

**VIABILIDADE DE CÉLULAS
PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E SUSPENSÃO
CELULAR DE MURICI-PEQUENO**

LUCIANO COUTINHO SILVA

2009

LUCIANO COUTINHO SILVA

**VIABILIDADE DE CÉLULAS
PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E SUSPENSÃO
CELULAR DE MURICI-PEQUENO**

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

Orientador

Prof. Dr. Renato Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

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

Silva, Luciano Coutinho.

Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de
Murici-pequeno / Luciano Coutinho Silva. – Lavras : UFLA, 2009.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Renato Paiva.
Bibliografia.

1. Massas pró-embriogênicas. 2. Viabilidade celular. 3. CTT –
Tetrazolium. 4. FDA. 5. Murici-pequeno. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 583.79146

LUCIANO COUTINHO SILVA

**VIABILIDADE DE CÉLULAS
PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E SUSPENSÃO
CELULAR DE MURICI-PEQUENO**

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

APROVADA em 18 de fevereiro de 2009

Profa. Dr^a. Rairys Cravo Nogueira UFPA

Prof. Dr. Sandro Barbosa UNIFAL-MG

Dr^a. Fernanda Pereira Soares MAPA

Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, aos meus pais Luiz Teodoro da Silva e Lúcia Coutinho
Silva e a toda minha família.

OFEREÇO.

À minha noiva e futura esposa Celita

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos, meus familiares por todo amor e encorajamento.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao Projeto.

Ao meu orientador, Professor Dr. Renato Paiva, por toda atenção, apoio, amizade e conselhos oferecidos durante estes anos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Renato Paiva, Profa. Dr^a. Rairys Cravo Nogueira, Prof. Dr. Sandro Barbosa e Dr^a. Fernanda Pereira Soares.

Aos funcionários técnico-administrativos do Setor de Fisiologia Vegetal por todo auxílio dado e pela simpatia sempre constante.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pela ajuda e companheirismo durante todos esses anos.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida, registre-se aqui meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

LUCIANO COUTINHO SILVA, filho de Luiz Teodoro da Silva e Lúcia Coutinho Silva, nasceu em 01 de maio de 1979 em Pouso Alegre-MG. Aos cinco anos de idade mudou-se para Estiva-MG, onde estudou nos colégios Escola Estadual Eduardo Amaral e Escola Estadual Cônego Francisco Stella de 1º e 2º graus finalizando o Ensino Médio em 1997. Em março de 2003 iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em julho de 2007. Durante esse período desenvolveu projetos de pesquisa no Setor de Fisiologia Vegetal, sob a orientação do Professor Dr. Renato Paiva, como bolsista de iniciação científica da FAPEMIG e posteriormente CNPq. Em agosto de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de Murici-pequeno.....	1
1 Introdução.....	2
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Descrição botânico-medicinal do Murici-pequeno.....	4
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	7
2.3 Embriogênese somática.....	8
2.4 Caracterização de massas pró-embriogênicas e viabilidade celular.....	12
2.4.1 Massas pró-embriogênicas (MPE).....	12
2.4.2 Viabilidade celular.....	13
2.4.2.1 Diacetato de fluoresceína - FDA.....	13
2.4.2.2 Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio.....	14
2.5 Suspensão celular.....	16
3 Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 2 Influência do tempo de exposição de sementes à solução de hipoclorito de sódio em diferentes pHs na micropropagação de Murici-pequeno.....	26
1 Resumo.....	27
2 Abstract.....	28
3 Introdução.....	29
4 Material e métodos.....	30
4.1 Material botânico.....	30
4.2 Retirada do tegumento.....	31
4.3 Variação de pH do NaOCl.....	32
4.4 Desinfestação e cultivo <i>in vitro</i>	32
4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	34
5 Resultados e discussão.....	34
5.1 Desinfestação e modo de ação do NaOCl.....	34
5.1.1 Desinfestação.....	34
5.1.2 Modo de ação do NaOCl.....	36
5.2 Crescimento das plântulas: influência do pH da solução de NaOCl e tempo de exposição.....	37
6 Conclusões.....	40
7 Referências Bibliográficas.....	40
CAPÍTULO 3 Caracterização das massas pró-embriogênicas em calos de Murici-pequeno.....	43
1 Resumo.....	44

2 Abstract.....	45
3 Introdução.....	46
4 Material e métodos.....	47
4.1 Material botânico.....	47
4.2 Calogênese.....	48
4.3 Desenvolvimento dos calos embriogênicos.....	48
4.4 Análises citoquímicas.....	49
4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	50
5 Resultados e discussão.....	50
5.1 Dupla coloração com Carmim Acético e Azul de Evans.....	50
5.2 Reação aos corantes citoquímicos.....	53
6 Conclusões.....	55
7 Referências Bibliográficas.....	56
CAPÍTULO 4 Quantificação da viabilidade celular de calos de Murici-pequeno por FDA e CTT.....	59
1 Resumo.....	60
2 Abstract.....	61
3 Introdução.....	62
4 Material e Métodos.....	63
4.1 Material botânico.....	63
4.2 Coleta das amostras.....	64
4.3 Testes com FDA.....	64
4.4 Testes com CTT.....	65
4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	65
5 Resultados e discussão.....	66
5.1 Viabilidade celular com FDA.....	66
5.2 Viabilidade com CTT.....	69
5.3 Viabilidade celular e curva de crescimento dos calos de <i>B. intermedia</i>	73
5.3.1 Curva de crescimento.....	73
5.3.2 Primeiro subcultivo (SB1).....	74
5.3.3 Segundo subcultivo (SB2).....	75
5.3.4 Terceiro subcultivo (SB3).....	76
6 Conclusões.....	76
7 Referências Bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 5 Suspensão celular de Murici-pequeno	81
1 Resumo.....	82
2 Abstract.....	83
3 Introdução.....	84
4 Material e métodos.....	85
4.1 Material botânico.....	85
4.2 Suspensão celular.....	86
4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	87

5 Resultados e discussão.....	88
5.1 Contagem de células isodiamétrica, alongada e total.....	88
5.1.1 Células isodiamétricas.....	88
5.1.2 Células alongadas.....	93
5.1.3 Células totais.....	96
6 Conclusões.....	102
7 Referências Bibliográficas.....	102
Anexo.....	104

RESUMO GERAL

SILVA, Luciano Coutinho. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de Murici-pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss) é uma espécie medicinal e frutífera do Cerrado que apresenta dificuldades de propagação por meios convencionais, sendo assim, o desenvolvimento de metodologias alternativas de propagação para essa espécie se faz necessário. Estudou-se nesse trabalho os efeitos residuais da desinfestação de sementes com uma solução de NaOCl, em diferentes pHs e tempos de exposição, no crescimento das plântulas *in vitro*. A partir de segmentos foliares das plântulas cultivadas *in vitro*, foram produzidos calos em meio MS com 4,52 µM de 2,4-D e submetidos a três sucessivos subcultivos de 60 dias cada. Para cada subcultivo foi avaliado o potencial embriogênico com os corantes Carmim-acético (C.A.) e Azul-de-Evans (A.E.). Também foram usados os corantes FDA e CTT para analisar a viabilidade de calos no decorrer dos subcultivos. Por fim foi estabelecida uma suspensão celular e analisado seu crescimento através da contagem de células com auxílio de uma câmara de Neubauer. O crescimento das plântulas foi afetado pela variação do pH e tempos de exposição ao NaOCl. Os testes citoquímicos por meio da dupla coloração com C.A. e A.E permitiram a caracterização do potencial embriogênico para os três subcultivos através da análise das áreas coloridas por estes corantes. A maior viabilidade de calos observada pelo teste de CTT ocorre no 25º dia de cultivo. Quanto ao FDA no 25º, 29º e 21º dia de cultivo foi observado o maior número de células viáveis para primeiro, segundo e terceiro subcultivos, respectivamente. A análise da suspensão celular revelou que a utilização de ANA promoveu o maior número de células viáveis para o terceiro subcultivo.

Palavras-chave: Massas pró-embriogênicas; Viabilidade celular; CTT-tetrazólium; FDA; *Byrsonima intermedia* A Juss.

* Comitê Orientador: Renato Paiva, PhD - UFLA (Orientador); Dr^a. Rairys Cravo Nogueira – UFPA; Dr. Sandro Barbosa – UNIFAL; Dr. Antônio Paulino da Costa Neto (UEMG) (Co-orientadores).

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Luciano Coutinho. **Pro-embryogenic cell viability and cell suspension of *Byrsonima intermedia* A. Juss.** 2009. 104 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss) is a fruitful medicinal species of Cerrado which presents difficulties to be propagated by conventional methods. This fact makes necessary the development of alternative methodologies of propagation for this species. In this work it was studied the *in vitro* seedlings growth according to residual effects of seeds disinfection with NaOCl solution, using different pH and periods of exposition. It was produced callus from *in vitro* seedlings leaf segments cultivated in MS medium with 2,4-D (4.5 µM). These were subcultivated for three times, with 60 days each. For each subcultivation it was assayed the embryogenic potential using the dyes Aceto-carmin (A.C.) and Evans-blue (E.B.). In addition, FDA and CTT dyes were also used to analyze the callus viability during the subcultivation periods. Finally, a cell suspension was established and its growth analyzed by the cells counting using a Neubauer chamber. Seedlings growth was affected by the pH variation and exposition periods to NaOCl. The cytochemical tests by double staining with A.C. and E.B. allowed the characterization of the embryogenic potential for the three subcultivations by analyzing the areas stained with these dyes. Using CTT, higher callus viability was observed at the 25^o day of cultivation. Using the FDA test at the 25^o, 29^o and 21^o days of cultivation, higher number of viable cells for the first, second and third subcultivation, respectively, were observed. The cell suspension analysis showed that use of NAA promotes a higher number of viable cells in the third subcultivation.

Keywords: Pro-embryogenic masses; Cell viability; TTC-tetrazolium; FDA;
Byrsonima intermedia A Juss.

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD - UFLA (Advisor); Dr. Raírys Cravo Nogueira – UFPA; Dr. Sandro Barbosa – UNIFAL-MG; Dr. Antônio Paulino da Costa Neto (UEMG) (Co-advisors).

CAPÍTULO I

VIABILIDADE DE CÉLULAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E SUSPENSÃO CELULAR DE MURICI-PEQUENO

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul (Prevedello & Carvalho, 2006) com uma área de 204 milhões de hectares. É considerada a savana de maior biodiversidade vegetal do planeta. Entre árvores, cipós, arbustos e ervas, já são conhecidas mais de 7000 espécies sendo 45% delas endêmicas (Klink & Machado, 2005).

Segundo Mittermeier et al. (2004), a área original do cerrado já foi reduzida a 30%, sendo, portanto, um dos biomas mais ameaçados do planeta. No Brasil, está distribuído principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal, correspondendo aproximadamente a 22% do território nacional (Pereira et al., 2001; Silva et al., 2001).

Esse bioma apresenta solos pobres e com altos teores de alumínio, no entanto, o crescimento populacional e a demanda por mais alimentos, associados às condições edafoclimáticas favoráveis, transformaram esta região em uma importante área para atividades agropecuárias (Klink & Machado, 2005).

O ritmo acelerado desta ação antrópica, nas últimas décadas, tem levado à perda de material genético vegetal nativo, praticamente desconhecido do ponto de vista científico (Vieira & Martins, 2000).

O gênero *Byrsonima* é essencialmente americano, sendo encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Felício et al., 1995), sendo composto por cerca de 150 espécies, muitas delas com potencial medicinal (Sannomiya et al., 2007). Na flora nacional ocorrem várias espécies de *Byrsonima* nos campos dos cerrados (Joly, 2002).

De acordo com Sannomiya et al. (2007), investigações químicas de algumas espécies de *Byrsonima* resultaram no isolamento de esteróides,

triterpenos (Mendes et al., 1999), flavonóides, entre outros. Flavonóides já foram identificados em folhas de *Byrsonima crassa* (Sannomiya et al., 2004, 2005).

Recentemente, vários trabalhos com o gênero *Byrsonima* vêm confirmando este potencial medicinal demonstrando uma variedade de efeitos tais como: antiulcerogênico (Sannomiya et al., 2005; Lima Z. et al., 2008); antioxidantes, gastroprotetor (Lima Z. et al., 2008); antimicrobial (Martínez-Vázquez et al., 1999; Lima Z. et al., 2008); antidiarréicos (Figueiredo et al., 2005; Lima Z. et al., 2008); demonstrando inclusive atividade mutagênica *in vitro* (Cardoso et al., 2006; Sannomiya et al., 2007; Lima Z. et al., 2008).

O Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é uma espécie medicinal do Cerrado pertencente à família Malpighiaceae. Assim como várias espécies do gênero, apresenta sementes com dormência tegumentar e grande dificuldade de propagação sexuada (Nogueira et al., 2007) o que inviabiliza a produção de mudas por meios convencionais.

Trabalhos visando à propagação de espécies nativas são escassos, aliado ao fato de que o Cerrado é o bioma mais ameaçado do Brasil, podem levar muitas espécies de interesse ecológico-farmacêutico a desaparecerem, principalmente se metodologias alternativas de propagação não forem estabelecidas.

Técnicas de cultivo *in vitro* podem representar uma boa alternativa para espécies com dificuldades de propagação. A embriogênese somática indireta, uma das técnicas da cultura de tecidos vegetais, vem sendo muito utilizada para propagação de espécies de interesse comercial e/ou nativas, possibilitando a produção de mudas com qualidade, de forma massal e em qualquer época do ano.

O sucesso na aplicação desta técnica depende de processos de indução, proliferação, diferenciação, maturação e regeneração de um novo indivíduo a

partir de células somáticas que passam por um processo de desdiferenciação originando uma massa celular denominada calo.

Neste contexto, o acompanhamento do desenvolvimento celular desses calos por meio de análises citoquímicas e preparações citológicas poderá favorecer a obtenção de importantes informações para a seleção de células com potencial embriogênico, permitindo adequar protocolos que viabilizem a produção vegetal em larga escala por meio da embriogênese somática indireta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição botânico-medicinal do Murici-pequeno

A família Malpighiaceae, uma das muitas famílias do cerrado brasileiro, compreende mais de 60 gêneros, constituídos por plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas ou, mais freqüentemente, trepadeiras com folhas inteiras, de disposição alterna, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração, em geral, amarela ou rosada, cíclicas, hermafroditas, diclamídeas, de simetria zigomorfa, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou terminais. As pétalas, em geral, são fimbriadas, longipenduculadas. O androceu é formado por dez estames, às vezes alguns estaminodiais (Joly, 2002).

Byrsonima intermedia A. Juss. (Figura 1) é um arbusto, podendo apresentar vários ramos que partem de uma base subterrânea. Possui folhas opostas lanceoladas e glabras, flores em cachos terminais, amarelas, tomando tonalidade alaranjada quando velhas (Ferri, 1969). Designada vulgarmente de Murici-pequeno, sua época de florescimento é de outubro a dezembro e seu hábitat é o cerrado apresentando ocorrência em Minas Gerais (Rodrigues & Carvalho, 2001).



FIGURA 1 Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

O Murici-pequeno é uma planta medicinal rica em taninos, cuja infusão é utilizada como febrífugo e adstringente nas diarreias e disenterias (Rodrigues & Carvalho, 2001), além de possuir atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, cicatrizante e antiinflamatória (Pinto & Bertolucci, 2002; Monteiro et al., 2005). A principal utilização medicinal se dá através do chá da casca do caule picada e a coleta do material silvestre é realizada de forma extrativista, o que coloca a espécie em grande risco de extinção. Além deste fato, segundo Lorenzi (2002), o gênero *Byrsonima* possui taxa de germinação baixa devido à presença de pirênio indeiscente e um tegumento extremamente lignificado que funciona como uma barreira mecânica sobre o embrião impedindo tanto a entrada de água ou oxigênio quanto à protusão radicular. Todas essas peculiaridades contribuem para a desuniformidade na produção de mudas.

Os frutos de *B. intermedia* são do tipo drupóide, indeiscentes e apresentam como principal característica o endocarpo lignificado, constituindo o

pirênio (endocarpo lenhoso que envolve completamente a semente) indeiscente (Souto & Oliveira, 2005) (Figura 2A).

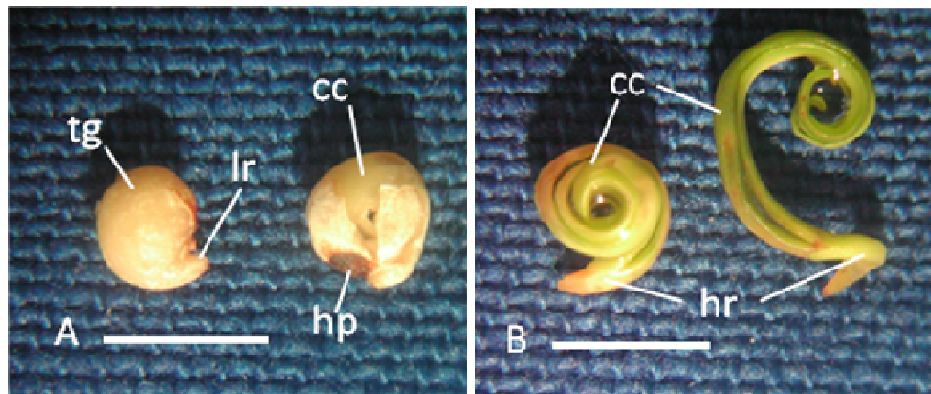


FIGURA 2 Sementes e embriões de *B. intermedia* A. Juss. (tg) Tegumento externo. (lr) Lobo radicular. (cc) Cotilédone circular do tipo circinado. (hp) Hipóstase. (hr) Eixo hipocótilo-radicular. Barra = 5mm.

O fruto maduro apresenta dimensões de 7,70-11,00 mm × 7,77-10,78 mm, com massa fresca de 0,29-0,71 g. Tem formato ligeiramente ovalado e coloração amarela, de consistência carnosa, formado por um pirênio muito lenhoso e trilocular, onde podem ser encontradas até três sementes maduras (Souto & Oliveira, 2005).

As sementes maduras medem 2,2-4,3 mm × 2,1-3,5 × 1,3-2,4 mm e são bitegumentadas. Os tegumentos (Figura 2A) se encontram bastante reduzidos, com células colapsadas. A testa é composta por resíduos celulares impregnados de compostos fenólicos e a endotégmen é formada por paredes lignificadas de uma camada celular uniseriada caracterizando uma semente endotégma (Souto & Oliveira, 2005).

O embrião é axial e contínuo apresentando um curto eixo hipocótilo-radicular (hr) continuando em dois cotilédones adjacentes e enrolados em espiral

entre si, caracterizando o tipo circinado (Figura 2B). A junção do eixo hr com os cotilédones não apresenta uma clara delimitação (Souto & Oliveira, 2005).

Souto & Oliveira (2005) relatam que a protoderme dos cotilédones é recoberta por uma cutícula delgada que armazena gotículas lipídicas e compostos fenólicos, bem como o meristema fundamental. Neste, as células mais próximas da protoderme apresentam predomínio de compostos fenólicos enquanto que as células mais internas, próximas ao centro do cotilédone, apresentam predomínio de gotículas lipídicas. O tegumento externo da semente apresenta estruturas como: testa composta por resíduos celulares impregnados de compostos fenólicos e o endotégmen formado por paredes lignificadas de uma camada celular uniseriada.

O efeito dos compostos fenólicos sobre a germinação de sementes já é bem conhecido. Em mamoeiro, sementes têm a sua germinação afetada devido a fenóis localizados no sarcotesta e sementes de alface tratadas com extratos de sarcotesta tiveram sua germinação afetada (Tokuhisa et al., 2007). Os fenóis podem ainda regular a síntese de AIA-oxidase interferindo, portanto, diretamente no crescimento vegetal (Rodrigues et al., 2002). De acordo com Souto & Oliveira (2005), frutos e sementes de *B. intermedia* apresentam grande quantidade de compostos fenólicos e o eixo hipocótilo-radicular apresenta-se muito curto.

Lorenzi (2002) menciona que a baixa taxa de germinação e emergência lenta de plântulas ocorre também em outras espécies de *Byrsonima*, como *B. coccolobifolia*, *B. lancifolia*, *B. sericea*, *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbacifolia*.

2.2 Cultivo *in vitro*

A técnica da cultura de tecidos de plantas é considerada eficaz na propagação de várias espécies, permitindo o crescimento de células, tecidos e órgãos isolados da planta-mãe, em condições assépticas e controlada.

As técnicas de cultivo *in vitro* constituem um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético. Com a demanda crescente da indústria de fármacos e a necessidade de conservação de germoplasma, esta técnica tem sido extensamente empregada para a propagação e conservação de espécies medicinais (Rout et al., 2000).

