



PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Annona glabra* L.

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI

2000

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Annona glabra* L.

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



Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

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

Deccetti, Soami Fernanda Caio

Propagação *In Vitro* de *Annona glabra* L. / Soami Fernanda Caio Deccetti. --
Lavras : UFLA, 2000.

101 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Annona glabra*. 2. Araticum. 3. Cultura de tecido. 4. Micropropagação. 5.
Propagação *In Vitro*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.41

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Annona glabra* L.

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

APROVADA em 18 de dezembro de 2000

Prof. MOACIR PASCOAL

UFLA

Pesq. LEONARDO FERREIRA DUTRA

UFLA



Prof. RENATO PAIVA, PhD.

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Romero e Vera

Às minhas irmãs Rojana, Ludmila e Jessica

À avó Flora e a tia Lúcia

Ao Bruninho

**Ao Palelo e a Elka, sem os quais esta etapa da vida
não teria o menor brilho**

DEDICO

À minha mãe Vera e a minha irmã Rojana.

Grandes mulheres, exemplos de determinação.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

Ao prof. Renato Paiva pela confiança e orientação.

Aos Professores do Curso de Fisiologia Vegetal José Donizete Alves, Luiz Edson Mota de Oliveira, Angela Maria Soares, Amauri Alves de Alvarenga, Nelson Delú Filho e Marcelo Murad Magalhães pelos ensinamentos.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal: Mauro, Evaristo, Joel, Odorêncio, Lena, Dartagnan e Izonel, pelo apoio e agradável convívio.

Ao Prof. Eduardo Bearzotti pela orientação nas análises estatísticas.

Aos amigos: José Carlos, Rupert, Nair, Edna, Cíntia, Rúbia, Ana Hortência, Darlan, Alessandro e Ranieri.

Aos amigos Jorge, Breno e Ana Gabriela pela imensurável ajuda.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes nessa etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI, filha de Vera Aparecida Caio Deccetti e Romero Deccetti, nasceu em 01 de setembro de 1974 em Santo André-SP. Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras em 1993, concluindo-o em novembro de 1998. Durante a realização do curso de graduação foi monitora de Fisiologia Vegetal, participou de projetos de pesquisa, no setor de Fisiologia Vegetal/Departamento de Biologia e foi bolsista de iniciação científica (CNPq-PIBIC), sob orientação dos profs. Renato Paiva e Luiz Edson Mota de Oliveira. Iniciou o Curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras em 1998, concluindo-o em 2000.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Descrição da espécie	2
2.2 Propagação convencional e Cultura de Tecidos.....	5
CAPÍTULO II. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CONVENCIONAL DE <i>Annona glabra</i> L.	11
1.RESUMO.....	11
2.ABSTRACT.....	11
3.INTRODUÇÃO.....	12
4.REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4.1 Germinação.....	13
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1 Germinação <i>in vitro</i>	16
5.1.1 Obtenção e desinfestação das sementes.....	16
5.1.2 Inoculação dos explantes.....	16
5.1.3 Aclimatização.....	17
5.2 Germinação <i>in vivo</i>	19
5.3 Avaliações e análises estatísticas.....	19
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
7.CONCLUSÕES.....	29
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

CAPÍTULO III. INDUÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES ATRAVÉS DA PROLIFERAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM SEGMENTOS NODAIS DE *Annona glabra* L.34

1.RESUMO.....	34
2.ABSTRACT.....	34
3.INTRODUÇÃO.....	35
4.REFERENCIAL TEÓRICO.....	36
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Obtenção e assepsia dos explantes.....	38
5.2 Inoculação dos explantes.....	39
5.3 Análises estatísticas.....	40
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
7.CONCLUSÕES.....	46
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

CAPÍTULO IV. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE *Annona glabra* L.51

1.RESUMO.....	51
2.ABSTRACT.....	51
3.INTRODUÇÃO.....	52
4.REFERENCIAL TEÓRICO.....	52
4.1 Enraizamento <i>in vitro</i>	52
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	55
5.1 Enraizamento <i>in vitro</i>	55
5.2 Análises estatísticas.....	56
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
7.CONCLUSÕES.....	66

