995). Individualmente ou combinado com pequenas concentrações de outras citocininas, tais como cinetina, o BAP tem induzido a proliferação de brotações em segmentos nodais de *Annona cherimola* cv. 'Concha Lisa' (Nair et al., 1984). O BAP isoladamente dentro da faixa de 1,0-8,8 μM é comumente usado na maioria dos sistemas de micropropagação sem levar em conta o tipo de explante e meio de cultura. O TDZ (thidiazuron), uma fenil-uréia, é uma das mais ativas fontes de citocininas para a cultura de tecidos de plantas, especialmente para espécies lenhosas recalcitrantes (Huetteman & Preece, 1993; Lu, 1993; Murthy et al., 1998) Entretanto, não há relato do seu uso em *Annonaceae*.

Tradicionalmente, na cultura de tecidos utilizam-se recipientes de cultivo fechados com plantas crescendo heterotroficamente em meio de cultura acrescido de uma fonte de carbono. Entretanto, é reconhecido que uma melhora na performance das plantas é alcançada quando o ambiente *in vitro* é o mais próximo daquele em que as plantas crescem *in vivo*. Uma possibilidade é a estimulação da fotoautotrofia, através da redução de carboidrato no meio de cultura, aumentando a intensidade luminosa e elevando a concentração de CO_2 (Kozai, 1991). Uma outra possibilidade é normalizar o ambiente gasoso, em que

os frascos fechados utilizados na cultura *in vitro* diferem acentuadamente do ambiente natural.

A cultura *in vitro* depende da fonte de carbono que fornece energia metabólica e esqueletos de carbono para a síntese de polissacarídeos estruturais, assim como qualquer composto orgânico necessário ao crescimento das células (Caldas et al., 1998). Entre as diversas fontes de carbono, a sacarose é a mais utilizada em plantas cultivadas *in vitro* e é considerada a melhor fonte para o crescimento e diferenciação.

Estudos sugerem que carboidratos podem atuar diferentemente em relação à morfogênese de tecidos *in vitro*. Lemos & Baker (1998) compararam o efeito de nove fontes de carbono (sacarose, glicose, frutose, maltose, galactose, sorbitol, manitol e polietileno glicol) na organogênese em segmentos internodais de *A. muricata*, em meio Nitsch suplementado com BAP e ANA. Brotações adventícias foram desenvolvidas apenas quando os explantes foram transferidos para um meio sem regulador de crescimento contendo sacarose, galactose ou glicose.

Em outras espécies frutíferas como a avelã (*Corylus avellana* L.), Yu & Reed (1993) estudaram o efeito de cinco fontes de carbono (frutose, galactose, lactose, glicose e sacarose) na indução de brotações em segmentos nodais e os melhores resultados foram obtidos em meio contendo 87,64 mM de glicose. Segundo Welander et al. (1989), em macieira (*Malus domestica*) o uso do sorbitol como fonte de carbono possibilita um melhor desenvolvimento *in vitro* dos tecidos.

As principais características do ambiente gasoso *in vitro* nos sistemas convencionais de cultura de tecidos são a alta umidade relativa, a grande flutuação diurna na concentração de CO₂ e o acúmulo de etileno e outras substâncias tóxicas (Kozai et al., 1992), que ocorrem principalmente devido à restrição das trocas de ar entre o recipiente de cultura e o ambiente externo.

Plantas cultivadas *in vitro* apresentam problemas em adaptar a condições *ex vitro* e a taxa de sobrevivência no campo é baixa devido, principalmente, a uma perda da função dos estômatos e à pouca capacidade das folhas de controlar a perda de água. Alguns autores atribuem a deficiência no controle da perda de água à alta umidade ou ao acúmulo de gases, tais como etileno e CO₂, dentro do recipiente de cultivo (De Pruff et al., 1985; Buddendorf-Jooten & Woltering, 1996). Um possível mecanismo para aumentar as trocas gasosas e aumentar o fluxo transpiratório é a ventilação dos frascos de cultura através de perfurações nas tampas ou vedando os mesmos com membranas (Buddendorf-Jooten & Woltering, 1996) ou algodão. A aeração dos frascos de cultura reduz a acumulação de gases, facilitando a aclimatização por produzir plantas com melhor controle da transpiração (Santamaria et al., 2000).

A literatura sobre aeração de culturas *in vitro* de *Annonaceae* é raríssima. Apenas *A. squamosa* e *A. muricata* foram estudadas e estas espécies, bem como as outras espécies dessa família, apresentam dificuldades propagação *in vitro*, devido a caducifolia, estimulada pela produção e acúmulo de etileno nos tecidos confinados no ambiente *in vitro*. De acordo com Lemos (2000), em *A. squamosa* o vigor das brotações e o crescimento dos explantes obtidos *in vitro* são prejudicados pela abscisão das folhas ainda jovens produzidas nos explantes. Lemos & Blake (1996a) estudaram o controle da ação do etileno e, por conseguinte, a abscisão foliar em explante de *A. squamosa* cultivados *in vitro* através do uso de compostos absorventes do etileno (carvão ativado e permanganato de potássio), compostos inibidores da síntese de etileno (Cloreto de cobalto, L- α -aminoetoxivinil glicina – AVG e ácido amionooxiacético) e compostos inibidores da ação do etileno (nitrate de prata e tiosulfato de prata). Embora os resultados obtidos tenham mostrado redução significativa da abscisão foliar, principalmente utilizando os compostos inibidores da ação do etileno, os efeitos produzidos não são duráveis. Ultrapassar esta dificuldade foi e tem sido o

grande desafio na obtenção de um protocolo consistente para a micropropagação de *A. squamosa* (Lemos, 2000).

Amstrong et al. (1997) estudaram os benefícios da ventilação forçada na cultura *in vitro* de *A. squamosa* e encontraram resultados estimuladores na emissão de folhas das brotações e na redução dos efeitos do etileno. Zobayed et al. (2002) estudaram o efeito da aeração dos frascos na indução de brotações em segmentos nodais de *A. squamosa* e *A. muricata* de cultura sob três tipos de ventilação. Os autores reportaram que em ambas as espécies o número de folhas, a área foliar e o número de nós por brotação aumentaram com a melhora na aeração dos frascos. A ventilação forçada inibiu a abscisão foliar precoce. Entretanto, esse método requer uma aparelhagem considerável para gerar uma ventilação pressurizada nos recipientes de cultura de tecidos vegetais.

A inclusão de carvão ativado ao meio de cultura tem sido relatada como uma condição indispensável na indução dos processos de morfogênese e rizogênese em muitas espécies (Fridborg et al., 1978; George, 1993).

O carvão ativado tem uma rede muito fina de poros com grande área superficial interna, na qual substâncias podem ser adsorvidas (Mohamed-Yasseen, 2001). De acordo com esse autor o carvão ativado pode promover embriogênese somática, androgênese, enraizamento, alongamento do caule, formação de bulbos e ainda inibir o escurecimento do explante. Pode também adsorver reguladores de crescimento, metabólitos tóxicos e exudatos fenólicos (Fridborg et al., 1978).

O mecanismo exato pelo qual o carvão ativado estimula o crescimento ainda é desconhecido (George, 1993). Entretanto, segundo alguns autores seu efeito estimulador sobre a morfogênese pode ser devido à adsorção irreversível de compostos inibidores e metabólitos tóxicos (notavelmente fenóis) produzidos pelo explante *in vitro*, ao escurecimento e aeração do meio de cultura, à liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão ativado, que

promovem o crescimento e a diminuição dos efeitos tóxicos da interação de altas concentrações de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, com substâncias secretadas pelo explante (Fidborg et al., 1978; Stein & Stephens, 1981, George, 1993; Mohamed-Yasseen, 2001).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal, assepsia e condições experimentais

Os explantes foram obtidos a partir de plantas, com três anos de idade, das espécies *Annona glabra* L., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona bahiensis* St. Hill. e *Rollinia silvatica* St. Hill., mantidas em casa de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida pela combinação de lâmpadas gro-lux e branca fria, fotoperíodo de 16 h, sem controle de temperatura.

Secções laterais de hastes caulinares semi-lignificadas foram utilizadas como fonte de explante. Para a desinfestação, as folhas foram retiradas e os segmentos foram mantidos em água corrente por 20 minutos e lavados com detergente neutro. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram seccionados em segmentos com comprimento de 10-15 mm, contendo uma única gema, e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de nova imersão em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) e gotas de detergente durante 15 minutos. Finalmente, os explantes foram lavados, por cinco vezes, em água destilada e autoclavada.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem à temperatura de 121°C, durante 15 minutos; posteriormente à autoclavagem, os tubos foram esfriados com inclinação de 30 a 45°.

Foi inoculado um segmento por tubo, os quais foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h sob, radiação fotossintética ativa de $45\text{-}56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecidos por lâmpadas fluorescentes.

5.2 Efeito comparativo de diferentes tipos e concentrações de citocinina na indução de brotações em segmentos nodais de *Annona glabra* L.

Segmentos nodais de *Annona glabra* foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), solidificado com 6 g.L^{-1} de ágar, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose e duas concentrações (17,76 e $36,52 \mu\text{M}$) de BAP, TDZ e cinetina.

Os tubos de ensaio contendo o meio e o explante foram fechados com tampa plástica e película de PVC.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2 (sendo que 3 representa os tipos de citocininas e 2 as concentrações) com 5 repetições, sendo cada uma formada por 12 tubos.

Foram avaliados o número brotações, a porcentagem de explantes responsivos e o comprimento da maior brotação 42 dias após a inoculação.

5.3 Efeito da fonte de carbono na indução de brotações em segmentos nodais de *Annonaceae*

Segmentos nodais de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 10 mL do meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar, suplementado com $8,87 \mu\text{M}$ de BAP, 250 mg.L^{-1} de benomyl e $87,64 \text{ mM}$ das seguintes fontes de carbono: glicose, sacarose, frutose, galactose, sorbitol e maltose.

Os tubos de ensaio contendo o meio e o explante foram fechados com tampa plástica sem película de PVC.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x6 (em que 5 representa as espécies e 6, as fontes de carbono) com 4 repetições, sendo cada uma formada por 4 tubos.

Foi avaliado o número brotações aos 21 dias e 42 dias após a inoculação. O comprimento da maior brotação, o número de folhas expandidas por brotação e o comprimento da maior folhas foram avaliados 42 dias após a inoculação.

5.4 Efeito do tipo de selamento do recipiente de cultura e de diferentes concentrações de carvão ativado e sacarose na indução e crescimento de brotações *in vitro* de segmentos nodais de *Annona glabra* L.

Segmentos nodais de *Annona glabra* foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com quatro concentrações de sacarose (0,00; 29,21; 58,63 e 116,84 mM) combinado com dois níveis de carvão ativado (0,0 e 2,0 g.L⁻¹) e 250 mg.L⁻¹ de benomyl.

Foram avaliados dois tipos de selamento nos tubos de ensaio: tampa com película de PVC (tampa com PVC ou selamento tradicional) e tampão de algodão (selamento alternativo).

Foram usados 10 mL de meio de cultura nos tubos de ensaio com tampa e película de PVC e 20 mL de meio nos tubos fechados com o tampão de algodão (experimentos preliminares mostraram que a evapotranspiração é maior em tubos com esse tipo de fechamento, por isso foi utilizado um maior volume).

Para esse experimento, antes de ferver o ágar foi adicionado o carvão ativado e, em seguida, o pH foi ajustado para 5,7. Todos os tubos foram fechados com tampa plástica e o algodão foi autoclavado à parte. Após a

inoculação dos segmentos nodais, as tampas plásticas foram substituídas pelo tampão de algodão previamente esterilizado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x2x2 (em que 4 representa as fontes de carbono e 2, as concentrações de carvão ativado e os tipos de selamentos) com 4 repetições. Cada repetição foi formada por 5 tubos.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: número brotações, porcentagem de explantes responsivos, número de folhas expandidas por brotação, comprimento da maior folha, abscisão foliar (número de folhas caídas por brotação), comprimento e matéria seca das brotações, 42 dias após a inoculação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito comparativo de diferentes tipos e concentrações de citocinina na indução de brotações em segmentos nodais de *Annona glabra* L.

A interação “tipos de citocininas x concentração” foi altamente significativa para o comprimento das brotações ($P < 0,01$). Não foi observado interação significativa para o número de explantes e a porcentagem de explantes responsivos ($P > 0,05$). Houve efeito significativo de tipos de citocininas para o número de brotações ($P < 0,01$) e porcentagem de explantes responsivos ($P < 0,01$). A concentração das citocininas influenciou o número de brotações ($P < 0,01$) (Tabela 1).

O BAP promoveu o maior número médio de brotações (1,61 por explante) e a maior porcentagem de explantes responsivos (68,3%) quando comparado com o TDZ e a cinetina (Tabela 2). O BAP é uma das citocininas mais utilizadas em estudos de indução de brotações em segmentos nodais (Nair et al., 1984; Jordan

TABELA 1- Resumo da análise de variância para número médio de brotações, porcentagem de explantes responsivos e comprimento das brotações em segmentos nodais de *Annona glabra* L em função de tipos e concentração de citocininas. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios ^z		
		Número de brotações	Explantes responsivos (%)	Comprimento das brotações
Tipo de Citocinina (A)	2	0,1533**	4,8731*	10,9440**
Concentrações (B)	1	0,1200*	3,7475ns	0,1171ns
A x B	2	0,0058ns	0,5336ns	2,5603**
Resíduo	24	0,0184	1,3889	0,3935
C.V.(%)		9,26	4,78	20,68

ns - Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

TABELA 2- Resultados médios para número de brotações e porcentagem de explantes responsivos em segmentos nodais de *Annona glabra* em função de citocininas. Lavras - MG, 2002.

Tipo de citocinina	Número médio de brotações	Explantes responsivos (%)
Cinetina	0,92 b ^z	62,48 ab
TDZ	0,99 b	47,49 b
BAP	1,61 a	68,31 a

^z - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

et al., 1991; Encina et al., 1994; Rasai et al., 1995; Lemos & Blake, 1996b). Em outras espécies frutíferas, como *Prunus armenica* L, Marino et al. (1993) reportaram aumento no número de brotações por explante utilizando o BAP em níveis superiores a 8,88 μM . Pérez-Tornero et al. (2000) estudando a mesma espécie, reportam que o BAP na concentração de 4,44 μM estimulou a formação

de brotações na forma de roseta em segmentos nodais de plantas mantidas *in vitro*. Essa característica de brotações no formato de roseta também foi verificada no presente estudo, quando se utilizou o TDZ na maior concentração (35,52 μM).

O aumento na concentração de citocinina teve um efeito negativo sobre o número de brotações e a porcentagem de explantes responsivos (Tabela 3). Entretanto, a maior concentração de TDZ e cinetina favoreceu o comprimento das brotações. O BAP e a cinetina promoveram maior crescimento das brotações nas concentrações de 17,76 e 35,52 μM , respectivamente. No entanto, o TDZ na concentração de 35,52 μM induziu brotações com um comprimento médio de 4,03 mm, quatro vezes menor quando comparado com as brotações induzidas com a mesma concentração de cinetina (Tabela 4).

TABELA 3- Valores médios para número de brotações e porcentagem de explantes responsivos em segmentos nodais de *Annona glabra* L, em função da concentração de citocinina. Lavras - MG, 2002.

Citocinina (μM)	Número de brotações	Explantes responsivos (%)
17,76	1,36 a ^z	64,43 ab
35,52	0,99 b	54,43 b

^z – Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi observado um grande número de segmentos nodais com raízes, principalmente quando esses foram inoculados em meio contendo cinetina (Tabela 4).

O BAP foi mais efetivo para a indução de brotações em segmentos nodais de *A. glabra* quando se utilizou a menor concentração (17,76 μM), obtendo-se 1,61 brotações por explante (Tabela 4). Esses resultados são semelhantes àqueles reportados por Decchetti (2000), que obteve 1,5 brotações por explante em meio WPM sem o uso de reguladores.

TABELA 4- Valores médios para comprimento das brotações (mm) e porcentagem de segmentos nodais com raiz em *Annona glabra* L em função de tipos e concentrações de citocininas. Lavras - MG, 2002.

Tipo de citocinina	Concentrações de citocininas (μM)		Média
	17,76	35,52	
	Comprimento das brotações (mm)		
TDZ	1,13 B ^z a ^y	4,03 Ba	2,58 B
Cinetina	11,15 Ab	16,28 Aa	13,71 A
BAP	15,31 Aa	8,63 Ba	11,97 A
	Segmentos nodais com raiz (%)		
TDZ	0,00 Ba	11,66 Ba	5,83 B
Cinetina	28,33 Aa	36,66 Aa	32,49 A
BAP	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 B

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em *A. muricata*, Encina et al. (1994) reportam 1,4 e 1,7 brotações por explante em meio MS suplementado com 1,1 μM BAP ou 1,36 μM zeatina, respectivamente. Entretanto, o número de brotações por explante é muito baixo quando comparado a 3,8 brotos obtidos por Nair et al. (1984) em atemóia, utilizando meio MS suplementado com 8,87 μM de BAP e 2,32 μM de cinetina, ou ainda às 3,8 brotações por explantes reportados por Lemos & Blake (1996b) em *A. muricata*, em meio WPM enriquecido com 8,87 μM de BAP e 0,54 μM de ANA.

A eficiência da cinetina e TDZ sobre a indução de brotações em comparação com BAP mostrou-se inferior. Paudyal & Haq (2000) obtiveram mais brotações por explantes (média de 5,2) quando ápices caulinares de

seedlings de pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) foram cultivados em meio MS suplementado com 1,8 μM de BAP.

As respostas dos segmentos nodais ao TDZ foram as mais baixas (47% de explantes responsivos) em comparação com BAP e cinetina. O TDZ é uma fenil-uréia com alta atividade citocinínica, sendo mais ativa em baixas concentrações do que citocininas derivadas da purina. O TDZ é muito efetivo na indução de brotações em espécies lenhosas (Huetteman & Preece, 1993; Mok et al., 1982). Entretanto, os resultados do presente estudo indicaram que o TDZ em concentração elevada (35,52 μM) produziu brotações pouco desenvolvidas em forma de roseta, sendo então inadequado na propagação *in vitro* para a espécie de *A. glabra*. Paudyal & Haq (2000) também reportam uma redução no crescimento de brotações de pomelo usando o TDZ.

Em um clone híbrido de castanha (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) foi reportado que o TDZ induziu brotações adventícias a partir do nó cotiledonar (San-José et al., 2001). Esses autores reportam que a produção de brotações foi alta na presença de 4,54-9,08 μM de TDZ, mas a proporção de explantes com brotações alongadas foi reduzida. Já é sabido que brotações induzidas em respostas ao uso do TDZ são geralmente aglomeradas, com dificuldade de alongamento e incapacidade para enraizamento. Para superar essas dificuldades, os explantes devem ser transferidos para um meio contendo um nível mais baixo de TDZ ou que possua outro regulador de crescimento vegetal (Huetteman & Preece, 1993; Lu, 1993). Bhagwat et al. (1996) reportam que a formação de múltiplas brotações não ocorre em segmentos nodais de mandioca cultivados continuamente em meio contendo TDZ, provavelmente devido ao efeito inibidor desse composto sobre o alongamento das brotações.

A morfogênese, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, requer uma constante regulação da divisão e diferenciação celulares, estando ambos os processos sob o controle dos fitorreguladores auxinas e citocininas. A aplicação do TDZ resulta

em uma variedade de respostas em tecidos cultivados *in vitro*, mas as bases bioquímicas e fisiológicas da modulação da resposta morfo genética induzida pelo TDZ são ainda pouco compreendidas (Murthy et al., 1998).

6.2 Efeito da fonte de carbono na indução de brotações em segmentos nodais de *Annonaceae*

A análise de variância mostrou efeito altamente significativo do genótipo para número de brotos, comprimento das brotações e número de folhas expandidas ($P < 0,01$). A fonte de carbono e a interação “espécie x fonte de carbono” não foram significativas para as variáveis avaliadas ($P > 0,05$) (Tabela 5).

TABELA 5. Resumo da análise de variância para número brotações por explante em segmentos nodais de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. em função de fontes de carbono. Lavras - MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios ^z	
		Número de brotações 21 dias após a inoculação	Número de brotações 42 dias após a inoculação
Espécie (A)	4	0,8802**	2,1858**
Fonte carbono (B)	5	0,0415ns	0,1402ns
A x B	20	0,0243ns	0,0812ns
Resíduo	90	0,0451	0,1137
C.V.(%)		15,93	22,16

ns - Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

O número de brotações por explante mostrou-se genótipo-dependente. Na primeira avaliação, 21 dias após a inoculação, o número de brotações (1,77 por

explante) de *A. cauliflora* superou significativamente as demais espécies. O menor número de brotações por explante (0,51) foi encontrado na espécie *A. bahiensis*. Após 42 dias de inoculação, os maiores valores para número de brotações foram observados nas espécies *A. bahiensis* (3 por explante) e *A. cauliflora* (2,23 por explante), superando significativamente as outras espécie (Tabela 6).

TABELA 6- Valores médios para número de brotações acumuladas 21 e 42 dias após a inoculação em segmentos nodais das espécies *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill.. Lavras - MG, 2002.

Espécie	Número de brotações 21 dias após a inoculação	Número de brotações 42 dias após a inoculação
<i>A. bahiensis</i>	0,51 b ^z	3,00 a
<i>A. coriacea</i>	0,54 b	0,79 b
<i>R. silvatica</i>	0,55 b	0,58 b
<i>A. glabra</i>	0,84 b	0,87 b
<i>A. cauliflora</i>	1,77 a	2,23 a

^z – Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observou-se efeito altamente significativo de espécie e fonte de carbono para número de comprimento das brotações e número de folhas expandidas ($P < 0,01$). A interação “espécie x fonte de carbono” foi significativa ($P < 0,01$) para comprimento da maior folhas e matéria seca das brotações (Tabela 7).

Os resultados também indicam que o tamanho das brotações correlacionou-se com o número de brotações por explante. As maiores brotações foram obtidas nas espécies *A. coriacea* e *A. glabra* (25,3 e 23,0 mm, respectivamente), diferindo significativamente das outras espécies (Tabela 8).

TABELA 7- Resumo da análise de variância para comprimento das brotações, número de folhas expandidas por brotação, comprimento da maior folha e matéria seca das brotações em segmentos nodais de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. em função de fontes de carbono. Lavras - MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios ^z			
		Comprimento das brotações (mm)	Número folhas expandidas	Comprimento da maior folha (mm)	Matéria seca das brotações (mg)
Espécie (A)	4	9,9283**	1,3547**	4,0015**	16,3122**
Fonte carbono (B)	5	11,4762**	1,3790**	13,7008**	25,0997**
A x B	20	1,2373ns	0,2124ns	2,4972**	4,4093**
Resíduo	90	1,0788	0,1353	1,0797	1,3682
C.V.(%)		25,30	18,08	27,91	24,47

ns - Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

TABELA 8- Valores médios para comprimento das brotações (mm) e número de folhas expandidas em de segmentos nodais de espécies de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill.. Lavras - MG, 2002.

Espécie	Comprimento das brotações	Número de folhas expandidas
<i>A. bahiensis</i>	13,3 b ^z	2,54 b
<i>A. coriacea</i>	25,3 a	5,33 a
<i>R. silvatica</i>	13,9 b	2,81 b
<i>A. glabra</i>	23,0 a	2,92 b
<i>A. cauliflora</i>	14,9 b	3,28 b

^z - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

O maior número de folhas expandidas foi encontrado na espécie *A. coriacea* (5,33 por brotação), diferindo estatisticamente das outras espécies (Tabela 8).

A fonte de carbono, com exceção do sorbitol, não interferiu no comprimento das brotações e no número de folhas expandidas. As brotações obtidas em meio de cultura suplementado com sorbitol foram três vezes menores que aquelas obtidas em meio suplementado com glicose, sacarose, frutose, maltose ou galactose (Tabela 9). De acordo com Lemos & Baker (1998), não há evidência do transporte de sorbitol em *Annonaceae* e o tecido de *Annona* não consegue metabolizar e converter em outras fontes de carbonos, permitindo

TABELA 9- Valores médios para comprimento das brotações (mm) e número de folhas expandidas por brotação de segmentos nodais de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. em função de fontes de carbono. Lavras - MG, 2002.

Fonte de carbono	Comprimento das brotações (mm)	Número de folhas expandidas
Glicose	22,1 a ^z	3,92 a
Frutose	20,3 a	3,97 a
Sacarose	19,7 a	3,92 a
Maltose	18,6 a	3,64 a
Galactose	18,4 a	3,30 a
Sorbitol	6,8 b	1,50 b

^z - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

acúmulo e, conseqüentemente, aumento no potencial osmótico dentro dos tecidos. Esses resultados corroboram Yu & Reed (1993), que obtiveram respostas similares na indução de brotações em segmentos nodais de avelã (*Corylus avellana* L.) quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono.

Na comparação entre as espécies, a *A. glabra* foi a que apresentou o valor mais elevado para comprimento da maior folha (22,1 mm), diferindo significativamente das demais espécies (Tabela 10). Entre as fontes de carbono glicose, sacarose, frutose, galactose e maltose não houve diferença significativa, mas todas superam ao nível de 5% de probabilidade o sorbitol, que apresentou o menor valor (4,5 mm) para o comprimento da maior folha (Tabela 10).

TABELA 10- Comprimento médio da maior folha (mm) em brotações de segmentos nodais de de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. em função de espécies e fontes de carbono. Lavras - MG, 2002.

Fontes de carbono	Comprimento médio da maior folha					Média
	<i>Annona glabra</i>	<i>Annona coriacea</i>	<i>Rollinia silvatica</i>	<i>Annona bahiensis</i>	<i>Annona cauliflora</i>	
Glicose	23,5A ^z a ^y	25,7 Aa	13,7 Aa	18,5 Aa	17,7 Aa	19,8 A
Sacarose	23,5 Aa	24,5 Aa	13,7 Aa	12,5 Aa	16,5 Aa	18,1 A
Frutose	32,0 Aa	13,5 ABb	10,0 Ab	11,7 Ab	13,2 Ab	16,1 A
Galactose	29,2 Aa	3,7 Bb	12,7 Ab	14,5 Ab	11,2 Ab	14,3 A
Maltose	24,2 Aa	14,5ABab	12,5Aab	9,7 Ab	22,5 Aab	16,7 A
Sorbitol	0,0 Ba	5,5 Ba	5,0 Aa	4,0 Aa	8,2 Aa	4,5 B
Média	22,1 a	14,6 b	11,3 b	11,8 b	14,9 b	

^z – Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y – Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

A matéria seca das brotações foi influenciada pela fonte de carbono. Com exceção da espécie *A. coriacea*, não houve diferença significativa na matéria seca entre as fontes de carbono glicose, sacarose, frutose, galactose e maltose (Tabela 11). Todas as fontes de carbono diferiram significativamente do sorbitol. Os maiores valores médios de matéria seca foram encontrados na espécie *A.*

coriacea, que diferiu estatisticamente das demais espécies. Com exceção da espécie *Annona cauliflora*, não houve ganho significativo de matéria seca com o uso das fontes de carbono glicose, frutose, galactose, maltose e sorbitol em comparação com a sacarose, para as outras espécies. A conversão de substâncias inorgânicas do meio de cultura em compostos orgânicos foi influenciada pela fonte de carbono. Os maiores valores de matéria seca foram obtidos em meio enriquecido com sacarose ou maltose (33,8 mg / brotação) e a menor em meio de cultura suplementado com sorbitol, indicando claramente que esse açúcar não é metabolizado pelo tecido de *Annona*. Esses resultados divergem daqueles encontrados por Welander et al. (1989), que reportaram maior crescimento das brotações *in vitro* de macieira utilizando o sorbitol como fonte de carbono.