A regeneração de um novo indivíduo, em condições assépticas, pode ocorrer a partir de uma única célula. Cada célula carrega a informação genética necessária para regeneração de um novo indivíduo. Tal processo é conhecido por totipotência celular e é característico de tecidos jovens e meristemáticos. O processo de regeneração *in vitro* pode ser realizado por duas vias distintas: a organogênese e a embriogênese somática. No primeiro caso, brotos e raízes formam-se sequencialmente, enquanto que na embriogênese somática, células somáticas originam estruturas semelhantes a embriões zigóticos (George et al., 2008).

2.3 Embriogênese somática

O entendimento dos mecanismos envolvidos na indução e expressão da embriogênese somática em diferentes espécies pode aumentar o número de plantas propagadas (Jiménez, 2001).

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas diferenciam-se em embriões. Este processo se assemelha morfológicamente ao que ocorre com embriões zigóticos (George et al., 2008), podendo ser empregado para estudos de desenvolvimento embrionário e para propagação

vegetativa em larga escala, principalmente para espécies que apresentam algum tipo de dificuldade de propagação por vias convencionais.

Culturas embriogênicas e/ou embriões somáticos podem ser criopreservadas para formar um banco de genótipos. Esse procedimento é utilizado como uma importante ferramenta para programas de transformação genética (George et al., 2008).

Células vegetais apresentam grande capacidade de se diferenciarem ou desdiferenciarem durante o seu desenvolvimento, de modo especial as células meristemáticas. Diversos tipos de células, além do zigoto, são capazes de iniciarem o desenvolvimento embrionário (Fehér et al., 2003).

A embriogênese é o ponto inicial do ciclo de vida tanto para plantas como para animais. Em plantas, a embriogênese não é estritamente dependente de fertilização, pois muitas espécies produzem naturalmente embriões derivados assexuadamente em sementes (apomixia) ou podem ser induzidos à forma de embrião em cultura de tecidos. Embriões derivados assexuadamente podem ser induzidos *in vitro* a partir de um vasto campo de tecidos somáticos. Em muitos casos, a adição de reguladores de crescimento ou um tratamento de estresse, são necessários para induzir o desenvolvimento embrionário (Ikeda et al., 2006).

A embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Dois padrões de embriogênese somática ocorrem *in vitro*. O primeiro corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calo. O segundo corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões se formam a partir de um calo, que apresenta diferentes estádios de diferenciação (Guerra et al., 1999; George et al., 2008).

No modelo indireto, o desenvolvimento de um calo embriogênico antecede a formação do embrião somático. A dediferenciação é o primeiro passo para a aquisição de competência por parte da massa de calos. Neste processo, o perfil de transcrição e tradução é apagado ou alterado no sentido de permitir as células caracterizar um novo programa de desenvolvimento. A ativação da divisão celular é requerida para manter as células destino dediferenciadas, bem como para a diferenciação do embrião (Fehér et al., 2003).

Já é bem conhecido que células de plantas cultivadas *in vitro* requerem um suprimento exógeno de reguladores de crescimento para iniciar e continuar o processo de divisão celular, principalmente auxinas e citocininas (Fehér et al., 2003; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Somente algumas células do explante primário são competentes para a indução embriogênica, as quais segundo Dutis et al. (1995) podem ser resultado de uma variação a sensibilidade à auxina dessas células (George et al., 2008).

Após a formação das células embriogênicas, elas continuam a se proliferar até formar as massas pró-embriogênicas (MPE). A auxina é requerida para a proliferação das MPE, mas também inibe o desenvolvimento delas até os embriões somáticos (Filonova et al., 2000; Smertenko et al., 2003; George et al., 2008). No meio de cultura, a auxina inicia um rápido processo de degradação em alguns poucos dias. Portanto, para a proliferação das MPE é necessário transferir semanalmente a cultura para um meio fresco. Se a cultura permanece no mesmo meio por um longo tempo, os embriões somáticos podem iniciar seu desenvolvimento (George et al., 2008).

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é considerado o principal fator de indução de embriogênese somática (Ammirato, 1993 apud Nogueira et al., 2007).

O processo básico consiste na inoculação de explantes em meio contendo 2,4-D, normalmente no escuro, visando à indução do calo embriogênico. Em seguida, retira-se a auxina paralela à inclusão de ABA e citocinina ao meio de cultivo, induzindo a diferenciação dos embriões (Guerra et al., 1999).

A partir de uma lista de 65 espécies de dicotiledôneas revisadas por Raemakers et al. (1995), a embriogênese somática foi induzida em 17 espécies em meio de cultura livre de regulador de crescimento, em 29 espécies em meio contendo auxina e em 25 espécies em meio suplementado com citocinina. Entre as auxinas, a mais freqüentemente utilizada é o ácido 2,4 diclorofenoxiacético - 2,4-D (49%), seguido do ácido naftaleno acético - ANA (27%), ácido indol-acético - AIA (6%), ácido indol butírico – AIB (6%), Picloram (5%) e Dicamba (5%). No caso das citocininas, o N6-benzilaminopurina ou BAP foi utilizado em 57% das espécies com sucesso, seguido pela cinetina – CIN (37%), zeatina - Zea (3%) e thidiazuron - TDZ (3%).

A indução de calos embriogênicos de *Parkia biglobosa*, uma angiosperma lenhosa, foi induzida em meio de cultura líquido contendo 2,4-D e cinetina, sob agitação. A transferência destes calos, com aspecto friável, para meio de cultura líquido sem 2,4-D facilitou o desenvolvimento de embriões somáticos em diferentes estádios, como o globular e o cotiledonar (Amoo & Ayisire, 2005).

Martin (2003), pesquisando a embriogênese somática em *Holostemma ada-kodien*, uma planta medicinal rara, observou que a utilização de 4,52 µM de 2,4-D em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) foi a mais eficiente para a indução de calos friáveis. Os subcultivos destes calos, em meio MS sólido e líquido contendo 2,26 µM de 2,4-D, favoreceram a formação de calos embriogênicos. No entanto, as suspensões celulares (em meio líquido) foram superiores às culturas em meio sólido. A transferência dos calos embriogênicos

para meio líquido com baixas concentrações de 2,4-D (0,22 a 0,45 μM) induziu o maior número de embriões somáticos.

O 2,4-D é considerado o principal fator de indução de embriogênese somática (Ammirato, 1993 apud Nogueira et al., 2007).

Nogueira et al. (2007), induziram a formação de calos embriogênicos em segmentos foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) utilizando a concentração de 4,52 μM de 2,4-D em meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

No entanto, Lima E. et al. (2008) constataram o maior aumento no peso fresco de calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Croton urucurana* Baill com a utilização da auxina 2,4-D nas concentrações de 13,57 e 22,62 μM .

2.4 Caracterização de massas pró-embriogênicas e viabilidade celular

2.4.1 Massas pró-embriogênicas (MPE)

De acordo com Xu & Huang (2008), as MPE podem ser definidas como aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos. São constituídas de células de tamanho reduzido e portam citoplasma denso (Filonova et al., 2000; Fehér et al., 2003). São, portanto, células embrionárias. Tais características também são encontradas em células meristemáticas (Murashige & Skoog, 1962).

As MPE podem ser induzidas e proliferadas com a adição de auxina no meio de cultura. Entretanto, para que o desenvolvimento continue até o embrião, o suprimento de auxina precisa ser reduzido ou até mesmo suprimido por completo do meio de cultura (George et al., 2008).

As MPE podem ser caracterizadas através de análises ultra-estruturais com o uso da microscopia eletrônica de transmissão e ou de varredura fornecendo maiores detalhes da morfologia interna e externa dos tecidos embriogênicos (Nogueira et al., 2007).

Alguns corantes podem ser utilizados para a identificação da viabilidade das MPE. Os corantes, Carmim-acético e Azul-de-Evans possibilitam a diferenciação de culturas embriogênicas (Steiner et al., 2005). As células embrionárias que apresentam citoplasma denso são isodiamétricas e reativas ao corante Carmim-acético, resultando em coloração avermelhada. A reação positiva ao carmim-acético (Durzan, 1988) está associada com a competência da célula para o desenvolvimento embriogênico (Steiner et al., 2005) e integridade cromossômica (Munhoz et al., 2008). Células alongadas são normalmente vacuoladas. A vacuolização é um dos primeiros sinais de morte celular, o que é acompanhado de rupturas na membrana (Filonova et al., 2000). O Azul-de-Evans é um corante que penetra através de rupturas da membrana, colorindo o interior dessas células em azul (Bhargava et al., 2007).

2.4.2 Viabilidade celular

2.4.2.1 Diacetato de fluoresceína - FDA

Os estudos de viabilidade celular com ensaios utilizando FDA se baseiam na medição da atividade de uma esterase não específica a qual converte o FDA não fluorescente em fluoresceína, um composto verde fluorescente (Clarke et al., 2001).

De acordo com Clarke et al. (2001), o teste com FDA descrito por Chand et al. (1994) fundamenta-se no princípio de que apenas células vivas convertem o FDA em fluoresceína. A vantagem deste método está principalmente na velocidade de obtenção dos resultados. Entretanto, alguns percalços podem acontecer quando o ensaio de FDA é utilizado. O FDA pode ser hidrolisado à fluoresceína na ausência de células vivas ou a fluorescência produzida pelas células vivas pode não ser detectada. A conversão do FDA em fluoresceína na ausência de células vivas resultaria em uma interpretação errada

dos resultados onde células mortas seriam tomadas por vivas. Se a fluorescência produzida não é percebida, células vivas podem ser tomadas como mortas.

Clarke et al. (2001) relataram que os primeiros estudos da atividade da esterase como detectora de viabilidade celular foram realizados por Kramer & Guilbault (1963). Desde então, seu uso como indicador de viabilidade celular foi intensificado. De acordo os mesmos autores, Swisher & Carroll (1980) usaram FDA como estimador da biomassa microbial em coníferas, Gilbert et al. (1992) para diagnosticar a viabilidade de algas marinhas, Lestan & Lamar (1999) em fungos, Jarmey-Swan et al. (2000) em *Giardia cysts* em água e ainda como medidor da atividade antimicrobial em produtos naturais Chand et al., (1994) e células vegetais (Kovarík & Fojtova, 1999; Steward et al., 1999).

Filonova et al. (2000), utilizaram o FDA para viabilidade de protoplastos de *Norway spruce* e Fojtová & Kovarik (2000) testaram a viabilidade celular de tabaco com este corante.

Iakimova et al. (2005) fizeram ensaios de viabilidade com FDA em suspensão celular de tomate.

Nogueira (2006) testou a viabilidade celular de calos de Murici-pequeno utilizando o FDA.

Fehér et al. (2003) trabalhando com células derivadas de protoplastos de folha de alfafa, constataram que as células alongadas, portanto, não embriogênicas, apresentavam acúmulo de FDA em cloroplastos funcionais enquanto que as células isodiamétricas, ricas em citoplasma, apresentavam a fluorescência dispersa no citoplasma.

2.4.2.2 Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio

O cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (CTT) é um composto bastante conhecido pelo seu alto potencial redox, o qual pode ser inserido na cadeia respiratória mitocondrial e ser reduzido a um composto de coloração intensa o

trifenilformazan (TFF) ou simplesmente “formazan”. Essa propriedade tem sido utilizada para determinar a viabilidade de cultura de células. Uma grande vantagem desse método é que a quantidade do produto final, o formazan, que é extraído em etanol pode ser determinado espectrofotometricamente (Zapata et al., 1991) e a quantidade de formazan produzido por células vivas depende do grau de viabilidade do tecido (Nam et al., 1998).

Tanto o CTT como o FDA são frequentemente utilizados para determinar a viabilidade celular (Whiters, 1985). Entretanto, o FDA é mais utilizado para determinar a viabilidade de protoplastos e de pequenos fragmentos de calos ou agregados de suspensão celular entre 30-100 células, enquanto que CTT pode ser utilizado em agregados celulares maiores (Ishikawa et al., 1995; Steponkus, 1971; Whiters, 1985). Mikula et al. (2006), utilizaram o teste de CTT em agregados de suspensões celulares de *Gentiana ssp.* que Mikula et al. (2006) constatou serem, em sua maioria, maiores que 120 µm.

O teste de CTT baseia-se na atividade enzimática de células vivas, exibindo o nível respiratório das amostras testadas (Whinters, 1985). A atividade de uma desidrogenase mitocondrial reduz o não colorido CTT ao trifetilformazan de coloração vermelha (Steponkus & Lanphear, 1967; Steponkus, 1971; Towill & Mazur, 1975), insolúvel em água (Duncan & Widholm, 2004; Silva & Yuffá, 2006).

De acordo com Amutha et al. (2007), o CTT entra na cadeia respiratória no lugar do oxigênio funcionando, portanto, como o acceptor final de elétrons entre o citocromo a1 até o a3 no complexo citocromo oxidase (Kalina & Palmer, 1968), evidenciando a integridade funcional e estrutural do aparato respiratório (Towill & Mazur, 1975). Desta forma, porções vivas de tecidos ou mesmo células individuais adquirem coloração avermelhada.

Mosmann (1983 apud Hosseini & Mulligan, 2002), sugere que este é um ensaio colorimétrico ideal para medidas de viabilidade, pois as células vivas convertem um composto descolorido em um colorido.

Segundo Mikula et al. (2006), o teste com CTT foi inicialmente utilizado em ensaios de viabilidade de sementes e para danos causados pelo congelamento em plantas (Steponkus & Lanphear, 1967), e o uso do CTT em cultura de tecidos foi descrito pela primeira vez por Stein & Gerarde (1950) e Towill & Mazur (1975).

2.5 Suspensão celular

A embriogênese somática pode ser obtida através do cultivo de explantes em meio sólido ou líquido, de forma direta ou indireta, sendo que a forma direta não passa pelo estágio de formação de calo (Guerra et al., 1999; George et al., 2008).

Uma suspensão celular pode ser iniciada diretamente por um explante sem que este tenha passado antes pelo estágio de calo. No entanto, na maioria dos casos, a suspensão celular é iniciada com a inoculação de calos friáveis em meio líquido sob agitação. A agitação permite a dissociação das células que podem se dividir formando pequenos agregados celulares ou simplesmente células individualizadas. O grau de dispersão de uma suspensão celular é fortemente influenciado pela concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura (George et al., 2008).

Quando comparado com cultivo de calos, as suspensões celulares exibem uma alta taxa de divisão celular (Gurel et al., 2002), permitindo assim um crescimento mais acelerado devido ao contato direto das células com os nutrientes do meio (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006). Além disso, as condições de cultivo podem ser mais facilmente controladas, pela adição de

meio fresco ou troca de meio nos mais diferentes níveis de composição, proporcionando maior uniformidade (George et al., 2008).

Vários métodos de análises podem ser utilizados para dimensionar o crescimento de suspensões celulares tais como: peso fresco e peso seco de células, sedimentação de volume celular (método - SCV), centrifugação de suspensão celular (método - PCV), contagem do número celular (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

A contagem de células, apesar de ser um método que demanda tempo e resulta em perda do material em estudo, é um parâmetro fidedigno para avaliação do crescimento celular. Uma vez feita a contagem, em câmara de Neubauer, a densidade celular pode ser estimada em número de células por mililitro de suspensão (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Células alongadas e isodiamétricas podem ser facilmente contabilizadas com a utilização desta técnica.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOO, S. O.; AYISIRE, B. E. Induction of callus and somatic embryogenesis from cotyledon explants of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, n. 1, p. 68-71, Jan. 2005.

AMUTHA, R.; MUTHULAKSMI, S.; RANI, W. B.; INDIRA, K.; MAREESWARI, P. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high temperature stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 245-251, 2007.

BHARGAVA, A.; OSUKY, M.; FORWARD, B. S.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W.; MISRA, S. Expression of a polyphenol oxidase variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, p. 301-312, 2007.

CARDOSO, C. R. P.; CÓLUS, I. M. S.; BERNADINI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa*. Niedenzu. **Toxicology**, Limerick, v. 225, n. 1, p. 55-63, 2006.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 47, n. 11, p. 1295-1304, 1994.

CLARKE, J. M.; GILLINGS, M. R.; ALTAVILLA, N.; BEATTIE, A. J. Potencial problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 261-267, 2001.

DUNCAN, D. R.; WIDHOLM, J. M. Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus cultures. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 4, p. 397-403, 2004.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: FRANS SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PALNT PHYSIOLOGI, 1988., Swedish. **Proceedings...** Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. v. 8, p. 147-186.

DUDITIS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 267-308.

FEHÉR A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FELÍCIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; LINS, A. L.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, Rio De Janeiro, v. 62, p. 91-92, jan./dez. 1995.

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

FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L. F. R.; BRITO, A. R. M. S.; SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 79-83, 2005.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, p. 4399-4411, 2000.

FOJTOVÁ, M.; KOVARIK, A. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 531-537, 2000.

GEROGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The background, 2008. v. 1.

GILBERT, F.; GALGANI, F.; CADIOU, Y. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and valuation of water quality. **Marine Biology**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 199-205, 1992.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUREL, S.; GUREL, E.; KAYA, Z. Establishment of cell suspension cultures and plant regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Turkish Journal of Botany**, Tübitag, v. 26, p. 197-205, 2002.

HOSSEINI, R.; MULLIGAN, B. Application of rice (*Oryza Sativa* L.) suspension culture in studying senescence *in vitro* (I). Single strand preferring nuclease activity. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 5, n. 1, p. 55-63, 2002.

IAKIMOVA, E.; KAPCHINA-TOTEVA, V.; JONG, A.; ATANASSOV, A.; WOLTERING, E. Involvement of ethylene, oxidative stress and lipid-derived signals in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. **BMC Plant Biology**, London, v. 5, n.1, p. 19, 2005.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 23, n. 2, p. 153-161, 2006.

ISHIKAWA, M.; ROBERTSON, A. J.; GUSTA, L.V. Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells. **Plant Science**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 83-93, 1995.

JARMEY-SWAN, C.; GIBBS, R. A.; HO, G. E.; BAILEY, I. W.; HOWGRAVE-GRAHAM, A. R. A novel method for detection of viable *Giardia* cysts in water samples. **Water Research**, New York, v. 34, n. 6, p. 1948-1951, 2000.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

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

KALINA, M.; PALMER, J. M. The reduction of tetrazolium salts by plant mitochondria. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 366-374, 1968.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

KOVARIK, A.; FOJTOVA, M. Estimation of viable cell count after fluorescein diacetate staining using phosphorimager analysis. **BioTechniques**, Natick, v. 27, n. 4, p. 685-688, 1999.

KRAMER, D. N.; GUILBAULT, G. G. A substrate for the fluorometric determination of lipase activity. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 35, n. 4, p. 588-589, 1963.

LESTAN, D.; LAMAR, R. T. Influence of humidity on production of pelleted fungal inoculum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 349-357, 1999.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, Á. A. N. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n. 1, p. 17-22, jan./fev. 2008a.

LIMA, Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M.; CARDOSO, C R. P.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 2, p. 149-160, 2008b.

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

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cel culture protocols**. 2.ed. Totowa: Humana. 2006. 416 p.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLES-ESQUINCA, A. R.; LUNA, L. C.; GUTIÉRREZ, M. N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, Lauseanne, v. 66, n. 1, p. 79-82, 1999.

MARTIN, K. P. Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma ada-kodien*, a rare medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht , v. 72, n. 1, p. 79-82, 2003.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, 185-188, 1999.

MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZNSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana spp.* cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physilogiae Plantarum**, Paris, v. 28, n. 4, p. 315-324, 2006.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES-GIL, P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J. D.; BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREX, J. L.; FONSECA, G. **Hotspots revisited**: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: CEMEX, 2004. 391 p.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

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

NAM, B-H.; JIN, H-J.; KIM, S-K.; HONG, Y-K. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 31-36, 1998.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2006. 41 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 48-50, jul. 2007.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, 2001. Suplemento. 1 CD-CROM.

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

PREVEDELLO, J. A.; CARVALHO, C. J. B. de. Conservação do cerrado brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 39-57, 2006.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 81, n. 1, p. 93-107, 1995.

RODRIGUES, A. C.; DINIZ, C. Â.; FACHIELLO, J. C.; SILVA, J. B.; FARIA, J. L. C. Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus sp.* nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 559-564, 2002.

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

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology advances**, New York, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R. P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. D.; SANTOS, F. V.; SERPELONI, J. M.; CÓLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 2, p. 319-326, 2007.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C. HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1035, n. 1, p. 47-51, 2004.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178 p.

SILVA, R. F.; YUFFÁ, A. M. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 5, p. 593-597, 2006.

SMERTENKO, A. P.; BOZHKO, P. V.; FILONOVA, L. H.; ARNOLD, S. V.; HUSSEY, P. J. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 813-824, 2003.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 697-712, 2005.

STEIN, R. J.; GERARDE, H. W. Triphenyl tetrazolium chloride in tissue culture. **Science**, Washington, v. 111, n. 2895, p. 691, 1950.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STEPONKUS, P. L.; LAMPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 42, n. 1, p. 1423-1426, 1967.

STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of plant tissue cultures. **Cryobiology**, San Diego, v. 8, n. 4, p. 386-387, 1971.

STEWART, N.; MARTIN, R.; EMGASSER, J. M. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 2, p. 171-176, 1999.

SWISHER, R.; CARROLL, G. C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology**, New York, v. 6, n. 3, p. 217-226, 1980.

TOKUHISA, D.; SANTOS DIAS, D. C. F.; ALVARENGA, E. M.; HILST, P. C.; DEMUNER, A. J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007.

TOWILL, L. E.; MAZUR, P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 2, p. 1097-1102, 1975.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

WHITERS, L. A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: VASIL, J. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants. Cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation.** Orlando, Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 253-316.

XU, C.; HUANG, B. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrotis grass* species contrasting in heat tolerance. **Jurnal of Experimental Botany**, New Brunswick, v. 59, n. 15, p. 4248-4194, 2008.

ZAPATA, M. J.; SALINAS, C.; CALDERÓN, A. A.; MUÑOZ, R.; BARCELÓ, A. R. Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by the KCN-insensitive, salicylhydroxamic acid-sensitive alternative respiratory pathway of mitochondria from cultured grapevine cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 579-582, 1991.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE SEMENTES À SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DIFERENTES pHs NA MICROPROGAÇÃO DE MURICI-PEQUENO

1 RESUMO

O Murici-pequeno, uma planta medicinal e frutífera do Cerrado, apresenta dificuldades de propagação por meios convencionais devido à presença de tegumentos extremante lignificados. A extração de sementes e a inoculação dos embriões em ambiente asséptico permitem a obtenção de plântulas *in vitro*, isentas de patógenos, que servem de fonte para a produção de calos a partir de segmentos foliares, entretanto, a utilização de sementes de fontes não assépticas implicam no uso de um agente desinfestante. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é largamente utilizado na desinfestação de explantes em cultura de tecidos, entretanto, poucos são os relatos de seus efeitos sobre o crescimento dos explantes. A redução do pH do NaOCl conduz a uma maior formação de HOCl, um de seus componentes e o que apresenta maior efeito biocida. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de diferentes pHs e tempos de exposição de sementes de Murici-pequeno a uma solução de NaOCl. As sementes foram submetidas a diferentes tempos de exposição (1, 5 e 10 minutos) a uma solução de NaOCl nos diferentes pHs (5; 7; 10 e 12). Após os tratamentos com NaOCl, os embriões foram inoculados em meio WPM com 50% da concentração dos sais, sem sacarose, 0,5% de ágar e pH 5,8. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$. Aos 75 dias de cultivo foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento do eixo embrionário, tamanho da parte aérea e tamanho da raiz, número de folhas e número de raízes, desenvolvimento de plântula normal. A desinfestação foi eficiente para todos os tratamentos. O uso do NaOCl é eficiente na desinfestação de sementes de *B. intermedia* independente da variação do pH e do tempo de exposição. Maior comprimento de parte aérea e número de folhas é obtido em solução de NaOCl a pH 7,0 e 10,0 e o maior número de raízes em pH 10, todos no tempo de exposição de 10 minutos.

Palavras-chave: desinfestação; hipoclorito de sódio; micropropagação; pH; *Byrsomina intermedia* A Juss.

2 ABSTRACT

Byrsonima intermedia A. Juss., a medicinal and fruit plant of the Cerrado presents difficulties for the conventional propagation due to the presence of extremely lignified tegument. Seed extraction and inoculation of embryos in an aseptic environment produce *in vitro* seedlings, free of pathogens, which serve as a source for the production of callus from leaf segments, however, the use of non aseptic sources of seeds imply in the use of a disinfectant agent. Sodium hypochlorite (NaOCl) is widely used in the disinfestations of explants in tissue culture; however, there are few reports of its effects on the explants growth. NaOCl pH reduction leads to higher formation of one of its components (HOCl) that presents higher biocidal effect. The objective of this work was to study the effect of different pH and exposure periods of *Byrsonima intermedia* A. Juss. seeds in a NaOCl solution. Seeds were subjected to different exposure periods (1, 5 and 10 minutes) to a NaOCl solution in different pH (5, 7, 10 and 12). After treatment with NaOCl, embryos were inoculated in WPM medium with 50% concentration of salts without sucrose, 0.5% agar and pH 5.8. The explants were maintained in a growth room under $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance, 16 hours of photoperiod and 27 ± 2 °C of temperature. At 75 days of culture, the following parameters were analyzed: growth of the embryonic axis, shoot and root size, leaf and root number and development of normal seedlings. The disinfection was effective for all treatments. The use of NaOCl is effective in the disinfection of *B. intermedia* seeds independent of pH variation and exposure periods. Higher shoot length and leaf number is obtained in NaOCl solution at pH 7.0 and 10.0 and higher root number at pH 10, all in 10 minutes of exposure.

Keywords: desinfestaton; sodium hypochlorite; micropropagation; pH ;
Byrsomina intermedia A Juss.

3 INTRODUÇÃO

O ambiente de cultivo *in vitro*, sala de crescimento e meio de cultura, fornecem condições ideais para o crescimento de fungos e bactérias. A desinfestação do explante é fundamental para qualquer ensaio de cultura de tecidos que utilize materiais vegetais de fontes *ex vitro*.

Além da desinfestação, o bom desenvolvimento *in vitro* do explante é desejável. Uma vez não obtido sucesso nesse tratamento, o progresso nos estudos de cultivo *in vitro* se tornam inviáveis. O agente desinfestante deve, portanto, eliminar microorganismos e, ao mesmo tempo, não afetar ou até mesmo melhorar o desenvolvimento do explante (Yildiz & Er, 2002).

De acordo com Yildiz & Er (2002), uma série de agentes desinfestantes podem ser utilizados, tais como: etanol, peróxido de hidrogênio, cloreto de mercúrio, nitrato de prata e até antibióticos. Entretanto, o hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido utilizado largamente para desinfestação de superfícies, demonstrando alta eficiência no combate a bactérias, fungos e vírus (Emmanuel et al., 2004).

O NaOCl é um agente desinfestante que, devido ao seu baixo custo e eficiência (Emmanuel et al., 2004), é utilizado em larga escala para os mais diversos fins: purificação de água (Khodadad et al., 2008), limpeza de superfícies (Kim et al., 2001), otimização de processos germinativos (Chun et al., 1997), escarificação de sementes (Ferreira & Ranal, 1999; Sofiatti et al., 2008), superação de dormência (Erasmio et al., 2008), esterilização química de meios de cultura (Teixeira et al. 2006, 2008) e na desinfestação dos mais diversos explantes em cultura de tecidos vegetais. É um produto seguro, relativamente barato, fácil de ser transportado, armazenado e dosado nas mais diversas concentrações.

A atividade biocida do NaOCl deve-se principalmente ao ácido hipocloroso (HOCl). A concentração deste componente em solução pode ser aumentada pela adição de NaOCl ou pela redução do pH.

A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss (Murici-pequeno) apresenta dormência tegumentar e emergência lenta de plântulas (Lorenzi, 2002). Neste contexto, o desenvolvimento de um protocolo que promova tanto a desinfestação como o bom desenvolvimento do explante *in vitro* é desejável.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do tempo de exposição de embriões zigóticos a solução de hipoclorito de sódio em diferentes pHs no crescimento de plântulas de *B. intermedia* cultivadas sob condições assépticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

4.1 Material botânico

Frutos maduros de *B. intermedia* foram coletados de uma população natural no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, localizado a 918,0 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

Após a coleta, os frutos passaram por beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Os pirênios permaneceram por três dias à sombra e em temperatura ambiente antes de serem armazenados a 4° C.

A abertura dos pirênios foi realizada manualmente com o auxílio de um torno (Figura 1B) e as sementes extraídas (Figura 1C).

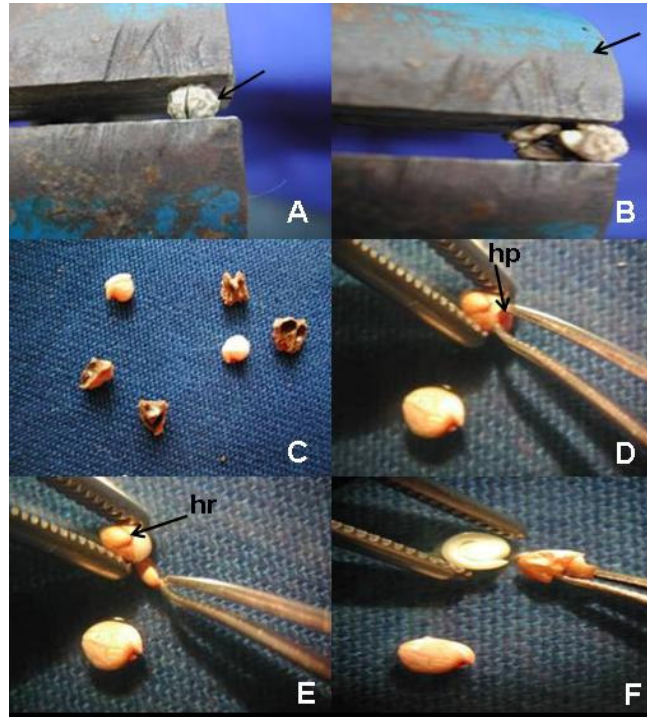


FIGURA 1 Processo de extração de sementes de *B. intermedia*. (A) Pirênio – seta. (B) Torno – seta. (C) Sementes extraídas. (D, E e F) Utilização de pinças para a extração do tegumento. (F) Tegumento extraído. (hp) Hipóstase. (hr) Eixo hipocótilo-radicular.

4.2 Retirada do tegumento

O tegumento externo foi retirado com auxílio de pinças de ponta fina (Figura 1D, E e F). A região alvo foi a hipóstase (hp) (Figura 1D). Esse procedimento foi realizado com extremo cuidado a fim de não atingir a região adjacente, o eixo hipocótilo-radicular (hr) (Figura 1E) e o lobo radicular (Figura 2A, Capítulo 1).

4.3 Variação de pH do NaOCl

O NaOCl é uma solução de elevada capacidade de tamponamento (Sofiatti et al., 2008), altamente alcalino e seu pH (11 – 13) normalmente varia de acordo com sua concentração.

Neste trabalho, foi utilizado o NaOCl comercial apresentando a concentração de cloro ativo de 2,0% de acordo com o fabricante.

Para a calibração do pH foi utilizado HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) e o pHmetro utilizado foi o modelo Tec-3MP da TECNAL.

4.4 Desinfestação e cultivo *in vitro*

Em câmara de fluxo laminar as sementes foram imersas em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, depois, em solução de NaOCl 50% (v/v) com 1,0% de cloro ativo com quatro diferentes variações de pH (5, 7, 10 e 12) e três tempos de exposição (1, 5 e 10 minutos). Logo em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada e estéril por três vezes. Seus tegumentos foram retirados com auxílio de pinças (Figura 1F). A retirada do tegumento externo se faz necessária para facilitar o processo de crescimento do eixo embrionário. Em alguns ensaios realizados em que se permitiu a presença do tegumento externo (Figura 3A), foi possível verificar que o crescimento do eixo embrionário foi prejudicado. Além disso, o tegumento externo da semente de Murici-pequeno é fonte de contaminação (observação pessoal, Figura 3B), o que também foi observado para arroz (Chum et al., 1997) e mamona (Rocha et al., 2003).

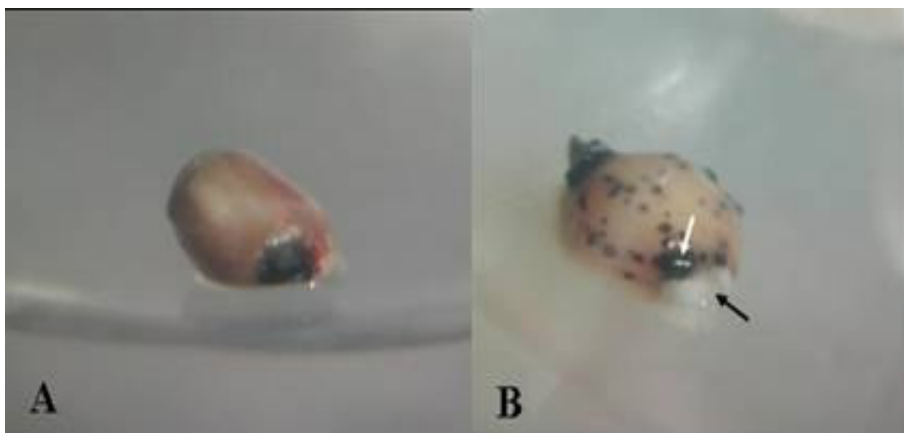


FIGURA 3 Sementes de Murici-pequeno com tegumentos inoculadas em meio WPM 50%, sem sacarose. (A) Semente íntegra logo após a inoculação. (B) semente após 10 dias de inoculação apresentando contaminação fúngica (seta preta) e bacteriana (seta branca).

O experimento consistiu de 12 tratamentos com 15 repetições cada. Foi inoculado um embrião por tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), com 50% da concentração dos sais, sem sacarose. O meio foi solidificado com 0,5% de ágar e o pH aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2004).

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Aos 75 dias de cultivo foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento do eixo embrionário, tamanho da parte aérea e o da maior raiz, número de folhas e de raízes, desenvolvimento de plântula normal.

Para o parâmetro crescimento do eixo embrionário, foi considerado o crescimento de qualquer parte do eixo, ou seja, raiz, parte aérea ou ambos. Com relação ao desenvolvimento de plântulas normais, estas deveriam apresentar o crescimento normal da raiz e parte aérea. Portanto, foi considerada como

plântula anormal aquela que não apresentava o crescimento de qualquer uma dessas estruturas.

Para o número de folhas foram consideradas todas aquelas abaixo do primeiro par apical, e para as raízes, foi contabilizado o número total. Com auxílio de um paquímetro, foi mensurado o comprimento da maior raiz e tamanho de parte aérea.

4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os dados foram avaliados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 (variações de pH) x 3 (tempos de exposição). Cada tratamento foi constituído por 15 repetições. Foi inoculado um embrião por tubo de ensaio e cada tubo considerado uma repetição.

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Sisvar e os dados foram transformados pela raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$. As médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott com nível nominal de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desinfestação e modo de ação do NaOCl

5.1.1 Desinfestação

A utilização do NaOCl em todos os pHs ou tempos de exposição foi eficiente com 100% de desinfestação. Foi realizado um tratamento adicional onde as sementes passaram apenas por um banho em álcool 70% (v/v) por 30 segundos e foram lavadas em água destilada e estéril por três vezes antes da retirada do tegumento. Neste grupo controle foi constatado a contaminação de 100% dos embriões (dados não mostrados).

A desinfestação foi eficiente em todas as variações de pH testados, esses resultados diferem daqueles encontrados por Chum et al. (1997). Esses autores verificaram que a redução do pH da solução de NaOCl aumentou a eficiência dos procedimentos de desinfestação de sementes de arroz onde, a contaminação bacteriana e fúngica foram eficientemente eliminadas nos valores de pH 2-7 e 2-5, respectivamente. No entanto, a maior taxa de germinação (100%) foi alcançada quando as sementes de arroz foram tratadas com NaOCl a pH 11,6.

Aparentemente, a água de lavagem das sementes não remove totalmente os componentes da solução de NaOCl. Sendo assim, o NaOCl pode continuar agindo de alguma forma durante algum período sobre o explante.

Teixeira et al. (2008), constataram a redução da contaminação *in vitro* devido a efeitos residuais provenientes da água clorada utilizada para o enxágue das vidrarias. Quando estes autores inocularam explantes de *Eucalyptus pellita* em meio de cultura preparado da forma convencional, porém sem a autoclavagem, a contaminação foi de 100%. Quando os tubos de ensaio foram enxaguados em uma solução de NaOCl com 0,001% de cloro ativo total, com subsequente distribuição do meio de cultivo em câmara de fluxo laminar e sem a autoclavagem, a contaminação foi reduzida em 60%, confirmando portanto o efeito residual dos componentes do NaOCl.

O efeito residual do NaOCl foi observado por Teixeira et al. (2008) inclusive no controle de contaminantes endógenos. Estes autores perceberam que meios de cultura tratados com concentrações inferiores a 0,005% de cloro ativo total, apresentavam alguma contaminação na base do explante, caracterizando, portanto, contaminação endógena. Quando esses autores utilizaram meios de cultura tratados com concentrações superiores a 0,005% de cloro ativo total, não foi encontrado qualquer tipo de contaminação, reafirmando o efeito residual do agente, neste caso, esterilizante do meio de cultivo.

5.1.2 Modo de ação do NaOCl

A atividade antimicrobiana é atribuída ao ácido hipocloroso (HOCl), que por ser um ácido fraco e de reduzido peso molecular, penetra na parede celular do microrganismo (Len et al., 2002). O íon hipoclorito (OCl⁻) também tem ação biocida, porém, seu efeito é inferior ao HOCl (Emmanuel et al., 2004). Ao penetrar no organismo, o HOCl muda drasticamente o potencial de oxido-redução causando alterações no metabolismo celular. As reações oxidativas causam inativação enzimática irreversível além da degradação de lipídeos, ácidos graxos e fosfolipídios (Estrela et al., 2002).

A concentração do HOCl pode ser aumentada, adicionando-se NaOCl à solução ou reduzindo-se o pH. A dissolução do NaOCl em água conduz a produção do HOCl e NaOH⁻ (Reação 1). O HOCl dissocia-se reversivelmente em H⁺ e OCl⁻ (Reação 2) e o pH da solução influencia no equilíbrio final destes elementos (Chun et al., 1997; Lopez et al., 2001; Emmanuel et al., 2004).



A disponibilidade dos elementos que compõem o NaOCl variam de acordo com o pH (Figura 1). O Cl₂ é o principal componente quando o pH está próximo de 2,0. Do pH 4 - 6, o HOCl é o principal componente em solução. Já acima do pH 9, o OCl⁻ é o componente mais abundante (Rouette, 2001).

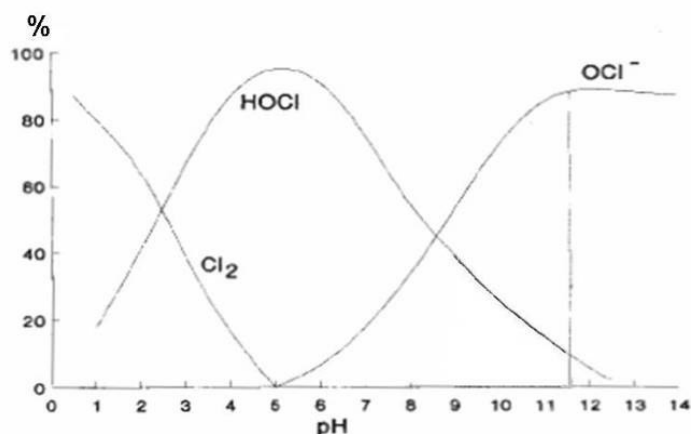
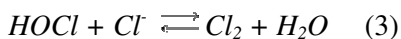


FIGURA 1 Componentes intermediários da solução de NaOCl relativos ao pH. (Adaptado de Rouette, 2001).

O redução do pH da solução através da adição de HCl conduz, até certo ponto, ao aumento da concentração de HOCl. Entretanto, essa redução pode levar também a perda de Cl₂ (Reação 3) por evaporação (Len et al., 2002). Além disso, o HOCl é altamente instável. Desta forma, a redução do pH da solução só deve ser feita se sua utilização for imediata.



5.2 Crescimento das plântulas: influência do pH da solução de NaOCl e tempo de exposição.

De acordo com a análise de variância, foram encontradas diferenças significativas para a fonte de variação pH da solução de NaOCl ($p = 0,0162$) e tempo de exposição ($p = 0,0099$). A interação pH de NaOCl x Tempo de exposição não apresentou significância com nível nominal de 5% pelo teste de Scott-Knott.

O crescimento do eixo embrionário e a formação de plântulas normais não foram afetados pelo pH do NaOCl e pelo tempo de exposição, sendo não significativos, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (p) = 0,4303 e (p) = 0,4454, respectivamente.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados para tamanho de parte aérea, número de folhas e de raízes em função da variação do pH da solução de NaOCl.

TABELA 1 Efeito da variação do pH da solução de NaOCl no crescimento de plântulas de Murici-pequeno cultivadas em meio WPM 50%, sem sacarose.

pH NaOCl	Comprimento da parte aérea (cm)	Número de folhas	Número de raízes
5	0,07 b	0,40 b	0,27 b
7	0,19 a	1,27 a	0,42 b
10	0,28 a	1,89 a	0,76 a
12	0,05 b	0,58 b	0,22 b
CV%	23,51	63,84	37,58

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott com nível nominal de significância de 5%.