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
-----------------------------------	----

CAPÍTULO V. ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE *Annona glabra* L. OBTIDAS POR MICROPROPAGAÇÃO.....70

1.RESUMO.....	70
2.ABSTRACT.....	70
3.INTRODUÇÃO.....	71
4.REFERENCIAL TEÓRICO.....	71
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	76
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
7.CONCLUSÕES.....	81
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CAPÍTULO VI. INDUÇÃO DE FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E INTERNODAIS DE *Annona glabra* L.86

1.RESUMO.....	86
2.ABSTRACT.....	86
3.INTRODUÇÃO.....	87
4.REFERENCIAL TEÓRICO.....	87
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	89
5.1 Obtenção e assepsia dos explantes.....	89
5.2 Inoculação dos explantes.....	90
5.3 Análises estatísticas.....	91
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
7.CONCLUSÕES.....	97
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ANEXO.....	100
-------------------	------------

RESUMO

DECCETTI, S.F.C. Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L. Lavras: UFLA, 2000, 101p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)

A *Annona glabra* L. é uma frutífera nativa, que tem merecido destaque em função da capacidade de adaptação em diversos ambientes e às propriedades biológicas de substâncias isoladas de suas folhas, frutos e sementes. Entretanto, os métodos convencionais utilizados na propagação da espécie, tem limitado à obtenção de novos indivíduos e contribuído para produção de plantas heterogêneas e com características agrônômicas indesejáveis. O presente estudo teve por objetivo estabelecer metodologias alternativas para a propagação da *Annona glabra* L. Os resultados indicaram que a germinação *in vitro*, de sementes pode contribuir para reduzir em 65 dias (43%) o tempo para a formação das mudas, desde que as sementes utilizadas tenham sido armazenadas sob condições de temperatura e umidade, que garantam sua viabilidade. Boa percentagem de germinação (80 - 90%) pode ser obtida, utilizando-se concentrações de sacarose entre 1,2 e 2,3 g/L, sem a adição de GA₃, o qual reduz o percentual de sementes que germinam. A produção expressiva de calos, a partir de segmentos foliares, foi obtida utilizando-se a combinação de TDZ e 2,4-D em concentrações superiores a 4,0 mg/L, enquanto que a produção máxima de calos, a partir de segmentos internodais, foi obtida sem a adição de reguladores de crescimento. Para a micropropagação da espécie, brotações mais alongadas e ideais para a fase posterior de enraizamento podem ser obtidas, utilizando-se até 0,75 mg/L de BAP, sem a adição de GA₃, o qual inibiu o desenvolvimento das brotações. Para o enraizamento dessas brotações recomenda-se o uso de até 1,0 mg/L de AIB e pH, ajustado para 5,0. O controle da umidade relativa do ar e da intensidade luminosa no local de aclimatização, garantiu 100% de sobrevivência das mudas obtidas por micropropagação.

Orientador: Renato Paiva – UFLA.

ABSTRACT

DECCEITI, S.F.C. *In vitro* propagation of *Annona glabra* L Lavras: UFLA, 2000, 101p. (Dissertation - Masters in Agronomy/Plant Physiology)

The *Annona glabra* L. is an important native fruit tree due to its capability to adapt to different environments and the biological properties of compounds isolated from leaves, fruits and seeds. Nevertheless, traditional propagation methods have limited the obtention of new individuals and contributed to produce heterogeneous plants with undesirable agronomic characteristics. The objective of the present work was to establish alternative propagation methodologies for *Annona glabra* L. The results indicated that *in vitro* seed germination can reduce in 65 days (43%) the period for seedling formation, once the seeds are maintained under temperature and humidity conditions which preserve their viability. A reasonable germination (80-90%) can be obtained using sucrose concentrations between 1.2 and 2.3 g/L in the absence of GA₃ which presence may reduce seed germination. While expressive callus formation from leaf segments can be obtained using the combination of TDZ and 2,4-D with concentrations above 4.0 mg/L, callus formed from nodal segments was obtained in the absence of growth regulators. For the species micropropagation, elongated shoots used for root induction can be obtained using BAP concentrations up to 0.75 mg/L without the addition of GA₃ whose presence inhibited shoot development. For rooting of these shoots, it is recommended the use of IBA up to 1.0 mg/L with pH adjusted to 5.0. The control of air relative humidity and light intensity of acclimatization provided 100% plantlet survival.