Aspectos das brotações de *A. bahiensis*, *A. coriacea*, *A. cauliflora*, *A. glabra* e *Rollinia silvatica* são mostrados na Figura 1.

TABELA 11- Matéria seca de brotação (mg) de segmentos nodais de de *Annona bahiensis* St. Hill., *Annona cauliflora* Mart., *Annona coriacea* Mart., *Annona glabra* L. e *Rollinia silvatica* St. Hill. em função de espécies e fontes de carbono. Lavras - MG, 2002.

Fontes de carbono	Matéria seca de brotação					Média
	<i>Annona glabra</i>	<i>Annona coriacea</i>	<i>Rollinia silvatica</i>	<i>Annona bahiensis</i>	<i>Annona cauliflora</i>	
Glicose	14,4AB ^z b ^y	55,0Ba	22,9ABb	21,7ABb	28,6Bb	28,6AB
Sacarose	14,3ABb	90,6Aa	20,6ABb	22,5ABb	20,8Bb	33,8A
Frutose	20,5ABa	39,0BCa	29,0Aa	32,9Aa	17,1Ba	27,7AB
Galactose	23,0Aa	23,3CDa	19,9ABa	20,3ABa	13,1Ba	19,9B
Maltose	10,2ABb	45,8BCa	35,0Aa	40,1Aa	37,8Aa	33,8A
Sorbitol	3,4Ba	7,7Da	7,1Ba	4,6Ba	13,2Ba	7,2C
Média	14,4b	43,6a	22,5b	23,7b	21,8b	

^z – Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y – Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

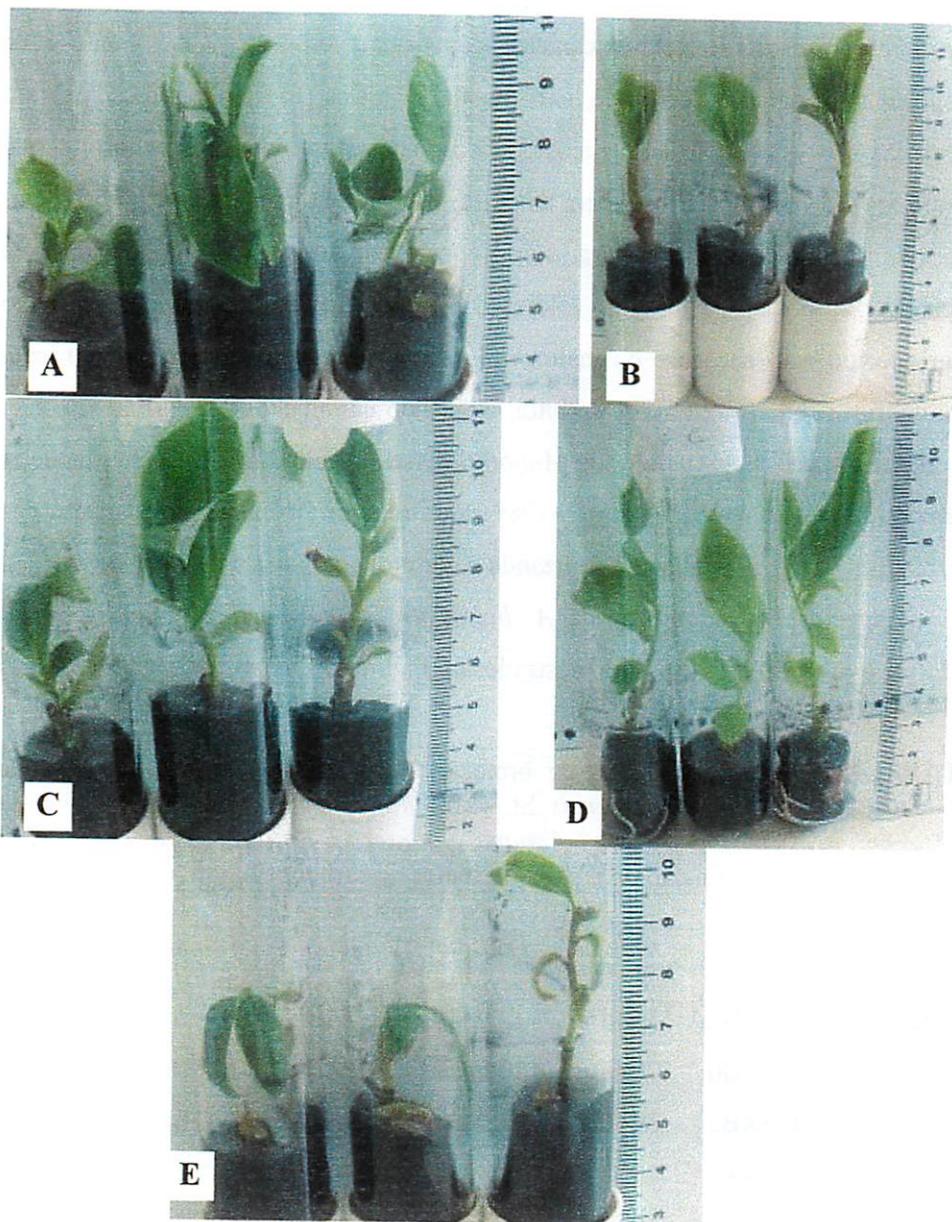


FIGURA 1- Aspectos das brotações em segmentos nodais *Annona bahiensis* St.Hill. (A), *Annona coriacea* Mart. (B), *Annona cauliflora* Mart. (C), *Annona glabra* L. (D) e *Rollinia silvatica* St. Hill. (E) 43 dias após a inoculação. Lavras – MG, 2002.

6.3 Efeito do tipo de selamento do recipiente de cultura e de diferentes concentrações de carvão ativado e sacarose na indução e crescimento de brotações *in vitro* de segmentos nodais de *Annona glabra* L.

A interação “concentração de sacarose x tipo de selamento” foi altamente significativa para número de brotações, porcentagem de explantes responsivos, número de folhas e comprimento da maior folha ($P < 0,01$). A interação “concentração de carvão ativado x tipo de selamento” foi significativa para número de brotações ($P < 0,01$) e porcentagem de explantes responsivos ($P < 0,05$). O carvão ativado isoladamente não apresenta efeito sobre o número de folhas e o comprimento da maior folha ($P > 0,05$) (Tabela 12).

O tipo de selamento influenciou significativamente a organogênese em segmentos nodais de *A. glabra*. O maior número de brotações (0,57 por explante) e a maior porcentagem de explante responsivos (56,25%) foram obtidos quando os tubos foram fechados com tampão de algodão. Esses valores, quando comparados com o selamento com tampa plástica e película PVC (selamento tradicional), representaram um acréscimo de aproximadamente 40% no número de brotações por explante (Tabela 13). Ao provocar uma vedação total do frasco, o selamento tradicional, com tampa plástica e película PVC, causa um acúmulo de gases liberados pelas culturas e uma saturação de vapor de água, induzindo a uma redução da transpiração capaz de causar deficiências minerais como o cálcio e, conseqüentemente, ocasionando a necrose de gemas apicais (Grattapaglia & Machado, 1988). Em cultura de batata, frascos vedados com parafilme (filme parafinado impermeável à água) mostraram maior incidência de necrose apical (Sha et al., 1985). Segundo esses autores, a vedação total do frasco de cultura pode também acarretar acúmulo de alguns metabólitos liberados pela cultura, os quais, ao se complexarem com o cálcio, tornam este indisponível, intensificando os sintomas de deficiência.

TABELA 12- Resumo da análise de variância para número de brotações por explante, porcentagem de explantes responsivos, número de folhas e comprimento maior folha provenientes de segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamentos. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios ^z			
		Número de Brotações	Explantes responsivos	Número de folhas	Comprimento maior folha
Conc. sacarose (A)	3	0,4161**	246,1383**	3,2114**	33,4188**
Conc. Carvão (B)	1	0,0366**	13,1804**	0,0505ns	0,7033ns
Tipo selamento (C)	1	0,0150**	21,9768**	0,5009**	18,5153**
A x B	3	0,0771**	4,2637 *	0,0714ns	0,5089ns
A x C	3	0,0263**	8,0690**	0,3865**	10,1195**
B x C	1	0,0066ns	2,3122ns	0,1155ns	0,1384ns
A x B x C	3	0,0007ns	0,4525ns	0,0451ns	0,5688ns
Resíduo	64	0,0042	1,3574	0,0508	0,4975
C.V. (%)		5,40	18,78	14,77	24,31

ns -Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

Na ausência de sacarose não houve indução de brotações nos segmentos nodais. Entretanto, alta concentração de sacarose (116,86 mM) combinado com carvão ativado (2 g.L⁻¹) inibiu a organogênese de brotações. Para todas as concentrações de sacarose, a indução de brotações foi superior na ausência de carvão ativado no meio de cultura (Tabela 14).

TABELA 13- Valores médios para número de brotações por explante e porcentagem de explantes responsivos provenientes de segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de tipos de selamentos. Lavras - MG, 2002.

Tipo de selamento	Número de brotações	Explantes responsivos (%)
Tampão de algodão	0,57 a ^z	56,25 a
Tampa plástica com PVC	0,41 b	41,25 b

^z - Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A concentração de sacarose influencia na indução de brotações em segmentos *in vitro*. Reduzindo-se a concentração de sacarose no meio de cultura, as plântulas mudam do crescimento heterotrófico para autotrófico, aumentando sua capacidade fotossintética (Wainwright & Scarce, 1987).

Bhatt & Dhar (2000) reportam que o pré-condicionamento do explante do nó cotiledonar de *Bauhinia vahlii* em concentrações de sacarose entre 58,43-87,64 mM produziu plantas com melhor qualidade em termos de comprimento das brotações, matéria fresca e seca das brotações, mas não foram encontradas diferenças significativas no número de raízes e pesos fresco e seco de raízes. Em concentrações de sacarose superiores a 87,64 mM, o crescimento das brotações foi reduzido. Silvente & Trippi (1986) também reportaram o efeito inibidor de concentrações de sacarose superiores a 87,64 mM na indução e crescimento de brotações de *Anagalis arvensis*.

A análise de regressão mostra um comportamento quadrático das concentrações de sacarose para as variáveis número de brotações por explante e porcentagem de explantes responsivos, tanto na presença ($P < 0,01$) quanto na ausência ($P < 0,01$) de carvão ativado (Figura 2 A, B).

TABELA 14- Resultados médios para número de brotações por explante e porcentagem de explantes responsivos em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de sacarose e carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
Número de brotações por explante					
0,0	0,00 a ^z	0,65 a	0,70 a	0,82 a	0,54 a
2,0	0,00 a	0,45 a	0,72 a	0,57 b	0,43 b
Explantes responsivos (%)					
0,0	0,0 a	65,0 a	70,0 a	82,5 a	54,37 a
2,0	0,0 a	45,0 a	72,0 a	57,5 b	43,12 b

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$Y(\blacktriangle) = 0.0497 + 0.01917X - 0.00010X^2 \quad R^2 = 92,62\% \quad **$$

$$Y(\blacktriangle) = 4,977 + 1,91740X - 0,01085X^2 \quad R^2 = 92,62\% \quad **$$

$$Y(\blacksquare) = -0.0047 + 0.01968X - 0.00012X^2 \quad R^2 = 99,91\% \quad **$$

$$Y(\blacksquare) = -0,067 + 1,90106X - 0,01205X^2 \quad R^2 = 100\% \quad **$$

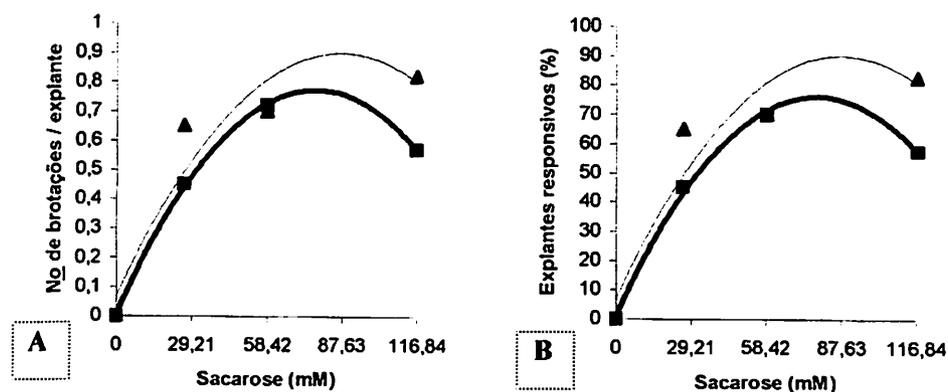


FIGURA 2- Valores médios estimados para número de brotações por explante (A) e porcentagem de explantes responsivos (B) em função de concentrações de sacarose e carvão ativado (—▲— 0,0 g.L⁻¹; —■— 2,0 g.L⁻¹) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Lavras - MG, 2002.

A combinação de concentração de sacarose e tipo de selamento produziu efeitos positivos na indução de brotações. Quando os tubos foram fechados com tampão de algodão, nas concentrações de 29,21 e 58,42 mM de sacarose, este superou significativamente o selamento tradicional em aproximadamente 95% e 50%, respectivamente. Por outro lado, houve um efeito inibidor da concentração mais alta de sacarose (116,86 mM) na indução de brotações no selamento tampão de algodão. Foi observado um número de brotações por explante 36,58% maior quando se utilizou o tampão de algodão como selamento (Tabela 15).

A porcentagem de explantes responsivos seguiu a mesmo padrão do número de brotações. A análise de regressão desses dados mostra tendências diferente da concentração de sacarose para as variáveis número de brotações por explante e porcentagem de explantes responsivos em função do tipo de selamento. Quando se utilizou o selamento tradicional, o comportamento foi linear ($P < 0,01$) e o maior número de brotações (0,7 / explante) foi obtido quando se utilizou a maior concentração de sacarose, enquanto, para o selamento alternativo, o modelo matemático mais representativo foi o quadrático ($P < 0,01$) e o maior número de brotações (0,85 / explante) foi observado com a 58,42 mM de sacarose no meio de cultura (Figura 3 A, B). Possivelmente a alta concentração de sacarose levou a um aumento no potencial osmótico e com menos água disponível, a transpiração foi reduzida e, conseqüentemente, o crescimento das brotações foi afetado.

O maior número de folhas expandidas (3,22 por brotação) foi obtido quando se utilizou 58,42 mM de sacarose em tubos selados com tampão de algodão. Em tubos com tampão de algodão, o número de folhas expandidas superou em aproximadamente 40% aquele obtido com o método tradicional de selamento (Tabela 16). O modelo de regressão quadrático das concentrações de sacarose apresentou melhor ajuste para a variável número de folhas expandidas por brotação tanto para o selamento tampa com película PVC ($P < 0,05$) quanto

TABELA 15. Resultados médios para número de brotações por explante e porcentagem de explantes responsivos em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de sacarose e selamento. Lavras - MG, 2002.

Tipo de Selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
Número de brotações por explante					
Tampão de algodão	0,00 a ^z	0,72 a	0,85 a	0,70 a	0,56 a
Tampa com PVC	0,00 a	0,37 b	0,57 b	0,70 a	0,41 b
Explantes responsivos (%)					
Tampão de algodão	0,0 a	72,5 a	82,0 a	70,0 a	56,25 a
Tampa com PVC	0,0 a	37,5 b	57,5 b	70,0 a	41,25 b

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$Y(\blacktriangle) = 0.0068 + 0.01400X - 0.00007X^2 \quad R^2 = 99,80\% \quad **$$

$$Y(\blacktriangle) = 0.6810 + 4.0909X - 0.05901X^2 \quad R^2 = 99,80\% \quad *$$

$$Y(\blacksquare) = 0.0381 + 0.02484X - 0.00016X^2 \quad R^2 = 95,89\% \quad **$$

$$Y(\blacksquare) = 4.227 + 7.06363X - 0.13636X^2 \quad R^2 = 94,93\% \quad **$$

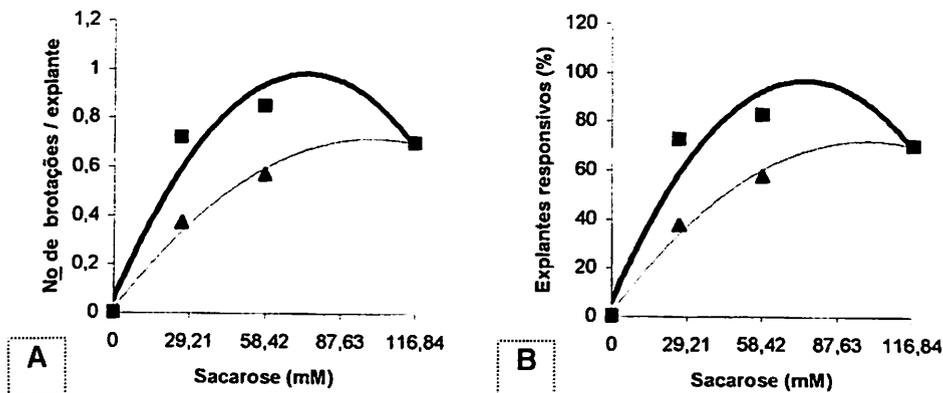


FIGURA 3- Valores médios estimado para número de brotações por explante (A) e porcentagem de explantes responsivos (B) em função de concentrações de sacarose e tipos de selamento (—■— tampão de algodão, --▲-- tampa com PVC) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Lavras - MG, 2002.

para o selamento tampão de algodão ($P<0,01$) (Figura 4, A). Os resultados obtidos com o uso da aeração natural dos tubos são similares àqueles reportados para *A.squamosa* (Armstrong et al., 1997; Zobayed et al., 2002) e *A.muricata* (Zobayed et al., 2002) utilizando a ventilação forçada nos recipientes de cultivo.

O comprimento da maior folha foi aproximadamente 92% maior quando os tubos foram selados com o tampão de algodão. Na concentração de 29,21 mM de sacarose, o selamento com tampão de algodão produziu folhas com comprimento seis vezes maior, quando comparado com o selamento tampa com película PVC (Tabela 16). Foi observado uma tendência quadrática das concentrações de sacarose para a variável comprimento da maior folha quando se utilizou o selamento tampão de algodão ($P<0,01$) e um ajuste linear quando o selamento foi tampa com película PVC ($P<0,05$) (Figura 4, B).

Para as variáveis abscisão foliar, comprimento da parte aérea e matéria seca das brotações, a análise de variância detectou efeitos significativos. A interação tripla “concentração de sacarose x concentração de carvão ativado x tipo de selamento” foi altamente significativa para comprimento das brotações ($P<0,01$). As interações duplas “concentração de sacarose x concentração de carvão ativado” e “concentração de sacarose x tipo de selamento” foram significativas para a abscisão foliar ($P<0,01$) (Tabela 17).

O carvão ativado reduziu à metade a abscisão foliar, passando de 0,18 folhas caídas por brotação para 0,09 (Tabela 18). Observaram-se comportamentos diferenciados das concentrações de sacarose para a variável abscisão foliar, a qual na ausência de carvão ativado foi linear ($P<0,01$), e na presença de carvão ativado, quadrático ($P<0,05$) (Figura 5, A).

A abscisão foliar foi controlada com sucesso somente quando se utilizou o selamento tampão de algodão nos recipientes de cultivo. O uso desse tipo de selamento reduziu a abscisão foliar em 12 vezes, quando comparado com o

TABELA 16- Resultados médios para número de folhas expandidas por brotação e comprimento da maior folha em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de sacarose e selamento. Lavras - MG, 2002.

Tipo de Selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
Número de folhas expandidas por brotação					
Tampão de algodão	0,0 a ^z	1,94 a	3,22 a	1,90 a	1,76 a
Tampa com PVC	0,0 a	0,42 b	2,27 b	2,37 a	1,26 b
Comprimento da maior folha (mm)					
Tampão de algodão	0,00 a	20,64 a	17,96 a	12,57 a	12,79 a
Tampa com PVC	0,00 a	3,01 b	8,91 b	14,78 a	6,67 b

^z - Médias seguidas pela mesma cm cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$Y(\blacktriangle) = -0,2147 + 0,04775X - 0,000214X^2 \quad R^2 = 87,63\%*$$

$$Y(\blacktriangle) = 0,0305 + 0,12997X \quad R^2 = 98,04\%**$$

$$Y(\blacksquare) = -0,0504 + 0,09183X - 0,000642X^2 \quad R^2 = 99,41\%**$$

$$Y(\blacksquare) = 1,9075 + 0,5942X - 0,004351X^2 \quad R^2 = 94,93\%**$$

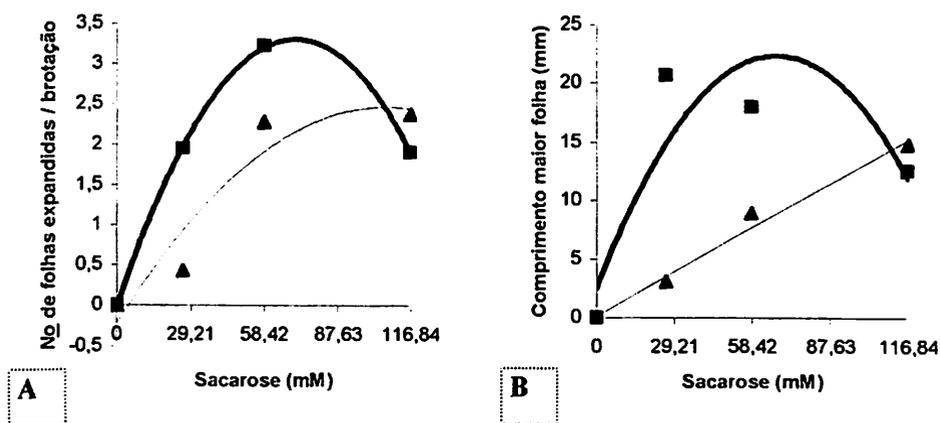


FIGURA 4- Número médio estimado de folhas expandidas por brotação (A) e comprimento da maior folha (B) em função de concentrações de sacarose e tipos de selamento (—■— tampão de algodão, —▲— tampa com PVC) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Lavras - MG, 2002.

TABELA 17- Resumo da análise de variância para abscisão foliar (número de folhas por brotação), comprimento das brotações e peso de brotações provenientes de segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamentos. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios ^z		
		Abscisão foliar	Comprimento das brotações	Matéria seca brotações
Conc. sacarose (A)	3	0,0364 **	55,8081 **	22,6174 **
Conc. carvão (B)	1	0,0312 **	1,8698 *	2,67527 **
Tipo selamento (C)	1	0,2259 **	16,6871 **	24,3699 **
A x B	3	0,0296 *	1,1947 *	1,0394 *
A x C	3	0,0255 *	8,4974 **	6,4012 **
B x C	1	0,0099 ns	7,3598 **	3,5963 **
A x B x C	3	0,0157 ns	1,6721 *	2,0714 **
Resíduo	64	0,0075	0,4477	0,3443
C.V. (%)		8,17	20,19	24,50

ns -Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em $\sqrt{x + 1}$.

método tradicional de selamento (Tabela 19). A análise de regressão das concentrações de sacarose mostra que o valor de R² não foi significativo (P>0,05) para a variável abscisão foliar quando se utilizou o tampão de algodão, enquanto a tendência da resposta às diferentes concentrações do carboidrato para a mesma variável foi quadrática (P<0,01) quando os recipiente de cultura *in vitro* foram selados pelo método tradicional (Figura 5, B).

O controle da abscisão durante o período de cultivo (42 dias) mostra claramente que os resultados obtidos são duráveis (45 dias de cultivo), o que permite passar para a outra etapa da micropropagação sem que ocorra perda de

TABELA 18- Resultados médios para abscisão foliar (número de folhas por brotação) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de sacarose e carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
0,0	0,00 a ^z	0,10 a	0,28 a	0,38 a	0,18 a
2,0	0,00 a	0,05 a	0,12 a	0,20 b	0,09 b

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

folhas e do vigor da brotação. Os resultados encontrados para abscisão foliar são similares àqueles obtidos com a ventilação forçada dos recipientes de cultivo já utilizado nas espécies *A.squamosa* e *A.muricata* por Zobayed et al.(2002) ou com o uso de compostos inibidores da ação do etileno, capazes de que controlar 95% da abscisão foliar de *A. squamosa* por um período de 30 dias de cultivo, como reportado por Lemos & Blake (1996).

TABELA 19- Resultados médios de abscisão foliar (número de folhas por brotação) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose e tipos de selamento. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
Tampão de algodão	0,00 a ^z	0,00 b	0,03 b	0,05 b	0,02 b
Tampa com PVC	0,00 a	0,30 a	0,38 a	0,38 a	0,26 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$Y(\blacktriangle) = 0,2000 + 0,00327X \quad R^2 = 93,61\%^{**}$$

$$Y(\blacksquare) = 0,0245 + 0,00497X - 0,000004X^2 \quad R^2 = 67,93\% \text{ ns}$$

$$Y(\blacktriangle) = 0,0143 + 0,01028X - 0,00062X^2 \quad R^2 = 97,38\%^{**}$$

$$Y(\blacksquare) = -0,0049 + 0,000465X \quad R^2 = 93,77\% \text{ ns}$$

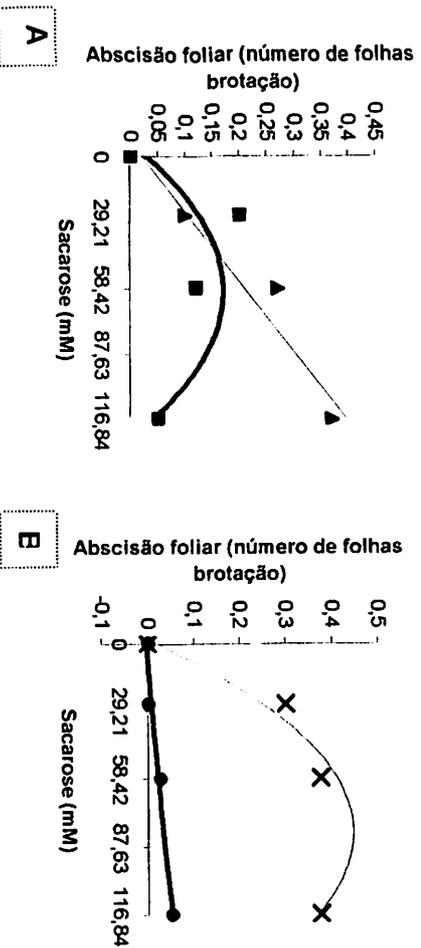


FIGURA 5. Valores médios estimados para abscisão foliar (número de folhas por brotação) em função de: A, concentrações de sacarose e carvão ativado (\blacktriangle - $0,0 \text{ g.L}^{-1}$; \blacksquare - $2,0 \text{ g.L}^{-1}$). B, concentrações de sacarose e tipos de selamentos (\bullet - tampão de algodão, \times - tampa com PVC) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Lavras - MG, 2002.