Apesar de todos os tratamentos de desinfestação terem sido eficientes, foi observado que o pHs 7 e 10 proporcionaram um crescimento mais pronunciado das plântulas. Entretanto, Chun et al. (1997) perceberam que o pH mais alcalino da solução de NaOCl afetou positivamente o desenvolvimento de plântulas de arroz. Quando estas sementes foram tratadas com NaOCl a pH 11,6 houve 100% de germinação, contra 42% quando tratadas a pH 3.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados para tamanho de parte aérea e de raiz, número de folhas e de raízes em função do tempo de exposição à solução de NaOCl.

TABELA 2 Efeito do tempo de exposição à solução de NaOCl no crescimento de plântulas de Murici-pequeno cultivadas em meio WPM 50%, sem sacarose.

Tempo (minutos)	Comprimento (cm)		Número de folhas	Número de raízes
	Parte aérea	Raiz		
1	0,05 b	0,17 b	0,35 b	0,13 b
5	0,13 b	0,77 a	1,00 b	0,37 b
10	0,26 a	1,21 a	1,75 a	0,75 a
CV%	23,51	53,26	63,84	37,58

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com nível nominal de significância de 5%.

O comprimento das raízes não foi afetado pelo pH do NaOCl, entretanto, o tempo de exposição de 5 e 10 minutos apresentou efeito positivo (Tabela 2). Já para o parâmetro comprimento da parte aérea, os melhores resultados foram obtidos a pH 7,0 e 10,0 (Tabela 1) combinados a 10 minutos de exposição à solução de NaOCl (Tabela 2).

Com relação ao parâmetro número de folhas e raízes, os melhores resultados foram obtidos com a exposição de 10 minutos (Tabela 2). Com relação aos valores de pH da solução de NaOCl, foi obtido o maior número de folhas nos valores de pH 7,0 e 10,0 (Tabela 1). O maior número de raízes foi obtido quando se utilizou o NaOCl a pH 10,0 (Tabela 1).

De maneira geral, o crescimento das plântulas foi afetado positivamente com a utilização de NaOCl a pH 7,0 ou 10,0 quando as sementes ficaram expostas por 10 minutos a essas soluções. Para essas variações de pH, ambos os componentes HOCl e OCl⁻ estão presentes na solução (Emmanuel et al., 2004) (Figura 1). Como mencionado no item 5.1.1, a água de lavagem pode não remover totalmente os componentes da solução de NaOCl utilizado na desinfestação. Portanto, seus resíduos podem influenciar no crescimento dos explantes.

Teixeira et al. (2008) constataram que a utilização de NaOCl no meio de cultura como um esterilizante químico, não só foi eficiente na esterilização do meio de cultura, mas também, favoreceu o alongamento da brotações de *Eucalyptus pellita*. Teixeira et al. (2006) confirmaram o aumento do número e do peso da biomassa fresca de rebentos de abacaxizeiro quando o NaOCl foi adicionado no meio de cultura. Segundo estes autores, esse aumento poderia estar ligado à fotossíntese já que o cloro tem a função catalisadora neste processo, especificamente na hidrólise da molécula de água. Além disso, o cloro é um elemento essencial (Emmanuel et al., 2004).

O maior crescimento dos explantes de *B. intermedia* em alguns tratamentos pode, portanto, estar diretamente relacionado aos resíduos da solução de NaOCl utilizada na desinfestação que, de acordo com o pH empregado no tratamento, possibilitou uma maior interação com o explante.

6 CONCLUSÕES

O uso do NaOCl é eficiente na desinfestação de sementes de *B. intermedia* independente da variação do pH e do tempo de exposição.

Maior comprimento de parte aérea e número de folhas é obtido em solução de NaOCl a pH 7,0 e 10,0 e maior número de raízes em pH 10, todos no tempo de exposição de 10 minutos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHUN, S-C.; SCHNEIDER, R. W.; COHN, M. A. Sodium hypochlorite: effect of solution pH on rice seed disinfestation and its direct effect on seedling growth. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 9, p. 821-824, 1997.

- EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfection using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, New York, v. 30, n. 7, p. 891-900, 2004.
- ERASMO, E. A. L.; TERRA, M. A.; DOMINGOS, V. D.; MARTINS, C. C.; COSTA, N. V. Superação da dormência em sementes de *Murdannia nudiflora* (L.) Brenan. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 273-277, 2008.
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirao Preto, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.
- FERREIRA, W. R.; RANAL, M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. var. *parahinesisi* (Bailey) sinskaja (couve-da-malásia). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 353-361, 1999.
- KHODADAD, A.; TEIMOURY, P.; ABDOLAHI, M.; SAMIEE, A. Detoxification of cyanide in a gold processing plant tailings water using calcium and sodium hypochlorite. **Mine Water and the Environment**, Berlin, v. 27, n. 2, p. 52-55, 2008.
- KIM, K.; HONG, W.; LEE, K. Disinfection characteristics of waterborne pathogenic protozoa *Giardia lamblia*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 6, n. 2, p. 95-99, 2001.
- LEN, S.-V.; HUNG, Y.-C.; CHUNG, D.; ANDERSON, J. L.; ERICKSON, M. C.; MORITA, K. Effects so storage conditions and ph on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 1, p. 209-212, 2002.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417 (abst. 321), 1980.
- LOPEZ, A.; CIANNARELLA, R.; TIRAVANTI, C. Formation of volatile halogenated by-products during chlorination of isoprotun aqueous solurions. **Chemosphere**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 269-274, 2001.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

ROCHA, M. S.; OLIVEIRA, K. C.; COSTAR, M. N.; CUNHA, A. O.; CARVALHO, J. M. F. C.; SANTOS, J. W. Métodos de regeneração *in vitro* da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 647-652, jan./abr. 2003.

ROUETTE, H-K. **Encyclopedia of textile finishing**. Berlin: Woodhead Publishing, 2001. 2765 p.

SOFIATTI, V.; ARAUJO, E. F.; ARAUJO, R. F.; REIS, M. S.; SILVA, L. V. B. D.; CARGNIN, A. Uso do hipoclorito de sódio para degradação do endocarpo de sementes de cafeeiro com diferentes graus de umidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 150-160, 2008.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 6, p. 375-378, 2006.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

YILDIZ, M.; ER, C. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 259- 261, 2002.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DAS MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM CALOS DE MURICI-PEQUENO

1 RESUMO

O Murici-pequeno (*B. intermedia* A Juss) é uma espécie frutífera e medicinal do Cerrado que apresenta potencialidades farmacológicas como outras espécies do gênero *Byrsonima*. Contudo, essa planta apresenta dificuldades de propagação por meios convencionais. O emprego de técnicas de micropropagação, como por exemplo, a embriogênese somática indireta, pode representar uma boa alternativa para a produção em larga escala desta espécie. A utilização de técnicas citoquímicas com o uso dos corantes Carmim-acético (C.A.) e Azul-de-Evans (A.E.) permite a identificação das massas pró-embriogênicas. Células com potencial embriogênico são coradas pelo C.A. e células inviáveis ao desenvolvimento embriogênico pelo A.E. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi induzir e caracterizar as massas pró-embriogênicas em calos de *B. intermedia* utilizando a dupla coloração com Carmim-acético e Azul-de-Evans. Segmentos foliares de 0,25 cm² foram extraídos de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculados em meio MS com 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,8 e suplementado com 4,52 µM de 2,4-D para a formação dos calos. Os calos passaram por três subcultivos de 60 dias cada e ao final de cada subcultivo foram coletadas amostras para os testes citoquímicos. Digitalizações das melhores preparações citológicas foram feitas para medir as áreas coloridas pelo C.A. e A.E. com auxílio do software Image Tool. Foi feita a porcentagem das respectivas áreas e os dados analisados pelo teste Skott-Knott, a 1% de probabilidade. A dupla coloração Carmim-acético/Azul-de-Evans é eficiente na identificação de células com potencial embriogênico nos diferentes subcultivos de calos. Estágios iniciais de subcultivo de calos apresentam maior porcentagem (83%) de áreas embriogênicas. Sucessivos subcultivos conduzem ao aumento da rediferenciação e morte celular em calos de Murici-pequeno.

Palavras-chave: embriogênese somática; massas pró-embriogênicas; carmim-acético; azul-de-evans; *Byrsonima intermedia* A Juss.

2 ABSTRACT

Byrsonima intermedia A Juss is a medicinal and fruit species of the Cerrado which has pharmaceutical potential like other species of the *Byrsonima* genus. Nevertheless, this plant has difficulties to be propagated by conventional methods. The application of micropropagation tools, as the indirect somatic embryogenesis, may be an alternative for the production in large scale of this species. The use of the cytochemical techniques with Aceto-carmin (A.C.) and Evans-Blue (E.B) dye enables the identification of pro-embryogenic masses. Potential embryogenic cells are labeled by A.C. dye and non potential embryogenic cells are labeled by E.B dye. The objective of this work was to establish the embryogenic potential of *Byrsonima intermedia* A Juss callus cultures from three successive subcultivations. For callus formation, 0.25 cm² leaf segments were extracted from *in vitro* cultivated seedlings and inoculated on MS medium with 3% sucrose, 0.6% agar, pH 5.8 and 2.4-D (4,52 µM). The callus was sub cultivated three times with 60 days each. At the end of each subcultivation period, samples for cytochemical tests were collected. Digitalizations of the best cytological preparations were performed using the software Image Tool in order to measure the areas stained with A.C. and E.B. dyes. Percentage of the stained areas were calculated and the data analyzed by Skott-Knott test ($p < 0,01$). Double staining with Aceto-carmin and Evans-blue is efficient to identify potential embryogenic cells in the different callus subcultivations. Initial stages of callus subcultivation presented higher percentage (83%) of embryogenic areas. Successive subcultivations promote an increase of the redifferentiation and cellular death of *Byrsonima intermedia* A Juss callus.

Keywords: somatic embryogenesis; pro-embryogenic masses; aceto-carmin; evans-blue; *Byrsomina intermedia* A Juss.

3 INTRODUÇÃO

O Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss) é uma espécie medicinal do Cerrado brasileiro, um bioma altamente ameaçado pela ação antrópica (Mittermeier et al., 2004; Vieira & Martins, 2000; Klink & Machado, 2005), que apresenta dificuldades de germinação e emergência lenta das plântulas (Lorenzi, 2002).

Devido à sua dificuldade de propagação por meios convencionais, a produção de mudas *in vitro* é uma boa alternativa tanto para recomposição da flora em áreas de ocorrência da espécie quanto para fins medicinais.

A técnica da embriogênese somática vem sendo utilizada em um grande número de espécies para a propagação de forma massal, podendo ser obtida de forma direta ou indireta, sendo que a primeira não passa pela formação de calos (Guerra et al., 1999; George et al., 2008).

Normalmente a auxina 2,4-D é utilizada para obtenção do calo embriogênico (Fehér et al., 2003; Guerra et al., 1999; George et al., 2008). O suprimento de auxina é necessário para a rápida proliferação das massas embriogênicas. Entretanto, para a diferenciação dessas massas há a necessidade de se reduzir ou eliminar a fonte de auxina do meio de cultivo (George et al., 2008).

Determinar o potencial embriogênico das culturas de calos durante os estádios do cultivo *in vitro* pode fornecer importantes informações para a continuidade de trabalhos visando a embriogênese somática.

A utilização de técnicas citoquímicas permite a identificação das massas pró-embriogênicas. Os corantes, Carmim-acético e Azul-de-Evans, permitem a identificação dessas massas (Steiner et al., 2005), pois células com potencial embriogênico são coradas em vermelho pelo Carmim-acético e células inviáveis ao desenvolvimento embriogênico são coradas pelo Azul-de-Evans. A

visualização dessas massas pró-embriogênicas, após a dupla coloração, é feita de maneira rápida e simples, com a utilização de microscopia de luz.

Muitos autores (Durzan, 1988; Hetherington & Fry, 1993; Filonova et al., 2000a, b; Smertenko et al., 2003; Suarez et al., 2004; Steiner et al., 2005; Bhargava et al., 2007; Cangahuala-Inocente et al., 2007; Valente, 2007; Gatica-Arias et al., 2008; Munhoz et al., 2008) relatam o uso desses dois corantes, em conjunto ou isoladamente, para a detecção de viabilidade celular e identificação de massas pró-embriogênicas bem como de partes do embrião, especialmente em pinófitas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi induzir e caracterizar as massas pró-embriogênicas em calos de *B. intermedia* utilizando a dupla coloração com Carmim-acético e Azul-de-Evans.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

4.1 Material botânico

Frutos maduros de *B. intermedia* foram coletados de uma população natural no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, a 918,0 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

Após a coleta, os frutos passaram por beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Os pirênios

permaneceram por três dias à sombra e em temperatura ambiente antes de serem armazenados a 4° C.

As sementes foram extraídas com auxílio de um torno e após a assepsia foram inoculadas em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), com 50% da concentração dos sais, sem sacarose. O meio foi solidificado com 0,5% de ágar e o pH aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2004).

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 \pm 2°C.

4.2 Calogênese

Foram utilizados como explantes iniciais segmentos foliares com área de 0,25 cm², obtidos de plântulas germinadas *in vitro*.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 4,52 μM de 2,4-D e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2007).

Antes da inoculação, foram feitos cortes na superfície abaxial do explante, o qual ficou em contato com o meio nutritivo. As culturas foram incubadas no escuro e em temperatura de 25⁰ \pm 2⁰C por um período de 60 dias que correspondeu à fase de indução de calos.

4.3 Desenvolvimento dos calos embriogênicos

Ao final do período de indução, a cada 60 dias de acordo com a curva de crescimento estabelecida por Nogueira et al. (2008), os calos foram transferidos para meio de cultura fresco idêntico ao de indução de calos. Essa rotina foi

realizada por três vezes caracterizando, portanto, três subcultivos (SB1, SB2 e SB3), os quais foram tomados como tratamentos. Todo o processo de indução de calos e subcultivos foram realizados nas mesmas condições descritas no item 4.2.

4.4 Análises citoquímicas

Para a avaliação do potencial embriogênico, ao final de cada subcultivo, cinco tubos de ensaio foram coletados ao acaso.

Porções de 50 mg de tecido fresco foram retiradas dos calos e levemente maceradas com o auxílio de um bastão de vidro sob vidro de relógio. Após a maceração, foram adicionadas três gotas do corante Azul-de-Evans 0,1%, o qual permaneceu em reação por três minutos. Após esse período, foi retirado o excesso de corante e adicionado três gotas do corante Carmim-acético 2%, o qual permaneceu em reação pelo mesmo tempo (Valente, 2007). Por fim, o excesso de corante foi retirado, a massa celular foi distribuída sob a superfície da lâmina e analisada em microscopia de luz, Olympus BX 60. As massas pró-embriogênicas (MPE) foram analisadas em objetivas de 10 e 40x em microscópio de luz com câmera digital acoplada.

Os melhores campos foram digitalizados e a medição das áreas coloridas foi realizada usando-se o software ImageTool. A calibragem foi feita por meio da digitalização de lâmina micrometrada fornecida pelo fabricante do equipamento utilizado nos mesmos aumentos das fotografias de acordo com Pereira et al. (2008).

Foi medida a área total, área colorida com Carmim-acético (C.A.) e área colorida com Azul-de-Evans (A.E.). De acordo com a área total, foram obtidas as porcentagens de cada área colorida para as análises estatísticas.

4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições por tratamento. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste de Skott-Knott, a 1% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dupla coloração com Carmim-acético e Azul-de-Evans

As células meristemáticas apresentam o formato isodiamétrico (Murashige & Skoog, 1962) e os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células com características meristemáticas, com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (Filonova et al., 2000a; Steiner et al., 2005; George et al., 2008).

Foi observado que o corante C.A reagiu mais fortemente com as células originárias do primeiro subcultivo – SB1 (Figura 1B). Neste, houve predomínio de células pequenas, isodiamétricas (Figura 1A). Pequenos aglomerados de células isodiamétricas também foram detectados neste subcultivo, reforçando ainda mais seu potencial embriogênico (Figura 1C). A reação com corante C.A. atingiu 83% das células (Tabela 1).

TABELA 1 Porcentagem das áreas coloridas com Carmim-acético (CA) e Azul-de-Evans (AE) em calos de *B. intermedia* A Juss. cultivados em meio MS com 3% de sacarose e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Subcultivo	CA (%) ¹	AE (%) ¹
SB1	83 a	17 c
SB2	69 b	31 b
SB3	32 c	68 a
CV (%)	19,67	31,40

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott (p> 0,01).

Ressalta-se que o início da formação de estruturas globulares ao final do período de cultivo do SB1 foi observado na superfície dos calos (Figura 1D).

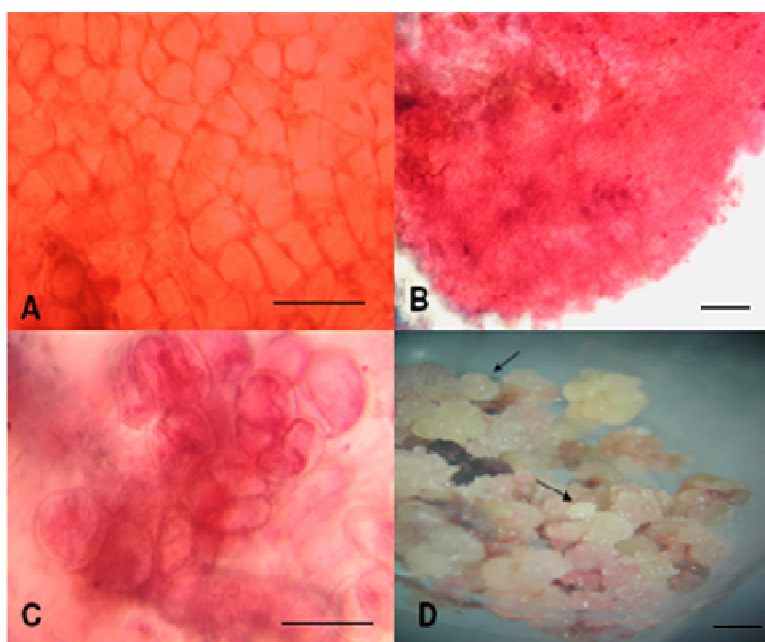


FIGURA 1 Fotos de massas celulares de SB1. Células fortemente coradas com Carmim-acético (A, B e C). (A) Células isodiamétricas em aumento de 40x. (B) Células em aumento de 10x. (C) Formação de aglomerado de células isodiamétricas. (D) Formação de estruturas globulares na superfície do calo ao final de 60 dias (setas). Barra: A e C = 50 μ m; B = 100 μ m; D = 30 mm.

O segundo subcultivo (SB2) apresentou 69% das células coloridas com C.A. (Tabela 1). Ocorreu neste subcultivo o aumento da reação ao A.E. (Figura 2B) que pode ser observado nas periferias das MPE (Figura 2A). Neste subcultivo foi observado também a presença de pequenos aglomerados de células isodiamétricas e células alongadas que reagiram ao corante A.E. (Figura 2C) com 31% de coloração (Tabela 1). Também ocorreu a formação de

pequenos embriões em estágio globular na superfície dos calos aos 60 dias de cultivo (Figura 2D).

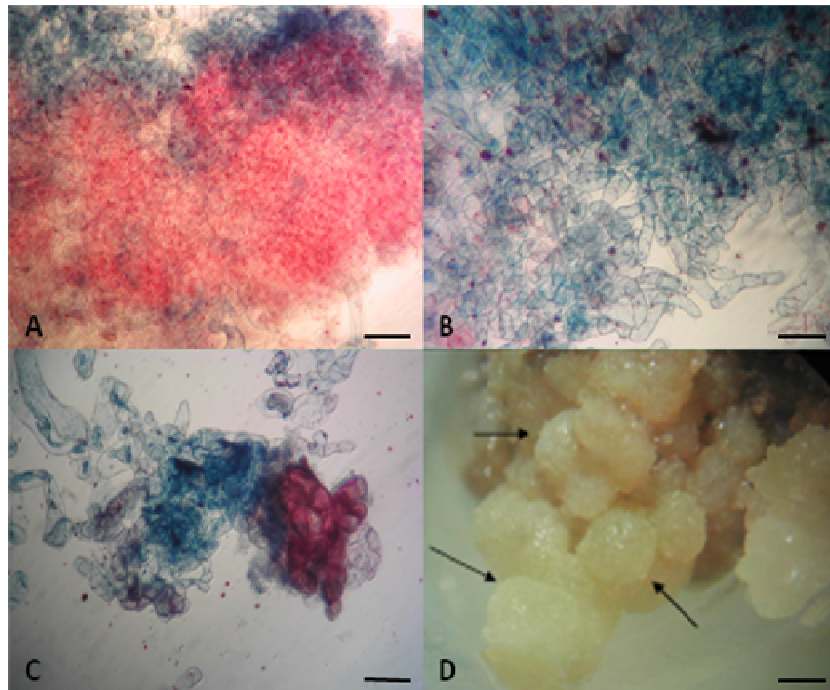


FIGURA 2 Massas celulares de segundo subcultivo. (A) Massa celular reagindo tanto ao Carmim-acético quanto ao Azul-de-Evans. (B) Forte reação ao Azul-de-Evans. (C) Células muito alongadas sensíveis ao Azul-de-Evans. (D) Grande formação de estruturas globulares na superfície do calo ao final de 60 dias. Fotos A, B e C em aumento de 10x. Barra: A, B e C = 100 μ m; D = 10 mm.