Adviser: Renato Paiva – UFLA.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

A propagação de plantas *in vitro* tem atraído a atenção de pesquisadores e produtores, porque permite contornar inúmeros obstáculos, que atingem a propagação convencional de diversas espécies. As técnicas de Cultura de Tecidos têm sido empregadas com eficiência, na busca de alternativas mais simples, objetivas e economicamente viáveis para a obtenção de mudas com alta qualidade, em tempo e espaço físico reduzidos.

A *Annona glabra* L. é uma espécie que tem despertado interesse em função do seu potencial frutífero e fitofarmacológico. No entanto, assim como outras nativas, a propagação por sementes é caracterizada por uma germinação lenta, desuniforme e pouco expressiva, além do inconveniente de resultar em plantas muito heterogêneas. A propagação vegetativa, que deveria surgir como alternativa para os problemas de propagação por sementes, não tem contribuído para a eficiente propagação da espécie.

A solução para a dificuldade de obtenção dessas mudas, parece apoiar-se em métodos alternativos, como a propagação *in vitro*. Neste contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de tais metodologias.

Infelizmente, estudos que permitam o domínio de técnicas de propagação, não têm sido conduzidos e, as raras informações sobre a espécie são fragmentadas e incompletas. A falta quase absoluta de literatura sobre a espécie, destaca a importância desta obra, por proporcionar uma fonte de consulta.

O presente trabalho tem por objetivo fornecer algumas informações sobre a viabilidade de propagação *in vitro* da *Annona glabra* L., definindo

metodologias alternativas, que solucionem o problema de obtenção de mudas da espécie.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

A *Annona glabra* L. é uma espécie frutífera tropical, pertencente à família Annonaceae, que ocorre naturalmente na América do Sul (Le, Hancock e Trinh, 1998) e foi introduzida na Ásia, África e Austrália (Swarbrick e Skarrat, 1994; Swarbrick, 1993; Antony e Antony, 1988; Croat, 1978), onde hoje é largamente distribuída. As Anonáceas se destacam como fonte de frutos e óleos comestíveis, sabão, produção de álcool, perfumaria, além de muitos membros da família serem usados na medicina popular com vários propósitos (Leboeuf et al., 1982).

A espécie é descrita pôr Pio Corrêa (1926), como: um arbusto grande, ou árvore pequena de até 4m de altura; casca grossa, avermelhada, muito aromática, revestida de epiderme espessa parda, irregularmente fendidas; folhas alternadas, pecioladas, muito variáveis, ovadas ou oblongas, agudas, simples, inteiras, geralmente glabras, às vezes, com nervação avermelhada nas duas páginas; flores carnosas, verde-amareladas externamente, com zona amarelada na base das pétalas, dispostas em pedúnculos com uma bráctea, axilares; fruto baga composto, quase liso, cordiforme, tuberculada, vermelho-amarela ou pardacenta, de 6-13 cm (Figura 1). De acordo com esse autor, a espécie fornece madeira de boa flexibilidade e suas raízes, em função de serem leves e esponjosas, podem ser utilizadas como cortiça em quase todas as suas aplicações.