O presente trabalho é pioneiro em abordar o controle da ação do etileno sem o uso de quimicos ou ventilação forçada em uma espécie de *Annonaceae*. O selamento dos tubos, a concentração de sacarose e o carvão ativado interagiriam no comprimento das brotações. O selamento tampão de algodão constitui um sistema excelente para o crescimento de brotações *in vitro* de *Annona glabra*, quando o conteúdo de sacarose no meio de cultura é baixo (29,21 mM), obtendo-se brotações com 17,35 e 20,25 mm de comprimento na presença e na ausência de carvão ativado, respectivamente. Em meio de cultura com o mesmo nível de sacarose, o tamanho das brotações foi reduzido em 303% em meio sem carvão ativado e em 912% em meio suplementado com $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado (Tabela 20). Essa diferença indica o estímulo às trocas gasosas no tipo

de selamento tampão de algodão, o que aumentou a transpiração e, conseqüentemente, o crescimento das brotações. Entretanto, esse benefício advindo da melhor aeração dos recipientes de cultivo é perdido quando a concentração de sacarose no meio é elevada e sendo a perda mais acentuada na ausência de carvão ativado no meio de cultura (Tabela 20).

Com o selamento tradicional ocorreu o oposto, ou seja, a presença do carvão ativado no meio se tornou quase inócua e o crescimento das brotações foi dependente do nível de carboidrato no meio de cultura. As maiores brotações foram com a concentração mais elevada de sacarose (116,86 mM) (Tabela 20).

TABELA 20- Resultados médios para comprimento de brotações (mm) para segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de sacarose, carvão ativado e selamento. Lavras - MG, 2002.

Tipos de Selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	4,30 b	16,50 a	21,25 a	10,51 a
Tampão de algodão	0,00 a	17,35 a	18,00 a	12,75 b	12,02 a
2,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	2,00 b	9,50 b	23,75 a	8,81 b
Tampão de algodão	0,00 a	20,25 a	38,50 a	26,75 a	21,37 a

² - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi observado também um comportamento linear ($P < 0,01$) das concentrações de sacarose para a variável comprimento das brotações, tanto na presença quanto na ausência de carvão ativado, quando se utilizou tampa com PVC como selamento dos tubos (Figura 6 A, B), enquanto houve uma tendência quadrática ($P < 0,01$) das concentrações para a mesma variável, independentemente da presença ou ausência de carvão ativado (Figura 6 A, B).

$$Y(\blacktriangle) = 0,9640 + 0,18960X \quad R^2 = 91,06\% **$$

$$Y(\blacksquare) = 1,1800 + 0,56120X - 0,00398X^2 \quad R^2 = 91,75\% **$$

$$Y(\blacktriangle) = -2,4928 + 0,21246X \quad R^2 = 96,97\% **$$

$$Y(\blacksquare) = -1,1520 + 1,03642X - 0,006798X^2 \quad R^2 = 98,11\% **$$

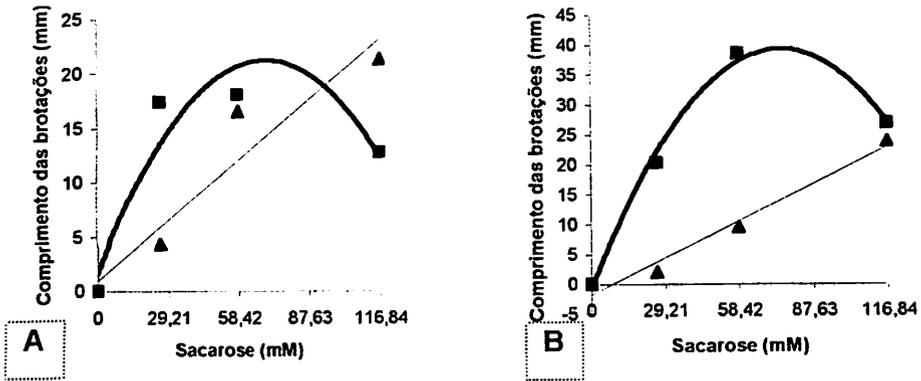


FIGURA 6- Valores médios estimados para comprimento de brotações (mm) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. em função de sacarose e de tipos de selamento (tampa com PVC --▲--, tampão de algodão --■--). A, na ausência de carvão ativado. B, na presença de 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

O efeito estimulador do carvão ativado no crescimento só foi verificado em tubos com o selamento alternativo. Essa mudança de tipo de selamento contribuiu com um acréscimo médio de 142,56% no crescimento das brotações (de 8,81 mm no selamento tampa com película PVC para 21,37 mm no selamento tampão de algodão) (Tabela 20). Segundo Fridborg et al. (1978), o carvão ativado tem sido utilizado como um coadjuvante útil no crescimento das brotações pela sua capacidade de reter concentrações excessivas de fitorreguladores e compostos tóxicos que inibem a morfogênese.

O escurecimento do explante e subsequente morte, usualmente devido a compostos fenólicos, é dos maiores problemas na iniciação de culturas de plantas lenhosas. Os compostos fenólicos estão envolvidos na regulação dos processos de crescimento e alguns são protetores de auxina. Os protetores de auxina devem ser mantidos dentro do tecido para estimular o crescimento e sua

liberação para o meio de cultura deve ser reduzido para aliviar os efeitos fitotóxicos (Debergh & Read, 1991).

A matéria seca das brotações variou em função da concentração de carvão ativado, do tipo de selamento e da concentração de sacarose, seguindo a mesma tendência descrita para comprimento das brotações.

Com o selamento alternativo, dentro do menor nível do carboidrato obtiveram-se brotações com 10,30 mg de matéria seca, correspondendo a 17 vezes mais biomassa seca que aquelas obtidas com o selamento tradicional. Entretanto, o efeito positivo nas trocas gasosas, advindo do tampão de algodão, foi neutralizado no nível mais elevado de sacarose, principalmente na ausência de carvão ativado no meio de cultura (Tabela 21). As maiores brotações (38,50 mm) foram obtidas quando o meio de cultura com foi suplementado com carvão ativado e 58,41 mM de sacarose e os recipientes de cultivo foram fechados com o tampão de algodão. Na ausência de carvão ativado, observaram-se tendências diferentes das concentrações de sacarose para a variável matéria seca nos dois tipos de selamentos, observando-se comportamento linear em tampa com PVC ($P<0,01$) e quadrático com o tampão de algodão ($P<0,05$) (Figura 7, A).

O efeito da combinação do selamento alternativo com o carvão ativado e o nível intermediário de sacarose (58,42 mM) resultou em brotações com maior biomassa seca (23,12 mg). Esse valor é 23 vezes maior que aquele obtido nas mesmas condições com o selamento tampa e película de PVC. Na média geral, o ganho em biomassa com o tampão de algodão em meio contendo carvão ativado foi de aproximadamente 234 % (Tabela 21). A análise de regressão desses dados mostra um comportamento linear das concentrações de sacarose para a variável matéria seca das brotações quando se usou como selamento a tampa com película PVC ($P<0,01$). Entretanto, quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão, observou-se uma tendência quadrática ($P<0,01$) das concentrações de carboidrato para a mesma variável (Figura 7, B).

TABELA 21- Resultados médios para matéria seca das brotações (mg) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamento. Lavras-MG, 2002.

Tipo de selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
0,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	0,56 b	3,80 b	8,95 a	3,32 a
Tampão de algodão	0,00 a	10,30 a	8,24 a	7,80 a	6,58 a
2,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	0,62 b	0,96 b	13,60 a	3,80 b
Tampão de algodão	0,00 a	9,98 a	23,12 a	17,66 a	12,69 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$Y(\Delta) = -0,8045 + 0,08085X \quad R^2 = 96,54\% **$$

$$Y(\Delta) = -2,2797 + 0,11882X \quad R^2 = 96,97\% **$$

$$Y(\blacksquare) = 1,4051 + 0,26100X - 0,00180X^2 \quad R^2 = 70,39\% *$$

$$Y(\blacksquare) = -1,1241 + 0,58900X - 0,003637X^2 \quad R^2 = 98,11\% **$$

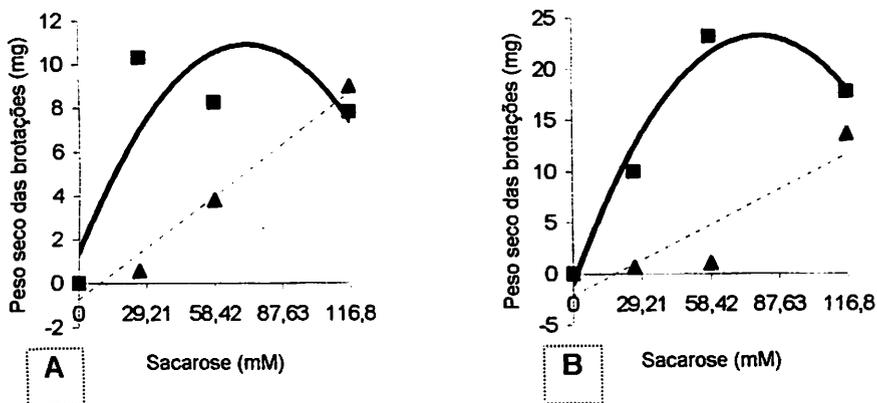


FIGURA 7- Valores médios estimados para matéria seca das brotações (mg) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose e tipos de selamentos (tampa com --▲--, tampão de algodão --■--) na ausência (A) e na presença (B) de 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. Lavras – MG, 2002.

O tipo de selamento foi o fator que mais contribuiu na composição do matéria seca das brotações. Em meio com carvão ativado e independente da concentração de sacarose, o selamento com tampão de algodão promoveu um sistema superior ao método tradicionalmente utilizado em cultura de tecidos.

Os efeitos benéficos do tampão de algodão podem ser mascarados quando a concentração de sacarose no meio cultura é elevada (116,86 mM) (Tabela 21), possivelmente devido ao efeito osmótico da sacarose. Concentrações elevadas de sacarose podem reduzir o potencial hídrico do meio e a transpiração e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes do meio, principalmente o cálcio e o boro, que dependem da corrente transpiratória. Quando a taxa de transpiração é alta, o fluxo de nutrientes é grande. Assim, a redução no fluxo transpiratório acarreta pode induzir uma deficiência de cálcio, e a morte da gema apical é um sintoma característico (Sha et al., 1985; Abousalim & Mantell, 1994). Portanto, uma melhora nas trocas gasosas facilita a transpiração e, conseqüentemente, aumenta a absorção de nutrientes do meio de cultura.

A sacarose exerce uma função central no crescimento e no desenvolvimento vegetal, como açúcar e como molécula sinalizadora. De acordo com Farrar et al. (2000), a sacarose tem um efeito regulatório e uma função integrativa. Esses autores afirmam que o excesso de sacarose pode regular, por *feed-back*, a fotossíntese. Assim, a redução no crescimento das brotações observadas em meio de cultura com elevadas concentrações de sacarose pode ter ocorrido devido à redução na transpiração e à inibição da fotossíntese, mesmo quando o tipo de fechamento dos tubos não restringe as trocas gasosas.

A diferença entre os dois sistemas é notória e, nas condições em que o experimento foi conduzido, o método de selamento alternativo foi superior, em todas as variáveis estudadas, ao tipo de selamento padrão utilizado na maioria dos estudos de propagação *in vitro*. Em adição, o tipo de selamento dos recipientes de cultura *in vitro* potencializa o efeito estimulador do carvão ativado na

morfogênese *in vitro*. No selamento tampa com película PVC, o benefício do carvão ativado no desenvolvimento é insignificante.

Observações no final do experimento (dados não mostrados) revelam que o sistema com o tampão de algodão proporcionou a conversão da maior parte do meio nutritivo em compostos orgânicos. A matéria seca das brotações foi de 9,63 mg com este selamento, em comparação aos 3,35 mg obtidos com o método tradicional de selamento, o que representa um ganho médio de 187% na matéria seca das brotações (Tabela 22).

TABELA 22- Matéria seca de parte aérea (mg) em brotações de segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de carvão ativado e tipos de selamento. Lavras - MG, 2002.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Tipo de selamento		Média
	Tampão de algodão	Tampa com película PVC	
0,0	6,58 A ^z b ^y	3,32 B a	4,95 b
2,0	12,69 A a	3,79 B a	8,24 a
Média	9,63 A	3,35 B	

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultados similares foram encontrados para outras espécies. Courmac et al. (1991) reportaram um aumento na matéria seca (aproximadamente 400%) e altura (77%) em batata devido à aeração dos recipientes de cultura, enquanto Jackson et al. (1991) reportaram redução na altura das brotações na mesma espécie em frascos com trocas gasosas reduzidas, o que resultou numa alta concentração de etileno.

O aumento na matéria seca das brotações em tubos com tampão de algodão pode ser devido a uma melhor performance na transpiração, já que nessas condições os estômatos funcionam normalmente. É razoável também sugerir que plantas *in vitro* com estômatos operantes indicam um tipo fisiológico mais próximo do normal, o que pode aumentar o crescimento e, posteriormente, facilitar a aclimatização.

De acordo com Murphy et al. (1998), a melhora na transpiração, capaz de resultar em maior incorporação de biomassa em frascos que possibilitam trocas gasosas, pode ter três possíveis razões. Primeiro, a permeabilidade do algodão causa uma redução na umidade relativa, aumentando o gradiente de pressão de vapor da folha para a atmosfera do frasco, o que leva a um aumento na taxa de transpiração da folha. A segunda possibilidade é de que a redução na resistência a difusão de gases permite que o vapor de água difunda mais rapidamente para a atmosfera externa e; finalmente, o aumento nas trocas gasosas entre o tubo e a atmosfera evita o acúmulo de gases, particularmente CO₂ e etileno, em concentrações potencialmente danosas.

Os resultados apresentados confirmam que a melhora na aeração do recipiente de cultivo reduz a umidade relativa e o acúmulo de gases dentro dos tubos. Ou seja, facilitando a difusão do vapor de água, através da ventilação, haverá um aumento na difusão de gases como etileno e gás carbônico no interior dos tubos, resultando na regeneração de plantas bem formadas e sem anormalidades fisiológicas.

Esses resultados estão de acordo com aqueles reportados pela literatura. Thomas et al. (2000) e Murphy et al. (1988) reportam que a perfuração e o fechamento de um orifício 1,25 cm com algodão ou filtro nas tampas de frascos grandes melhoraram a aeração no interior dos recipientes, em culturas *in vitro* de melancia tiplóide e de *Delohinium*. A melhor provisão para aeração também

permite as trocas de gases, incluindo o etileno, que é conhecido por sua relação com a abscisão e com a hiperhidricidade (Dillan & Buysens, 1989; Ziv, 1991).

O tratamento que ajuda a controlar a senescência também contribui para a redução ou eliminação do problema do amarelecimento das culturas. A melhor aeração das culturas acentuou a coloração verde das plantas e evitou a senescência precoce das folhas.

Alguns aspectos das brotações de segmentos de *A. glabra* são mostrados na Figura 8. Observa-se que houve interação positiva entre o selamentos tampão de algodão e o carvão ativado sobre o crescimento das brotações, e essas apresentavam aspectos morfológicos normais.

O tampão de algodão fornece um sistema permeável às trocas gasosas, que permite a realização da fotossíntese pelas brotações em uma escala suficiente para induzir a passagem do modo de crescimento heterotrófico para autototrófico em meio contendo baixa concentração de sacarose. O sistema testado se mostra um método muito útil para a conservação de clones, com uma menor probabilidade de variação somaclonal, requeridos como estoques para propagação contínua *in vivo* ou *in vitro* ou como pais em programas de melhoramento genético.

Este trabalho fornece uma grande contribuição para a micropropagação de *Annonaceae* com valor econômico, uma vez que apresenta uma alternativa acessível e economicamente viável para resolver o problema da abscisão foliar precoce, principal problema ligado ao cultivo *in vitro* de várias espécies dessa importante família.

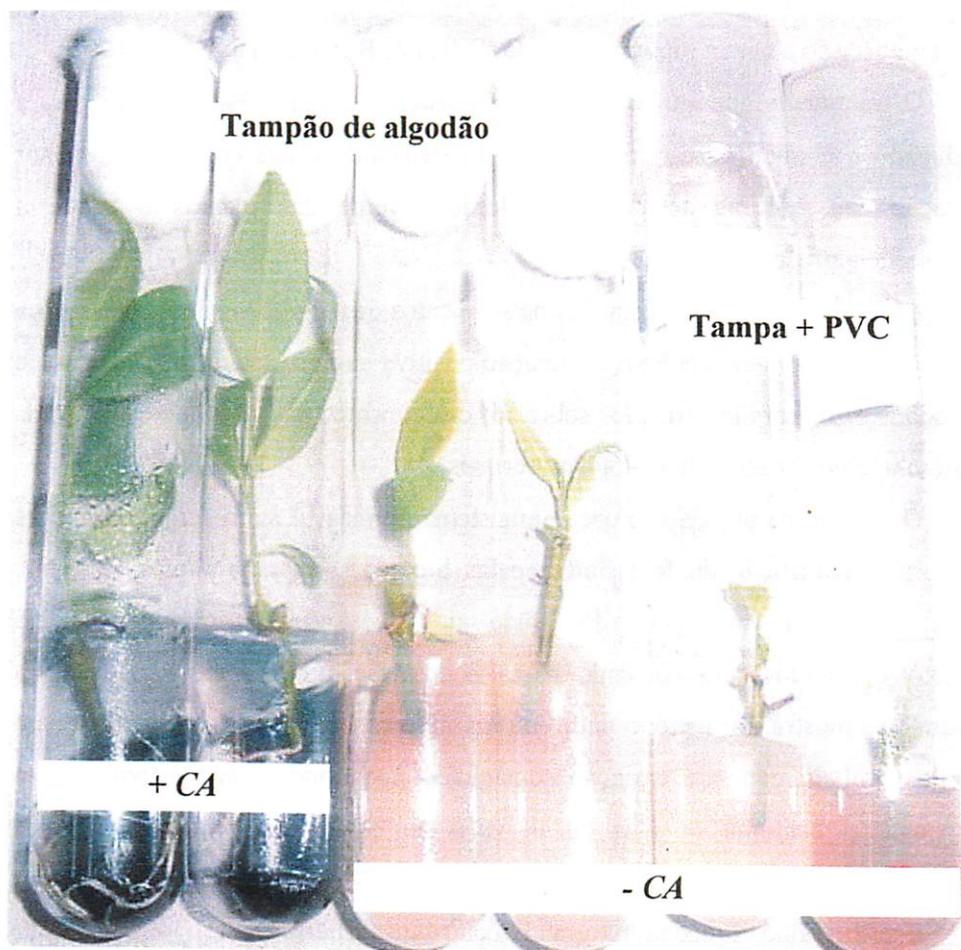


FIGURA 8- Aspectos das brotações em segmentos nodais de *Annona glabra* L em função do tipo de selamentos dos tubos e presença (+CA) e na ausência de carvão ativado (-CA) no meio de cultura, 42 dias após a inoculação. Lavras – MG, 2002.

7 CONCLUSÕES

a) Na comparação entre as três citocininas (BAP, cinetina e TDZ), o BAP é o que promove as melhores respostas na indução de brotações em segmentos nodais de *Annona glabra*. O TDZ induz brotações em forma de roseta, sendo inadequado para a espécie em questão.

b) O aumento na concentração de citocinina de 17,76 para 35,62 μM no meio de cultura tem um efeito negativo sobre o comprimento das brotações e sobre a porcentagem de explantes responsivos.

c) A fonte de açúcar influencia as variáveis número de folhas, comprimento e matéria seca das brotações das espécies *Annona bahiensis*, *Annona cauliflora*, *Annona coriacea*, *Annona glabra* e *Rollinia silvatica*.

d) A aeração dos recipientes de cultura é um dos fatores que mais contribui na indução e crescimento de brotações de *Annona glabra*. A mudança do modo tradicional de fechamento dos tubos para o selamento alternativo contribui com acréscimos significativos no crescimento das brotações, além de controlar a processo de abscisão foliar.

e) A aeração das culturas, combinada com uma redução no conteúdo de sacarose no meio de cultura para 58,42 ou 29,21 mM, traz ganhos de 17 e 23 vezes na matéria seca das brotações, respectivamente.

f) Os benefícios encontrados com o uso do tampão de algodão no fechamento dos recipientes de cultura são similares àqueles obtidos com o uso de ventilação forçada ou com a adição no meio de cultura de compostos inibidores da ação do etileno.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSALIM, A.; MANTELE, S. H. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot culture of *Pistacia vera* cv. Mateur. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 2, p. 357-365, Mar. 1994.

ARMSTRONG, J.; LEMOS E. E. P.; ZOBAYED, S. M. A.; JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. A humidity-induced convective through flow ventilation systems benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut calloid. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 1, p. 31-49, Jan. 1997.

BHAGWAT, B.; VIEIRA, L. G. E.; ERICKSON, L. R. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 1-7, July 1996.

BHATT, I. D.; DHAR, U. Combined effect of cytokinin on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bauhinia vahlii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, n. 1, p. 79-83, 2000.

BUDDENDORF-JOOSTEN, J. M. C.; WOLTERING, E. J. Controlling the gaseous composition *in vitro*- description of a flow system and effects of the different gaseous components on *in vitro* growth of potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 65, n. 1, p. 11-23, Apr. 1996.

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/CBAB, 1998. v. 1, p. 87-132.

COURNAC, L.; DIMON, B.; CARRIE, P.; IOHOU, A.; CHAGVARDIFF, P. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 1, p. 112-115, Sept. 1991.

De PROFT, M. P.; MAENE, L. J.; DEBERGH, P. C. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 65, n. 4, p. 375-379, Dec. 1985.

- DEBERG, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, H. (Ed). **Micropropagation technology application**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 1-13.
- DECCEITI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** UFLA, 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DILLEN, W.; BUYSSENS, S. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 19, n. 3, p. 181-188, 1989.
- ENCINA, C. L.; PADILA, I. M. G.; CAZORLA, J. M.; CARO, E. Tissue culture in cherimoya. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 497, p. 289-302, 1994.
- FARRAR, J.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, Limerick, v. 154, n. 1, p. 1-11, May 2000.
- FRIDBORG, G.; PEDERSON, M.; LANDSTROM, L. E.; ERIKSSON, T. The effects of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites, inhibition of morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 2, p. 104-106, 1978.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. part 1 - the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 105-119, May 1993.
- JACKSON, M. B.; ABBOT, A. L.; BELCHER, A. R.; HALL, K. C.; BUTLER, R.; CAMERON, J. Ventilation in plant tissue culture and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. **Annals of Botany**, London, v. 67, p. 229-237, 1991.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, I.; ROVERARO, C.; GOREUX, A. Promotion of *Annona cherimola in vitro* morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft*, Stuttgart, v. 56, n. 5, 224-227, Sept./Oct. 1991.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. (Ed.). **Micropropagation, technology and application**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 1991. p. 447-469.

KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; HAYASHI, M.; AITCHEN-CHRISTIE, J. The *in vitro* environmental and its control in micropropagation. In: KURATA, K.; KOZAI, T. (Ed.). **Transplant production systems**. Dordrecht: Kluwer, 1992. p. 247-282.

LEMOS, E. E. P. Organogênese e micropropagação em anonáceas. In: **WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS**, 3., 2000, Lavras. *Anais. . .* Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.

LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 105-112, July 1998.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 5, p. 721-728, Sept. 1996a.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, May 1996b.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 415, 1980. (Abst. 321),

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 29, n. 2, p. 92-96, Apr. 1993.

MARINO, G.; BERTAZZA, G.; MAGNANINI, E.; ALTAN, A. D. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 34, n. 3, p. 235-244, Sept. 1993.

- MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 37, n. 2, p. 204-205, Mar./Apr. 2001.
- MOK, M.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of *N*-phenil-*N*'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (thidiazuron). **Phytochemistry**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 1509-1511, July 1982.
- MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis – Review. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 34, n. 4, p. 267-275, Oct./Dec. 1998.
- MURPHY, K. P.; SANTAMARIA, J. M.; DAVIES, W. J.; LUMSDEN, P. J. Ventilation of culture vassels. I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 73, n. 6, p. 725-729, Nov. 1988.
- NAIR, S.; GUPTA, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona* hybrid (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* L). **Indian Journal of Horticulture**, v. 41, n. 2, p. 160-165, June 1984.
- PAUDYAL, K. P.; HAQ, N. *In vitro* propagation of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 511-516, Nov./Dec. 2000.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J. M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 3, p. 283-286, May 2000.
- RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, . S. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, supar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.
- SAN-JOSÉ, M. C.; BALLESTER, A. VIEITEZ, A. M. Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 5, p. 588-595, Sept. 2001.

SANTAMARÍA, J. M.; MURPHY, K. P.; LEIFER, C.; LUMSDEN, P. J. Ventilation of culture vessels. II Increased water movement rather than reduced concentration of ethylene and CO₂ is responsible for improve growth and development of *Delphinium in vitro*. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 3, p. 320-327, May 2000.

SHA, L.; McCOWN, B. H.; PETERSON, L. A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 5, p. 631-634, Sept. 1985.

SILVENTE, S.; TRIPPI, U. S. Sucrose modulated morphogenesis in *Anagalis arvensis* L. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 249-254, Mar. 1986.
STAIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bractris gasipaes* H. B. K. **Turrialba**, San José, v. 41, n. 2, p. 196-201, apr./june 1981.

THOMAS, P.; MYTHILI, J. B.; SHIVASHANKARA, K. S. Explant, medium and vessel aeration affect the incidence of hiperhidricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 1, p. 19-25, Jan. 2000.

WAINWRIGHT, H.; SCARCE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrate during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.

WELANDER, M.; WELANDER, N. T.; BRACKMAN, A. S. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 64, n. 3, p. 361-366, May 1989.

YU, X.; REED, B. M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 5, p. 256-259, 1993.

ZIV, M. Quality of micropropagated plants – vitrification. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 27, n. 1, p. 64-69, Jan./Feb. 1991.

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

CAPÍTULO VI

FATORES QUE AFETAM O ENRAIZAMENTO *IN VITRO* EM BROTAÇÕES E ESTACAS DE *ANNONA GLABRA* L

1 RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Fatores que afetam o enraizamento *in vitro* em brotações e estacas de *Annona glabra* L. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécie de *Annonaceae***. 2003. p. 151-197. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.*

O trabalho teve como objetivos determinar os fatores que afetam o enraizamento *in vitro* em brotações de *Annona glabra* L. Foram conduzidos dois experimentos para avaliar o enraizamento. No primeiro, brotações de *A. glabra* (com e sem folhas expandidas) obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com 87,64 mM de sacarose, 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado e diferentes concentrações de AIB (0,0; 4,9 e 9,8 µM). Foram avaliadas três formas de fechamento dos tubos de ensaio: tampa plástica com e sem a película de PVC e tampão de algodão. No segundo, estacas (segmentos nodais) de *A. glabra* foram inoculados em meio WPM contendo diferentes concentrações de sacarose (0,00; 29,21; 58,63 e 116,84 mM) em combinação com dois níveis de carvão ativado (0,0 e 2,0 g.L⁻¹). Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 µmol.s⁻¹.m⁻² a 25 ± 3 °C. Os resultados mostraram que houve formação de raízes adventícias em brotação sem folhas, mesmo quando estimuladas pelo AIB. O método de fechamento dos tubos com tampão de algodão ou tampa plástica sem a película de PVC, trouxe ganhos significativos na porcentagem de enraizamento, na matéria seca das raízes e no número de raízes adventícias em brotações de *A. glabra*. O efeito promotor do carvão ativado na rizogênese foi maximizado quando o enraizamento das estacas ocorreu em meio de cultura com baixa concentração de sacarose (58,42 mM) e em tubos com provisão para trocas gasosas. Com a melhora na aeração, a rizogênese em estacas de *A. glabra* ocorreu em meio de cultura com baixo conteúdo de sacarose (29,21 mM) e nessas condições foi verificado um expressivo incremento no número de raízes adventícias e secundárias (laterais). A aeração dos tubos estimulou o desenvolvimento de um sistema radicular morfológicamente normal, com formação de raízes adventícias e raízes secundárias (laterais).