Uma tendência de aumento da coloração por A.E. foi observada no SB2 que se mostrou ainda mais intensa no terceiro subcultivo (SB3) com 68% de reação a este corante (Tabela 1). Neste, houve predomínio de coloração azul (Figura 3).

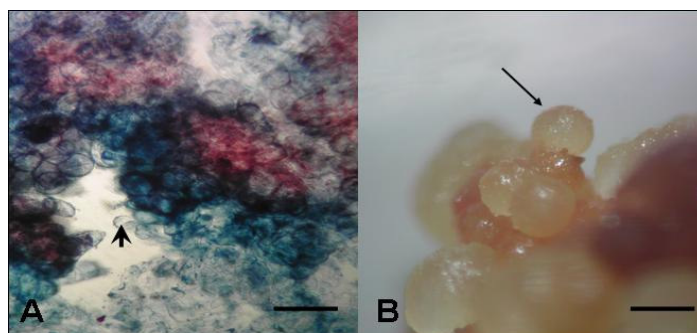


FIGURA 3 Massas celulares de terceiro subcultivo. (A) Células isodiamétricas reagindo fortemente ao Azul-de-Evans (ponta de seta), foto em aumento de 10x. (B) Grande formação de embriões, no estágio globular tardio, na superfície do calo ao final de 60 dias (seta). Barra, A e B = 100 μ m; C = 20 mm.

No SB3, foi observado uma grande formação de embriões globular na superfície dos calos ao final do período de cultivo (Figura 3B). Houve uma predominância de células coradas em azul indicando a rediferenciação celular à partir dos calos (Figura 3A).

Gatica-Arias et al. (2008), utilizaram A.E. para determinar a viabilidade de células de *Coffea arabica* em suspensão. As células inviáveis apresentavam coloração azul intensa, enquanto que células viáveis apresentavam formato isodiamétrico com núcleo e nucléolo proeminente, citoplasma denso e ausência de coloração a este corante.

5.2 Reação aos corantes citoquímicos

De acordo com Steiner et al. (2005), o uso dos corantes C.A. e A.E. possibilita a diferenciação de culturas embriogênicas. O teste para identificação de MPE fornece, portanto, uma importante informação sobre a qualidade dessas culturas. As MPE apresentam, basicamente, dois tipos de células. O primeiro grupo é composto por células isodiamétricas, pequenas e com citoplasma denso (Murashige & Skoog, 1962; Filonova et al., 2000a, b; Fehér et al., 2003; George et al., 2008). Tais células são reativas ao corante C.A., resultando em coloração

avermelhada. O outro grupo é composto por células não embrionárias, alongadas, vacuoladas e permeáveis ao A.E., resultando em coloração azulada (Filonova et al., 2000a, ; Suarez et al., 2004; Steiner et al., 2005).

A reação positiva ao C.A. pode demonstrar integridade cromossômica (Munhoz et al., 2008), e células de citoplasma denso são consideradas meristemáticas, o que também reforça a teoria da integridade cromossômica. Estas células têm competência para o desenvolvimento embriogênico (Steiner et al., 2005), o que explicaria a forte reação no primeiro subcultivo (Figura 1).

Observou-se que à medida que o material era subcultivado, reduzia-se a reação ao C.A. paralelo ao aumento à coloração ao A.E. A reação ao A.E. ocorre naquelas células que apresentam algum tipo de dano na membrana celular (Hetherington & Fry, 1993; Bhargava et al., 2007). Células alongadas reagiram mais fortemente a este corante (Figura 2C). De acordo com Filonova et al. (2000b), células altamente vacuoladas são também alongadas e a vacuolização é o primeiro sinal da morte celular. Células que estão em processo de morte celular apresentam rupturas na membrana plasmática o que permite a coloração com o A.E. (Filonova et al., 2000b; Bhargava et al., 2007).

No SB3 foi observado que até mesmo células de formato isodiamétrico apresentavam reação ao A.E. (Figura 3A – ponta de seta). Esta reação foi contrária àquela ocorrida no primeiro subcultivo, onde este tipo de célula reagiu fortemente ao C.A. No terceiro subcultivo foi constatado o menor índice de coloração ao C.A. com apenas 32% das células coradas de vermelho (Tabela 1).

De acordo com George et al. (2008), para a proliferação das MPE um suprimento de auxina é exigido. Após um período de indução da embriogênese, se a fonte de auxina é reduzida ou eliminada por completo do meio de cultivo, os embriões podem então iniciar seu desenvolvimento.

A auxina controla processos básicos de divisão e alongação celular (Fehér et al., 2002; George et al., 2008). A formação de embriões globular na

superfície dos calos pode estar relacionada à diminuição da atividade da auxina 2,4-D, possibilitando a ocorrência da polarização celular. A formação de embriões globular ocorreu nos três subcultivos, porém, se mostrou mais intensa no SB3 (Figura 3B). O fato de células isodiamétricas também ter apresentado coloração azul pode também estar relacionado ao fator auxina, não apenas pela redução na sua atividade ao longo do subcultivo, mas também pelo próprio subcultivo em si. De acordo com Smertenko et al. (2003), a diminuição dos níveis de reguladores de crescimento conduz também ao início de um processo de degradação das MPE.

Esse tipo de reação pode indicar que a condução das MPE de *Byrsonima intermedia* até o terceiro subcultivo conduz a uma maior morte celular, inclusive de células isodiamétricas com potencial embriogênico. Pode indicar ainda a redução na viabilidade devido aos sucessivos subcultivos.

Estruturas características de cultivos embriogênicos puderam ser identificadas nos três subcultivos com diferentes graus de diferenciação, como por exemplo, células isodiamétricas, células alongadas e embriões em estágio globular na superfície dos calos ao final dos subcultivos.

6 CONCLUSÕES

A dupla coloração Carmim-acético/Azul-de-Evans é eficiente na identificação de células com potencial embriogênico nos diferentes subcultivos de calos de Murici-pequeno.

Estágios iniciais de subcultivo de calos de Murici-pequeno apresentam maior porcentagem (83%) de áreas embriogênicas.

Sucessivos subcultivos conduzem ao aumento da rediferenciação e morte celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHARGAVA, A.; OSUKY, M.; FORWARD, B. S.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W.; MISRA, S. Expression of a polyphemusin variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 88, n. 3, p. 301-312, 2007.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 87-89, jul. 2007.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: FRANS SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PALNT PHYSIOLOGI, 1988, Swedish. **Proceedings...** Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. v. 8, p. 147-186.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfalfa cells: the role of auxin and stress. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 46, n. 3, p. 13-14, 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FILONOVA, L. H.; BOZHKO, P. V.; ARNOLD, S. V. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 343, p. 249-264, 2000a.

FILONOVA, L. H.; BOZHKO, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 1, p. 4399-4411, 2000b.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESQUIVEL, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1999. v. 2, p. 533-568.

HETHERINGTON, P. R.; FRY, S. Xyloglucan endotransglycosylase activity in carrot cell suspensions during cell elongation and somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, p. 987-992, 1993.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417 (abst. 321), 1980.

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

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES-GIL, P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J. D.; BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREX, J. L. FONSECA, G. **Hotspots revisited**: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: CEMEX, 2004.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

SMERTENKO, A. P.; BOZHKO, P. V.; FILONOVA, L. H.; ARNOLD, S. V.; HUSSEY, P. J. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 813-824, 2003.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

SUAREZ, M.; FILONOVA, L.; SMERTENKO, A.; SAVENKOV, E.; CLAPHAM, D.; ARNOLD, S. von; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKO, P. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, London, v. 14, n. 9, p. 339-340, 2004.

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

CAPÍTULO 4

QUANTIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CALOS DE MURICI-PEQUENO POR FDA E CTT

1 RESUMO

O Murici-pequeno, uma espécie frutífera e medicinal do Cerrado, pertence ao gênero *Byrsonima* que compreende uma série de espécies com potencial farmacológico. Como várias espécies do gênero, o Murici-pequeno apresenta dificuldades de propagação por meios convencionais, sendo assim, o emprego da embriogênese somática indireta configura-se em uma boa alternativa para a produção em larga escala desta espécie seja para recomposição florística de áreas nativas ou exploração comercial. A utilização de corantes vitais para determinar a viabilidade celular gera importantes informações para seleção de células com potencial embriogênico. Este trabalho teve por objetivo determinar a viabilidade celular de calos de Murici-pequeno obtidos a partir de segmentos foliares. Os calos passaram por três subcultivos de 60 dias em meio MS com 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,8 e 4,52 μM de 2,4-D. Os calos foram mantidos no escuro e a cada dez dias, para cada subcultivo, foram coletadas amostras para os testes de viabilidade com os corantes 3,6-diacetato de fluoresceína (FDA) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT). Células coradas por FDA foram visualizadas em microscopia de fluorescência e contabilizadas para a obtenção do percentual de células viáveis enquanto que a reação com o CTT permitiu a extração de um composto colorido que pôde ser quantificado em espectrofotômetro a $\lambda=490$ nm. A metodologia de coloração utilizada permitiu quantificar a viabilidade celular em cada subcultivo, o que possibilitou determinar o ponto de máxima viabilidade para cada um dos testes. Os melhores resultados para o teste de FDA foram obtidos no 25°, 29° e 21° dia de cultivo para primeiro (SB1), segundo (SB2) e terceiro (SB3) subcultivos, respectivamente, com 53,86; 61,88 e 53,73% de células viáveis. Para o teste de CTT, as maiores absorvâncias foram obtidas no 27°, 28° e 21° dia de cultivo para SB1, SB2 e SB3, respectivamente. A transferência dos calos deve ocorrer no 26° e 29° dia de cultivo para SB1 e SB2. O SB3 apresentou a menor viabilidade para os dois corantes testados na qual a transferência não deve ultrapassar o 21° dia de cultivo.

Palavras-chave: viabilidade celular; 3,6-diacetato de fluoresceína; cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio; subcultivos; *Byrsonima intermedia* A Juss.

2 ABSTRACT

Byrsonima intermedia A Juss, a medicinal and fruit species of the Brazilian Cerrado (savanna) belongs to *Byrsonima* genus, which has many pharmacological potential species. Like many species of this genus, the *Byrsonima intermedia* A Juss presents propagation problems by using conventional methods, and therefore, the indirect somatic embryogenesis may be considered as a promising alternative for its production, for both floristic restorations of native areas as well as commercial exploration. The use of dyes to determine the cellular viability provides important information for the selection of potential embryogenic cells. The objective of this work was to determine the cellular viability of *Byrsonima intermedia* A Juss callus obtained from leaf sections. Formed callus passed through three 60 days subcultures. The medium used was MS containing sucrose (3%), agar (0.6%) and 2,4-D (4.52 μ M). The pH was adjusted to 5.8 and the callus was maintained in dark conditions and for each ten days culture, samples were collected for the viability tests using fluorescein 3,6-diacetate (FDA) and 2,3,5-tripheniltetrazolium chloride (TTC) dyes. Stained cells by FDA test were visualized in fluorescence microscopy and accounted to obtain the percentage of viable cells while TTC reaction allowed the extraction of a colourful compound, quantified in a spectrophotometer at $\lambda= 490$ nm. The stain methodology used allowed the quantification of cellular viability in each subculture which enabled to determine the maximum viability point of each test. The best results using the FDA test were obtained at the 25^o, 29^o and 21^o day of culture for the first (SB1), second (SB2) and third (SB3) subcultures respectively, showing 53,86; 61,88 and 53,73% of viable cells. For the TTC test, higher absorbance's were observed at the 27^o, 28^o and 21^o day of culture for SB1, SB2 and SB3 respectively. Callus transference should occur at the 26^o and 29^o culture day for SB1 and SB2 subcultures, respectively. The subculture SB3 presented the lowest viability for both dyes on which transference may not exceed the 21^o culture day.

Keywords: cell viability; fluorescein 3,6-diacetate; 2,3,5-tripheniltetrazolium chloride; subculture; *Byrsonima intermedia* A Juss.

3 INTRODUÇÃO

A utilização de corantes vitais para determinar a viabilidade celular gera importantes informações para seleção de células com potencial embriogênico (Nogueira, 2006). As células de maior potencial embriogênico são pequenas, isodiamétricas e possuem citoplasma denso (Filonova et al., 2000; Fehér et al., 2003).

Os corantes, 3,6-diacetato de fluoresceína (FDA) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT), são amplamente utilizados na determinação de viabilidade celular. De acordo com Clarke et al. (2001), apenas células vivas podem converter o não fluorescente FDA em fluoresceína, um composto fluorescente, mediante a ação de uma esterase não específica. A grande vantagem deste método é a rapidez com que as células podem ser visualizadas sob microscópio de fluorescência. O CTT é também um corante vital que ao ser inserido na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, é reduzido em um composto de coloração vermelho intenso, o trifenilformazan ou simplesmente “Formazan” (Amutha et al., 2007). O formazan pode ser extraído em etanol e quantificado espectrofotômicamente (Zapata et al., 1991). Enquanto o FDA é mais eficiente para contagem de células sob microscópio, o CTT é mais eficiente na quantificação da viabilidade em agregados celulares maiores (Steponkus, 1971; Whitters, 1985; Ishikawa et al., 1995).

A combinação dessas duas técnicas pode nos permitir desenvolver um método prático e simples de determinação da viabilidade celular. Identificar, ainda durante a fase de calos, o momento de maior disponibilidade e viabilidade celular, faz dessa metodologia uma ferramenta a ser aplicada em trabalhos que visam a embriogênese somática, tornando-os mais ágeis e eficientes.

Nesta perspectiva, este trabalho teve por objetivo utilizar o FDA e o CTT na quantificação da viabilidade celular de calos de *Byrsonima intermedia*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

4.1 Material botânico

Frutos maduros de *B. intermedia* foram coletados de uma população natural localizada no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, a 918,0 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

Após a coleta, os frutos passaram por beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Os pirênios permaneceram por três dias à sombra e em temperatura ambiente antes de serem armazenados a 4° C.

As sementes foram extraídas com auxílio de um torno e após a assepsia foram inoculadas em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), com 50% da concentração dos sais, sem sacarose. O meio foi solidificado com 0,5% de ágar e o pH aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2004).

Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 \pm 2°C para obtenção de plântulas.

Segmentos foliares de *B. intermedia*, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 4,52 μM de 2,4-D e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e o pH ajustado para 5,8

antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2007).

Os explantes permaneceram no escuro por 60 dias caracterizando o período de indução a calogênese. Após esse período, os calos passaram por três subcultivos (SB1, SB2 e SB3) sucessivos de 60 dias cada e, para cada subcultivo, foram extraídas amostras para os testes de viabilidade.

4.2 Coleta das amostras

Para cada subcultivo, em intervalos de 10 dias a partir da inoculação, a amostragem foi feita de forma aleatória, coletando-se pequenas porções de calos que constituíram a amostra final do subcultivo. A amostra final foi cuidadosamente homogeneizada e as frações separadas para as análises de viabilidade celular com 3,6-Diacetato de fluoresceína (FDA) e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT).

Para determinar a viabilidade celular com FDA, foram tomadas amostras contendo 1g de matéria fresca por dia de coleta.

Para determinar a viabilidade celular com CTT, foram tomadas amostras contendo 0,5g de matéria fresca por dia de coleta.

4.3 Testes com FDA

Cada amostra contendo 1g de calos foi homogeneizada em 10 mL de solução de manitol 0,6M e CaCl₂ 0,03M, pH (5,8) (Filonova et al., 2000) por 30 minutos a 90 rpm e em temperatura de 27 ± 2°C. Na ausência de luz, as amostras foram filtradas em peneira de 100µm, retirados 980µL da suspensão e adicionado 20µL de uma solução com 5µg mL⁻¹ de FDA, resultando em 0,1µg mL⁻¹ de concentração final de FDA. Após 5 minutos, foram feitas as preparações citológicas e realizada a contagem de células embriogênicas viáveis em microscópio de fluorescência, Olympus BX 60, com filtro WIBA.

Para cada subcultivo, foi realizada a contagem de 1000 células, 200 células por lâmina, para cada dia de análise. Foi totalizada a porcentagem de células isodiamétricas e alongadas no decorrer dos subcultivos e plotada a curva de viabilidade celular.

4.4 Testes com CTT

Amostras contendo 500 mg de calos foram subdivididas em cinco amostras de 100 mg cada.

Em tubos de ensaio, cada amostra de 100 mg foi homogeneizada em três mililitros do reagente de CTT 0,6% (p/v) preparado em solução-tampão fosfato pH 7,4. A mistura foi incubada por 24 horas, no escuro, a 28°C. Após esse período, foram adicionados sete mililitros de etanol 95% (v/v) no tubo. O composto colorido, Formazan, foi extraído mediante incubação dos tubos em água fervente durante quatro minutos. Após a extração do Formazan, o material foi centrifugado por duas vezes a 6000 rpm durante 20 minutos para a separação dos sólidos. O sobrenadante foi reservado para as leituras de absorbância.

Foi feita a curva padrão, absorbância/peso fresco de calos com cinco leituras de absorbância para cada ponto da curva e a viabilidade celular foi expressa como absorbância/g de peso fresco de acordo com Benson (1994). Para cada subcultivo foram realizadas cinco leituras de absorbância por dia de amostragem. O espectrofotômetro utilizado foi um Beckman modelo DU®640B a 490 nm de comprimento de onda.

4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado na forma de parcela subdividida no tempo em esquema fatorial (3 subcultivos x 7 dias de coleta). A parcela experimental foi composta por 75 tubos de ensaio por subcultivo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade celular com FDA

Os testes com FDA, mostraram diferenças significativas entre subcultivos ($p=0,0003$), de acordo com o teste Tukey com nível nominal de significância de 5% (Figura 1).

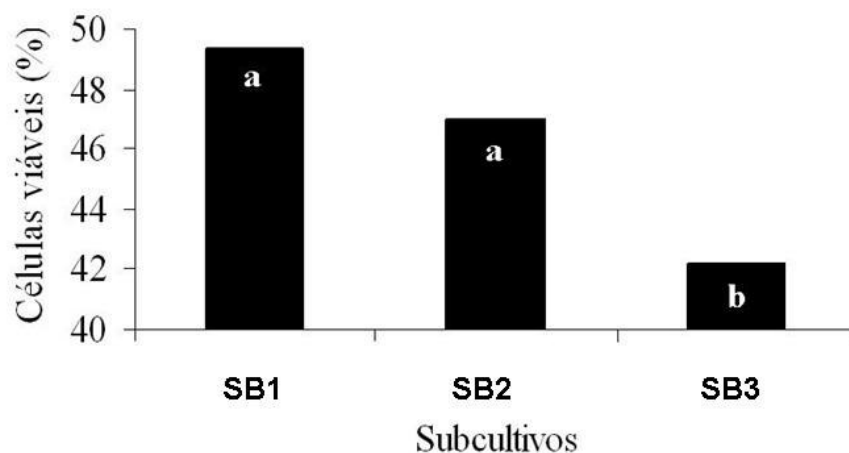


FIGURA 1 Média geral para número de células viáveis (isodiamétricas) para os três subcultivos. Barras que receberam a mesma letra não diferem entre si com nível nominal de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Para o SB1, a maior porcentagem de células isodiamétricas, 53,86%, foi alcançada no 25º dia de cultivo (Figura 2). Para o SB2, a maior porcentagem ocorreu no 29º dia de cultivo com 61,88% de células viáveis (Figura 3). Para o SB3, no 21º dia foram obtidos 53,73% de células viáveis (Figura 4).