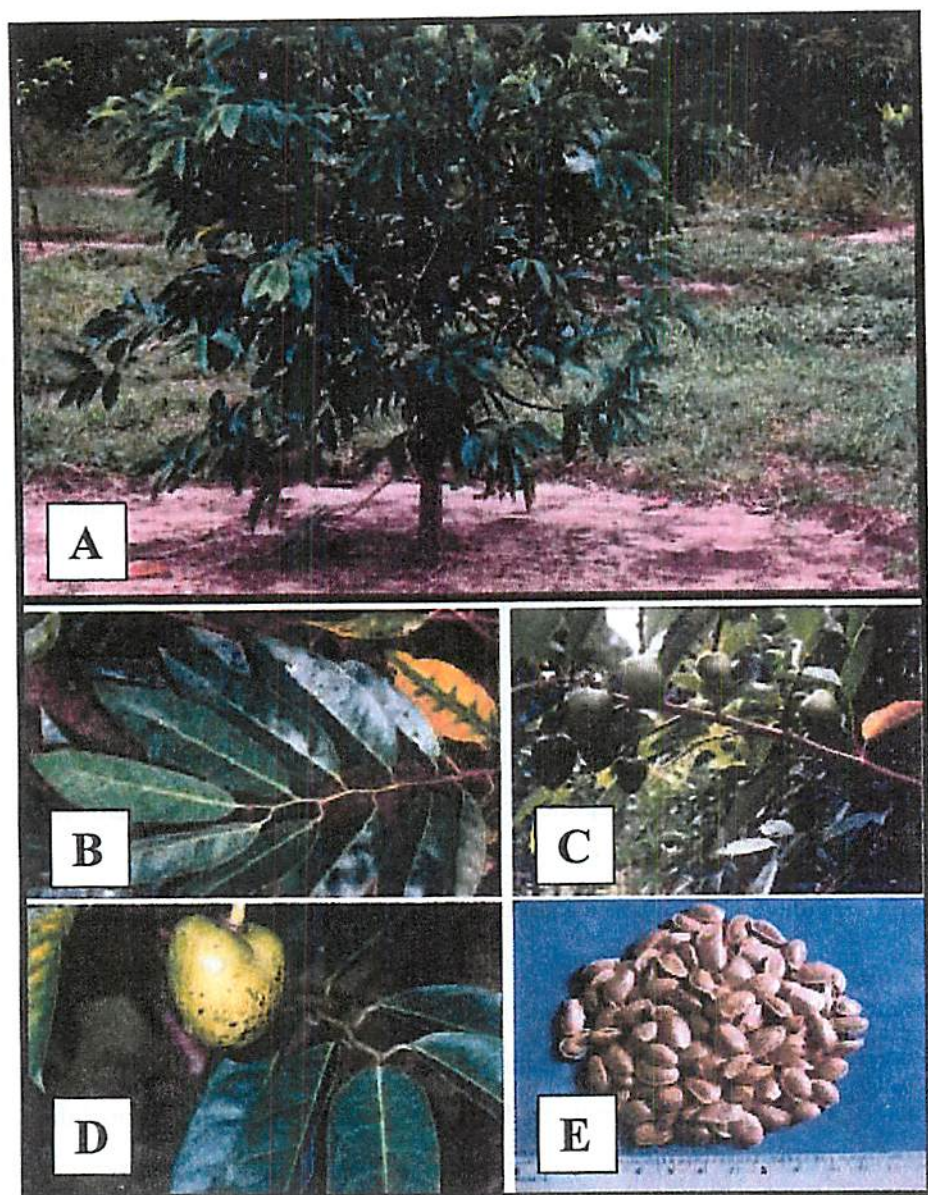


FIGURA 1. Aspecto visual de uma *Annona glabra* L. A) planta adulta; B) folhas; C) e D) frutos; E) sementes. UFLA, Lavras-MG, 2000.

A *Annona glabra* L, conhecida popularmente como “araticum do brejo”, no Brasil e “pond apple” na Austrália e Ásia, se destaca pelo fornecimento de frutos bastante saborosos, de uso *in natura* ou processados e, mais recentemente, pelas propriedades biológicas de suas sementes, folhas e frutos.

Em estudos fitoquímicos, de plantas da espécie, foram isolados e identificados, diversos componentes de interesse (Ming et al., 1998; Leboeuf et al., 1982) com atividade antibactericida, antifúngica, antimicrobial (Padmaja et al., 1995), inseticida (Padmaja et al., 1995; Oshawa et al., 1991) e citotóxica, inibindo a replicação de células cancerígenas (Liu, Pilarinou e McLaughlin, 1999; Liu et al., 1998; Chang et al., 1998; Chavez et al., 1997; Warthen e Gooden, 1969); do HIV (Chang et al., 1998), atuando como potentes inibidores da cadeia respiratória mitocondrial (Gallardo et al., 1998) e causando anormalidades cromossômicas (Padmaja et al., 1995).