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Factors affecting *in vitro* rooting of *Annona glabra* L. shoots and stem cuttings. In: _____. **Control of the *in vitro* morphogenesis in some *Annonaceae* species.** 2003. p. 151-197. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The objective of the present work was to determine the factors that affect the rhyzogenesis in *Annona glabra* L. shoots and stem cuttings. Two experiments were performed. In the first experiment, shoots (with and without leaves) obtained *in vitro* were inoculated in WPM medium supplemented with 87.64 mM sucrose, 2.0 g.L⁻¹ activated charcoal and different IBA concentrations (0.0; 4.9 or 9.8 µM) and the following vessel sealing were evaluated: cap with or without PVC film and cotton tampon. In the second experiment, stem cuttings (nodal segments) were inoculated in WPM medium supplemented with different sucrose concentrations (0.00; 29.21; 58.63 or 116.84 mM) combined with two concentrations of activated charcoal (0.0 or 2.0 g.L⁻¹). After inoculation, the tubes with explants were maintained in growth room under photosynthetic active radiation of 45-56 µmol.s⁻¹.m⁻² and temperature of 25 ± 3 °C. The results showed that no adventitious root was induce in shoots without leaves even if stimulated by IBA. The methods of sealing the vessel with cotton tampon or cap without PVC film brought significant gain in percentage of rooting, length and dry weight of roots formed in shoots. The promoter effect of activated charcoal was maximized when the stem cuttings rooting occurred in culture medium with low sucrose concentration (58.42 mM) and in vessel able to perform gas exchanges. With the improvement in the aeration, the rhyzogenesis was induced in medium with low sucrose content (29.21 mM) and there were expressive increments in the number of adventitious and secondary (side) roots. Aeration of cultures stimulated the development of normal morphological root system, with adventitious and secondary (side) roots.

3 INTRODUÇÃO

O enraizamento é uma etapa decisiva da micropropagação e influencia diretamente a sobrevivência durante o transplante e aclimatização. Quando comparado com espécies herbáceas, o enraizamento de espécies lenhosas é mais difícil de ser obtido, e a dificuldade se agrava à medida que se usa material vegetal menos juvenil.

O processo de enraizamento tanto *in vitro* quanto *ex vitro* é fortemente influenciado por fatores ligados à planta doadora de explantes (estresse hídrico, substâncias de reservas, nutrição mineral, condições de crescimento da planta, reguladores de crescimento, juvenildade, sazonalidade, etc) e por fatores externos (temperatura, umidade, substrato, pré-condicionamento), os quais necessitam ser otimizados para favorecerem uma maior formação de raízes.

O presente trabalho teve como objetivos: avaliar a influência da presença de folhas, AIB, carvão ativado, sacarose e do fechamento dos tubos sobre o enraizamento de microbrotações de *Annona glabra* L.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

A rizogênese apresenta as seguintes fases: indução, iniciação e alongamento das raízes. Enquanto as duas primeiras fases (às vezes consideradas como uma só) respondem ou dependem de auxinas, o crescimento das raízes é inibido na sua presença. A dificuldade em um sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem demandar manipulação adicional de uma fase para outra (Grattapaglia & Machado, 1998).

A indução de raízes *in vitro* é um importante passo na micropropagação e em protocolos de transformação genética de plantas (George, 1993). A maioria dos trabalhos de indução de enraizamento adventício de espécies lenhosas envolve tratamentos com auxinas exógenas, tais como AIB, ANA e AIA (George, 1993).

Alguns pesquisadores têm atribuído às auxinas a capacidade de induzir as mudanças intercelulares necessárias para a indução do enraizamento. Para a maioria das espécies, a indução ao enraizamento é feita com a presença de uma auxina no meio de cultura (De Klerk et al., 1995) e a quantidade a ser adicionada depende das concentrações endógenas de auxinas do explante utilizado (James & Thurbon, 1981; Blakesley et al., 1991). No entanto, Druart et al. (1982), sugerem que o processo pode ser induzido apenas pela ausência de luz e que as auxinas são necessárias principalmente nas fases subsequentes ao enraizamento (iniciação e alongamento das raízes). Algumas espécies, no entanto, induzem o enraizamento sem a necessidade da aplicação de reguladores de crescimento. Por exemplo, brotações axilares de *Acacia aldiba* produzem raízes utilizando meio diluído sem adição de reguladores (George, 1993). Grattapaglia & Machado (1998) reportam que diversas espécies, principalmente herbáceas, enraízam na presença de níveis muito reduzidos de auxinas no meio ou em meio básico sem fitoregulador. Neste caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese.

O nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxina endógena que induz a formação de raízes. Geralmente, o uso de reguladores de crescimento acelera consideravelmente o processo de enraizamento. O número de raízes formadas no explante normalmente aumenta com o incremento do conteúdo de auxina,

porém, quando concentrações elevadas são utilizadas, a formação de calo é verificada (George, 1993).

Várias substâncias de reação sinérgica com auxinas têm sido isoladas em estacas de fácil enraizamento (Assis & Teixeira, 1998). Para esses autores, compostos fenólicos (polifenóis) são, em geral, considerados co-fatores de enraizamento, multiplicando o efeito indutor das auxinas, sendo que alguns deles (catecol, floroglucinol e os ácidos floréticos, caféicos, ferúlico, p-cumárico e clorogênico) podem atuar independentemente da presença de auxinas. Os produtos da oxidação de fenóis (as quinonas) são, entretanto, inibidores.

O mecanismo de iniciação radicular em tecidos caulinares, principalmente nos aspectos da fisiologia da diferenciação, é ainda pouco entendido, uma vez que os reguladores de crescimento apresentam outros efeitos no metabolismo, no crescimento e na diferenciação, afetando outros processos fisiológicos (Hatney, 1980, citado por Assis & Teixeira, 1998).

Apesar de as auxinas promoverem consistentemente a formação de primórdios radiculares, pelo menos em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento, sua adição no meio de cultura pode promover a produção de etileno por estimular a biossíntese da ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) (Yang & Hoffman, 1984).

É bem conhecido que o etileno promove abscisão de frutos e folhas de muitas espécies. Algumas espécies de *Annona*, como, por exemplo, *A. squamosa*, são conhecidas por sua sensibilidade ao etileno (Lemos & Blake, 1996). Conforme resultados mostrados nesse trabalho (capítulo II), parece razoável atribuir a outras espécies dos gêneros *Annona* e *Rollinia* sensibilidade ao etileno, manifestada através de abscisão foliar ou hiperhidricidade. De acordo com Zobayed et al. (2002), *A. muricata* é mais sensível ao etileno do que a *A. squamosa* e abscisão é o maior problema na micropropagação de *Annona* spp, além do mais, a adição de ANA ao meio aumenta a abscisão. De acordo

com Hartmann et al. (1997), o etileno pode estimular, reduzir ou não ter efeito sobre a formação de raízes adventícias. A promoção do enraizamento ocorre mais em plantas intactas do que em estacas e mais em espécies herbáceas do que em plantas lenhosas, e em plantas que possuem raízes pré-formadas.

Além das auxinas, outros compostos podem ser utilizados para estimular o enraizamento. O carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% (p/v) tem sido relatado com benéfico em muitas espécies. Embora Mohamed-Yasseen (2001) reporte que o exato mecanismo pelo qual o carvão ativado estimula o crescimento e o enraizamento ainda seja desconhecido, Grattapaglia & Machado (1998) mencionam que fisicamente o carvão ativado simula a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Quimicamente, ele tem efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio de cultura, fixando citocininas residuais dos tecidos das plantas e absorvendo compostos tóxicos inibidores do enraizamento.

A fixação de auxina pelo carvão ativado, em geral, exerce uma ação benéfica no alongamento de raízes (Drew, 1988, Mohamed-Yasseen, 2001). As raízes crescem rapidamente, ramificando-se bastante e mantendo cor mais clara do que quando expostas à luz.

O carvão ativado é usado também para evitar a luz exclusivamente na base dos explantes, o que contribui para a diminuição no enraizamento. Quimicamente, a luz contribui para a diminuição nos teores endógenos de AIA, assim como o acúmulo de fenóis e seus subprodutos que inibem o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998). A luz na base do explante pode estimular a formação de uma camada de esclerênquima, células lignificadas que agem como uma barreira física que dificulta a passagem das raízes. Segundo Rasai et al. (1995), a utilização de carvão ativado aumentou o potencial de enraizamento de espécies de *Annona*, principalmente porque reduz o problema da oxidação, muito frequente nessas espécies.

Outros fatores determinantes do enraizamento dizem respeito às plantas doadoras de explantes. O estresse hídrico, substâncias de reservas como carboidratos, nutrição mineral, condições de crescimento da planta, substâncias reguladoras de crescimento, juvenilidade e sazonalidade da planta matriz têm sido apresentados como aqueles que apresentam efeitos mais relevantes no enraizamento (Assis & Teixeira, 1998).

Além das características ligadas às plantas doadoras de explantes, fatores relacionados com o próprio explante podem exercer influência no seu enraizamento *in vitro*.

É bem conhecido que a presença de folhas nas estacas exerce um forte estímulo sobre o enraizamento (Hartmann et al., 1997). O efeito estimulador das folhas sobre o enraizamento de estacas foi demonstrado com muita clareza em abacateiro (Reuveni & Raviv, 1981). Folhas e gemas produzem auxinas, que são transportadas para a base, o que é essencial para o enraizamento. Neste caso, a sua ausência não é suprida por auxinas, sacarose ou compostos nitrogenados. Esses compostos estimulam o enraizamento na presença de folhas, onde são produzidas auxinas e outros fatores de crescimento (Assis & Teixeira, 1998). Esses autores afirmam que o número de folhas tem influencia, principalmente, na velocidade de enraizamento e no número de folhas formadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Enraizamento de brotações de *Annona glabra* L. em função de presença de AIB, folhas e tipo de selamento dos tubos.

Foram utilizadas brotações de *Annona glabra* L. com aproximadamente 20 mm de comprimento, originadas de cultivos em tubos completamente vedados, de onde foram coletadas brotações sem folhas expandidas, e de cultivos em tubos fechados com tampa plástica e PVC ou tampão de algodão, de onde foram

coletadas brotações com pelo menos um par de folhas expandidas. Foram avaliados três tipos de selamento dos tubos: tampa plástica com PVC, tampa plásticas sem PVC e tampão de algodão.

O meio utilizado foi WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com 87,64 mM de sacarose, 0,70% de ágar, 2.g.L⁻¹ de carvão ativado e as seguintes concentrações de AIB (0.0; 4,9; 9.8 µM). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem e, em seguida, foram distribuídos 15 mL de meio em tubos de ensaio (25 x 150 mm). Os tubos foram selados com tampas de polietileno e autoclavados por 15 minutos a 121^o C.

Foram usados 10 mL de meio de cultura nos tubos de ensaio com tampa plástica com película de PVC e 20 mL de meio nos tubos fechados com tampa sem PVC ou em tubos com tampão de algodão. Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram inoculadas e os tubos de ensaio foram fechados com os três tipos de selamento. No caso do tampão de algodão, inicialmente os tubos foram autoclavados com tampa plástica e somente após a inoculação das brotações é que esses foram fechados com algodão (autoclavado separadamente) e em seguida mantidos em sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol.s⁻¹, a uma temperatura de 25 ± 2°C, durante 60 dias, quando foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias, número de raízes secundárias, comprimento da maior raiz (mm), matéria seca da raiz e da parte aérea (mg).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x3x2 (3 representa as concentrações de AIB e os tipos de selamento dos tubos, 2 representa os tipos de brotações) com 4 repetições, sendo cada uma formada por três tubos.

5.2 Microestaquia

Segmentos nodais de *Annona glabra* foram obtidos de plantas-estoque com três anos de idade, mantidas em casa de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida pela combinação de lâmpadas gro-lux e branca fria, fotoperíodo de 16 h, sem controle de temperatura.

Brotações laterais de hastes caulinares semi-lignificadas foram utilizadas como fonte de explante. Para a desinfestação, as folhas foram retiradas e os segmentos foram mantidos em água corrente por 20 minutos e lavados com detergente neutro. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram seccionados segmentos com comprimento de 20-30 mm, contendo uma única gema, e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de nova imersão em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) e gotas de detergente durante 15 minutos. Finalmente, os explantes foram lavados, por cinco vezes, em água destilada e autoclavada.

O segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio WPM solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar, suplementado com quatro concentrações de sacarose (0,00; 29,21; 58,63 e 116,84 mM) em combinação com dois níveis de carvão ativado (0,0 e 2,0 g.L^{-1}) e 250 mg.L^{-1} de benomyl. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem.

Foram avaliados dois tipos de selamento dos tubos: tampa plástica com película de PVC e tampão de algodão. Foram usados 10 mL de meio de cultura nos tubos de ensaio com tampa e película de PVC e 20 mL nos tubos fechados com tampão de algodão. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas com radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 45 dias, quando foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias, número de raízes secundárias (laterais), comprimento maior raiz (mm) e matéria seca da raiz (mg).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x2x2 (4 representa as concentrações de sacarose, 2 representa os tipos de selamentos e as concentrações de carvão ativado) com 5 repetições, sendo cada uma formada por quatro tubos.

5.3 Análises estatísticas.

Os dados de cada um dos três experimentos foram analisados separadamente. Os experimentos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância usando arranjo fatorial, testando-se as médias pelo teste de Tukey. Os dados de percentagens foram transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$ e os número de contagem, em $\sqrt{x+1}$. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFLA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Enraizamento de brotações de *Annona glabra* L. em função da presença de AIB, folhas e tipo de selamento dos frascos.

Porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias, número de raízes secundárias (laterais)

A interação tripla “concentração de AIB x folha x tipo de selamento” foi altamente significativa para as variáveis porcentagem de enraizamento ($P \leq 0,01$) e número de raízes adventícias ($P \leq 0,01$). A interação “folha x tipo de selamento” foi significativa ($P \leq 0,05$) para a variável número de raízes secundárias (laterais) (Tabela 1).

TABELA 1- Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias e número de raízes secundárias (laterais) em brotações de *Annona glabra* L. com ou sem folha, em função de diferentes concentrações de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		Enraizamento ^z	Nº raízes adventícias ^y	Nº raízes secundárias ^y
Concentração AIB (A)	2	122,65ns	0,2326**	0,0238 ns
Folha (B)	1	11.742,78**	6,4377**	0,6360**
Tipo selamento (C)	2	558,21**	0,2714**	0,1210 *
A x B	2	122,65ns	0,2326**	0,0238 ns
A x C	4	383,79**	0,2952**	0,0646 ns
B x C	2	558,21**	0,2714**	0,1210 *
A x B x C	4	383,79**	0,2952**	0,0646 ns
Resíduo	54	49,37	0,04121	0,0383
C.V. (%)		55,02	15,81	17,90

ns -Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$.

^y - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

Não houve formação de raízes adventícias em brotações sem folhas, oriundas de cultivo em tubos completamente vedados e sob o efeito do etileno (Tabela 2).

Na ausência de AIB no meio de cultura, a maior porcentagem de enraizamento (66,7%) foi obtido nos tubos com tampa sem PVC, enquanto na presença de 9,8 μ M AIB, os melhores resultados foram verificados quando se utilizou o tampão de algodão. Os selamentos tampa sem PVC e tampão de algodão promoveram um acréscimo de 111 e de 89%, respectivamente, na porcentagem de brotações enraizadas, quando comparados com o método tampa

com PVC (Tabela 2). Entretanto, o maior valor obtido (66,7%) difere dos resultados reportado por Deccetti (2000) para essa espécie, nos quais, o percentual de enraizamento chegou a 90% em meio sem adição de AIB.

TABELA 2- Resultados médios para porcentagem de enraizamento de brotações de *Annona glabra* L., com e sem folhas, em função de AIB e tipo de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de Selamento	AIB (μM)			Média
	0,0	4,9	9,8	
		+ folha / - folha		
Tampa com PVC	33,30 b ^z / -	33,30 b / -	8,32 b / -	24,97 b
Tampa sem PVC	66,70 a / -	66,70 a / -	24,98 b / -	52,79 a
Tampão algodão	33,33 b / -	41,63 b / -	66,70 a / -	47,21 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Observaram-se comportamentos quadráticos ($P \leq 0,01$) das concentrações de AIB para a variável porcentagem de enraizamento em tubos fechados com tampa, com ou sem PVC, enquanto, quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão, a tendência de incremento na porcentagem de enraizamento foi linear ($P \leq 0,01$) em função do aumento na concentração de AIB (Figura 1).

As curvas de respostas indicam que a utilização de AIB, principalmente em concentrações superiores a 4,9 μM , reduz o número médio de raízes emitidas por brotação de *Annona glabra* (Figura 2). Esses resultados concordam em parte com os reportados para outras espécies. Em *Rollinia mucosa*, a formação de raízes foi dificultada quando as brotações alongadas oriundas de hipocótilo e epicótilo foram inoculadas diretamente em meio suplementado com AIB (Figueiredo et al., 2001). Entretanto, as concentrações de AIB utilizadas por esses autores foram elevadas. Em meio WPM suplementado com 53,7 ou 107,4 μM AIB, o enraizamento de *R. mucosa* foi de 33% e 20%, respectivamente

(Figueiredo et al., 2001). Essa dificuldade pode estar ligada ao efeito residual de citocininas requeridas para induzir a proliferação de brotações e o pré-condicionamento das brotações em meio contendo carvão ativado, durante 7 dias no escuro, aumentou o enraizamento de *A. cherimola* (Encina et al., 1994).

$$y(\bullet) = 33,300 + 2,5484 x - 0,52000 x^2 \quad R^2 = 100^{**}$$

$$y(\blacktriangle) = 66,700 + 4,2576 x - 0,86890 x^2 \quad R^2 = 100^{**}$$

$$y(\times) = 30,529 + 3,4056 x \quad R^2 = 92,23^{**}$$

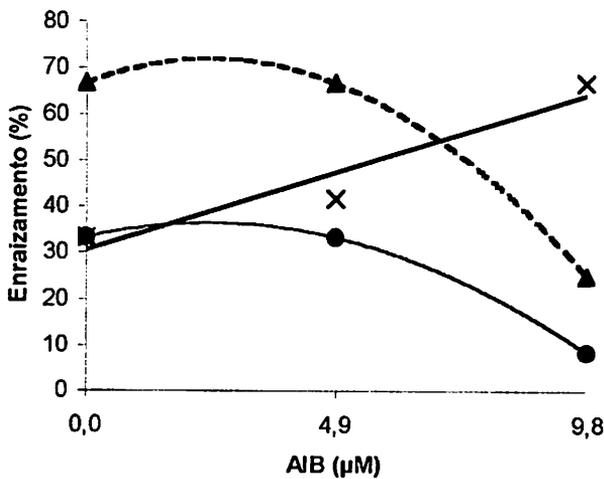


FIGURA 1- Valores médios estimados para porcentagem de enraizamento de brotações de *Annona glabra* L., com folhas, em função de AIB e tipo de selamento (—●— tampa com PVC, --▲-- tampa sem PVC, —×— tampão de algodão). Lavras - MG, 2002.

O percentual de enraizamento encontrado é superior aos resultados encontrados por Nair et al. (1984). Esses autores reportaram 43% de enraizamento quando as brotações obtidas de uma árvore de atemóia adulta foram mantidas em meio MS semi-sólido (1/2 macronutrientes) contendo 50 mg.L⁻¹ (245 µM) AIB por três dias no escuro, seguidos por 13 dias na luz. Resultados mais laboriosos foram reportados por Encina et al. (1994), que

incubaram brotações de cherimola *in vitro* por 7 dias em meio MS suplementado com 0,1 g.L⁻¹ carvão ativado, seguidos de inoculação em meio de cultura contendo 500 µM AIB, 2,13% sacarose e 200 mg.L⁻¹ de ácido cítrico por 10 dias (7 dias no escuro, seguidos por 3 dias na luz), em meio solidificado com ágar. Os autores obtiveram 95% de enraizamento quando as brotações foram transferidas para um mesmo meio sem AIB e com a metade dos macronutrientes.

O maior número de raízes adventícias (3,75 por brotação) foi induzido quando se utilizou a tampa sem PVC, diferindo significativamente dos outros tipos de selamento, tanto na ausência quanto na presença de pequenas concentrações de AIB (4,9 µM). No geral, foi observado um ganho de 124% no número de raízes adventícias efetuando a retirada da película de PVC da tampa dos tubos de ensaio (Tabela 3).

TABELA 3- Resultados médios para número de raízes adventícias em brotações de *Annona glabra* L., com e sem folhas, em função de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de Selamento	AIB (µM)			Média
	0,0	4,9	9,8	
	+ folha / - folha			
Tampa com PVC	1,31 b ² / -	1,87 b / -	0,25 b / -	1,14 b
Tampa sem PVC	3,75 a / -	3,46 a / -	0,50 b / -	2,56 a
Tampão algodão	1,25 b / -	1,00 b / -	2,25 a / -	1,50 b

² - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As concentrações de AIB mostram comportamentos quadráticos ($P \leq 0,01$) para a variável número de raízes adventícias em tubos fechados com tampa com ou sem PVC e uma tendência quadrática ascendente ($P \leq 0,01$) quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão (Figura 2).

Os resultados obtidos para número de raízes adventícias são superiores àqueles reportados por Deccetti (2000), que obteve o maior número (2 por explante) em meio WPM sem regulador de crescimento, em frascos completamente vedados.

$$\begin{array}{ll}
 y(\bullet) = 1,317 + 0,3364 x - 0,04540 x^2 & R^2 = 100^{**} \\
 y(\blacktriangle) = 3,750 + 0,2122 x - 0,05540 x^2 & R^2 = 100^{**} \\
 y(\times) = 1,250 - 0,2030 x + 0,03118 x^2 & R^2 = 100^{**}
 \end{array}$$

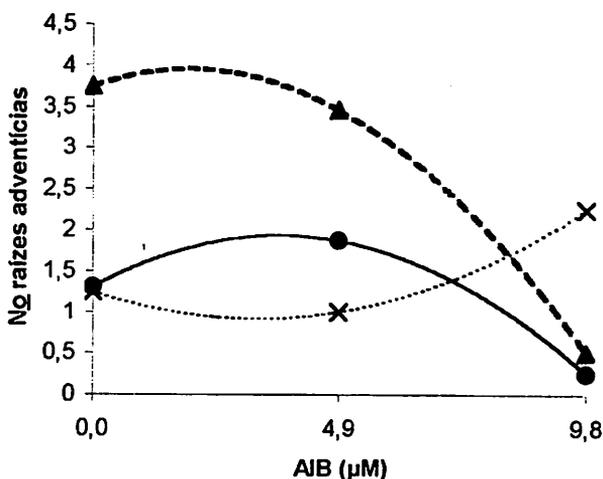


FIGURA 2- Valores médios estimados para número de raízes adventícias em brotações de *Annona glabra* L., com folhas, em função de AIB e tipo de selamento (—●— tampa com PVC, - - ▲ - - tampa sem PVC, --×-- tampão de algodão). Lavras - MG, 2002.

O maior número de raízes secundárias (0,72 por brotação) foi observado utilizando-se AIB na concentração mais reduzida (Tabela 4). Observou-se um comportamento quadrático das concentrações de AIB para a variável número de raízes secundárias, embora o valor de R^2 não tenha sido significativo ($P > 0,05$) (Figura 3). A presença das raízes secundárias (laterais) aumenta a superfície radicular e o volume de substrato explorado. A curva de regressão para número

de raízes secundárias (laterais) apresentou um comportamento quadrático para as concentrações de AIB (Figura 3).

TABELA 4- Resultados médios para número de raízes secundárias (laterais) em brotações de *Annona glabra* L., com e sem folhas, em função de diferentes concentrações de AIB. Lavras - MG, 2002.

Tipos de brotação	AIB (μM)			Média
	0,0	4,9	9,8	
Com folha	0,30	0,72	0,47	0,50 a
Sem folha	0,00	0,00	0,00	0,00 b

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$y(\bullet) = 0,304 + 0,1533 x - 0,01390 x^2 \quad R^2 = 100 \text{ ns}$$

$$y(\blacktriangle) = 0$$

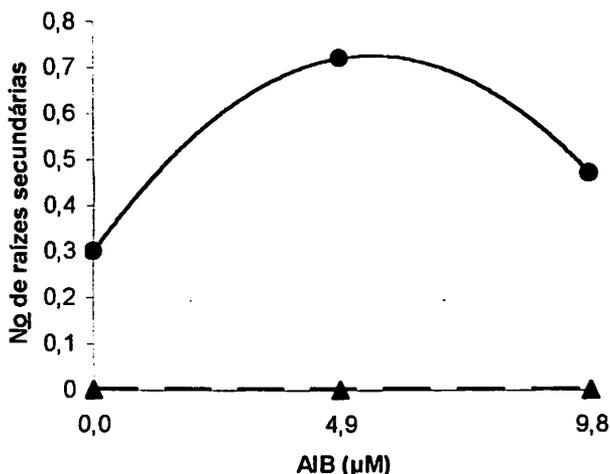


FIGURA 3- Valores médios estimados para número de raízes secundárias (laterais) em brotações com folhas (—●—) e sem folhas (—▲—) de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de AIB. Lavras - MG, 2002.

O alto percentual de enraizamento e o maior número de raízes adventícias formadas, na ausência da auxina, sugerem que, pelo menos em parte, a formação de raízes adventícias, em brotações de *Annona glabra*, não depende do suprimento exógeno de AIB. Todavia, a presença de 4,9 μM de AIB aumentou o número de raízes secundárias (laterais). Esse fato pode indicar o alto nível endógeno de auxina nos explantes e caracterizar a facilidade de enraizamento da espécie. Hartmann et al. (1997), afirmam que auxinas são produzidas por gemas e folhas jovens em quantidade suficiente para induzir o enraizamento, pois na ausência de AIB no meio de cultura, a porcentagem de enraizamento foi de 66,7%, em tubos com tampa sem PVC.

A indução de primórdios radiculares em *Annona glabra* pode ser obtida facilmente sem a adição de AIB. Esses resultados sugerem que a desdiferenciação e a indução à divisão celular para a formação dos primórdios radiculares não dependem da aplicação exógena desta auxina e a aplicação de concentrações elevadas de auxinas pode ocasionar aumento da oxidação (James & Thurbon, 1981) e da atividade da peroxidase, reduzindo as concentrações endógenas de ácido indolilacético (Harbage et al., 1998). Isto pode explicar, em parte, a redução no enraizamento das brotações cultivadas em meio de cultura com 9,8 μM de AIB em tubos com tampa plástica.

Comprimento da maior raiz, matéria seca de raiz e de parte aérea

A interação tripla “concentração de AIB x folha x tipo de selamento” foi altamente significativa para as variáveis comprimento da maior raiz ($P \leq 0,01$), matéria seca de raiz e da parte aérea ($P \leq 0,01$) (Tabela 5).