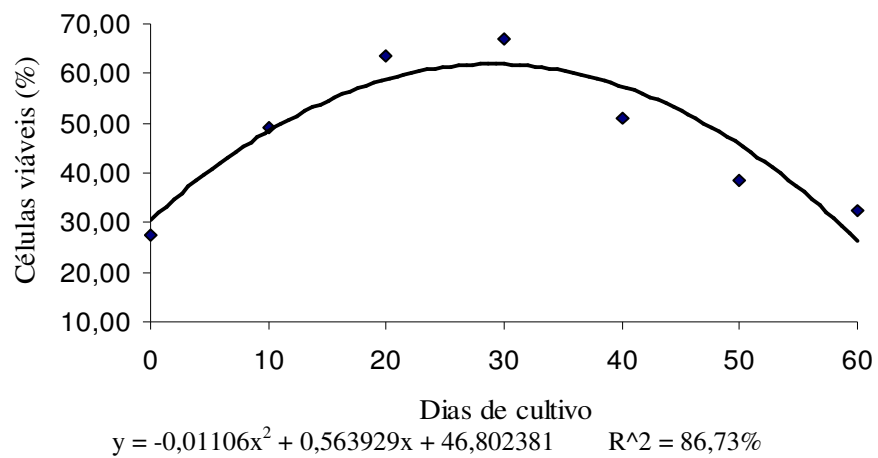


FIGURA 2 Viabilidade celular pelo teste de FDA para SB1.

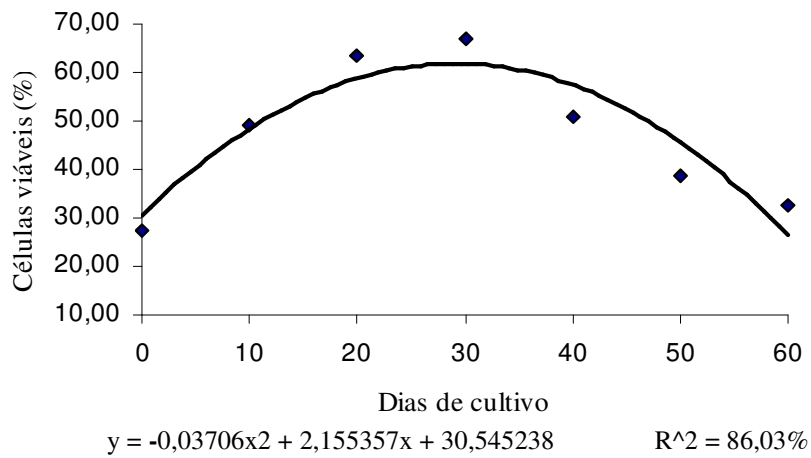


FIGURA 3 Viabilidade celular pelo teste de FDA para SB2.

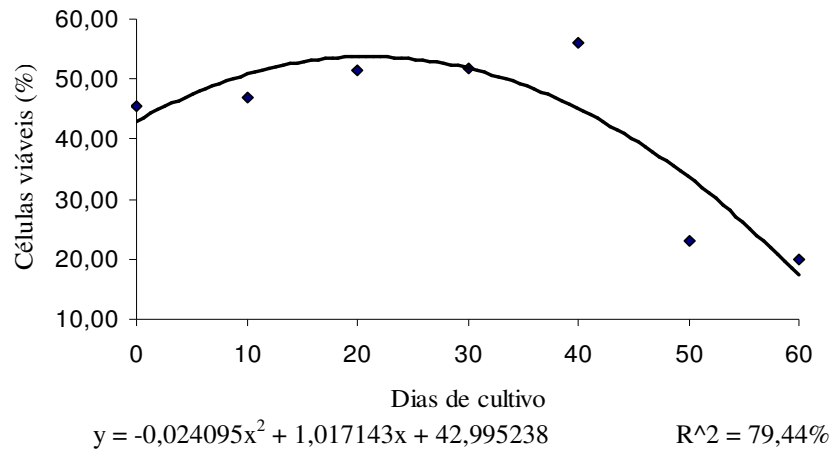


FIGURA 4 Viabilidade celular pelo teste de FDA para SB3.

A utilização do FDA como medida de viabilidade celular tem sido reportada por diversos autores (Chand et al., 1994; Clarke et al., 2001; Fehér et al., 2003; Filonova et al., 2000; Fojtova & Kovarik, 2000; Gilbert et al., 1992; Iakimova et al., 2005; Kovarik & Fojtova, 1999; Nogueira, 2006; Steward et al., 1999; Swisher & Carroll, 1980).

Quando as moléculas de FDA, uma substância não polar e não fluorescente, entram em contato com células vivas, ocorre a hidrolização por parte de esterases ligadas a membrana plasmática que removem moléculas de acetato. Tal reação resulta no acúmulo de moléculas de fluoresceína no citoplasma, uma substância fluorescente e polar. Devido a essa polaridade a fluoresceína fica retida na célula por não conseguir atravessar a membrana plasmática e ao serem excitadas por uma fonte de luz, emitem fluorescência verde. Tal particularidade permite a visualização e contabilização de células em microscópio de fluorescência de maneira rápida e confiável. As células alongadas (Figura 5A), embora vivas, são classificadas como não viáveis e células isodiamétricas (Figura 5B), são classificadas como viáveis ao desenvolvimento embrionário.

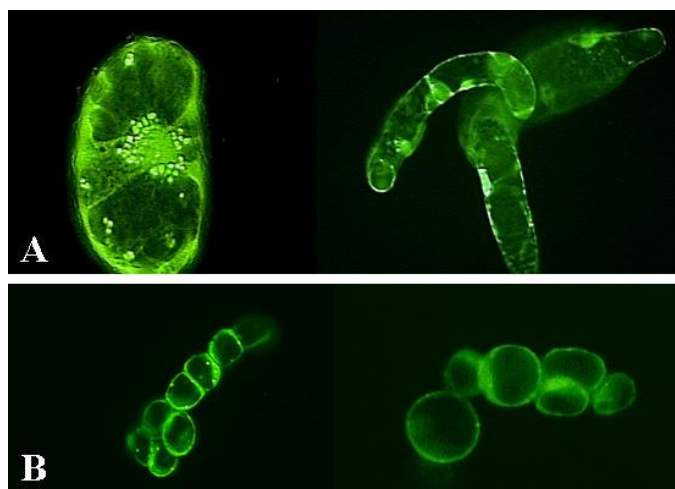


FIGURA 5 Células coradas com FDA em microscopia de fluorescência. (A) Células alongadas. (B) Células isodiamétricas.

5.2 Viabilidade com CTT

A extração do Formazan (Figura 6) permitiu a obtenção da curva padrão absorvância/massa fresca de calos (Anexo A, Figura 1).

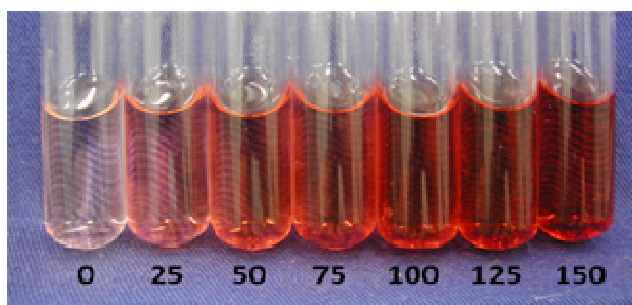


FIGURA 6 Extração de Formazan em diferentes pesos (mg) de massa fresca de calos de *B. intermedia* para obtenção da curva padrão.

Os testes com CTT, mostraram diferenças significativas entre subcultivos ($p=0,0000$), de acordo com o teste Tukey com nível nominal de significância de 5% (Figura 7).

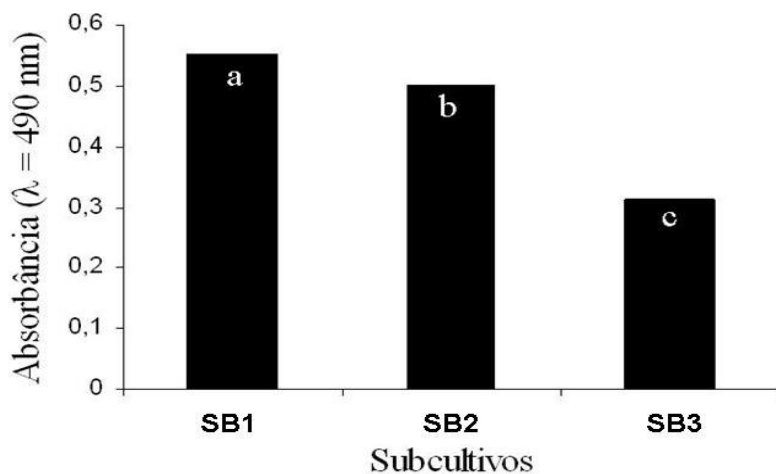


FIGURA 7 Média geral de absorbância para os três subcultivos. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si com nível nominal de significância de 5% pelo teste Tukey.

Apesar de diferenças pontuais com relação à absorbância máxima para os três subcultivos serem observadas, bem como o dia de ocorrência dessas absorbâncias, o fator dias de coleta foi significativo ($p=0,0000$) para os subcultivos. Na Figura 8 é apresentado o comportamento geral das coletas para os subcultivos. A derivada da equação de regressão geral para as coletas indica que no 25º dia de cultivo ocorreu a maior absorbância (0,56897), sugerindo, portanto, uma data intermediária para o máximo de viabilidade com CTT, com relação aos dados pontuais apresentados para os três subcultivos separadamente (Figura 9, 10, e 11). Conhecer os valores máximos de viabilidade pelo teste de CTT para cada subcultivo é relevante, pois podem auxiliar na tomada de decisão quanto ao tempo de subcultivo.

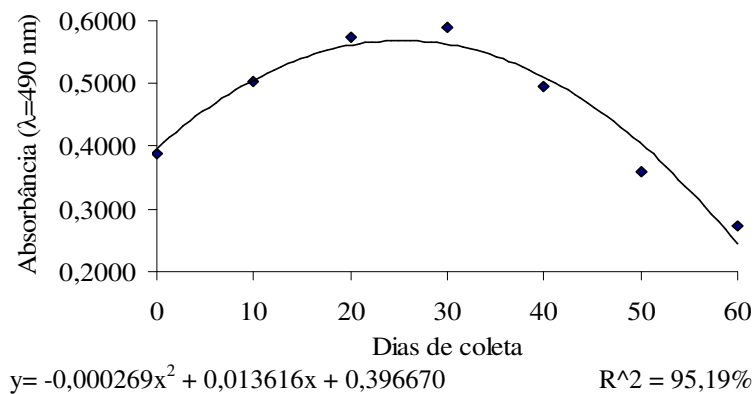


FIGURA 8 Regressão geral para absorvância em função dos dias de coletas.

De acordo com a derivada das equações da reta para os três subcultivos pode-se constatar que a viabilidade máxima ocorreu no 27°, 28° e 21° dia de cultivo, onde foram obtidos os máximos valores de absorvância (0,6924; 0,6190 e 0,3938) para o SB1, SB2 e SB3, respectivamente (Figuras 10, 11 e 12). Estes valores estão compreendidos dentro do intervalo de segurança da curva padrão o que mostra a confiabilidade desses dados (Figura 7).

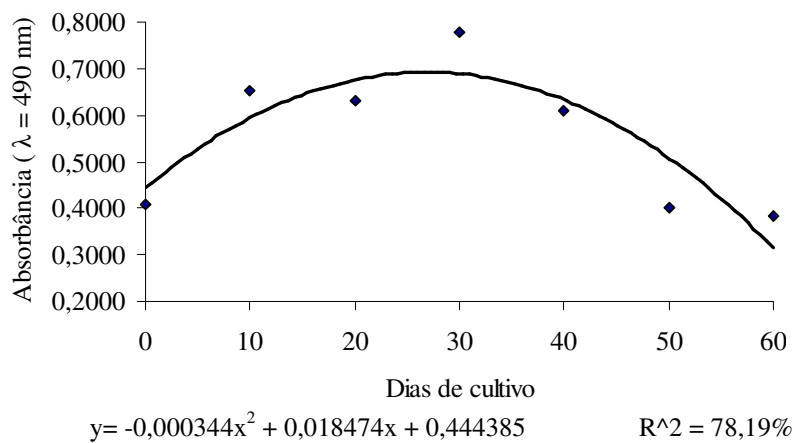


FIGURA 9 Viabilidade celular com CTT para SB1.

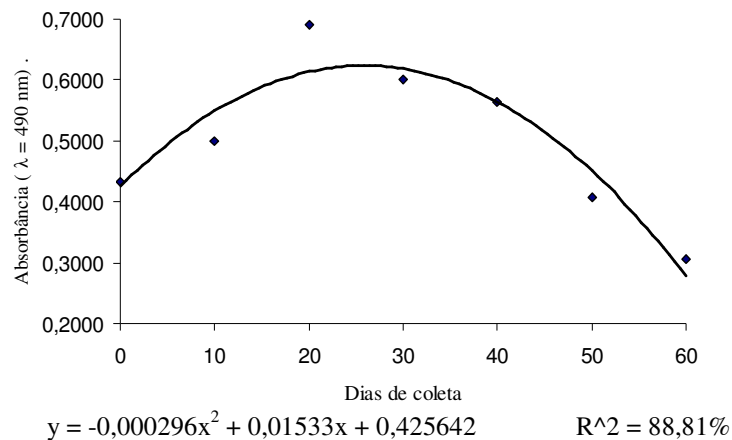


FIGURA 10 Viabilidade com CTT para SB2.

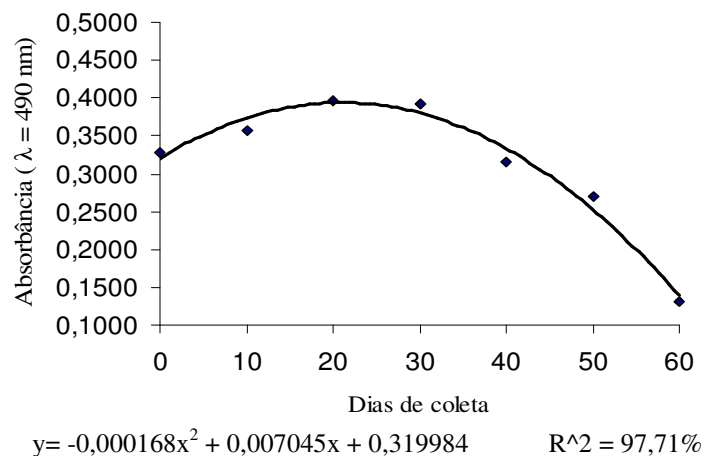


FIGURA 11 Viabilidade com CTT para SB3.

A utilização do teste de CTT como medida de viabilidade tem sido reportada por muitos autores. Mikula et al. (2006) utilizaram teste de CTT para verificar a viabilidade celular de culturas embriogênicas de diferentes espécies vegetais criopreservadas. Lyngved et al. (2008) trabalhando com massas pró-embriogênicas de *Cyclamen persicum* também fizeram uso do teste de CTT. Xu

& Huang (2008) testaram a viabilidade de raízes de *Agrostis scabra* submetidas a diferentes estresses por temperatura. Sadia et al. (2003), pesquisando os efeitos do descongelamento de suspensões celulares de *Solanum tuberosum* criopreservadas, utilizaram o teste de CTT como medida de viabilidade. Munhoz et al. (2008), testaram vários corantes para viabilidade polínica de *Carica papaya* e constatou que o CTT foi o único método que apresentou resultados semelhantes à estimativa da viabilidade polínica em testes *in vitro*.

O CTT é uma substância solúvel em água que na sua passagem pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Amutha et al., 2007) é convertida em Formazan, uma substância insolúvel em água, mas solúvel em etanol (Zapata et al., 1991). O teste de CTT indica, portanto, não apenas a presença de células vivas, mas também, seu estado metabólico. Quanto maior o número de células vivas e maior sua atividade metabólica, maior será a quantidade de Formazan produzida. Portanto, este teste indica também o grau de viabilidade do tecido (Nam et al., 1998). Como células mortas não convertem o CTT em formazan, este é um teste confiável para mensurar a viabilidade celular.

5.3 Viabilidade celular e curva de crescimento dos calos de *B. intermedia*.

5.3.1 Curva de crescimento

De acordo com Nogueira et al. (2008), a curva de crescimento de calos de *B. intermedia*, a partir de segmentos foliares, se comporta da seguinte maneira: a fase lag ocorre até o 20º dia, a exponencial vai do 20º ao 40º dia, a fase linear ocorre do 40º ao 60º dia, entre o 60º e o 80º ocorre a fase de desaceleração, do 80º ao 100º ocorre a fase de estabilização e a partir do 100º inicia-se a fase de declínio.

5.3.2 Primeiro subcultivo (SB1)

Os testes de FDA e CTT indicaram que a viabilidade máxima para o SB1 ocorreu no 25º e 27º dia, com 53,86% de células viáveis e 0,6924 de absorbância máxima, respectivamente (Tabela 1). Este período de cultivo corresponde ao início da fase exponencial da curva de crescimento dos calos de *B. intermedia*. Esta fase é caracterizada pela rápida divisão celular (Santos et al., 2003; Serra et al., 2000). Diferentemente do SB2 e SB3, o maior número de células viáveis coradas com FDA ocorreu dois dias antes da maior viabilidade celular encontrada com CTT.

Tabela 1 Viabilidade celular de calos de Murici-pequeno pelo teste de FDA e CTT para os três subcultivos (SB1, SB2 e SB3). (DMV) dia de maior viabilidade. (%) porcentagem de células coradas por FDA. (DMA) dia de máxima absorbância. (Abs) absorbância.

		Subcultivos		
		SB1	SB2	SB3
FDA	DMV	25	29	21
	(%)	53,86	61,88	53,73
CTT	DMA	27	28	21
	Abs	0,6924	0,6190	0,3938

Tal fato pode indicar que o período de indução, quando a calogênese foi induzida em explantes foliares durante 60 dias antes do início do SB1, tenha sido muito longo. Isso pode ter levado ao aumento da fase lag neste primeiro subcultivo. A fase lag caracteriza-se pela ausência de divisões celulares, aquisição de competência para o início de um novo ciclo de divisões, concomitante com aumento significativo no nível de metabolismo celular (Santos et al., 2003; Serra et al., 2000). Isto poderia explicar o fato da maior viabilidade pelo teste de CTT ter sido encontrada neste subcultivo e de ter ocorrido após a maior viabilidade com teste de FDA.

O fator auxina também pode ter relação com esses resultados, pois o período de subcultivo é longo, 60 dias, e as auxinas degradam-se rapidamente no meio de cultivo (Fehér et al., 2003; George et al., 2008). Embora o regulador de crescimento 2,4-D apresente grande estabilidade no meio de cultura, não sofrendo oxidação, quando absorvido pelo tecido a taxa de degradação e conjugação pode ser bem rápida (George et al., 2008).

O fato de a viabilidade celular pelo teste de FDA iniciar seu declínio precocemente neste subcultivo reforça a idéia de que o período de indução a calogênese foi muito longo, sugerindo que ensaios de viabilidade celular também devem ser feitos durante a fase de indução desse processo.

5.3.3 Segundo subcultivo (SB2)

Para o SB2, os resultados indicaram que os maiores índices de viabilidade pelo teste de FDA e CTT ocorreram no 29º e 28º dia de cultivo, com 61,88% de células viáveis e absorbância máxima de 0,6190, respectivamente (Tabela 1). Embora o valor em absorbância seja 10,61% inferior quando comparado com o SB1, a viabilidade máxima para os dois testes ocorreu muito próxima. Além disso, a viabilidade com FDA é 12,96% superior em relação ao primeiro subcultivo.

Essas duas medidas de viabilidade estão compreendidas próximas da região mediana da fase exponencial de crescimento dos calos. Esta fase é caracterizada pela rápida divisão celular (Santos et al., 2003; Serra et al., 2000), o que pode explicar a maior porcentagem de células viáveis coradas com FDA logo após a maior viabilidade com teste de CTT.

O resultado da viabilidade celular com FDA para este subcultivo está muito próximo daquele encontrado por Nogueira (2006), onde 61% de células viáveis foram obtidas no 33º dia de cultivo de acordo com a derivada da equação da reta.

5.3.4 Terceiro subcultivo (SB3)

Para o SB3, os maiores índices de viabilidade pelo teste de FDA e CTT ocorreram no 21º dia de cultivo, início da fase exponencial e final da fase lag, com 53,73% de células coradas com FDA e absorvância máxima de 0,3938, respectivamente (Tabela 1). Neste subcultivo, a maior viabilidade com teste de FDA é 13,17% inferior ao SB2. Com relação ao teste de CTT, ocorreu uma redução na viabilidade celular de 36,38% e 43,13% em relação ao segundo e primeiro subcultivos, respectivamente.

O fato da menor viabilidade com relação ao teste de CTT ter sido encontrada neste subcultivo, principalmente durante o intervalo entre o final da fase lag, quando o metabolismo celular é mais intenso, e início de fase exponencial, onde se iniciam as divisões celulares, reflete uma clara redução no número de células vivas bem como no seu metabolismo respiratório.

6 CONCLUSÕES

Testes de viabilidade utilizando CTT e FDA apontam que os calos devem ser transferidos para subcultivos sequenciais no 26º e 29º dia de cultivo, para o primeiro e segundo subcultivos, respectivamente.

O terceiro subcultivo apresenta a menor viabilidade celular para os dois corantes testados e a transferência não deve ultrapassar o 21º de cultivo.