A espécie possui grande capacidade de adaptação em diversos ambientes, como a habilidade de resistir a baixas temperaturas sem sofrer grandes prejuízos (Sentellas et al., 1996), ou a temperaturas elevadas (Mai, 1995) e crescer temporariamente, ou permanentemente em habitat inundado (Pérez et al., 1993; Croat, 1978).

Segundo Zotz, Tryee e Patiño (1997), a tolerância à inundação indica a grande adaptabilidade anatômica, fisiológica e ecológica da espécie a esses ambientes. O autor, estudando as relações hídricas de plantas da espécie, observou baixa condutividade hidráulica em folhas, caule e raízes, o que caracteriza uma maior resistência ao fluxo de água nesses órgãos e concluiu que esse fato pode ser de grande importância à tolerância à inundação e pode representar adaptação ao habitat de água salobra (mangue), onde é freqüentemente encontrada.

2.2 PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E CULTURA DE TECIDOS

A *Annona glabra* L. pode ser propagada via sementes (sexuada), ou por métodos vegetativos (assexuada). No entanto, a propagação sexuada da *Annona glabra* L., e de maneira geral das Anonáceas, resulta em grande heterogeneidade de plantas e frutos, devido à polinização cruzada favorecida pelo fenômeno da dicogamia. Essa diversidade é importante, no estabelecimento de programas de melhoramento genético, porque garante a biodiversidade. No entanto, apresenta como inconveniente, o fato de produzir plantas muito heterogêneas, de porte elevado, com menor precocidade e de frutificação mais tardia, além do que, os frutos originados dessas plantas podem ser diferentes em tipo e qualidade em relação à planta matriz (Manica, 1994).

A *Annona glabra* L. tem sido utilizada como porta-enxerto de outras espécies de *Annona* (Le, Hancock e Trinh, 1998), como a Cherimoleira (*Annona cherimola* Mill.) e a gravioleira (*Annona muricata*), entretanto resultam em plantas de porte elevado, o que torna-se desfavorável a plantios comerciais.

Os porta-enxertos, utilizados na propagação vegetativa das Anonáceas devem ser formados por sementes ou por estaquia. De acordo com Manica (1994), a propagação por estaquia não tem apresentado resultados concretos.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido bastante eficazes na propagação de várias espécies. Essas técnicas permitem o crescimento de células, tecidos ou órgãos isolados da planta mãe (explantes), em condições assépticas e controladas; se baseiam na totipotencialidade das células da planta, o que significa que qualquer célula, no organismo vegetal, contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Torres e Caldas, 1990), desde que submetidas a tratamentos adequados.

O processo de formação de órgãos, em tecidos de plantas cultivadas *in vitro*, como partes aéreas e raízes, é chamado organogênese ou morfogênese e pode ocorrer por via direta ou indireta (George, 1996). Neste último, o processo de regeneração é precedido pela formação do calo (Grattapaglia e Machado, 1998).

As técnicas por via indireta podem ser empregadas, quando são desejadas variações genéticas nos descendentes, em virtude da possibilidade de obtenção de variantes, mutantes ou transformantes em células provenientes do calo (Dickinson et al., citados por Cid, 1998).

A micropropagação refere-se à propagação vegetativa *in vitro* e pode ser interessante, quando se deseja manter a identidade genética do genótipo propagado, visto que não introduz nenhuma variabilidade genética (Grattapaglia e Machado, 1998). As técnicas de micropropagação apresentam superioridade em relação aos métodos vegetativos convencionais, porque incluem altas taxas de multiplicação, produção de material livre de doenças e pequeno espaço requerido para multiplicar um grande número de plantas (Vuylsteke e Ortiz, 1996).

A micropropagação de espécies lenhosas possui alguns fatores que dificultam seu uso, como: a grande variabilidade genética existente em plantas de espécies nativas e a maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro* (Coelho, 1999). Para superar esses obstáculos, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências da planta e, em alguns casos, do explante em questão, tornando o processo bastante específico.