O tipo de selamento afetou diretamente a rizogênese. Na ausência de AIB, as raízes apresentaram o maior comprimento (17,17 mm) em tubos fechados com tampa sem PVC, enquanto na presença de 9,8 μM AIB no meio de cultura, as maiores raízes (44,25 mm) foram obtidas quando se fecharam os tubos com o

TABELA 5- Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento, matéria seca de raiz e matéria seca da parte aérea em brotações de *Annona glabra* L. com ou sem folha, em função de diferentes concentrações de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		Comprimento maior raiz	Matéria seca de raiz	Matéria seca parte aérea
Concentração AIB (A)	2	22,77 ns	0,78*	18,29 ns
Folha (B)	1	4.443,88**	96,55**	2.835,29**
Tipo selamento (C)	2	271,89**	7,16**	178,67**
A x B	2	26,77 ns	0,78*	18,29 ns
A x C	4	409,17**	3,32**	180,97**
B x C	2	271,89**	7,16**	178,69**
A x B x C	4	409,17**	3,32**	180,97**
Resíduo	54	13,92	0,24	6,97
C.V. (%)		42,50	42,43	42,07

ns - Não-Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

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

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

tampão de algodão. Esse resultado é 13 vezes maior que aquele obtido com o método tradicional para fechar os tubos (Tabela 6). Nos tubos completamente (tampa com PVC) ou parcialmente vedados (tampa sem PVC), a concentração mais elevada de AIB (9,8 μ M) causou inibição da divisão e alongamento celulares. Observaram-se tendências quadráticas ($P \leq 0,01$) das concentrações de AIB para a variável comprimento da maior raiz nos três tipos de selamentos. Entretanto, com o tampão de algodão, a tendência foi diferente e nenhum modelo matemático se ajustou aos dados (Figura 4).

TABELA 6- Resultados médios para comprimento da maior raiz (mm) em brotações de *Annona glabra* L., com e sem folhas, em função de diferentes concentrações de AIB e tipo de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de Selamento	AIB (μ M)			Média
	0,0	4,9	9,8	
	+ folha / - folha			
Tampa com PVC	12,08 b ^z / -	13,50 b / -	3,16 b / -	9,58 c
Tampa sem PVC	17,17 a / -	20,08 a / -	6,66 b / -	14,63 b
Tampão algodão	12,41 b / -	12,08 b / -	44,25 a / -	22,91 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

$$y(\bullet) = 12,082 + 1,4882 x - 0,24474 x^2 \quad R^2 = 100^{**}$$

$$y(\blacktriangle) = 17,165 + 2,2632 x - 0,34027 x^2 \quad R^2 = 100^{**}$$

$$y(\blacksquare) = ns$$

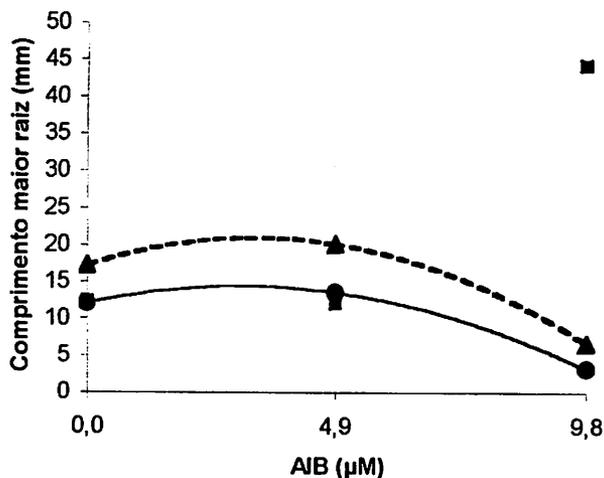


FIGURA 4- Valores médios estimados para comprimento da maior raiz (mm) em brotações de *Annona glabra* L., com folhas, em função de diferentes concentrações de AIB e tipos de selamento (—●— tampa com PVC, -- ▲-- tampa sem PVC, ■ tampão de algodão). Lavras - MG, 2002.

O provável acúmulo de etileno no tubo de ensaio pode explicar o menor enraizamento em tubos completamente vedados. De acordo com Biddington (1992), a função geral do etileno na cultura de tecidos não é clara, embora ele possa mudar a capacidade organogênica de explantes *in vitro*. O acúmulo desse gás em quantidades excessivas é provavelmente o gatilho que dispara vários processos fisiológicos, os quais, além da abscisão foliar precoce, em muitas espécies promovem o enraizamento (Dimassi-Theriou et al., 1993). Entretanto, de acordo com Hartmann et al. (1997), o etileno pode estimular, reduzir ou não ter efeito sobre a formação de raízes adventícias.

Na comparação entre os três tipos de selamento, na ausência de AIB, o maior matéria seca de raízes (2,25 mg / brotação) foi obtido com a tampa sem PVC, enquanto, na presença de 9,8 μM AIB, o tampão de algodão proporcionou melhores condições para o desenvolvimento radicular, obtendo-se 4,32 mg por planta, 12 vezes superior ao valor encontrado quando os tubos foram fechados com tampa e película PVC (Tabela 7).

TABELA 7- Resultados médios para matéria seca de raiz (mg) em brotações de *Annona glabra* L., com e sem folhas, em função de concentrações de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de Selamento	AIB (μM)			Média
	0,0	4,9	9,8	
	+ folha / - folha			
Tampa com PVC	2,26 ab ^z / -	1,10 c / -	0,33 c / -	1,23 c
Tampa sem PVC	2,85 a / -	2,85 b / -	1,17 b / -	2,29 b
Tampão algodão	1,86 b / -	4,06 a / -	4,32 a / -	3,41 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observou-se um comportamento linear ($P \leq 0,01$) decrescente nas concentrações de AIB para a variável matéria seca de raiz quando os tubos foram fechados com tampa plástica com ou sem PVC. Por outro lado, com o tampão de algodão, o matéria seca das raízes cresceu linearmente ($P \leq 0,01$) com o aumento das concentrações de AIB (Figura 5).

$$\begin{array}{ll}
 y(\bullet) = 2,201 - 0,1974 x & R^2 = 98,63^{**} \\
 y(\blacktriangle) = 3,135 - 0,1716 x & R^2 = 75,33^{**} \\
 y(\times) = 2,187 + 0,2510 x & R^2 = 83,18^{**}
 \end{array}$$

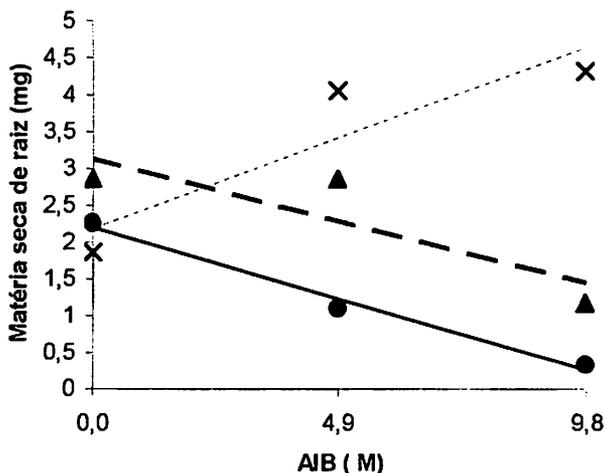


FIGURA 5- Valores médios estimados para matéria seca de raiz (mg) em brotações de *Annona glabra* L., com folhas, em função de diferentes concentrações de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio (—●— tampa com PVC, --▲-- tampa sem PVC, --×-- tampão de algodão). Lavras - MG, 2002.

Foi observado um comportamento similar entre a biomassa seca de raiz e parte aérea das plantas (Tabela 8, Figura 6). A maior produção de matéria seca das plantas coincidiu com os tratamentos que apresentaram as maiores percentagens de enraizamento. Na ausência de AIB, a retirada da película de

PVC da tampa proporcionou um ganho de 284% de biomassa seca quando comparada com o método de vedação total do tubo. Com o tampão de algodão e meio suplementado com 9,8 μM AIB, obteve-se a maior biomassa seca da parte aérea (16,55 mg) e de raízes (3,41 mg), o que corresponde a acréscimos de 10,4 e 12,1 vezes na matéria seca de parte aérea e de raiz, respectivamente (Tabelas 7 e 8).

TABELA 8- Resultados médios para peso da parte aérea (mg) brotações de *Annona glabra* L., com e sem folhas, em função de diferentes concentrações de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de Selamento	AIB (μM)			Média
	0,0	4,9	9,8	
	+ folha / - folha			
Tampa com PVC	6,63 c ^z / *	10,09 a / *	2,28 b / *	6,23 b
Tampa sem PVC	25,47 a / *	14,08 a / *	4,73 b / *	14,76 a
Tampão algodão	11,22 b / *	12,46 a / *	25,97 a / *	16,55 a

^z - Médias seguidas pela mesma cm cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* - Não determinado.

Aspectos do enraizamento das brotações de *A. glabra* são mostrados na Figura 7.

$$\begin{aligned}
 y(\bullet) &= 9,627 + 1,8576 x - 0,23479 x^2 & R^2 &= 100^{**} \\
 y(\blacktriangle) &= 25,134 - 2,1163 x & R^2 &= 99,68^{**} \\
 y(\times) &= 9,177 + 1,5053 x & R^2 &= 81,29^{**}
 \end{aligned}$$

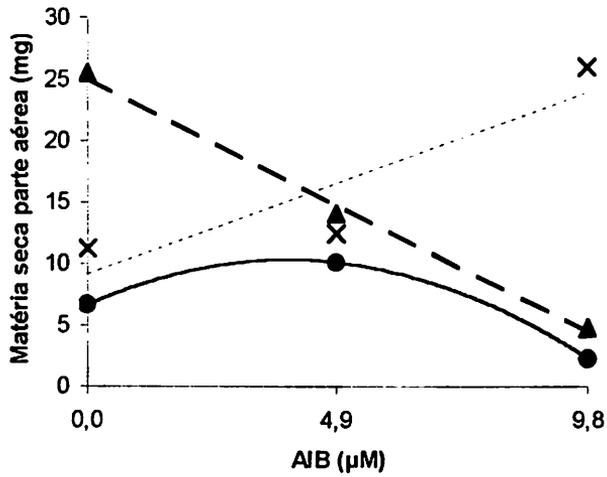


FIGURA 6- Valores médios estimados para peso da parte aérea (mg) de brotações de *Annona glabra* L., com folhas, em função de diferentes concentrações de AIB e tipos de selamento dos tubos de ensaio (—●— tampa com PVC, - - ▲ - - tampa sem PVC, --×-- tampão de algodão). Lavras - MG, 2002.

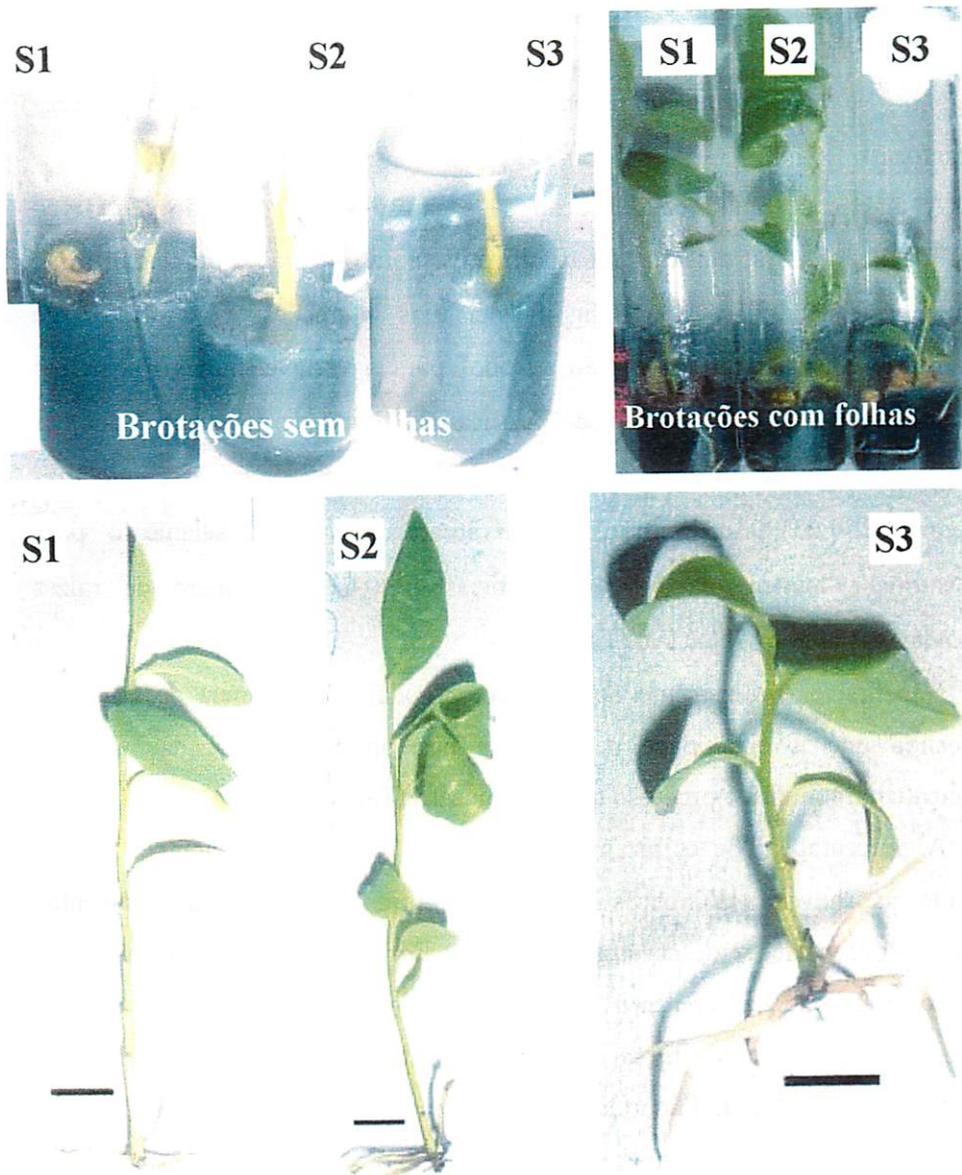


FIGURA 7- Enraizamento de brotações de *Annona glabra* L. em função da presença ou ausência de folhas e tipos de selamento dos tubos de ensaio (S1, tampa com PVC; S2, tampa sem PVC; S3, tampão de algodão) em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras - MG, 2002. Barra = 10mm.

6.2 Microestaquia

Porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias e número de raízes secundárias

A interação tripla “concentração de sacarose x concentração de carvão ativado x tipos de selamento” foi significativa para a variável porcentagem de enraizamento ($P \leq 0,05$). Houve significância das interações “concentração de sacarose x concentração de carvão ativado” para a variável número de raízes adventícias ($P \leq 0,01$), “concentração de sacarose x tipo de selamento” para as variáveis número de raízes adventícias ($P \leq 0,01$) e número de raízes secundárias (laterais) ($P \leq 0,05$) e “concentração de carvão ativado x tipo de selamento” para as variáveis número de raízes adventícias ($P \leq 0,01$) e número de raízes secundárias (laterais) ($P \leq 0,01$) (Tabela 9).

Não houve enraizamento dos segmentos nodais na ausência de sacarose, indicando que a quantidade de reservas nas brotações utilizadas não foi suficiente para iniciar o processo de enraizamento (Tabela 10).

A porcentagem de enraizamento foi muito baixa na ausência de carvão ativado, não havendo diferenças significativas entre os dois tipos de selamentos para as concentrações de sacarose utilizadas. Em meio de cultura com carvão ativado, a taxa de enraizamento foi de 40% nos segmentos nodais cultivados na presença de 29,21 mM de sacarose e com tubos fechados com tampão de algodão (Tabela 10). É importante ressaltar que nessa menor concentração de sacarose ocorreu a indução de primórdios radiculares (dados não mostrados) ou raízes muito pequenas, característica desejável por facilitar o transplante e a aclimatização.

A contribuição da aeração na porcentagem de enraizamento, calculada com base nos resultados apresentados na tabela 10, foi de 118,6% em meio com carvão ativado.

TABELA 9- Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias e secundárias (laterais) de brotações provenientes de segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativo e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		Enraizamento ^z	Nº raízes adventícias ^y	Nº raízes secundárias ^y
Conc. de sacarose (A)	3	4.590,00 **	1,0938 **	0,4970 **
Conc. de carvão (B)	1	7.605,00 **	2,2535 **	1,9682 **
Tipo de selamento (C)	1	1.361,25 **	0,2394 **	1,3257 **
A x B	3	855,00 **	0,3381 **	0,2519 ns
A x C	3	521,25 *	0,1455 **	0,3140 *
B x C	1	1.901,25 **	0,5709 **	2,3064 **
A x B x C	3	401,25 *	0,0721 ns	0,2658 ns
Resíduo	64	146,25	0,0263	0,0985
C.V. (%)		67,19	12,98	25,91

ns -Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

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

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

^z - Dados originais transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$

^y - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

Em meio de cultura com baixo conteúdo de sacarose (58,42 mM) suplementado com carvão ativado, obteve-se a maior porcentagem de enraizamento (75%) (Tabela 10). Esse resultado é muito superior àquele encontrado por Figueiredo et al. (2001) para *Rollinia mucosa*. Os autores obtiveram um percentual de 53% de enraizamento e número médio de 3,5 raízes por brotação, em meio de cultura suplementado com um baixo nível de sacarose (58,42 mM).

Em meio de cultura com elevado conteúdo de sacarose (116,86 mM) e 2,0 g.L⁻¹ carvão ativado, houve um decréscimo na porcentagem de enraizamento em tubos fechados com o tampão de algodão (Tabela 10). Esse aumento no conteúdo de sacarose provavelmente elevou o potencial osmótico do meio e o tampão de algodão permitiu uma maior evapotranspiração, proporcionando uma mudança no estado físico do meio, alterando a disponibilidade de água, nutrientes e reguladores de crescimento nele contidos. Segundo Taiz & Zeiger (1998), o estresse hídrico pode provocar aumento nos conteúdos endógenos de ABA e etileno nas folhas, compostos reconhecidos como inibidores do enraizamento em muitas espécies.

Em meio suplementado com 58,42 mM de sacarose e 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, obteve-se 75% de enraizamento com o selamento tampão de algodão, em relação aos 20% obtidos em tubos fechados com tampa e PVC, ou seja, uma diferença de 275% em favor do selamento alternativo (Tabela 10).

TABELA 10- Resultados médios para porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
0,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a ^z	0,00 a	10,00 a	20,00 a	7,50 a
Tampão de algodão	0,00 a	0,00 a	10,00 a	15,00 a	6,25 a
2,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	10,00 b	20,00 b	50,00 a	20,00 b
Tampão de algodão	0,00 a	40,00 a	75,00 a	60,00 a	43,73 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na ausência de carvão ativado, observou-se um comportamento linear das concentrações de sacarose para a variável porcentagem de enraizamento, tanto com o selamento tampa com PVC ($P \leq 0,01$) quanto com o tampão de algodão ($P \leq 0,05$) (Figura 8 A), enquanto, na presença de carvão ativado no meio, observou-se tendências linear e quadrática das concentrações de sacarose para a mesma variável, em tubos com tampão de algodão ($P \leq 0,01$) e tampa com PVC ($P \leq 0,01$), respectivamente (Tabela 8, B).

O enraizamento, como evidenciado neste trabalho, é fortemente estimulado pela presença do carvão ativado no meio de cultura. Entretanto, a interação concentração de açúcar, carvão ativado e tipo de selamento dos recipientes de cultivo é inédita, pelo menos em *Annonaceae*.

$$Y(\blacktriangle) = -1,9992 + 0,18581X$$

$$R^2 = 93,7\% **$$

$$Y(\blacktriangle) = -1,9985 + 0,43030X$$

$$R^2 = 98,78\% **$$

$$Y(\blacksquare) = -0,9993 + 0,14180X$$

$$R^2 = 88,99\% *$$

$$Y(\blacksquare) = -1,9087 + 1,96683X - 0,01225X^2 \quad R^2 = 98,59\% **$$

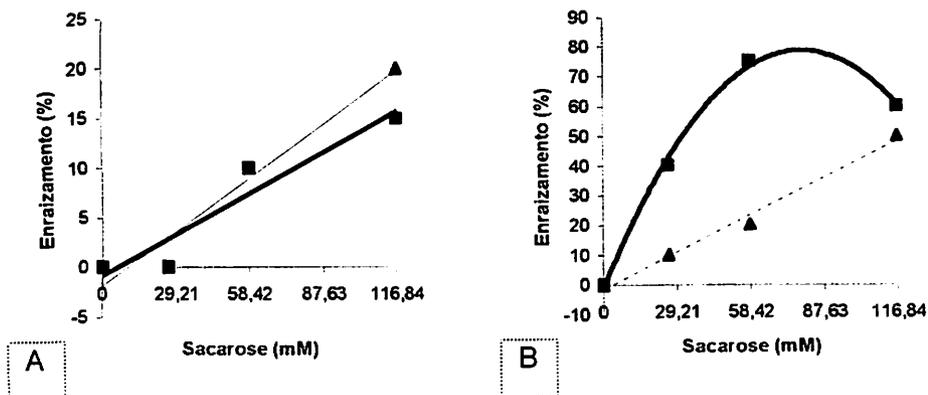


FIGURA 8- Valores médios estimados para porcentagem de enraizamento em função de diferentes concentrações de sacarose e tipos de selamento dos tubos de ensaio (—▲—tampa com PVC; —■— tampão de algodão) em segmentos nodais de *Annona glabra* L, inoculados na ausência (A) e na presença (B) de 2,0 g.L⁻¹ d carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

O efeito benéfico do carvão ativado no enraizamento também foi observado por Encina et al. (1994). Esses autores reportam que a pré-indução das brotações de *A. cherimola* em meio de cultura contendo 1,0 g.L⁻¹ carvão ativado aumentou o enraizamento, atribuindo isto à sua provável função de absorver inibidores, como por exemplo, exudatos ou citocininas residuais.

A atividade estimulatória do carvão ativado em induzir o enraizamento de brotações também foi reportada por Dumas & Monteouis (1995) em estudos com *Pinus pinaster*. Moncousin (1991) afirma que a maioria das espécies lenhosas necessita, durante o seu processo de enraizamento, da atuação de compostos antioxidantes, como o carvão ativado, para minimizar os efeitos maléficos dos compostos fenólicos presentes em grandes quantidades. O escurecimento do meio de cultura provocado pelo carvão ativado pode ter favorecido o incremento na indução e no crescimento de raízes (Figuras 8 B e 9 A, B), pois Druart et al. (1982) afirmam que apenas a ausência de luz na base do explante é suficiente para a indução do enraizamento. Esse fato foi comprovado em pereira por Wang (1991), o qual também observou aumento no enraizamento nessas condições.

Provavelmente, o principal efeito do carvão ativado no meio de cultura está relacionado com a sua capacidade de adsorver metabólitos produzidos pelo explante *in vitro*, como compostos fenólicos, bem como de reduzir os efeitos tóxicos da interação entre altas concentrações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio de cultura, e substâncias secretadas pelo explante (Fridborg et al., 1978; Stein & Stephens, 1981). O efeito estimulatório do carvão ativado sobre o enraizamento pode ser devido, também, ao escurecimento e aeração do meio de cultura (Mohamed-Yasseen, 2001). Quimicamente, a luz contribui para a diminuição nos teores endógenos de AIA, assim como o acúmulo de fenóis e seus subprodutos, que inibem o enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

Anatomicamente, a luz na base do explante pode estimular a formação de uma camada de células de esclerênquima, que dificultam a passagem das raízes.

Em todas as concentrações de sacarose, o número de raízes adventícias e secundárias foi maior na presença de carvão ativado. Na média geral, a presença desse composto no meio aumentou em 5,1 vezes o número de raízes adventícias e em 6,3 vezes o número de raízes secundárias. Na presença de carvão ativado a rizogênese foi estimulada mesmo em meio contendo pequenas concentrações de sacarose (Tabela 11).

TABELA 11- Resultados médios para número de raízes adventícias e número de raízes secundárias (laterais) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de sacarose e carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
Número de raízes adventícias					
0,0	0,00 a ^z	0,00 b	0,20 b	0,57 b	0,19 b
2,0	0,00 a	0,75 a	1,43 a	2,51 a	1,17 a
Número de raízes secundárias (laterais)					
0,0	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,64 b	0,16 b
2,0	0,00 a	1,31 a	1,72 a	1,67 a	1,17 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observou-se um comportamento linear das concentrações de sacarose para a variável número de raízes adventícias na presença ($P \leq 0,01$) e ausência de carvão ativado ($P \leq 0,01$) (Figura 9, A). Para a variável número de raízes secundárias (laterais), observou-se tendência quadrática das concentrações de sacarose na presença de carvão ativado ($P > 0,05$) (Figura 9, B).

$$Y(\blacktriangle) = -0,0074 + 0,15229X$$

$$R^2 = 93,65\% **$$

$$Y(\blacktriangle) = ns$$

$$Y(\blacksquare) = 0,0084 + 0,06220X$$

$$R^2 = 99,31\% **$$

$$Y(\blacksquare) = 0,0049 + 0,13605X - 0,00242X^2 \quad R^2 = 98,43\% *$$

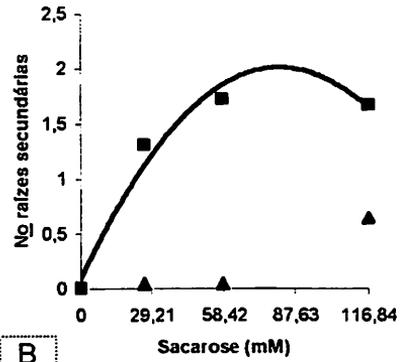
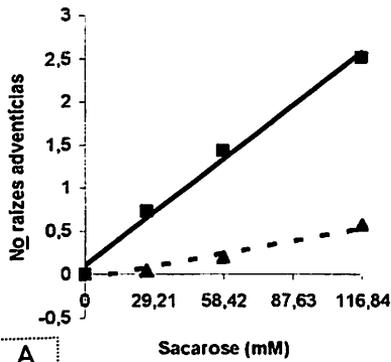


FIGURA 9- Valores médios estimados para número de raízes adventícias (A) e número de raízes secundárias (laterais) (B) em função de concentrações de sacarose e carvão ativo (--▲-- 0 g.L⁻¹; —■— 2 g.L⁻¹) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Lavras - MG, 2002.

O tipo selamento dos tubos influenciou diretamente a indução de raízes adventícias e secundárias. Com o tampão de algodão, a rizogênese foi induzida em meio com pequena concentração de sacarose (29,21 mM), enquanto, em tubos fechados com tampa e PVC, a indução da raízes adventícias e secundárias só ocorreu em meios suplementados com 58,42 mM e 116,86 mM de sacarose, respectivamente. Na média geral, com o selamento com tampão de algodão houve ganho de 61,5% no número de raízes adventícias e de 354% no número de raízes secundárias (laterais) (Tabela 12).

TABELA 12- Resultados médios para números de raízes adventícias e número de raízes secundárias (laterais) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de concentração de sacarose e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipo de Selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
Números de raízes adventícias					
Tampão de algodão	0,00 a	0,69 a	1,20 a	1,47 a	0,84 a
Tampa com PVC	0,00 a	0,06 b	0,43 b	1,61 a	0,52 b
Números de raízes secundárias					
Tampão de algodão	0,00 a	1,31 a	1,72 a	1,35 a	1,09 a
Tampa com PVC	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,96 a	0,24 b

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observaram-se tendências linear e quadrática das concentrações de sacarose para a variável número de raízes adventícias com o tampão de algodão ($P \leq 0,01$) e com a tampa com PVC ($P \leq 0,01$), respectivamente (Figura 10 A). Para a variável número de raízes adventícias (laterais), observou-se um comportamento quadrático das concentrações de sacarose quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão ($P \leq 0,01$) (Figura 10 B).