Com base na curva geral para dias de coleta, de acordo com o teste de CTT, a transferência de todos os subcultivos deve ser feita no 25º dia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUTHA, R.; MUTHULAKSMI, S.; RANI, W. B.; INDIRA, K.; MAREESWARI, P. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high temperature stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 245-251, 2007.

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture – a practical approach**. 2.ed. Oxford: IRL, 1994. 194 p.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 47, n. 11, p. 1295-1304, 1994.

CLARKE, J. M.; GILLINGS, M. R.; ALTAVILLA, N.; BEATTIE, A. J. Potencial problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 261-267, 2001.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, 2000.

FOJTOVÁ, M.; KOVARIK, A. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 531-537, 2000.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1.

GILBERT, F.; GALGANI, F.; CADIOU, Y. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. **Marine Biology**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 199-205, 1992.

- IAKIMOVA, E.; KAPCHINA-TOTEVA, V.; JONG, A.; ATANASSOV, A.; WOLTERING, E. Involvement of ethylene, oxidative stress and lipid-derived signals in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. **BMC Plant Biology**, Yalta, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2005.
- ISHIKAWA, M.; ROBERTSON, A. J.; GUSTA, L. V. Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells. **Plant Science**, Limerick, v. 107, n. 1, p. 83-93, 1995.
- KOVARIK, A.; FOJTOVA, M. Estimation of viable cell count after fluorescein diacetate staining using phosphorimager analysis. **Bio Techniques**, Natick, v. 27, p. 685-688, 1999.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron spp.* **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417 (abst. 321), 1980.
- LYNGEVED, R.; SNIPEN, L. G.; IVERSEN, T-H.; HVOSLEF-EIDE, A. K. Influence of potential growth factors on the production of proembryogenic masses of *Cyclamen persicum* Mill. in bioreactors. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 53-59, 2008.
- MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZNSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana spp.* cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 28, n. 4, p. 315-324, 2006.
- MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- NAM, B-H.; JIN, H-J.; KIM, S-K.; HONG, Y-K. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 31-36, 1998.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de Murici-pequeno** (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2006. 41 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

SADIA, B.; ANTONY, P.; LOWE, K. C.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Culture treatments for enhancing post-thaw recovery of cryopreserved suspension cells of potato cv. *Desiree*. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wrocław, v. 8, n. 1, p. 979-989, 2003.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar *rubi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, 2003.

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

STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of plant tissue cultures. **Cryobiology**, San Diego, v. 8, n. 4, p. 386-387, 1971.

STEWART, N.; MARTIN, R.; EMGASSER, J. M. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 2, p. 171-176, 1999.

SWISHER, R.; CARROLL, G. C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology**, New York, v. 6, n. 3, p. 217-226, 1980.

WHITERS, L. A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: VASIL, J. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants. Cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation**. Orlando, Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 253-316.

XU, C.; HUANG, B. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrotis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 15, p. 4248-4194, 2008.

ZAPATA, M. J.; SALINAS, C.; CALDERÓN, A. A.; MUÑOZ, R.; BARCELÓ, A. R. Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by the KCN-insensitive, salicylhydroxamic acid-sensitive alternative respiratory pathway of mitochondria from cultured grapevine cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 11, p. 579-582, 1991.

CAPÍTULO 5

SUSPENSÃO CELULAR DE MURICI-PEQUENO

1 RESUMO

A suspensão celular destina-se a obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, evitando possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura e são comumente iniciadas pela inoculação de calos friáveis. A cultura de células em suspensão pode ser utilizada para estudos de metabolismo, assimilação de nutrientes, desenvolvimento embrionário e para produção massal por meio da embriogênese somática. O Murici-pequeno é uma espécie medicinal do Cerrado que apresenta dificuldades de propagação por vias convencionais. Tendo em vista essa questão, neste trabalho buscou-se avaliar o efeito dos reguladores CIN e ANA na formação de células isodiamétricas e alongadas em suspensão celular de Murici-pequeno. Calos friáveis obtidos a partir de segmentos foliares, passaram por três subcultivos de 60 dias em meio MS com 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,8 e suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Ao final de cada subcultivo, os callus foram inoculados em meio líquido. Para as suspensões, foram utilizadas diferentes combinações dos reguladores de crescimento CIN (0,0; 0,5 e 2,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹) em meio MS com 3% de sacarose, pH 5,8. Foi avaliado o número de células total, isodiamétrica e alongada. O maior número de células alongadas e isodiamétrica foram encontrados no terceiro subcultivo utilizando a concentração de 1,0 de ANA.

Palavras-chave: suspensão celular; células isodiamétricas; reguladores de crescimento; *Byrsonima intermedia* A Juss.

2 ABSTRACT

The cell suspension is obtained through the proliferation of cells in liquid medium under continuous stirring avoiding possible nutritional and gaseous gradients in the culture medium, commonly initiated using friable callus. The culture of cell in suspension can be used for metabolism studies, nutrient assimilation, embryony development and for massal production using somatic embryogenic. *Byrsonima intermedia* A. Juss. is a medicinal species from the Brazilian Cerrado (savanna) which presents propagation problem by conventional way. The objective of the present work was to evaluate the effect of the growth regulators, kinetin (KIN) and naphthalene acetic acid (NAA), in the formation of isodiametric and elongated cells on cell suspension of *Byrsonima intermedia* A. Juss. Friable callus obtained from leaf sections were subcultured three times (60 days each) in MS medium containing sucrose (3%), agar (0.6%) and 2,4-D (1.0 mg L⁻¹). At the end of each subculture, callus was inoculated in liquid medium. For the suspensions, different combinations of the growth regulators KIN (0.0; 0.5 and 2.0 mg L⁻¹) and NAA (0.0; 0.1 and 1.0 mg L⁻¹) were tested using MS medium containing sucrose (3%) and pH adjusted to 5.8. The variables evaluated were: number of total, isodiametric and elongated cells. The highest number of elongated and isodiametric cells was observed in the third subculture using 1.0 mg L⁻¹ NAA

Keywords: cell suspension; isodiametric cells; growth regulator; *Byrsomina intermedia* A Juss.

3 INTRODUÇÃO

A suspensão celular destina-se à obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, evitando possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura (Torres et al., 1998), e são comumente iniciadas pela inoculação de calos friáveis (George et al., 2008).

Culturas de células em suspensão podem ser utilizadas para diversos estudos como: metabolismo primário, secundário e extração de produtos de importância comercial, obtenção de protoplastos com organelas intactas, assimilação de nutrientes, desenvolvimento embrionário (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Suspensões celulares embriogênicas são amplamente utilizadas para produção massal de clones, manipulação e transformação genética de plantas (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006). Exibem alta taxa de divisão celular (Gurel et al., 2002) e as condições de cultivo podem ser mais facilmente controladas, pela adição de meio fresco ou troca de meio em seus diferentes níveis de composição, permitindo crescimento mais acelerado que o cultivo de calos e proporcionando maior uniformidade (George et al., 2008).

O Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é uma planta medicinal e nativa do Cerrado (Rodrigues & Carvalho, 2001). Recentemente, investigações químicas com algumas espécies do gênero *Byrsonima* tem resultado no isolamento de diversos compostos de interesse farmacológico (Sannomiya et al., 2007). Além disso, esta espécie apresenta dificuldades de propagação por meios convencionas devido à baixa taxa de germinação e emergência lenta de plântulas (Lorenzi, 2002).

Devido a essas características, o desenvolvimento de um protocolo de regeneração de plantas via embriogênese somática por cultivo celular em suspensão pode, subsidiar com material biológico trabalhos que visem a

micropropagação da espécie auxiliando e fornecendo aos programas de conservação do Cerrado espécimes para o repovoamento em áreas de ocorrência, como também fornecer material biológico para pesquisas de interesse farmacológico e da biotecnologia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

4.1 Material botânico

Frutos maduros de *B. intermedia* foram coletados de uma população natural localizada no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, a 918,0 m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9°00'W GRW.

Após a coleta, os frutos passaram por beneficiamento, com retirada da polpa, imersão em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e lavagem em água corrente com auxílio de peneira por 10 minutos. Os pirênios permaneceram por três dias à sombra e em temperatura ambiente antes de serem armazenados a 4° C.

As sementes foram extraídas com auxílio de um torno e após a assepsia foram inoculadas em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), com 50% da concentração dos sais, sem sacarose. O meio foi solidificado com 0,5% de ágar e o pH aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2004).

Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 \pm 2°C para obtenção das plântulas.

Para a obtenção dos calos foram utilizados como explante inicial segmentos foliares de área de 0,25 cm². Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 4,52 µM de 2,4-D e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos de acordo com o protocolo estabelecido por Nogueira et al. (2007).

Após o período de indução da calogênese, os calos passaram por três subcultivos (SB1, SB2 E SB3) de 60 dias, em meio idêntico ao de indução.

Para iniciar o estabelecimento da suspensão celular, foram utilizados calos friáveis obtidos de cada um dos subcultivos.

4.2 Suspensão celular

Ao final de 60 dias, para os três subcultivos, foram coletados 0,5 g de calos friáveis e inoculados em frascos de 270 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS líquido (Murashige & Skoog, 1962), com 3% de sacarose, 0,1% de carvão ativado e suplementado com diferentes combinações de cinetina (CIN) 0,0; 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ e ácido naftaleno acético (ANA) 0,0; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹. O pH foi aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

As suspensões celulares foram mantidas em mesa agitadora a 110 rpm, em sala de crescimento, sob irradiância de 43 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

Ao final de 60 dias de cultivo em suspensão, foi contabilizado o número de células isodiamétricas, alongadas e total para cada tratamento, com a utilização de câmara de Neubauer e microscopia de luz. A estimativa do número total de células isodiamétricas, alongadas e total por mililitro de suspensão foi obtido pela multiplicação do valor estimado de células por 10⁴, de acordo com Loyola-Vargas & Vázquez-Flota (2006).

4.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

Foi utilizado na condução do experimento o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições em que os tratamentos constituíam-se de três subcultivos (SB1, SB2 e SB3), três diferentes concentrações de CIN (0; 0,5 e 2,0 mg L⁻¹) e três diferentes concentrações de ANA (0; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). Foram medidas as seguintes variáveis: Peso fresco (g), número de células isodiamétricas, número de células alongadas e número de células totais.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijkl} = \nu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha_i\beta_j + \alpha_i\delta_k + \beta_j\delta_k + \alpha_i\beta_j\delta_k + \varepsilon_{ijkl},$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu o i-ésimo tipo de subcultivo, j-ésima concentração de CIN, e k-ésima concentração de ANA, com $l = 1, \dots, r$;

ν é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito do i-ésimo subcultivo, com $i = 1, \dots, 3$;

β_j é o efeito da j-ésima concentração de CIN, com $j = 1, \dots, 3$;

δ_k é o efeito da k-ésima concentração de ANA, com $k = 1, \dots, 3$;

$\alpha_i\beta_j$ é o efeito da interação entre o i-ésimo subcultivo e a j-ésima concentração de CIN;

$\alpha_i\delta_k$ é o efeito da interação entre o i-ésimo subcultivo e a k-ésima concentração de ANA;

$\beta_j \delta_k$ é o efeito da interação entre o j-ésima concentração de CIN e a k-ésima concentração de ANA;

$\alpha_i \beta_j \delta_k$ é o efeito da interação entre o i-ésima subcultivo, a j-ésima concentração de CIN e a k-ésima concentração de ANA;

ε_{ijkl} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Para as variáveis número de células isodiamétricas, alongadas e número total, foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados.

Os dados de número de células caracterizam-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logarítmica, dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i)$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo o delineamento experimental, dado por:

$$\eta = \nu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha_i \beta_j + \alpha_i \delta_k + \beta_j \delta_k + \alpha_i \beta_j \delta_k + \varepsilon_{ijkl}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de células isodiamétricas, alongadas e totais

5.1.1 Células isodiamétricas

Para análise de Deviance do número de células isodiamétricas, houve efeito significativo da interação tripla entre subcultivo, concentração de CIN e concentrações de ANA (Tabela 1).

TABELA 1 Análise de Deviance para número de células isodiamétricas segundo os tratamentos estudados.

Fonte de variação	G. L.	Deviance	valor-p
Subcultivo (S)	2	3,569	0,1680
Concentração de CIN (K)	2	2,181	0,3360
Concentração de ANA (A)	2	10,874	0,0040
S x K	4	10,479	0,0330
S x A	4	11,644	0,0200
K x A	4	10,466	0,0330
S x K x A	8	27,917	0,0005
Erro	54	68,271	

Na ausência de CIN ocorreram diferenças significativas entre os subcultivos, com relação às células isodiamétricas, na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA, em que se observou que o SB2 foi superior ao SB3 (Figura 1).

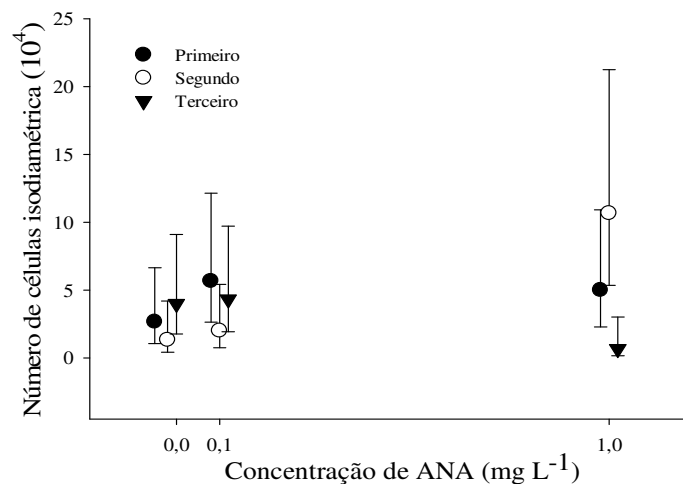


FIGURA 1 Valores médios estimados (pontos) para ausência de CIN e respectivo intervalo de confiança do número de células isodiamétricas em função das concentrações de ANA.

Somente para a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA observou-se diferenças significativas entre o primeiro e o terceiro subcultivos, sendo que no SB3 foi observado o maior número de células isodiamétricas (Figura 2).

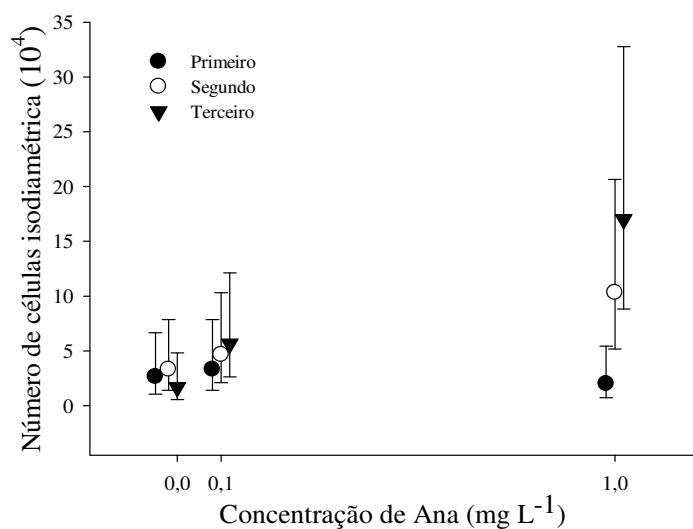


FIGURA 2 Valores médios estimados (pontos) para concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN e respectivo intervalo de confiança do número de células isodiamétricas em função das concentrações de ANA.

Para a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN combinados com diferentes concentrações de ANA, não houve diferenças significativas entre os subcultivos, quando fixadas as concentrações de ANA (Figura 3).

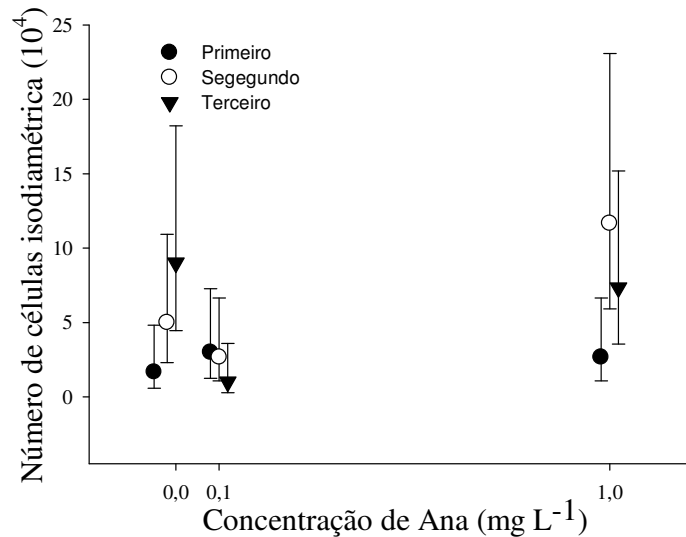
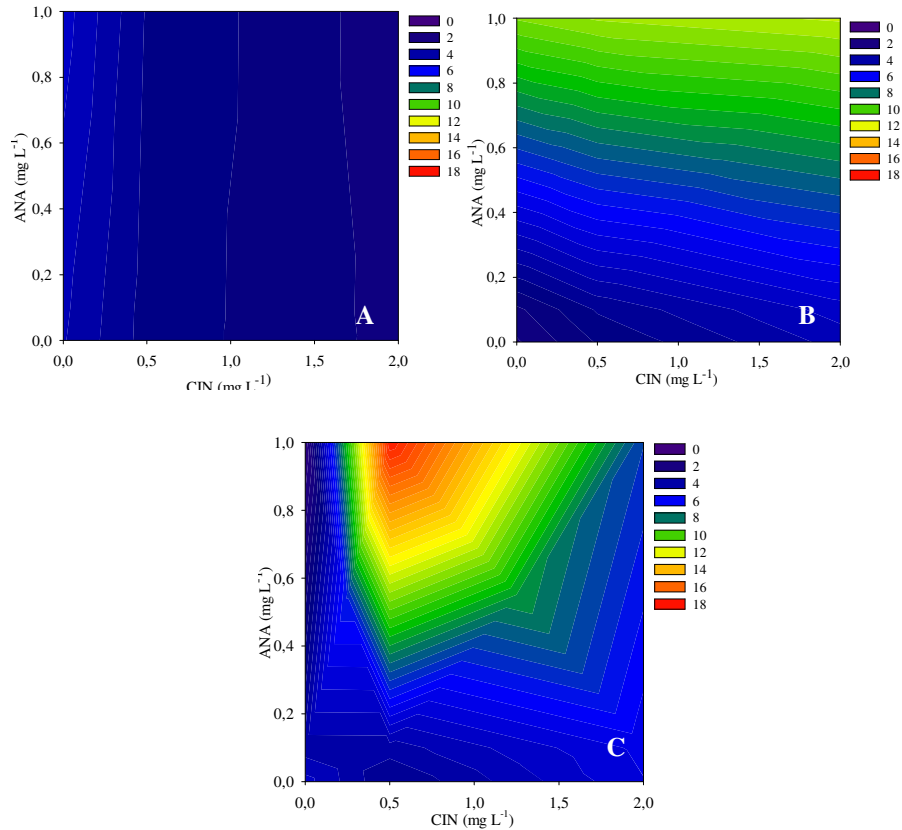


FIGURA 3 Valores médios estimados (pontos) para concentração de 2,0 mg L⁻¹ de CIN e respectivo intervalo de confiança do número de células isodiamétricas em função das concentrações de ANA.

Para as células isodiamétricas em diferentes concentrações combinadas de CIN e ANA, no SB1, foi encontrado valores médios próximos a zero em todas as concentrações, sugerindo que houve influência desses reguladores (Figura 4A). Já no SB2 concentrações mais elevadas de ANA combinadas com concentrações de CIN apresentaram maiores quantidades de células isodiamétricas (Figura 4B). Para o SB3 o maior número de células isodiamétricas foi encontrado em altas concentrações de ANA e no intervalo entre 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de CIN (Figura 4C).



$y = 1,3952 + 0,1292A - 0,5728K - 0,1748AK$ (Figura A)
 $y = 3,00826 + 0,1571A - 0,0499K - 0,6896AK$ (Figura B)
 $y = 1,5172 + 1,5437K - 1,6711K^2 - 1,8794A + 12,1774 AK - 10,0225AK^2$ (Figura C)

FIGURA 4 Valores médios estimados para o número de células isodiamétricas em função das concentrações de CIN e ANA para SB1 (A), SB2 (B) e SB3 (C). Nas equações K representa as concentrações de CIN e A de ANA.

Pode-se observar que o aumento na concentração de ANA para as três concentrações de CIN tendeu a aumentar o número de células isodiamétricas (Figura 1, 2 e 3). Estas apresentam características meristemáticas podendo, portanto, se diferenciarem em embriões somáticos (Murashige & Skoog, 1962; Filonova et al., 2000; Fehér et al., 2003).