Segundo Rasai, George e Kantharajah (1995), a propagação clonal, utilizando técnicas de micropropagação, tem-se mostrado viável às espécies de *Annona*. Essas técnicas, mostram-se eficientes para a rápida propagação de cultivares superiores e permitem a obtenção de plantas mais uniformes. De acordo com os mesmos autores, as partes aéreas e raízes podem ser formadas

com relativa facilidade, com exceção de algumas espécies que apresentam dificuldade de indução de raízes, em função da oxidação pela liberação de fenóis no meio de cultura.

De acordo com George (1996), a cultura de tecidos além de permitir a propagação de espécies, com problemas de propagação convencional, possibilita a obtenção de plantas isentas de viroses e de clones mais produtivos, preservação e intercâmbio de germoplasmas e estudos envolvendo biologia molecular.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONY, K.; ANTONY, V.T. On the occurrence of *Annona glabra* (Annonaceae) in Kerala, India. **Journal of Swamy Botanical Club, India**, v.5, n.2, p.117-118, 1988.
- CID, L.P.B. Suspensão celular. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.(ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1998. p.331-353.
- CHANG, F.R.; YANG, P.Y.; LIN, J.Y.; LEE, K.H.; WU, Y.C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Washington, v.61, n.4, p.437-439, 1998.
- CHAVEZ, P.I.; SÁNCHEZ, L.A.; GONZÁLEZ, F.A.; RODRIGUEZ, J.L.; AXELROD, F. Citotoxicity correlations of Puerto Rican using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. **International Journal of Pharmacognosy**, Lisse-Netherlands, v.35, n.4, p.222-226, 1997.
- COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. Lavras: UFLA, 1999. 119p. (Tese – Mestrado em Fitotecnia).

CROAT, T. **Flora of Barro Colorado Island**. Stanford ,CA: Stanford University Press, 1978. 943p.

GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; TORMO, J.R.; BLÁZQUEZ, M.A.; POLO, M.C.Z.; CORTES, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v.47, n.5, p. 811-816, 1998.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – the technology**. 2^o ed. Edington: Exegetics limited, 1996. 1574p.

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

LE, H.T.; HANCOCK, J.F.; TRINH, T.T. The fruit crops of Vietnam: introduced species and their native relatives. **Fruit Varieties Journal**, P.A., v.52, n.3, p.158-168, 1998.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982.

LIU, X.X.; ALILI, F.Q.; PILARINOU, E.; McLAUGHLIN, J.L. Glacins A and B: two novel bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, USA, v.61, n.5, p.620-624, 1998.

LIU, X.X.; PILARINOU, E.; McLAUGHLIN, J.L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Washington, v.62, n.6, p.848-852, 1999.

MAI, T.T. Fruit trees in Vietnam. **Chronica Horticulturae**, Belgium, v.35, n.3, p.8-9, 1995.

MANICA, I. **Fruticultura - cultivo das Anonáceas: ata, cherimólia e graviola.** Porto Alegre: EVANGRAF, 1994. 116p.

MING, L.C.; HUA, T.N.; QING, M.; LAN, Z.H.; JIANG, H.X.; LING, L.H.; JUN, Z. Cyclopeptides from seeds of *Annona glabra*. **Phytochemistry**, Oxford, v.47, n.7, p.1293-1296, 1998.

OSHSAWA, K.; ATSUZAWA, S.; MITSUI, T.; YAMAMOTO, I. Isolation and insecticidal activity of three acetogenins from seeds of pond apple, *Annona glabra*. **Journal of Pesticide Sciences**, Japan, v.16, n.1, p.93-98, 1991.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v.48, p.21-24, may 1995.

PÉREZ, N.D.; FONSECA, R.M.; PÉREZ, L.L.; HERNANDEZ, F.L. Vegetacion de las lagunas costeras y zonas inundables del Estado de Guerrero, Mexico. **Brenesia**, Costa Rica, v. 39/40, p.7-28, 1993.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. p.155-157.

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

SENTELHAS, P.C.; PÍZA, C.T.J.; SIGRISTI, J.M.M.; KAVATI, R.; PARODI, M.T. Temperatura letal de diferentes plantas frutíferas tropicais. **Bragantia**, Campinas, v.55, n.2, p. 231-235, 1996.