O tipo de selamento maximizou o efeito promotor de rizogênese do carvão ativado em segmentos nodais de *A. glabra*. Em meio contendo carvão ativado, o número médio de raízes adventícias por explante foi 1,56 com o tampão de algodão contra 0,78 do selamento tampa com PVC, uma diferença de 100% em favor do primeiro. Essa tendência foi mais acentuada na indução de raízes secundárias, em que o selamento tampão com algodão promoveu um enraizamento mais de 10 vezes superior àquele obtido com o método tradicional de fechamento dos frascos (Tabela 13).

$$Y(\blacktriangle) = -0.1972 + 0.01972X \quad R^2 = 93,17\% ** \quad Y(\blacktriangle) = ns$$

$$Y(\blacksquare) = 0.0093 + 0.02288X - 0,0001X^2 \quad R^2 = 99,99\% ** \quad Y(\blacksquare) = -0.183 + 0.0414X - 0,0002X^2 \quad R^2 = 84,75\% *$$

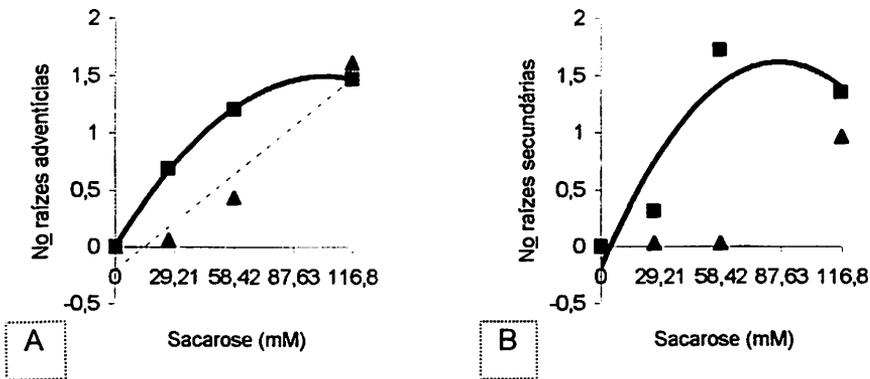


FIGURA 10- Valores médios estimados para número de raízes adventícias (A) e número de raízes secundárias (laterais) (B) em função de concentrações de sacarose e tipos de selamento dos tubos de ensaio (—▲—tampa com PVC; —■— tampão de algodão) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Lavras - MG, 2002.

O tipo de selamento dos recipientes de cultura influenciou diretamente a rizogênese. A tampa com a película de PVC é capaz de vedar totalmente os tubos e a energia necessária à indução e crescimento radicular vem exclusivamente da fonte exógena de carbono utilizada no meio de cultura. Quando esse suplemento de carboidrato foi inferior a 116,86 mM, o desenvolvimento radicular foi comprometido. Por outro lado, o tampão de algodão proporcionou trocas gasosas suficientes para compensar a falta de energia nos meios de cultura com concentração de carboidrato inferior àquela normalmente utilizada (87,63 mM ou 3% p/v).

Tem sido reportado que o crescimento de plantas *in vitro* pode ser melhorado através da manipulação da umidade relativa dentro dos frascos (Wardle et al., 1983). O aumento nas trocas gasosas promovido pelo tampão de algodão foi responsável pela redução da umidade relativa dentro dos tubos.

Assim, a melhora no crescimento obtido sob aeração natural pode ter sido, pelo menos parcialmente, resultado do aumento da absorção de minerais do meio de cultura. Esses resultados corroboram aqueles encontrados para *A. muricata* e *A. squamosa* utilizando a aeração forçada (Zobayed et al., 2002).

TABELA 13. Resultados médios para números de raízes adventícias e número de raízes secundárias (laterais) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Tipo de selamento		Média
	Tampão de algodão	Tampa com parafilme	
Números de raízes adventícias			
0,0	0,11 A ^y b ^z	0,27 A b	0,19 b
2,0	1,56 A a	0,78 B a	1,17 a
Média	0,84 A	0,52 B	
Número de raízes secundárias (laterais)			
0,0	0,03 A b	0,29 A a	0,16 b
2,0	2,16 A a	0,19 B a	1,17 a
Média	1,09 A	0,24 B	

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si o nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Na Figura 11 podem ser observados aspectos das plantas após 60 dias de inoculação. Na ausência de sacarose no meio de cultivo não houve crescimento das gemas axilares. O melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular ocorreu em meio de cultura com sacarose e carvão ativado e quando os tubos de ensaio foram fechados com o tampão de algodão.

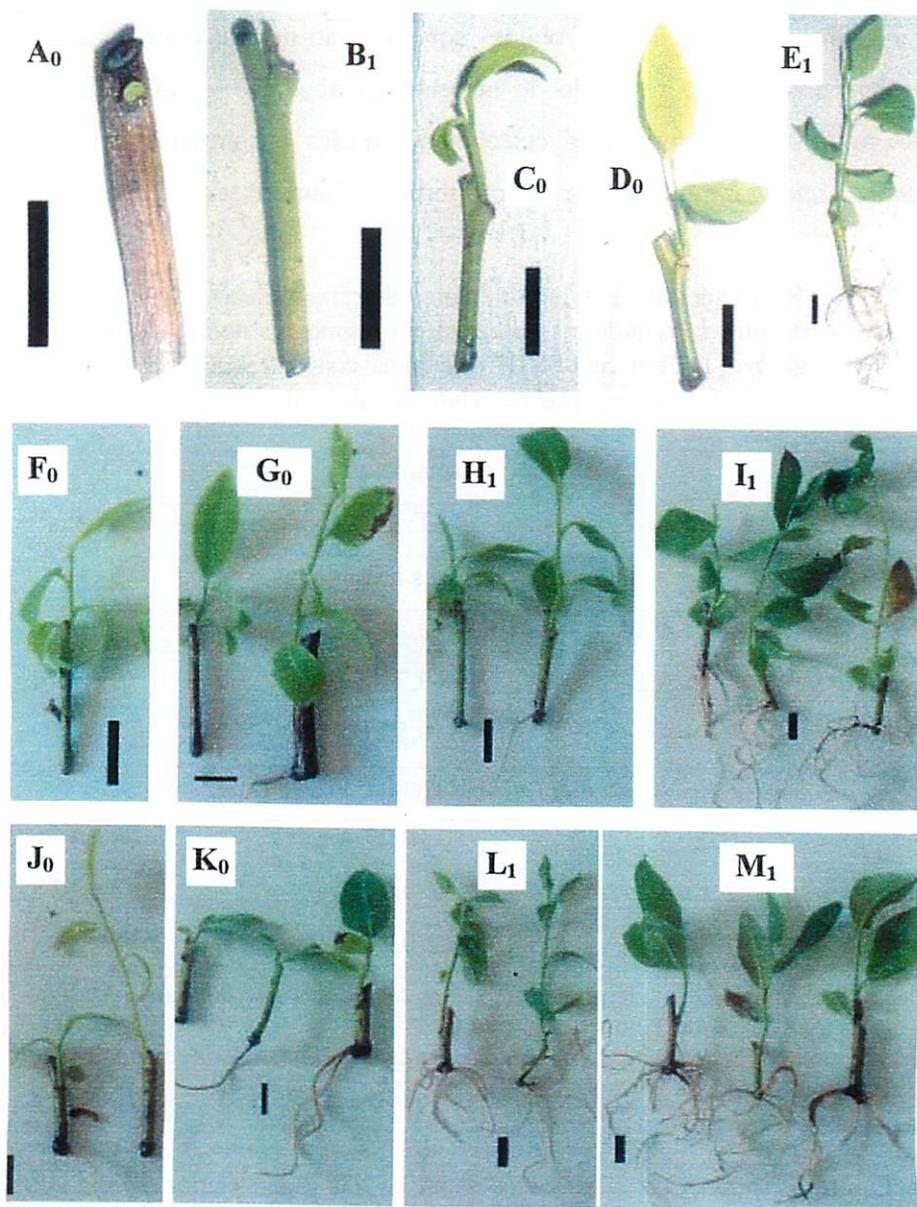


FIGURA 11- Microestaquia em segmentos nodais de *Annona glabra* L. em função de sacarose (A-B, 0 mM; C-E, 10 mM; F-I, 20 mM; J-M, 40 mM) na ausência (0) e na presença (1) de carvão ativado e tipos de selamento dos tubos de ensaio (A,C,F,H,J,L, tampa com PVC; B,D,E,G,I,K,M, tampão de algodão) em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras - MG, 2002. Barra = 10mm.

Comprimento da maior raiz e matéria seca das raízes

A interação tripla “concentração de sacarose x concentração de carvão ativado x tipo de selamento” foi altamente significativa para variáveis comprimento da maior raiz ($P \leq 0,01$) e matéria seca das raízes ($P \leq 0,01$) (Tabela 14).

TABELA 14- Resumo da análise de variância para comprimento da maior raiz e matéria seca das raízes provenientes de brotações de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativo e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Comprimento da maior raiz	Matéria seca das raízes
Concentração sacarose (A)	3	2.817,18 **	67,43 **
Concentração carvão (B)	1	2.965,70 **	135,07 **
Tipo de selamento (C)	1	712,04 **	2,66 ns
A x B	3	913,71 **	48,35 **
A x C	3	387,49 **	15,29 **
B x C	1	1.037,44 **	10,40 **
A x B x C	3	339,57 **	10,13 **
Resíduo	64	59,95	1,36
C.V. (%)		80,48	77,16

ns - Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

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

O comprimento da maior raiz foi sempre maior na presença de carvão ativado, em qualquer concentração de sacarose ou tipo de selamento. Em meio com 58,42 mM de sacarose e sem carvão ativado, houve um crescimento radicular inexpressivo, enquanto com meio suplementado com carvão ativado e

a mesma concentração de sacarose, o comprimento da maior raiz foi de 6,6 mm em tubos com tampa e PVC e de 42,40 mm em tubos com o tampão de algodão, o que significa um ganho de 10 e 15,6 vezes sobre os valores obtidos na ausência de carvão ativado para os dois tipos de selamento, respectivamente (Tabela 15).

TABELA 15- Resultados médios para comprimento da maior raiz em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
0,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a ^z	0,00 a	0,60 a	16,00 a	4,15 a
Tampão de algodão	0,00 a	0,00 a	2,55 a	9,10 a	2,91 a
2,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	0,25 a	6,60 b	29,65 b	9,15 b
Tampão de algodão	0,00 a	1,72 a	42,40 a	45,05 a	22,29 a

^z - Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os dois tipos de selamento apresentaram diferenças em todas as concentrações de sacarose. O selamento com tampão de algodão foi superior ao método de vedação total com tampa e PVC. A resposta à adição do carvão ativado no meio de cultura é facilmente perceptível em tubos com tampão de algodão e dentro da concentração 58,42 mM de sacarose houve um acréscimo de 542% no comprimento da maior raiz (Tabela 15).

Na ausência do carvão ativado, observou-se tendência linear das concentrações para a variável comprimento da maior raiz, tanto com selamento tampa com PVC ($P \leq 0,01$) quanto com o tampão de algodão ($P \leq 0,05$) (Figura 12,

A). Em meio de cultura com carvão ativado, observou-se um comportamento quadrático das concentrações de sacarose para essa variável, em tubos com tampa e PVC ($P \leq 0,05$) e com tampão de algodão ($P \leq 0,01$) (Figura 12, B).

$$Y(\Delta) = -3,0797 + 0,14142X \quad R^2 = 79,67\% **$$

$$Y(\blacksquare) = -1,3113 + 0,04068X - 0,0016 \quad R^2 = 91,98\% *$$

$$Y(\Delta) = -0,2171 - 0,0373X + 0,002514X^2 \quad R^2 = 99,99\% *$$

$$Y(\blacksquare) = -5,3330 + 0,8226X - 0,003220X^2 \quad R^2 = 81,13\% **$$

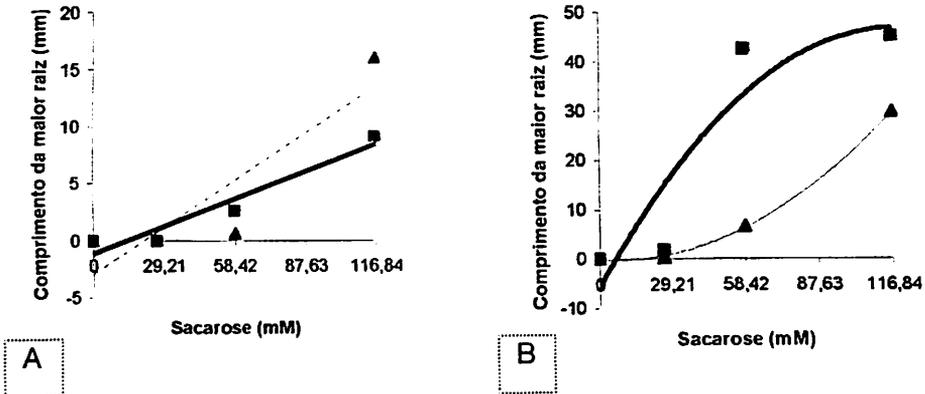


FIGURA 12- Valores médios estimados para comprimento da maior raiz (mm) em função de concentrações de sacarose e tipos de selamento dos tubos de ensaio (—Δ— tampa com PVC; —■— tampão de algodão) em segmentos nodais de *Annona glabra* L. inoculados na ausência (A) e na presença (B) de 2,0 g.L⁻¹ d carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

A matéria seca das raízes foi muito baixo na ausência de carvão ativado, mesmo na presença de elevadas concentrações de sacarose (116,86 mM). Entretanto, em meio suplementado com carvão ativado e baixas concentração de sacarose (58,42 mM), a matéria seca das raízes foi de 5,48 mg por segmento nodal com o selamento tampão de algodão e de apenas 0,27 mg com o sistema tradicional de fechamento dos tubos, uma diferença de mais de 19 vezes em favor do selamento alternativo (Tabela 16). A concentração mais elevada de sacarose favoreceu a rizogênese somente quando combinada com carvão ativado e vedação total dos tubos.

TABELA 16- Resultados médios para matéria seca das raízes (mg) em segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Sacarose (mM)				Média
	0,00	29,21	58,42	116,86	
0,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a ^z	0,00 a	0,37 a	1,20 a	0,39 a
Tampão de algodão	0,00 a	0,00 a	0,15 a	0,00 a	0,04 a
2,0 g.L ⁻¹ de carvão ativado					
Tampa com PVC	0,00 a	0,10 a	0,27 b	8,70 a	2,24 a
Tampão de algodão	0,00 a	1,52 a	5,48 a	6,42 b	3,35 a

^z – Médias seguidas pela mesma em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observaram-se comportamentos lineares das concentrações de sacarose para a variável matéria seca das raízes em meio sem carvão ativado e tubos fechado com tampa e PVC ($P > 0,05$) e tampão de algodão ($P > 0,05$), respectivamente (Figura 13, A), enquanto, em meio com carvão, verificou-se uma tendência linear das concentrações de sacarose para os dois tipos de selamento ($P \leq 0,01$) (Figura 13, B).

Resultados similares foram encontrados para outras espécies. Coumac et al. (1991) reportaram um aumento no matéria seca (aproximadamente 400%) e na altura (77%) em plantas de *Solanum tuberosum* quando a aeração dos recipientes de cultivo foi melhorada.

Em meio contendo carvão ativado, a contribuição da aeração da cultura no comprimento da maior raiz e na matéria seca das raízes, calculados com base nos resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16, foi de 143,6 e 49,5%, respectivamente. É razoável afirmar que o tampão de algodão potencializou o efeito benéfico do carvão ativado na rizogênese de segmentos de *A. glabra*.

$$Y(\blacktriangle) = -0,1643 + 0,01091X$$

$$R^2 = 92,91\% \text{ ns}$$

$$Y(\blacktriangle) = -1,6426 + 0,07650X$$

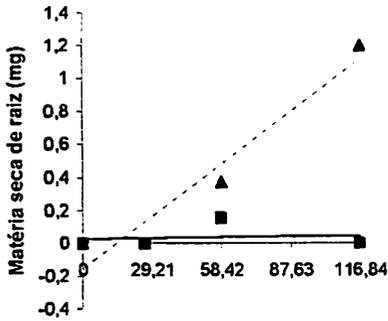
$$R^2 = 79,32\%^{**}$$

$$Y(\blacksquare) = -0,0245 + 0,00400X$$

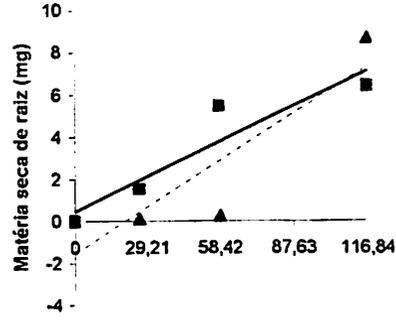
$$R^2 = 56,37\% \text{ ns}$$

$$Y(\blacksquare) = 0,4195 + 0,05746X$$

$$R^2 = 86,32\%^{**}$$



A



B

FIGURA 13- Valores médios estimados para o matéria seca das raízes (mg) em função de concentrações de sacarose e tipos de selamento dos tubos de ensaio (--▲--tampa com PVC; —■— tampão de algodão) em segmentos nodais de *Annona glabra* L inoculados na ausência (A) e na presença (B) de 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. Lavras - MG, 2002.

O carvão ativado contribuiu para a formação de raízes adventícias com morfologia externa normal, finas, flexíveis, de coloração branca e com raízes secundárias, em comparação às raízes adventícias grossas, quebradiças, de coloração amarelada e sem raízes secundárias (laterais) em meio sem carvão ativado.

O tipo de sistema radicular obtido no enraizamento *in vitro* determina o sucesso do transplante e aclimatização. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), raízes curtas são desejáveis, pois facilitam a lavagem e retirada do meio de cultura aderido, bem como a introdução da planta no substrato. Além disso, afirmam os autores, raízes curtas ou ainda na forma de primórdios radiculares estão em uma fase de crescimento ativo, o qual acelera o pegamento da planta e evita o envelhecimento.

A disponibilidade na fonte de energia é indispensável na rizogênese de segmentos nodais de *A. glabra*. Entretanto, a redução na concentração de sacarose para 29,21 mM foi capaz de induzir o enraizamento quando carvão ativado estava presente no meio de cultura. Esse resultado indica que o carvão ativado fornece fatores capazes de induzir o enraizamento em baixas concentrações de sacarose (29,21 mM) em tubos selados com o tampão de algodão.

A redução na concentração da fonte de carbono combinado com os efeitos estimuladores do carvão ativado e a aeração dos tubos (que permitiu permeabilidade a gases tóxicos, como o etileno e o CO₂), constitui um método eficiente para estimular a indução do enraizamento e a fotossíntese nas plantas, o que facilita a adaptação ao ambiente *ex vitro*.

Os maiores percentuais de enraizamento foram obtidos em meio de cultura suplementado com 58,42 mM de sacarose, o que corresponde 66,67% do conteúdo de carboidrato normalmente utilizado em meio de cultura para enraizamento. Altas concentrações de carboidratos no meio de cultura têm um efeito negativo sobre o enraizamento, devido ao acúmulo de açúcar acima dos níveis fisiológicos nos tecidos (Veierskov et al., 1982). O pré-condicionamento de brotações oriundas do nó cotiledonar de *Bauhinia vahlii* em meio com 58,42 mM de sacarose produziu plantas com melhor qualidade em termos de comprimento de brotações, matérias fresca e seca das brotações, mas não foi observado nenhum efeito significativo entre as concentrações de sacarose (de 0 a 146 mM) sobre o número de raízes e as matérias fresca e seca de raízes (Bhatt & Dhar, 2000).

O crescimento das raízes depende de condições físicas e químicas do meio de cultura utilizado e das substâncias de reservas que a planta utiliza para divisão e alongamento celulares. A redução da fonte de açúcar no meio estimula a pré-adaptação *in vitro* à condição autotrófica. Com o selamento tampão de

algodão, as trocas gasosas são facilitadas, permitindo que a fotossíntese seja estimulada.

Esse sistema permite o enraizamento diretamente no meio de indução de brotações sem a necessidade de transferência para um meio de enraizamento, o que pode ser vantajoso por evitar uma fase de labor intensivo e bastante dispendiosa.

7 CONCLUSÕES

a) Brotações de *Annona glabra* sem folhas expandidas não enraízam, mesmo quando estimuladas pelo AIB.

b) O método de fechamento dos tubos com tampão de algodão ou tampa plástica sem a película de PVC traz ganhos significativos na porcentagem de enraizamento, na matéria seca das raízes e no número de raízes adventícias em brotações de *Annona glabra*.

c) O efeito promotor do carvão ativado na rizogênese é maximizado quando o enraizamento ocorre em meio de cultura com baixa concentração de sacarose (58, 42 mM) e em tubos com provisão para trocas gasosas.

d) A aeração dos tubos estimula o desenvolvimento de um sistema radicular morfológicamente normal, com formação de raízes adventícias e raízes secundárias (laterais).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

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

BHATT, I. D.; DHAR, U. Combined effect of cytokinin on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bauhinia vahlii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, n. 1, p. 79-83, 2000.

BIDDINGTON, N. L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 173-178, Apr. 1992.

BLAKESLEY, D.; WESON, G. G.; HALL, J. F. The role of endogenous auxin in root initiation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 89, n. 4, p. 341-353, Nov. 1991.

COURNAC, L.; DIMON, B.; CARRIER, P.; IOHOU, A.; CHAGVARDIFF, P. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 1, p. 112-127, Sept. 1991.

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

De KLERK, G. J.; KEPPEL, M.; BRUGGE, J. T.; MEEKES, H. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 289, p. 965-972, May 1995.

DIMASSI-THIRIOU, K.; ECONOMOU, A. S.; SFAKIOTAKIS, EM. Promotion of petúnia (*Petúnia hybrida* L) regeneration *in vitro* by ethylene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, n. 2, p. 219-225, Feb. 1993.

DREW, R. A. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature fieldgrown trees. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 609-611, June 1988.

DRUART, P. H.; KEVERS, C.; BOXUS, P.; GASPAR, T. H. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 108, n. 5, p. 429-439, 1982.

DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 40, n. 3, p. 231-235, Mar. 1995.

ENCINA, C. L.; BARCELO-MUNHOZ, A.; HERERRO-CASTANO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, Nov. 1994.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2001.

FRIDBORG, G.; PEDERSON, M.; LANDSTROM, L. E.; ERIKSSON, T. The effects of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites, inhibition of morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 2, p. 104-106, 1978.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. part 1 - the technology.** 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.

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

HARBAGE, J. F.; STIMART, D. P.; AUER, C. pH effects indol-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induced in apple microcuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 1, p. 6-10, Jan. 1998.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

- JAMES, D. J.; THURNBON, I. J. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis in the apple rootstocks M. 9 e M. 26. **Zeitschrift Pflanzenphysil**, Stuttgart, v. 105, n. 1, p. 11-20, 1981.
- LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 5, p. 721-728, Sept. 1996.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microclimate for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 416, 1980. (Abst. 321).
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 37, n. 2, p. 204-205, May/June 2001.
- MONCOUSIN, C. Rooting of microcuttings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 289, p. 301-327, 1991.
- NAIR, S.; GUPTA, M. V.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 29-40, 1984.
- RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, S. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.
- REUVENI, O.; RAVIV, M. Improvement of the leaf retention to rooting avocado cuttings. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 2, p. 127-130, Mar. 1981.
- STAIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bractris gasipaes* H. B. K. **Turrialba**, San José, v. 41, n. 2, p. 196-201, Apr./June 1991.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

VEIERSKOV, B.; ANDERSEN, A. S.; ERIKSEN, E. N. Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisum sativum*. I- Carbohydrate and nitrogen content in pea plants and cuttings grown at two different irradiances. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n. 2, p. 167-173, 1982.

WANG, Q. Factors affecting rooting of microcuttings of pear rootstock BP10030. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 45, p. 209-213, 1991.

WARDLE, K. DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, p.386-389, 1983.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 155-189, 1984.

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

CAPÍTULO VII

AQUISIÇÃO DO COMPORTAMENTO FOTOAUTOTRÓFICO DURANTE O ENRAIZAMENTO *IN* *VITRO* DE BROTAÇÕES DE *ANNONA GLABRA* L.

1 RESUMO

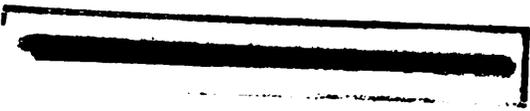
SANTANA, José Raniere Ferreira de. Aquisição do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de brotações *Annona glabra* L. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. p. 198-218. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O trabalho teve como objetivo induzir a aquisição do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* em brotações de *Annona glabra* L. Brotações oriundas de cultivo em tubos fechados com tampa e película de PVC (cultivo sem aeração) e com tampa sem a película de PVC ou tampão de algodão (cultivo com aeração) foram inoculadas em meio WPM suplementado com 4,9 μM de AIB e 2,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carvão ativado na presença (58,42 mM) ou ausência de sacarose. Durante o enraizamento, foram mantidas as mesmas condições de fechamento dos tubos de ensaio em que as brotações foram induzidas. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a 25 ± 3 °C. Os resultados mostraram que o enraizamento das brotações de *A. glabra* não dependeu do suprimento de carbono no meio de cultura, em tubos fechados com o tampão de algodão ou tampa plástica sem PVC. A aeração dos tubos de ensaio trouxe incrementos de significativos (até 250%) na matéria seca radicular. A indução de raízes secundárias (laterais) em *A. glabra* só ocorreu em culturas com aeração, independentemente da presença ou ausência de sacarose no meio de cultura. Com os resultados desse experimento, conclui-se que a aquisição do comportamento fotoautotrófico em *A. glabra* pode ser obtido com sucesso durante a fase de enraizamento *in vitro*.

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Acquisition of the photoautotrophic behavior during the *in vitro* rooting of *Annona glabra* L. shoots. In: _____. **Control of the *in vitro* morphogenesis in some *Annonaceae* species.** 2003. p.198-218. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The objective of the present work was to evaluate whether *Annona glabra* L. shoots are able to acquire the photoautotrophic behavior during the *in vitro* rooting. *In vitro* *A. glabra* shoots originated from cultures in vessels sealed with cap and PVC film (culture without aeration), cap without PVC film or cotton tampon (cultures with aeration), were inoculated in WPM medium supplemented with 4.9 μM IBA and 2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal in the presence (58.42 mM) or absence of sucrose. During rooting, same conditions in which shoots were induced were maintained. After inoculation, the tubes with explants were maintained in growth room under photosynthetic active radiation of 45-56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ and of temperature 25 ± 3 °C. The results showed that the rooting of *A. glabra* shoots do not depend on the supply of carbon into culture medium, in vessel with aeration. Aeration of cultures brought expressive increments of dry weight of roots (up to 250%). The induction of secondary (side) roots was only found in cultures with aeration, independent of sucrose presence. It was concluded that the acquisition of the photoautotrophic behavior in *A. glabra* may be obtained with success during the *in vitro* rooting phase.



3 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a cultura de tecidos envolve recipientes vedados com plantas crescendo heterotroficamente sobre meio solidificado com ágar e suplementado com sacarose. Entretanto, é consenso que, melhorando a performance das plantas cultivadas *in vitro*, especialmente durante a fase de enraizamento, a etapa seguinte de aclimatização ocorre com mais facilidade.

As plantas produzidas *in vitro* apresentam modificações na estrutura e nas funções fisiológicas do sistema fotossintético como resultado de condições peculiares de cultivo, que incluem baixa radiação fotossintética ativa, alto conteúdo de sacarose e baixa disponibilidade de CO₂. Essas condições podem afetar o sucesso posterior da aclimatização.

O enraizamento *in vitro* em condições fotoautotróficas (livre de açúcar) pode ter ainda, como vantagem sobre o enraizamento tradicional, a produção de mudas com característica anatomo-fisiológicas superiores. Uma outra vantagem é o baixo risco de contaminação das culturas, o que facilita a introdução de grandes frascos de cultivo, o que pode seguramente reduzir o custo da micropropagação.