Wai-Leng & Lai-Keng (2004), trabalhando com suspensão celular de *Orthosiphon stamineus*, relataram melhores resultados quando utilizaram 1,0 mg L⁻¹ de ANA em meio MS. Wang et al. (1996), utilizando CIN e ANA nas concentrações de 1,0 e 0,2 mg L⁻¹, respectivamente, induziram maior formação de células isodiamétricas em suspensão celular de *Elymus giganteus* Vahl.

5.1.2 Células alongadas

Os resultados da Tabela 2 demonstram efeito significativo da interação tripla entre subcultivos, concentração de CIN e concentração de ANA.

TABELA 2 Análise de deviance para número de células alongada segundo os tratamentos estudados.

Fonte de variação	G. L.	Deviance	valor-p
Subcultivo (S)	2	6,923	0,0310
Concentração de CIN (K)	2	0,300	0,8610
Concentração de ANA (A)	2	35,323	<0,0001
S x K	4	7,215	0,1250
S x A	4	1,982	0,7390
K x A	4	11,487	0,0220
S x K x A	8	44,775	<0,0001
Erro	54	57,871	

Na ausência de CIN combinado com diferentes concentrações de ANA observou-se que na concentração de 0,1 mg L⁻¹ o SB2 apresentou maior número de células alongadas que o SB1, e na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ onde os dois subcultivos apresentaram maior número de células alongadas do que o observado para SB3 (Figura 5).

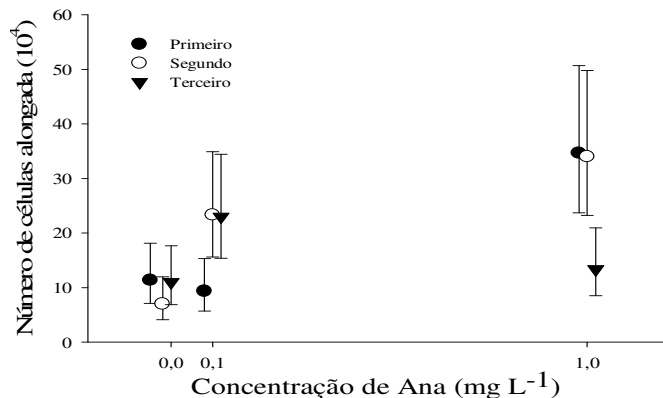


FIGURA 5 Valores médios estimados (pontos) para ausência de CIN e respectivo intervalo de confiança do número de células alongadas em função das concentrações de ANA.

Na concentração de 0,1 mg L⁻¹ de CIN combinado com diferentes concentrações de ANA não foi observada diferença significativa, dentro das diferentes concentrações de ANA (Figura 6 e 7).

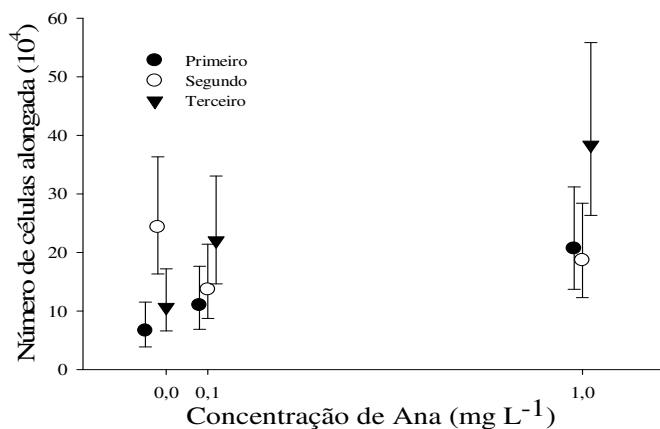


FIGURA 6 Valores médios estimados (pontos) para concentração de 0,5 mg L⁻¹ de CIN e respectivo intervalo de confiança do número de células alongadas em função das concentrações de ANA.

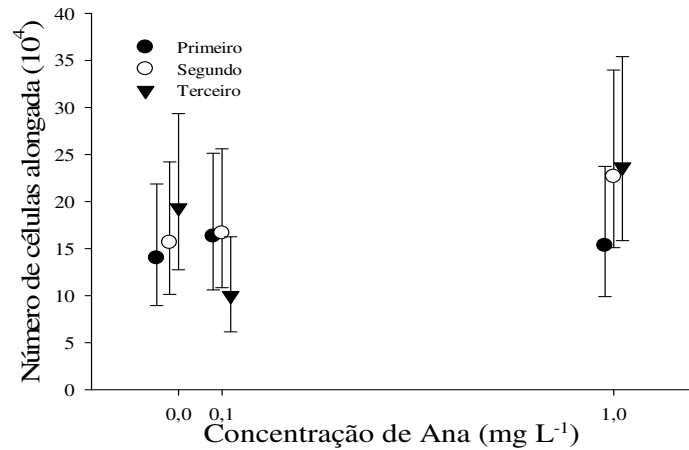
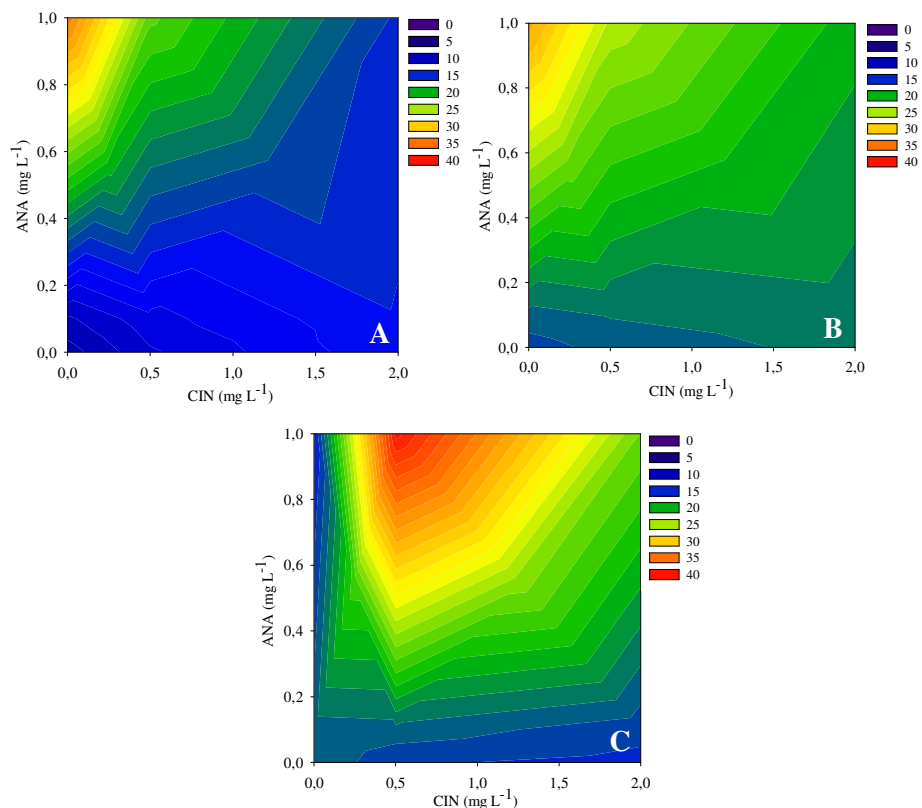


FIGURA 7 Valores médios estimados (pontos) para concentração de 2,0 mg L⁻¹ de CIN e respectivo intervalo de confiança do número de células alongadas em função das concentrações de ANA.

Para o número de células alongadas no SB1 (Figura 8A), em baixas concentrações de CIN e altas de ANA, verificou-se maior número de células, resultado semelhante ao encontrado no SB2 (Figura 8B) para as mesmas concentrações dos reguladores. Contudo, para o SB3, o maior número de células foi observado em altas concentrações de ANA e no intervalo de 0,5 e 1,0 mg L de CIN (Figura 8C).



$$y = 2,1438 + 1,3758A + 0,4812K - 1,3111AK \text{ (Figura A)}$$

$$y = 2,7299 + 0,7096A + 0,1278K - 0,5837AK \text{ (Figura B)}$$

$$y = 2,8262 - 0,2939K + 0,1538K^2 - 0,1942AK - 3,3191 AK^2 \text{ (Figura C)}$$

FIGURA 8 Valores médios estimados para o número de células alongadas em função das concentrações de CIN e ANA para o SB1 (A), SB2 (B) e SB3 (C). Nas equações, K representa as concentrações de CIN e A de ANA.

5.1.3 Células totais

Na análise do número de células totais, verificou-se efeito significativo da interação tripla entre subcultivos, concentração de CIN e concentração de ANA (Tabela 3).

TABELA 3 Análise de Deviance para número total de células segundo os tratamentos estudados.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Deviance	valor-p
Subcultivo (S)	2	8,473	0,0140
Concentração de CIN (K)	2	0,926	0,6290
Concentração de ANA (A)	2	40,961	<0,0001
S x K	4	10,658	0,0310
S x A	4	0,750	0,9450
K x A	4	14,155	0,0070
S x K x A	8	49,416	<0,0001
Erro	54	57,432	

Para o número total de células na ausência de cinetina combinada com diferentes concentrações de ANA, o primeiro e segundo subcultivos diferenciaram-se significativamente do SB3 na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA, não havendo diferenciação dos subcultivos nas demais concentrações de ANA (Figura 9).

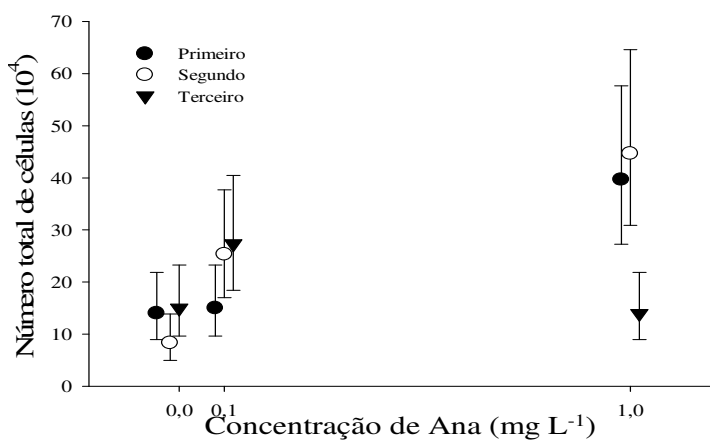


FIGURA 9 Valores médios estimados (pontos) para concentração 0 de CIN e respectivo intervalo de confiança do número total de células em função das concentrações de ANA.

Na Figura 10 o número total de células, na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN em diferentes concentrações de ANA demonstrou que na ausência de ANA, o SB2 apresentou valores médios superiores ao do SB1, e que na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, o SB3 apresentou maior número de células que no primeiro.

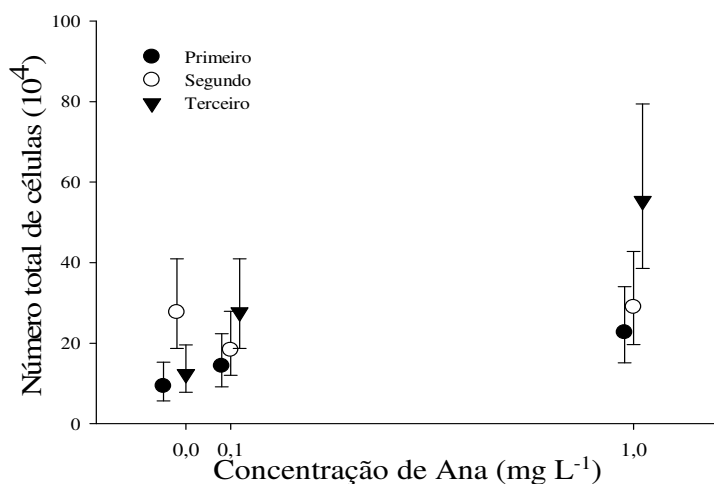


FIGURA 10 Valores médios estimados (pontos) para concentração $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN e respectivo intervalo de confiança do número total de células em função das concentrações de ANA.

Na Figura 11 observa-se que na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN, nas diferentes concentrações de ANA, houve uma sobreposição dos subcultivos nas concentrações de ANA.

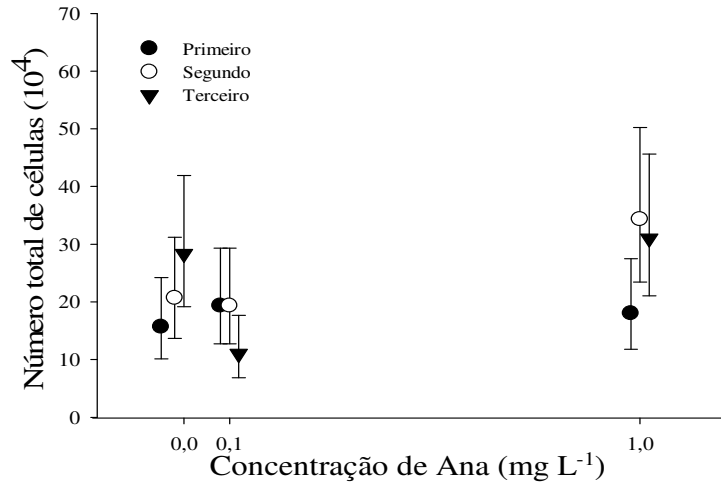
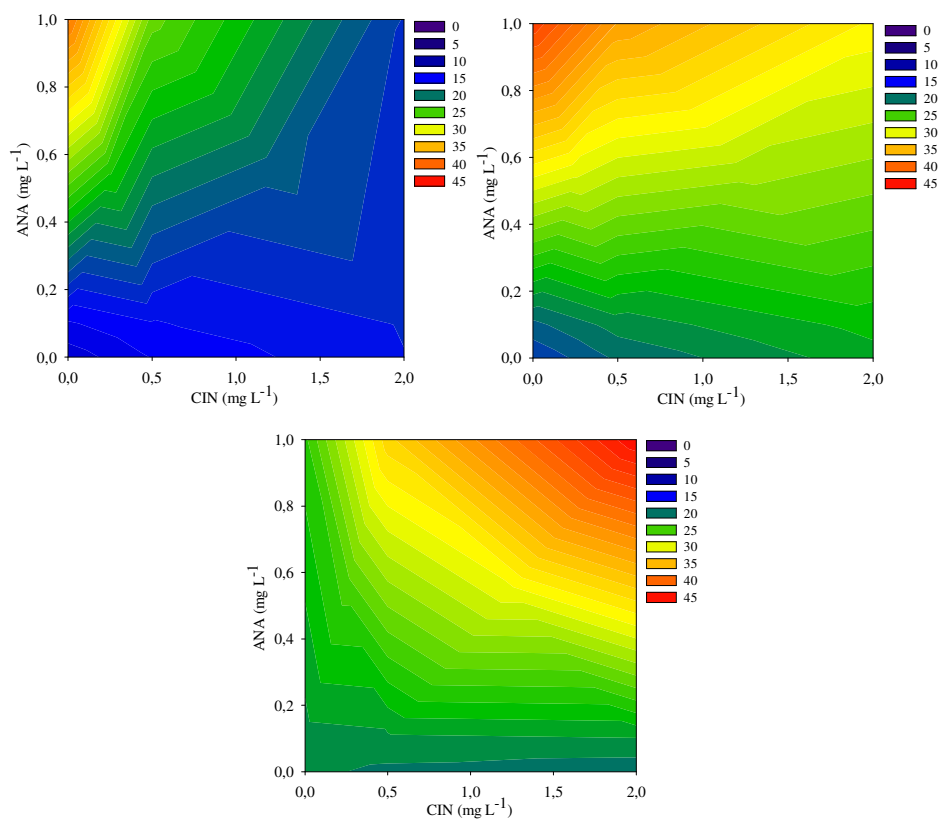


FIGURA 11 Valores médios estimados (pontos) para concentração 2,0 mg L⁻¹ de CIN e respectivo intervalo de confiança do número total de células em função das concentrações de ANA.

Para o primeiro subcultivo maior número de células totais foi encontrado em altas concentrações de ANA e baixas concentrações de CIN tendendo ao maior número de células, próximo à ausência de CIN (Figura 12A).



$$y = 2,5165 + 1,1303A + 0,2545K - 1,074AK \quad (\text{Figura A})$$

$$y = 2,8388 + 0,8942A + 0,2328K - 0,5397AK \quad (\text{Figura B})$$

$$y = 3,0083 + 0,1571A - 0,0499K + 0,6896AK \quad (\text{Figura C})$$

FIGURA 12 Valores médios estimados para o número total de células em função das concentrações de CIN e ANA para SB1 (A), SB2 (B) e SB3 (C). Nas equações, K representa as concentrações de CIN e A de ANA.

No SB2 obteve-se maior número de células totais quando se utilizou maiores concentrações de ANA combinadas com baixas concentrações de CIN (Figura 12B). No SB3 maior número de células totais foi observado em concentrações superiores de CIN combinadas com o aumento da concentração de ANA (Figura 12C).

Citocininas e auxinas são constantemente utilizadas em conjunto para estimular a divisão celular e controlar a morfogênese em cultura de tecidos. Enquanto as auxinas exercem funções sobre a replicação do DNA, induzindo as divisões celulares, as citocininas controlam e promovem processos mitóticos (George et al., 2008).

Na literatura a utilização de CIN e ANA tem sido relatada em diferentes trabalhos visando a obtenção de cultivos embriogênicos (Wang et al., 1996; Rout et al., 1997; Morais-Lino et al., 2008).

Rout et al. (1997) estabeleceram suspensões celulares de *Echinochloa colona* utilizando 1,0 mg L⁻¹ de ANA combinado com BAP e 2,4-D nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹, respectivamente. Entretanto, Wakita et al. (1996), conseguiram melhores resultados no cultivo de células em suspensão de *Betula platyphylla* var. *Japonica* utilizando somente ANA na concentração de 0,186 mg L⁻¹.

No SB1 foi observada a presença de formação de raízes em todas as combinações testadas de CIN e ANA (dados não mostrados) (Figura 19)



FIGURA 19 Formação de raízes em calos do SB1 após a inoculação em meio MS líquido suplementado com diferentes concentrações de CIN e ANA.

6 CONCLUSÕES

Concentrações mais elevadas de ANA e períodos prolongados (180 dias) de subcultivo de calos de Murici-pequeno conduzem a obtenção de um maior número de células isodiamétricas e alongadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, 2000.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1.

GUREL, S.; GUREL, E.; KAYA, Z. Establishment of cell suspension cultures and plant regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Turkish Journal of Botany**, Tübitag, v. 26, p. 197-205, 2002.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron spp.* **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417 (abst. 321), 1980.

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

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2.ed. Totowa: Humana, 2006. 416 p.

MORAIS-LINO, L. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SILVA, S. O.; SANTANA, J. R. F.; KOBAYASHI, A. K. Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1325-1330, out. 2008.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

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

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Regeneration of metal tolerant grass *Echinochloa colona* via somatic embryogenesis from suspension culture. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 40, n. 1, p. 17-23, 1997.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R. P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. D.; SANTOS, F. V.; SERPELONI, J. M.; CÓLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 2, p. 319-326, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa/SPI, 1998. 1509 p.

WAI-LENG, L.; LAI-KENG, C. Establishment of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for cell growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, n. 2, p. 101-106, 2004.

WANG, L.; WANG, X.; HUANG, B. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from single cell suspension cultures of *Elymus giganteus* Vahl. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 11, p. 865-868, 1996.

WAKITA, Y.; SASAMOTO, H.; YOKOTA, S.; YOSHIZAWA, N. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *Japonica*. **Plant Tissue Culture Letters**, v. 13, n. 1, p. 49-54, 1996.

ANEXO A

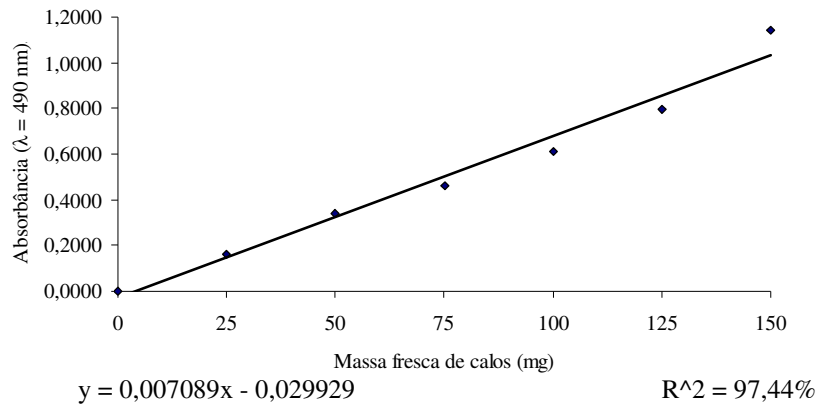


Figura 1 Curva padrão de calos de *B. intermedia* submetidos ao teste do CTT. Leituras de absorbância a $\lambda = 490$ nm.