SWARBRICK, J.T. **The biology distribution, impact and control of five weeds of the wet tropics world heritage area.** Queensland, Austrália: Wet Tropics Management Agency, 1993. 63p.

SWARBRICK, J.T.; SKARRAT, D.B. **The ecological requirements and potential Australian distribution of pond apple (*Annona glabra*).** Queensland, Austrália: Wet Tropics Management Agency, 1994. 8p.

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

VUYLSTEKE, D.R.; ORTIZ, R. **Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB Group).** *HortScience*, Alexandria, v.31, n.5, p.862-865, 1996.

ZOTZ, G.; TYREE, M.T.; PATIÑO, S. **Hydraulic architecture and water relations of a flood-tolerant tropical tree, *Annona glabra*.** *Tree Physiology*, Victoria, v.17, p.359-365, 1997.

WARTHEN, D.; GOODEN, E.L. **Tumor inhibitors: Liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Washington, v.58, n.5, p.637-638, 1969.

CAPÍTULO II. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CONVENCIONAL DE *Annona glabra* L.

1. RESUMO

Em função da necessidade de estabelecer uma metodologia, que proporcione um processo germinativo mais eficiente e a formação rápida de plantas matrizes, que forneçam explantes com características mais adequadas para o cultivo *in vitro*, sementes de *Annona glabra* L. foram germinadas em areia lavada e em meio de cultura MS, solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com diferentes concentrações de sacarose 0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 g/L, combinados ou não com 2,0 mg/L de GA₃. As sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C e intensidade luminosa de 13 μmol.s⁻¹m⁻² durante 40 dias. A máxima percentagem de germinação pode ser obtida sem a adição de sacarose ao meio de cultura e em concentrações inferiores à 1,2 g/L. Entretanto, boa percentagem de germinação e desenvolvimento mais satisfatório das plântulas, pode ser obtida, utilizando-se concentrações de sacarose entre 1,2 e 2,3 g/L. Foi observada a superioridade da germinação *in vitro*, em relação à germinação convencional, a qual possibilita a redução em 65 dias (43%), do tempo necessário para a formação das mudas.

2. ABSTRACT

Comparative studies between conventional and *in vitro* germination of *Annona glabra* L.

With the objective to establish an efficient germination methodology and a rapid formation of explant donor plants with adequate characteristics for *in vitro* cultivation, seeds of *Annona glabra* L. were germinated in washed sand and MS medium containing 0.7% agar supplemented with the following concentrations of sucrose 0; 1.5; 3.0; 4.5; 6.0 and 7.5 g/L in the presence and absence of GA₃. Seeds were maintained for 40 days in a growth room with 16 hours photoperiod, temperature of 25 ± 1°C and light intensity of 13 μmol.s⁻¹m⁻². Maximum germination percentage can be obtained in the absence of sucrose or in the presence of sucrose concentrations below 1.2 g/L. However, good germination percentage and seedling development can be obtained using sucrose concentrations between 1.2 and 2.3 g/L. Compared to conventional germination, *in vitro* germination was superior providing a reduction of 65 days (43%) in the period of seedling formation.

3. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista fisiológico, Street e Opik (1974) conceituam a germinação, como sendo a retomada da atividade metabólica e o crescimento dos tecidos da semente, paralisados nas fases finais de maturação do fruto.

Assumindo que as sementes sejam viáveis, a germinação destas é influenciada por diversos fatores ambientais externos e intrínsecos à semente, havendo necessidade da ocorrência de um conjunto de condições favoráveis, para que a mesma se complete satisfatoriamente.

Através do cultivo *in vitro*, de sementes ou embriões, condições ambientais fundamentais, como disponibilidade de água, temperatura adequada, luminosidade e composição atmosférica apropriadas podem ser fornecidas e controladas, para que o processo de germinação ocorra. Além do que, a presença de reguladores de crescimento e de fontes exógenas de carboidratos, no meio de cultura, possibilitam contornar fatores, que inibem a germinação de diversas sementes, como a presença de inibidores químicos, imaturidade de embriões e pobre acúmulo de reservas nutritivas, aumentando assim, a percentagem de germinação, ou fazendo com que o processo seja mais efetivo, rápido e uniforme.