O presente trabalho teve como objetivo induzir a aquisição do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* em brotações de *Annona glabra* L.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

As plantas propagadas *in vitro* são potencialmente capazes de desenvolver um aparelho fotossintético funcional (Yue et al., 1993) e a taxa fotossintética pode ser mensurável (Van Huylenbroeck et al., 1998, 2000). Entretanto, é fundamental que novas estruturas (autotróficas) sejam formadas durante a fase de enraizamento. Entre os fatores que podem ser manipulados, a concentração de sacarose no meio e aeração dos recipientes de cultivo parecem ser os mais promissores.

A cultura de tecidos autotrófica (sem açúcar) tem muitas vantagens sobre a cultura de tecidos heterotrófica convencional: a ausência de açúcar no meio permite o uso de frascos de cultura maiores, menor contaminação, menor hiper-hidricidade, menor labor e o enraizamento e a aclimatização podem ser obtidos mais facilmente (Kozai, 1991a,b). A redução ou eliminação da sacarose no meio de enraizamento pode acelerar a aquisição de estruturas autotróficas e, conseqüentemente, facilitar e encurtar a fase posterior de aclimatização.

Em condições heterotróficas, a utilização do dióxido de carbono é reprimida pela presença de sacarose exógena (Langford & Wainwright, 1987). Grout & Donkin (1987) sugerem que esta repressão ocorre devido à inibição da enzima ribulose bisfosfato carboxilase, a qual, segundo George (1993), permanece após a transferência para um meio de cultura livre de sacarose.

Pesquisas recentes revelam que plantas cultivadas *in vitro* têm habilidade fotossintética suficiente para desenvolver a fotoautotrofia, mas essa atividade é restringida principalmente pela baixa concentração de CO₂ nos frascos de cultura durante o fotoperíodo e também pela presença de açúcar no meio de cultura (Hdider & Desjardins, 1994; Kozai, 1991a).

A autotrofia pode ser estimulada através da redução de carboidrato no meio, aumentando a intensidade luminosa e elevando a concentração de CO₂

(Kozai, 1991b). Alguns métodos, tais como perfurar a tampa e preencher o orifício com tampões, fazer aberturas laterais nos recipientes de cultura ou tampar os frascos com um filtro, podem ser usadas para aumentar as trocas gasosas (Murphy et al., 1998).

Armstrong et al. (1997) descrevem um aparelho simplificado para gerar um fluxo de ventilação pressurizada nos recipientes de cultivo, sem o uso de bombas ou cilindros de gás, através de membranas porosas. Com esse sistema, os autores reportam um aumento na produção de folhas de *A. squamosa* e a abscisão foliar atribuída ao etileno é consideravelmente reduzida. Entretanto, o sistema de fluxo de pressão induzida apresenta a desvantagem de necessitar de ajustes diários do nível da água no torreão para manter o fluxo de água alto.

A melhora nas trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco de cultura e o meio externo conduz a um efeito positivo sobre o crescimento (capítulo IV) e sobre a aquisição do comportamento autotrófico.

O crescimento das plantas *in vitro* pode ser maior sob condições fotoautotróficas do que heterotróficas (Kozai, 1991 a,b). Serret et al. (1997) avaliaram o crescimento de plantas de *Gardênia jasminoides* e o desenvolvimento da fotoautotrofia durante os estádios de multiplicação e enraizamento *in vitro*. Os autores concluíram que a fotoautotrofia é mais fácil de ser induzida na fase de enraizamento e a baixa concentração de sacarose induziu o mais alto grau de fotoautotrofia, sendo que o efeito mais evidente foi verificado em plantas cultivadas em tubos frouxamente selados.

Uma das vantagens da micropropagação fotoautotrófica (meio sem açúcar) é a possibilidade de usar grandes recipientes de cultura com o risco mínimo de contaminação (Zobayed et al., 2000).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas brotações coletadas de cultivos mantidos *in vitro* com três tipos de fechamento dos tubos de ensaio: tampa com película de PVC, tampa sem película de PVC e tampão de algodão, com comprimento médio de 31,00, 23,00 e 22,75 mm, respectivamente. Todas as brotações tinham pelo menos um par de folhas expandida.

As brotações foram inoculadas em dois meios de enraizamento: 1) meio WPM solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e suplementado com 4,9 µM AIB, 2 g.L⁻¹ carvão ativado sem sacarose e 2) meio igual ao anterior acrescido de 58,42 mM sacarose (Testemunha). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem.

Foram avaliados três tipos de fechamento dos tubos: tampa plástica com ou sem a película de PVC e o tampão de algodão. Foram usados 10 mL de meio de cultura nos tubos de ensaio com tampa e película de PVC e 20 mL nos tubos fechados com tampa sem PVC ou em tubos com tampão de algodão. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas com radiação fotossintética ativa de 45-56 µmol m⁻² s⁻¹, durante 60 dias, quando foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento da maior folha (mm), matéria seca da parte aérea (mg), porcentagem de enraizamento, número de raízes adventícias, número de raízes secundárias (laterais), comprimento maior raiz (mm) e matéria seca da raiz (mg).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 (2 representa as concentrações de sacarose e 3, os tipos de selamentos) com 5 repetições, sendo cada uma formada por três tubos.

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância usando arranjo fatorial, testando-se as médias pelo teste de Tukey. Os dados de

percentagens foram transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$ e os número de contagem, em $\sqrt{x+1}$. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR, v 4.3, desenvolvido pela UFPA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Porcentagem de enraizamento e número de raízes adventícias e secundárias

A interação “concentração de sacarose x tipos de selamento” foi altamente significativa para a variável número de raízes secundárias (laterais) ($P \leq 0,01$). Observaram-se efeitos significativos da sacarose para a variável número de raízes adventícias ($P \leq 0,05$) e dos tipos de selamento para as variáveis porcentagem de enraizamento ($P \leq 0,01$) e número de raízes adventícias ($P \leq 0,01$) (Tabela 1).

TABELA 1- Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento, números de raízes adventícias e secundárias (laterais) de plantas de *Annona glabra* L., em função de presença ou ausência de sacarose e de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		Enraizamento ^z	Nº raízes adventícias ^y	Nº raízes secundárias ^y
Sacarose (A)	1	750,00 ns	0,1811*	0,1882*
Selamento (B)	2	3.427,50 **	0,5213**	1,7797**
A x B	2	232,50 ns	0,0132ns	0,9790**
Resíduo	24	277,50	0,0247	0,0397
C.V.(%)		28,72	10,29	13,97

ns - Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

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

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

(^z) - Dados originais transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$:

(^y) - Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

O enraizamento das brotações não depende do suprimento de carbono no meio de cultura (Tabela 1). Entretanto, a porcentagem de enraizamento foi fortemente influenciada pelo tipo de selamento dos tubos. Os maiores percentuais de enraizamento foram encontrados nos tubos fechados com o tampão de algodão e com tampa sem a película de PVC (Tabela 2). Nos dados apresentados na Tabela 2, na média, a porcentagem de enraizamento foi 87,5 e 112,5% maior nos tubos fechados com tampão de algodão e tampa sem PVC, respectivamente, quando comparados ao método tradicional de fechamento dos tubos.

TABELA 2- Porcentagem de enraizamento de plantas de *Annona glabra* L., em função de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipo de selamento	Enraizamento (%)
Tampão de algodão	75,0 a ^z
Tampa sem PVC	85,0 a
Tampa com PVC	40,0 b

^z – Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na comparação entre os meios com e sem suplementação de sacarose, observou-se que apesar de o maior número de raízes adventícias ter sido encontrado no meio com sacarose (1,61 por microplanta), o ganho foi de apenas 36,4% (Tabela 3). O enraizamento foi mais influenciado pelo tipo de selamento dos tubos. Quando comparados os três métodos de selamento, os maiores números de raízes adventícias foram obtidos em brotações cultivadas em tubos fechados com tampa sem PVC (1,82 por brotação) e tampão de algodão (1,75 por brotação), que diferiram significativamente do valor obtido com o método tradicional de fechamento dos tubos. A retirada da película de PVC da tampa

contribuiu com aumento de 193,5% no número de raízes adventícias. Entre os selamentos tampão de algodão e tampa sem PVC, não houve diferenças significativas (Tabela 4).

TABELA 3- Número de raízes adventícias de plantas de *Annona glabra* L., em função de função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultura. Lavras - MG, 2002.

Sacarose (mM)	Número de raízes adventícias
0,00	1,18 b ^z
58,42	1,61 a

^z - Médias seguidas pela mesma não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 4- Número de raízes adventícias de plantas de *Annona glabra* L., em função de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Número de raízes adventícias
Tampa com PVC	0,62 b ^z
Tampa sem PVC	1,82 a
Tampão de algodão	1,75 a

^z - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em tubos completamente vedados não houve emissão de raízes secundárias. O maior número de raízes secundárias (laterais) (4,25 por microplanta) foi encontrado quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão, em meio sem sacarose. O ganho nas trocas gasosas, advindo do tampão de algodão, estimulou a emissão de raízes secundárias (laterais) para suprir a maior demanda transpiratória. Por outro lado, em tubos fechados com o tampão de sacarose, a adição de 58,42mM de sacarose ao meio de cultura causou uma redução de 304% no número de raízes secundárias (laterais) (Tabela 5).

TABELA 5-Número de raízes secundárias (laterais) de plantas de *Annona glabra* L., em função de presença ou ausência de sacarose e de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Sacarose (mM)	Tipo de selamento			Média
	Tampão de algodão	Tampa sem PVC	Tampa com PVC	
0,00	4,25 A ^z a ^y	0,60 B b	0,00 B a	1,62 a
58,42	1,05 A b	1,62 A a	0,00 B a	0,90 b
Média	2,65 A	1,13 B	0,00 C	

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Comprimento da maior raiz, matéria seca da parte aérea e das raízes e matéria seca total.

A interação “concentração de sacarose x tipo de selamento” foi significativa para as variáveis matéria seca da parte aérea ($P \leq 0,05$) e matéria seca total das plantas ($P \leq 0,05$). Os efeitos isolados de sacarose e de tipos de selamento foram altamente significativos para as variáveis comprimento da maior raiz ($P \leq 0,01$) e matéria seca das raízes ($P \leq 0,01$) (Tabela 6).

A presença de sacarose no meio de cultura estimulou o crescimento das raízes adventícias (Tabela 7). Entretanto, o tipo de selamento foi o fator que mais influenciou no crescimento das raízes. Quando os tubos foram completamente selados com tampa e PVC, as raízes apresentaram o menor comprimento (9,02mm), enquanto, com o tampão de algodão ou tampa sem PVC, o comprimento médio da maior raiz foi de quase 32 mm (Tabela 8), o que significa um acréscimo de mais de 250% no crescimento radicular com a melhora nas trocas gasosas entre a atmosfera interna no tubo e o meio externo.

TABELA 6-Resumo da análise de variância para comprimento da maior raiz, matéria seca (MS) da parte aérea e de raiz de plantas de *Annona glabra* L., em função de presença ou ausência de sacarose e de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		Comprimento da maior raiz	MS parte aérea	MS raiz	MS total
Sacarose (A)	1	1.116,30 **	0,08 ns	6,51 **	3,68 ns
Selamento (B)	2	1.738,63 **	615,82 **	6,43 **	729,78 **
A x B	2	36,38 ns	77,20 *	0,61 ns	94,48 *
Resíduo	24	71,67	16,81	0,54	20,75
C.V. (%)		34,91	26,81	48,54	27,20

ns - Não-significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

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

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

TABELA 7-Comprimento da maior raiz de plantas de *Annona glabra* L., em função de função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultura. Lavras - MG, 2002.

Sacarose (mM)	Comprimento da maior raiz (mm)
0,00	18,15 b ^z
58,42	30,35 a

^z - Médias seguidas pela mesma não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com a vedação total dos tubos, o acúmulo de matéria seca na parte aérea não respondeu à presença de sacarose no meio de cultura. Entretanto, com a retirada da película de PVC da tampa, a matéria seca da parte aérea passou de 7,04 mg para 13,18 mg/brotação, em meio sem sacarose, e de 7,38 para 18,40 mg/brotação em meio suplementado com 58,42 mM de sacarose (Tabela 9).

TABELA 8- Comprimento da maior raiz de plantas de *Annona glabra* L., em função de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Comprimento da maior raiz (mm)
Tampa com PVC	9,02 b ^z
Tampa sem PVC	31,95 a
Tampão de algodão	31,75 a

^z - Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em termos percentuais, esses valores representam, respectivamente, ganhos de 87,2% e 149,3% na biomassa seca da parte aérea. O maior matéria seca da parte aérea foi encontrado quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão, na ausência (25,82 mg/brotação) ou na presença de sacarose (19,95 mg/brotação) no meio de cultura (Tabela 9).

TABELA 9- Matéria seca da parte aérea (mg) de plantas de *Annona glabra* L., em função de presença ou ausência de sacarose e de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Sacarose (mM)	Tipo de selamento			Média
	Tampão de algodão	Tampa sem PVC	Tampa com PVC	
0,00	25,82 A ^z a ^y	13,18 A a	7,04 B a	15,35 a
58,42	19,95 A b	18,40 A a	7,38 B a	15,24 a
Média	22,88 A	15,79 B	7,21 C	

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Altos níveis de sacarose no meio influenciam o enraizamento e o estabelecimento de brotações *in vitro* (Wainwright & Scarce, 1989), enquanto

uma baixa concentração aumenta a capacidade fotossintética, além de melhorar a sobrevivência das plantas (Langford & Wainwright, 1987).

Quando os tubos foram fechados com o tampão de algodão, não houve limitação alguma para as trocas gasosas e a fotossíntese ocorreu normalmente, o que resultou em um grande acúmulo de matéria seca (25,82 mg/brotação) que, comparado com o método mais comum de enraizamento em meio com sacarose e tubos completamente selados, representa um ganho de 250% na biomassa seca (Tabela 9).

Esses resultados estão de acordo com Rasai et al. (1995) os quais reportaram evidências da autotrofia em explantes de atemóia cultivados em casa de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 400-450 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ e conteúdo de sacarose reduzido para 0,75%. Resultados similares foram também encontrados para outras espécies. Por exemplo, em plantas de *Rosa*, a fotossíntese aumentou quando a concentração de sacarose no meio de crescimento foi reduzida (Langford & Wainwright, 1987). Esses autores mostram que um incremento no conteúdo de sacarose no meio de cultura resultou em um decréscimo no CO_2 fixado. Fato, segundo Grout & Donkin (1987), atribuído à inibição da enzima ribulose biscofato carboxilase (RuBPCase). Plantas de kiwi cultivadas *in vitro* são capazes de fixar CO_2 e assimilá-lo em açúcares e amido e a presença deste último nas folhas de uma cultura em meio sob a exclusão de sacarose indica que ela é capaz de realizar a fotossíntese *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997). Esses autores reportam ainda que o uso de uma concentração de magnésio três vezes mais elevada (105 mg.L^{-1}) que aquela normalmente utilizada (35 mg.L^{-1}) é capaz de aumentar a capacidade fotossintética das folhas.

Em meio de cultura suplementado com sacarose, obteve-se maior biomassa seca de raiz (Tabela 10). Entretanto, a maior contribuição para a biomassa de raiz veio do fator tipo de selamento. As raízes produzidas em tubos com o

tampão de algodão apresentaram o maior peso (2,17 mg / planta), seguido do selamento tampa sem PVC (1,74 mg). Esses dois selamentos superaram significativamente o selamento tampa com PVC (Tabela 11). Em termos percentuais, o ganho de biomassa radicular foi de 250 e 180% quando se utilizou o tampão de algodão ou a tampa sem PVC para fechar os tubos, respectivamente.

TABELA 10- Biomassa de raiz de plantas de *Annona glabra* L., em função de função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultura. Lavras - MG, 2002.

Sacarose (mM)	Biomassa de raiz (mg)
0,00	1,04 b ^z
58,42	1,98 a

^z - Médias seguidas pela mesma não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 11- Biomassa seca de raiz de plantas de *Annona glabra* L., em função de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Tipos de selamento	Biomassa seca de raiz (mg)
Tampa com PVC	0,62 b ^z
Tampa sem PVC	1,74 a
Tampão de algodão	2,17 a

^z - Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na média, quando os tubos foram selados com tampa e PVC, a matéria seca total das plantas não aumentou de maneira significativa com a adição de sacarose ao meio de cultura. Em tubos fechados com o tampão de algodão, a matéria seca total foi maior em meios sem sacarose. Por outro lado, em tubos com tampa sem PVC, a resposta à sacarose foi positiva (Tabela 12).

TABELA 12- Matéria seca total (mg) de plantas de *Annona glabra* L., em função da presença ou ausência de sacarose e de diferentes tipos de selamento dos tubos de ensaio. Lavras - MG, 2002.

Sacarose (mM)	Tipo de selamento			Média
	Tampão de algodão	Tampa sem PVC	Tampa com PVC	
0,00	27,65 A ^z a ^y	14,19 B b	7,36 C a	16,40 a
58,42	22,08 A b	20,91 A a	8,30 B a	17,10 a
Média	24,86 A	17,55 B	7,84 C	

^z - Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^y - Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observa-se na Figura 1, que as plantas de *A. glabra* em meio de cultura sem sacarose tiveram desenvolvimento similar às aquelas em meio com sacarose. O tipo de selamentos dos frascos é o fator principal na aquisição do comportamento fotoautotrófico durante a fase de enraizamento.

O método tradicional de fechamento dos tubos (tampa plástica com película de PVC) mostrou-se completamente inadequado para o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra*.

Este é o primeiro trabalho em que brotações foram enraizadas *in vitro* com sucesso em meio fotoautotrófico (livre de sacarose). Os resultados encontrados indicam que a aeração natural durante a fase de enraizamento é suficiente para estimular o crescimento autotrófico e estão de acordo com aqueles reportados para outras espécies. O aumento da taxa fotossintética líquida através da aeração das culturas já foi reportado em batata-doce (Zobayed et al., 1999) e em *Annona squamosa* e *A. muricata* (Zobayed et al., 2002) cultivadas *in vitro*.

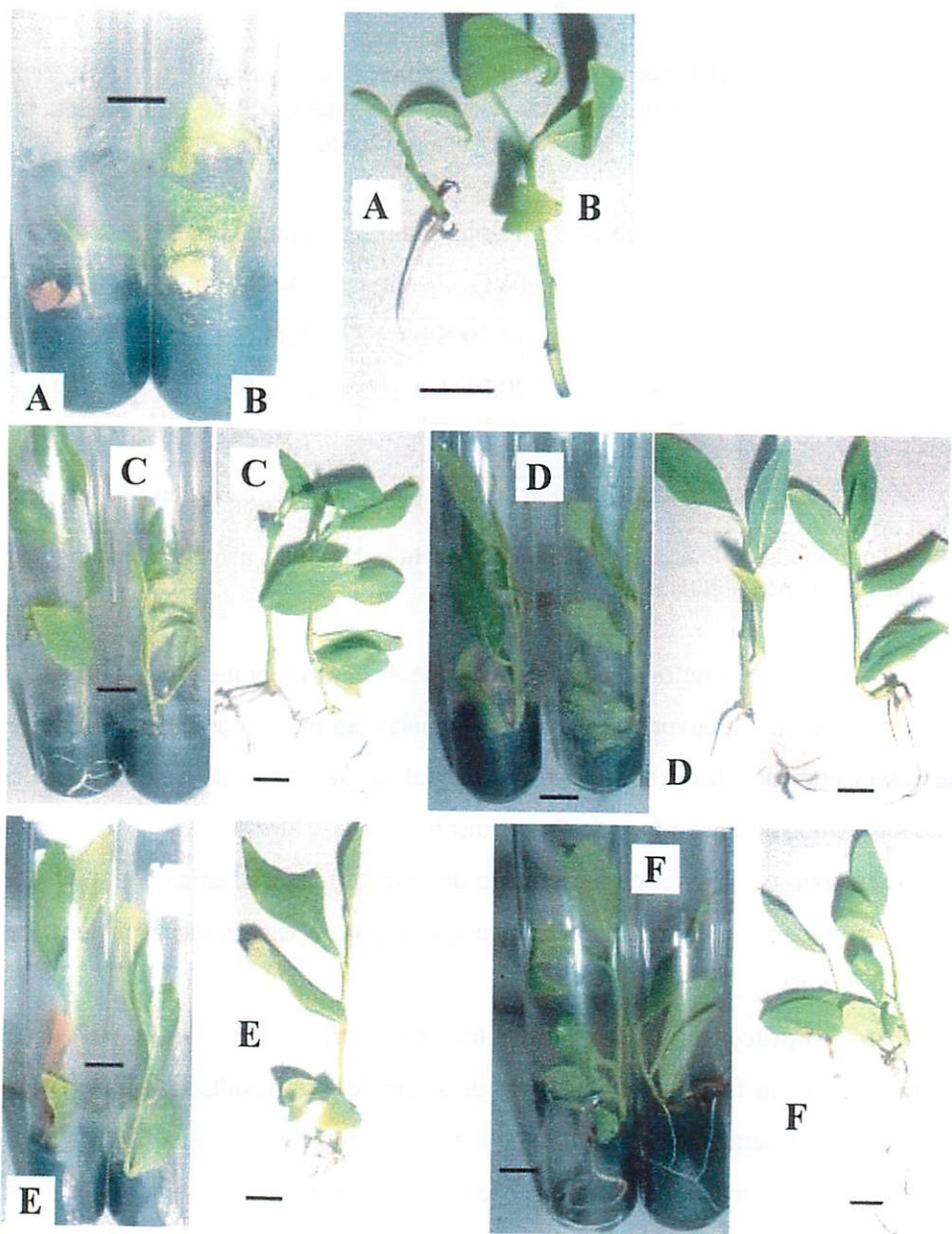


FIGURA 1- Enraizamento de brotações de *Annona glabra* L. na presença em meio de cultura livre de sacarose (A, C, F) e na presença de 58mM de sacarose (B, D, G) em função de três tipos de selamento dos tubos de ensaio: tampa com PVC (A,B), tampa sem PVC (C, D) e tampão de algodão (F,G), 60 dias após a inoculação. Lavras -MG, 2002. Barra = 10mm.

Espera-se que a técnica de enraizamento autotrófica descrita nesse trabalho possa contribuir com a propagação em larga escala de *Annona* spp. A aeração natural parece ser melhor alternativa que o uso de antagonistas de etileno ou mesmo a ventilação forçada dos recipientes de cultura para controlar a abscisão foliar. O uso da aeração natural, combinado com o meio livre de sacarose, estimula a mudança do modo de crescimento heterotrófico para autotrófico durante a fase de enraizamento, o que pode facilitar e encurtar a fase de aclimatização.

7 CONCLUSÕES

a) O enraizamento das brotações de *Annona glabra*, originárias de cultivo *in vitro*, não depende do suprimento de carbono no meio de cultura, em tubos fechados com o tampão de algodão ou tampa plástica sem PVC.

b) A aeração dos tubos de ensaio traz incrementos significativos (até 250%) na matéria seca radicular. A indução de raízes secundárias (laterais) em *Annona glabra* só ocorre em culturas com aeração.

c) A principal conclusão deste trabalho é de que a aquisição do comportamento autotrófico é obtido com sucesso durante a fase de enraizamento *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ARMSTRONG, J.; LEMOS E. E. P.; ZOBAYED, S. M. A. et al. A humidity-induced convective through flow ventilation systems benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut calloid. *Annals of Botany*, London, v. 79, n. 1, p. 31-49, Jan. 1997.
- DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALADIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, Feb. 1997.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. part 1 - the technology.** 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 574 p.
- GROUT, B. W. W.; DONKIN, M. E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 212, 323-327, 1987.
- HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* culture strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 36, n. 1, p. 27-33, Jan. 1994.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. (Ed.). **Micropropagation, technology and application.** Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991a. p. 447-469.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Columbia, v. 27, n. 1, p. 47-51, Jan./Feb. 1991b.
- LANGFORD, P. J.; WAINRIGHT, S. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, London, v. 60, n. 5, p. 633-640, May 1987.

MURPHY, K. P.; SANTAMARIA, J. M.; DAVIES, W. J.; LUMSDEN, P. J. Ventilation of culture vassels. I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 73, n. 5, p. 725-729, Sept. 1998.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, . S. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, Apr. 1995.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. The effect of different closure types, light and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 3, p. 217-230, 1997.

Van HUYLENBROECK, J. M.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. C. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. **Plant Science**, Limerick, v. 155, n. 1, p. 59-66, June 2000.

Van HUYLENBROECK, J. M.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. C. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. **Plant Science**, Limerick, v. 134, n. 1, p. 21-30, May 1998.

WAINWRIGHT, H.; SCARCE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrate during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.

YUE, D.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 3, p. 419-424, May 1993.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, London, v. 85, n. 5, p. 587-592, May 2000.

1 RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Impacto da aquisição do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* na anatomia e na aclimatização de plantas de *Annona glabra* L. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécie de *Annonaceae***. 2003. p. 219-237. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O objetivo do trabalho foi comparar a anatomia de folhas de plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, sob condições fotoautotróficas (meio sem sacarose e com aeração) e heterotróficas (meio com sacarose e sem aeração) durante a fase de enraizamento (sob radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a 25 ± 3 °C), com plantas-estoque *ex vitro* (mantidas em case de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ sem controle de temperatura) e correlacionar as características anatômicas com a aclimatização. Seções transversais das folhas foram estudadas e a espessura dos tecidos do limbo foliar, determinada. A variação na anatomia das folhas de *A. glabra*, desenvolvida em três tipos de cultivo, foi caracterizada por um aumento na espessura foliar com a melhora na aeração, o que caracteriza plasticidade fenotípica de acordo com a aeração dos recipientes de cultura. O enraizamento de brotações de *A. glabra* em condições fotoautotróficas permitiu desenvolvimento anátomo-fisiológico semelhante àquele observado em condições *ex vitro*, o que tornou a aclimatização mais fácil e rápida, minimizando as perdas nesse processo crucial da propagação *in vitro*.

**IMPACTO DA AQUISIÇÃO DO COMPORTAMENTO
FOTOAUTOTRÓFICO DURANTE O ENRAIZAMENTO *IN*
VITRO NA ANATOMIA E NA ACCLIMATIZAÇÃO DE
PLANTAS DE *ANNONA GLABRA* L.**

CAPÍTULO VIII

1 RESUMO

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Impacto da aquisição do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* na anatomia e na aclimatização de plantas de *Annona glabra* L. In: _____. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécie de Annonaceae.** 2003. p. 219-237. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O objetivo do trabalho foi comparar a anatomia de folhas de plantas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, sob condições fotoautotróficas (meio sem sacarose e com aeração) e heterotróficas (meio com sacarose e sem aeração) durante a fase de enraizamento (sob radiação fotossintética ativa de 45-56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a 25 ± 3 °C), com plantas-estoque *ex vitro* (mantidas em case de vegetação sob radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ sem controle de temperatura) e correlacionar as características anatômicas com a aclimatização. Seções transversais das folhas foram estudadas e a espessura dos tecidos do limbo foliar, determinada. A variação na anatomia das folhas de *A. glabra*, desenvolvida em três tipos de cultivo, foi caracterizada por um aumento na espessura foliar com a melhora na aeração, o que caracteriza plasticidade fenotípica de acordo com a aeração dos recipientes de cultura. O enraizamento de brotações de *A. glabra* em condições fotoautotróficas permitiu desenvolvimento anátomo-fisiológico semelhante àquele observado em condições *ex vitro*, o que tomou a aclimatização mais fácil e rápida, minimizando as perdas nesse processo crucial da propagação *in vitro*.

2 ABSTRACT

SANTANA, José Raniere Ferreira de. Impact of acquisition of the photoautotrophic behavior during the *in vitro* rooting on anatomy and acclimatization of *Annona glabra* L. plants. In: _____. **Control of the *in vitro* morphogenesis in some *Annonaceae* species.** 2003. p. 219-237. Thesis. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The objective of this work was to compare the anatomy of leaves of *Annona glabra* L. plantlets obtained *in vitro*, under a photoautotrophic (sucrose-free medium with aeration) or heterotrophic (medium with sucrose without ventilation) conditions during the root phase (under photosynthetic active radiation of 45-56 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ and temperature of 25 ± 3 °C), with *ex vitro* stock-plants (maintained in greenhouse under photosynthetic active radiation of 130-170 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, without control of room temperature) and to correlate these anatomical characteristics with acclimatization. The cross section of leaves was studied and thicknesses of leaflet tissues were measured. The results showed anatomical variation in leaves of *A. glabra* plantlets during rooting in different cultivation conditions, characterized by an increase of leaf thickness improved with the aeration, suggesting a phenotypic plasticity according with the aeration in the culture vessel. *In vitro* photoautotrophic rooting of shoots stimulated an anatomical and physiological development similar to that observed in an *ex vitro* condition, turning the acclimatization easier and faster minimizing the loss at this crucial process of the *in vitro* plant propagation.

3 INTRODUÇÃO

A aclimatização é apontada como uma das fases mais críticas do processo de micropropagação de plantas, em que ocorre a maioria das perdas. Durante esse estágio as plantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais devido à transferência de um ambiente *in vitro* para o meio externo. De uma forma geral, são poucos os trabalhos de micropropagação que relatam as dificuldades e soluções para o processo de aclimatização. A familiarização com a cultura e as condições de trabalho disponíveis são fatores determinantes para o sucesso desta etapa.

A cultura de tecidos envolve, tradicionalmente, o uso de recipientes fechados, com as plantas crescendo sobre meio solidificado com ágar e suplementado com uma fonte de carbono. Entretanto, na abordagem atual do tema, é consenso que uma melhora na performance das plantas cultivadas *in vitro*, que pode ser alcançado tomando o ambiente *in vitro* mais próximo das condições em que as plantas crescem *in vivo*, especialmente durante a fase III (crescimento sobre meio de enraizamento), aumenta a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização.

Uma possibilidade para facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plantas é estimular a fotoautotrofia através da redução ou eliminação de carboidrato do meio, do aumento na intensidade luminosa e da melhora na aeração das culturas.

No enraizamento fotoautotrófico, ocorrem mudanças nas condições de cultivo *in vitro*, capazes de determinar a plasticidade adaptativa de *Annona* spp, o que até o momento não foi estudado. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi estudar o impacto do enraizamento fotoautotrófico na anatomia foliar e na sobrevivência de mudas de *Annona glabra* L durante processo de aclimatização.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Para facilitar o crescimento *in vitro*, a sacarose é incorporada ao meio de cultura. O alto conteúdo de carbono no meio, combinado com a baixa intensidade luminosa durante o cultivo *in vitro*, conduz a um lento desenvolvimento da fotoautotrofia das plantas e à perda na eficiência de aclimatização (Serret et al., 1996, 1997; Serret & Trillas, 2000). O desenvolvimento reduzido do sistema fotosintético tem sido citado como o principal fator responsável pela vulnerabilidade durante o transplante (Lee et al., 1985).

Modificação nas condições ambientais dentro dos frascos de culturas pode melhorar a aclimatização. Assim, pesquisadores têm se dedicado ao estudo de desenvolvimento de sistemas mais fotoautotróficos durante a micropropagação testando meios com baixo conteúdo ou sem sacarose, alta irradiância durante a cultura, suplementação com CO₂ e melhor troca gasosa nos frascos de cultura (Kozai, 1991; Serret & Trillas, 2000). Entretanto, a maioria desses estudos é focado sobre a descrição de mudanças fisiológicas associadas com o desenvolvimento da fotoautotrofia durante a micropropagação (Capellades et al., 1991; Kozai, 1991), e pouca informação está disponível sobre as mudanças ocorridas na anatomia da plantas *in vitro* (Lee, et al., 1985; Dimassi-Theriou & Bosabaladis, 1997).

Tem sido reportado que microbrotações ou culturas foliares contendo clorofila *in vitro* têm capacidade fotossintética para crescer fotoautotroficamente em meio livre de sacarose. Sob alta intensidade luminosa e condições de cultivo enriquecidas com CO₂, o crescimento é promovido mais sobre meio livre de açúcar do que em meio contendo carboidrato (Kozai, 1991).

No sistema convencional de cultura de tecidos e /ou micropropagação, são utilizados altos níveis de sacarose no meio de cultura, o que pode influenciar o

enraizamento e o estabelecimento de brotações *in vitro* (Wainwright e Scarce, 1989). Entretanto, uma baixa concentração aumenta a capacidade fotossintética, além de melhorar a sobrevivência das plantas (Langford & Wainwright, 1987). O cultivo fotoautotrófico traz como vantagem a possibilidade do uso de grandes recipientes de cultura com risco mínimo de contaminação (Zobayed et al., 2000).

Há evidências de que o conteúdo de sacarose influencia o processo de aclimatização porque as plantas mudam do modo de crescimento heterotrófico para autotrófico e nenhum tratamento antes ou depois da transferência aumenta a capacidade fotossintética, que pode melhorar a sobrevivência *ex vitro* das plantas (Wainwright & Scarce, 1989). A capacidade fotossintética pode ser aumentada *in vitro* pela redução do conteúdo de sacarose no meio, pelo aumento na intensidade luminosa e pelo enriquecimento do ambiente com CO₂, podendo conduzir a uma aclimatização mais rápida com alta taxa de sobrevivência (Desjardins et al., 1987; Fujiwara et al., 1988; Lees et al., 1991).

As plantas cultivadas em ambiente *in vitro* tradicional apresentam como características principais baixa taxa fotossintética, baixa taxa de transpiração e baixa taxa de absorção.

As folhas formadas durante a cultura de tecidos são anatômica e fotossinteticamente afetadas pelo ambiente de cultivo, caracterizado pela alta umidade relativa e baixa radiação fotossintética ativa, que provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecido, levando a incapacidade das plantas produzidas *in vitro* de controlar as perdas de água quando submetidas às condições adversas do ambiente natural (Lee et al., 1985; Preece & Sutter, 1991). As folhas *in vitro*, também, freqüentemente agem como órgãos de armazenamento para suprir a demanda metabólica durante a primeira parte da aclimatização (Capellades et al., 1991; Van Huylenbroeck & Debergh, 1996).

As plantas *in vitro* possuem menos cera epicuticular e cuticular do que as plantas desenvolvidas *ex vitro*, o que é responsável pela transpiração excessiva (Brainerd & Fuchigami, 1981) que, aliada a uma ineficiência quanto ao mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, leva ao dessecamento das folhas, causa da baixa sobrevivência durante o transplântio.

Estes fatores tendem a ser alterados quando a planta é retirada da condição *in vitro* e transferida para outro local onde será submetida a um período de aclimatização. A dificuldade em controlar estes fatores fica evidente quando autores como Ziv (1991), citado por Campostrini & Otoni (1996), afirmam que, em se tratando de micropropagação em escala comercial, nenhuma tecnologia convencional de aclimatização resolve eficientemente o problema de mudança das condições *in vitro* para *ex vitro*.

Durante a aclimatização, o controle da luz poder ser efetuado com a utilização de sombrite. A umidade é conservada elevada com a cobertura plástica das plantas, irrigações ou nebulizações. A nutrição pode ser feita com auxílio de soluções nutritivas balanceadas, aliada ao aumento das condições autotróficas da planta quando a folha eleva a sua capacidade fotossintética (Desjardins et al., 1987; Zimmerman, 1988).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Medições anatômicas

Para o estudo de anatomia foliar foram comparadas plantas de *Annona glabra* L. obtidas em três tipos de cultivo: cultivo *in vitro* com aeração (plantas obtidas em cultivo fotoautotrófico (Capítulo V), cultivo *in vitro* sem aeração (obtido pelo método tradicional com fechamento dos tubos com tampa plástica e PVC, em meio de cultura com sacarose), em culturas em enraizamento em sala de crescimento com radiação fotossintética ativa de $45-56 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a 25 ± 3

°C, e cultivo *ex vitro* (plantas-estoque utilizadas como fonte de explante, mantidas em sala casa de vegetação com radiação fotossintética ativa de 130-170 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a 25 ± 3 °C).

A coleta de material para as medições anatômicas foi feita na ocasião da transferência das plantas *in vitro* para a sala de aclimatização. As folhas foram conservadas em álcool 70%

Os estudos foram efetuados na posição mediana da primeira folha jovem recém-expandida do ápice da planta, a qual apresenta estrutura anatômica definida e máxima atividade metabólica (Fahl, 1989). De cada tratamento foram escolhidas, ao acaso, quatro plantas e de cada uma foi retirada uma folha, da qual foram extraídos segmentos de 0,5 cm^2 da região mediana. Os estudos anatômicos foram realizados com base no exame microscópico de seções obtidas a mão livre. As seções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, seguidas pela lavagem em água destilada e neutralização em água acética 1:500, e montadas em glicerina a 50%. O corante usado foi a mistura azul de astra-sefranina, seguindo os métodos descritos por Bukastsch (1972).

A partir das seções transversais foram efetuadas 16 medições, com o auxílio de ocular micrométrica, de 4 plantas de cada tipo de cultivo, das espessuras das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas esponjoso e paliádico.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada uma formada por 6 campos.

5.2 Aclimatização

Na aclimatização foram utilizadas apenas plantas obtidas em cultivo fotoautotrófico, que foram transferidas para saco com plástico (2 L) contendo o substrato plantmax® da Eucatex. Após a transferência, as plantas foram cobertas com uma garrafa tipo *pet* com tampa (Figura 1 A, B, C) para a manutenção da

umidade relativa alta no microambiente e mantidas em sala de aclimatização, sem controle de umidade e temperatura.

Foi realizado o controle da intensidade luminosa durante as três primeiras semanas de aclimatização, nas quais as plantas foram mantidas sob sombrite 30% ($75 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Durante este período, a tampa da garrafa *pet* foi desenroscada no 3º dia (Figura 1,D), para redução da umidade relativa, e retirada no 8º dia (Figura 1, E). A garrafa (Figura 1, F) e o sombrite foram retirados no 21º dia.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 *Medições anatômicas*

O do tipo de cultivo foi significativo ($P \leq 0,01$) para as variáveis epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, epiderme abaxial e espessura limbo (Tabela 1).

TABELA 1- Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos epidérmicos e parênquimas de plantas de *Annona glabra* L. em três tipos de cultivo. Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios			
		Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso
Tipo de cultivo	2	43,63**	15,81**	94,72**	852,18**
Erro	9	0,69	0,81	3,69	8,09
C.V.		3,05	4,59	5,11	3,98

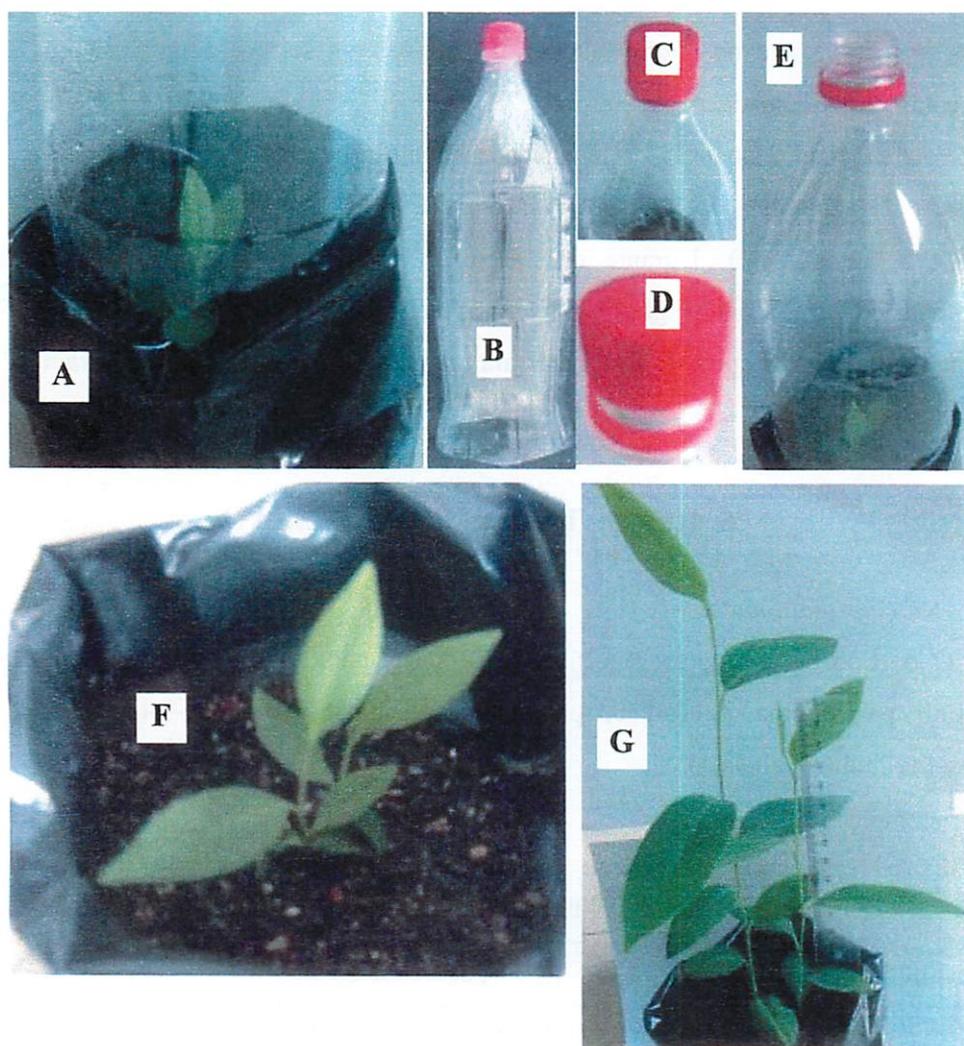


FIGURA 1- Sequência de aclimatização de plantas de *Annona glabra* L oriundas de cultivo fotoautotrófico. **A**, planta transferida para o substrato plantmax, coberta com garrafa tipo *pet*. **B**, **C**, detalhes da garrafa e da tampa. **D**, afrouxamento da tampa no 3º dia. **E**, retirada da tampa no 8º dia. **F**, retirada da garrafa no 21º dia de aclimatização. **G**, aspectos gerais das plantas após 49 dias. Lavras – MG, 2002.

A seção transversal da lâmina foliar mostrou diferenças entre os três tipos de cultivo (Tabela 2). Observou-se que no cultivo *in vitro* com aeração, o parênquima paliçádico e lacunoso, a epiderme abaxial e a espessura do limbo mostram-se mais espessas do que no cultivo *in vitro* sem aeração. Essa mudança na anatomia de plantas cultivadas *in vitro* é uma consequência da aeração dos frascos de cultura e a melhora na aeração produz plantas morfológicamente normais. Resultados semelhantes têm sido reportados para outras espécies. Majada et al.(2000) observaram que as mudanças na anatomia em cravo podem ser justificadas em termos de ambiente que regula o fluxo de água. O alto fluxo de água, devido ao aumento na transpiração, pode induzir um melhor desenvolvimento das células do tecido paliçádico quando comparado com frascos com pouca ou nenhuma aeração. Além do mais, o incremento na taxa de aeração aumenta o movimento no frasco que afeta a taxa de transpiração (Fujiwara & Kozai, 1995), e a melhora na aeração também decresce os níveis de etileno, um dos principais problemas associados à micropropagação de *Annona* spp.

TABELA 2- Espessura (μm) dos tecidos da epiderme (adaxial e abaxial), mesofilo (parênquimas paliçádico e esponjoso) e do limbo foliar de plantas de *Annona glabra* L. em três tipos de cultivo. Lavras - MG, 2002.

Tipo de cultivo	Epiderme		Mesofilo		Limbo foliar
	adaxial	abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	
<i>In vitro</i> sem aeração	25,52 b ²	17,52 b	31,52 b	55,05 c	129,63 b
<i>In vitro</i> com aeração	31,20 a	21,44 a	39,52 a	76,96 b	169,06 a
<i>Ex vitro</i>	25,44 b	20,44 a	40,32 a	82,71 a	168,52 a

² - Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Entre os três tipos de cultivo, observa-se claramente que nas variáveis estudadas, com exceção da epiderme abaxial, a espessura dos tecidos de plantas no cultivo *in vitro* em condições fotoautotróficas foi muito próxima daquela encontrada nas plantas *ex vitro* mantidas em sala de crescimento. Essa capacidade de alterar a estrutura das folhas em resposta à aeração dos frascos pode revelar uma plasticidade adaptativa que facilita a aclimatização da espécie.

As espessuras do mesofilo e limbo foliar foram significativamente maiores no cultivo *in vitro* com aeração, quando comparado com o cultivo *in vitro* sem aeração (Tabela 2). Em termos percentuais, o ganho na espessura do mesofilo e no limbo foi de 35,59 e 33,50% com a aeração dos frascos de cultura. Na comparação ente o cultivo *ex vitro* e *in vitro* com aeração, observou-se que não houve diferença significativa para as variáveis espessura das epiderme e do limbo foliar.

O grau de desenvolvimento da anatomia do mesofilo no limbo foliar suporta a hipótese de que no estágio de enraizamento, ou talvez já na fase de multiplicação das culturas com provisão para trocas gasosas, as plantas de *Annona glabra* já tinham desenvolvido tecidos fotossintéticos capazes de sustentar o desenvolvimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Serret & Trillas (2000) em *Gardênia jasminoides* aumentando a intensidade de luz e reduzindo a concentração de sacarose no meio de cultura. Os autores demonstraram que um aumento na intensidade de luz de valores moderados para $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tem um efeito benéfico sobre o desenvolvimento de mudanças anatômicas e ultraestruturais associadas com a fotoautotrofia. Entretanto, o efeito positivo só é estimulado em meio de cultura com baixo conteúdo de sacarose (5 g.L^{-1}). Nessas condições houve um aumento expressivo na espessura do mesofilo e do limbo foliar e a taxa fotossintética foi mais de quatro vezes superior à de plantas cultivadas no mesmo meio, com $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade de luz.

O aumento na taxa fotossintética promovida pelo cultivo fotoautotrófico na fase de enraizamento garantiu uma taxa de sobrevivência máxima. Esses resultados corroboram aqueles reportados para outras espécies. O aumento na taxa fotossintética *in vitro* de plantas de *Eucaliptus* aumentou a percentagem de sobrevivência *ex vitro* (Kirdmanee et al., 1995), o que enfatiza a promoção significativa da fotossíntese na micropropagação fotoautotrófica (Kubota et al., 2001). Além do mais, a atividade fotossintética pode ser limitada pela condutância de água e absorção de nutrientes pela planta durante o período de aclimatização. As plantas, antes de irem para a fase de aclimatização, apresentavam um sistema radicular bem desenvolvido (capítulo V) e, de acordo com Mohammed et al. (1992), plantas de 'Douglas fir' com um sistema radicular bem desenvolvido exibiram uma taxa fotossintética mais alta do que aquelas com um sistema radicular limitado, durante o período de aclimatização.

O enraizamento em condições fotoautotróficas produz plantas para a aclimatização com características anatômicas semelhantes às mantidas em ambiente *ex vitro* e permite alcançar um balanço hídrico ótimo para o desenvolvimento *in vitro* das plantas. Os resultados apresentados aqui mostram claramente que o aumento nas trocas gasosas dos frascos de culturas proporciona melhora nas características anatômicas e na qualidade das plantas na fase de enraizamento, o que torna a fase de aclimatização mais fácil, rápida e pouco dispendiosa. Assim, o controle da morfogênese em plantas de *Annona glabra* micropropagadas pode ser alcançado através do manejo adequado de fatores ambientais no frasco de cultura e também por fatores ligados ao meio nutritivo.

6.2 Aclimatização

A observação do estado hídrico das plantas durante o período de aclimatização e o estudo da anatomia descrito anteriormente indicam que elas

foram pré-aclimatizadas durante o período de enraizamento, já que a absorção e a perda de água mostraram-se completamente reguladas, não sendo observado estado de murcha durante o período mais crítico da aclimatização. O percentual de sobrevivência foi de 100%.

Aspectos gerais das plantas de *A. glabra* aos 21 e aos 49 dias após o início do processo de aclimatização podem ser visualizados na Figura 1 F, G.

Os resultados encontrados estão de acordo com aqueles reportados por Deccetti (2000) para essa espécie. Entretanto, os resultados obtidos aqui com plantas originárias de enraizamento fotoautotrófico mostraram um maior crescimento e desenvolvimento. As plantas cultivadas em meio fotoautotrófico mostraram características semelhantes às mantidas em condições *ex vitro*, como resposta estomática e presença de cera epicuticular. Essa última deduzida do aspecto brilhante das folhas.

A taxa de sobrevivência de 100% está, provavelmente, associada ao fato de que plantas enraizadas em cultivo fotoautotrófico já tinham desenvolvido o mecanismo de regulação da perda de água. De acordo com Murphy et al. (1998), em cultivos com abertura para trocas gasosas, o funcionamento dos estômatos é semelhante àquele encontrado em condições naturais, o que resulta, especialmente durante aclimatização, na melhora no controle da perda de água e, conseqüentemente, na sobrevivência. É possível, também, que a aeração das culturas durante o enraizamento tenha proporcionado melhor formação de cera epicuticular, contribuindo para melhorar a retenção de água (Sutter, 1983).

Os resultados encontrados também estão de acordo com Serret et al. (1997). Esses autores reportaram que durante a aclimatização de *Gardênia jasmonoides*, as plantas com a fotoautotrofia mais desenvolvida (crescidas dentro de tubos frouxamente selados, sob condições externas de enriquecimento de CO₂) foram mais eficientes quando foi avaliado o peso seco final. Entretanto, os resultados encontrados aqui contradizem aqueles obtidos por outros autores (Capellardes et

al., 1991). Esses autores concluíram que, com plantas menos fotoautotróficas, observam-se melhores resultados durante o estágio de aclimatização. Plantas menos fotoautotróficas, obtidas nas condições específicas desses experimentos, acumulam mais amido em seus cloroplastos e, assim, mais reservas estão disponíveis para o período de aclimatização.

O enraizamento *in vitro* em condições mais fotoautotróficas, favorecidas pelo fechamento dos tubos com o tampão de algodão, estimulou um maior desenvolvimento de adaptações contra a perda de água excessiva pela transpiração. Assim, um sistema radicular bem desenvolvido (capítulo anterior), aliado, provavelmente, a um aumento na espessura da camada de cêra epicuticular, e o melhor funcionamento dos estômatos nas plantas (Sutter, 1983; Capellardes et al., 1990) parecem evitar o estresse hídrico durante o período de aclimatização.

Houve correlação entre o desenvolvimento de características anatômicas com a aclimatização. A rustificação (alcançada nesse trabalho através do cultivo em meio fotoautotrófico) durante o enraizamento *in vitro* é uma maneira de induzir modificações anátomo-fisiológicas nas plantas, que vão reduzir as perdas durante a remoção das plantas do cultivo *in vitro* para as condições *ex vitro*.

O efeito positivo da aeração dos tubos durante o enraizamento e os benefícios para a sobrevivência das plantas foram estabelecidos. Entretanto, é muito importante determinar se o fator crítico que tornou a aclimatização mais fácil foi a rustificação das plantas, através de um melhor controle da perda de água, ou se foi a prevenção de acúmulo de gases tóxicos, principalmente o etileno.

O controle da umidade durante a aclimatização de plantas oriundas de cultivos fotoautotróficos pode ser menos rigoroso; entretanto, estudos anatômicos complementares são necessários para entender melhor a transição do comportamento heterotrófico para o autotrófico. A resposta à intensidade

luminosa durante a aclimatização deve ser mais estudada, uma vez que seu aumento pode resultar em um acréscimo na taxa fotossintética e, conseqüentemente, no crescimento e desenvolvimento das plantas.

7 CONCLUSÕES

a) A variação na anatomia das folhas de *Annona glabra*, desenvolvida em três tipos de cultivo (*in vitro* sem aeração, *in vitro* com aeração e *ex vitro*), foi caracterizada por um aumento na espessura foliar com a melhora na aeração, o que caracteriza plasticidade fenotípica de acordo com a aeração dos frascos de cultura.

b) O enraizamento de brotações de *A. glabra* em condições fotoautotróficas permite desenvolvimento anátomo-fisiológico semelhante àquele observado em condições *ex vitro*, o que torna a aclimatização mais fácil e rápida, minimizando as perdas nesse processo crucial da propagação *in vitro* de plantas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. M. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

BUKASTSCH, F. Benerkungren zur doppelfarbung astrablausafranina. **Micokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 255, 1972.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de Plantas: Abordagens recentes. **ABCTP- Notícias**, Brasília, n. 25, p. 2-12, 1996.

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

CAPELLARDES, M.; LEMEURE, M. R.; DEBERGH, P. C. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.

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

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALADIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1997.

DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, p. 846-851, Sept. 1987.

FALH, J. I. **Influência da irradiância e do nitrogênio na fotossíntese e crescimento de plantas jovens de café (*Coffea arabica* L.).** 1989. 84 p. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Physical microenvironment and its effects. In: AITKEN-CHRISTIE, A.; KOZAI, A.; SMITH, M. A.L. (Ed.). **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 301-318.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoot and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 230, p. 153-158, 1988.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vivo* and *ex vitro*. **In Vitro Cell Development**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 144-149, July/Sept. 1995.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 27, p. 47-51, 1991.

KUBOTA, C.; KAKIZAKI, N.; KOZAI, T.; KASAHARA, K.; NEMOTO, J. Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **HortScience**, Alexandria, v. 36, n. 1, p. 49-52, Feb. 2001.

LANGFORD, P. J.; WAINRIGHT, S. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 60, n. 6, p. 633-640, Dec. 1987.

LEE, H.; WETZSTEIN, Y; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, n. 3, p. 637-641, July 1985.

LEES, R. L.; EVANS, E. H.; NICCHOLAS, J. R. Photosynthesis in *Clematis* 'The President' during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n.238, p. 605-610, May 1988.

MAJADA, L. P.; TADEO, F.; FAL, M. A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 207-214, 2000.

MOHAMMED, G. H.; GILLIES, S. L.; VIDAVER, W. E. *Ex vitro* photosynthetic activity in plantlets of tissue-cultured Douglas-fir. **Tree Physiology**, Victoria, v10, p. 403-410, 1992.

MURPHY, K. P.; SANTAMARIA, J. M.; DAVIES, W. J.; LUMSDEN, P. J. Ventilation of culture vassels. I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 73, n.5, p. 725-729, Sept. 1988.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I. Effect of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. **International Journal Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 2, p. 281-289, Mar. 2000.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. Development of photoautotrophic and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 1-16, Apr. 1996.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. The effect of different closure types, light, and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, n. 3, p. 217-230, 1997.

SUTTER, E. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plant grown *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 1, p. 74-77, 1984.

Van HUYLENBROECK, J. M.; DEBERGH, P. C. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 96, n. 2, p. 298-304, Feb. 1996.

WAINWRIGHT, H.; SCARCE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrate during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 18, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 227. p. 489-499, 1988.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, London, v. 85, n. 5, p. 587-592, May 2000.