Em função da pressão de doenças nos ambientes tropicais, o estado da planta matriz pode ser um dos fatores limitantes no estabelecimento de explantes (Litz, Jarret e Asokan, 1986). Explantes provenientes de matrizes de campo, geralmente apresentam muitos problemas de contaminação e uma das alternativas para diminuir a infestação nos explantes é cultivar sementes *in vitro*, selecionando daí as plântulas assépticas, de onde serão obtidos os explantes (Braga, Caldas e Habe, 1997).

Em função da necessidade de disponibilização de mudas matrizes, como fonte de explantes, para experimentos *in vitro*; da baixa percentagem de

germinação, obtida através de métodos propagativos convencionais e da carência de informações sobre a perda de viabilidade e vigor de sementes de *Annona glabra* L., estudos comparativos entre os métodos de germinação convencional e *in vitro* foram realizados.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. GERMINAÇÃO

O período de dessecação é um evento terminal normal do desenvolvimento do embrião e caracteriza um estado metabólico quiescente (de baixa atividade metabólica), que, naturalmente interpola o desenvolvimento e a germinação.

A água é essencial para a hidratação das sementes e, portanto, para o processo de germinação. Sua absorção ou embebição é a primeira etapa na seqüência de eventos, como ativação enzimática, quebra, translocação e uso do material de reserva, que culminam com a retomada do crescimento do eixo embrionário (Bewley e Black, 1994).

O processo inicial de absorção de água pelas sementes é passivo e ocorre, principalmente em função da diferença de potencial hídrico (osmótico), entre o meio de germinação e a semente. Portanto, ocorre, independentemente das sementes serem viáveis ou não e de estarem ou não dormentes.

As soluções de sais inorgânicos e açúcares, que compõem os meios de cultura de tecidos, não possuem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese através de propriedades osmóticas (George, 1996).

O potencial osmótico do meio de cultura é relacionado à concentração de solutos, sendo os açúcares os principais componentes reguladores do potencial do meio. Para que ocorra a germinação, cada espécie necessita atingir um determinado grau de umidade, e a determinação da quantidade mínima de água, para que o processo seja iniciado, pode ser obtido através da variação da concentração de sacarose do meio de cultura.

Em muitos casos, o controle regulatório do desenvolvimento do embrião, para evitar a germinação precoce, pode ser restrito à não absorção de água, causada pelo alto potencial osmótico dos tecidos da semente, que circundam o embrião (Kigel e Galili, 1995). Dessa maneira, a transferência de sementes ou embriões para meios com baixo (mais negativo) potencial osmótico é, às vezes, necessário para o crescimento e/ou germinação.

Diversos autores têm relatado os efeitos de soluções de diferentes concentrações de sacarose, sobre a germinação e/ou crescimento *in vitro* de espécies lenhosas (Gomes, 1999; Carimi, De Pasquale e Puglia, 1998; Ashburner, Thompson e Burch, 1993; Komatsuda e Lee, 1992).

A temperatura é um fator que tem influência sobre o processo, afetando a velocidade de embebição, bem como a percentagem total, quanto a velocidade e a uniformidade de germinação (Bewley e Black, 1994; Carvalho e Nakagawa, 1988).

Para a maioria das espécies, dentro de certos limites específicos, o aumento da temperatura leva ao aumento da velocidade de embebição das sementes, de maneira semelhante a uma reação química, em função do aumento das atividades enzimáticas e metabólicas, a germinação será mais rápida e o processo mais eficiente.

O requerimento de oxigênio para a germinação, pode depender, grandemente, de outros fatores ambientais, incluindo temperatura, pressão osmótica do meio de germinação e luz. Para muitas sementes não dormentes a

sensibilidade à deficiência de O_2 decresce com a diminuição da temperatura. Sementes de girassol e tomate requerem mais O_2 para germinar, quando se encontram em meio com baixo potencial hídrico (Kigel e Galili, 1995).

Sabe-se que, as giberelinas têm papel chave na germinação de sementes, estando envolvidas, tanto na superação de dormência, como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento.

Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA_3) é o que possui maior efeito em cultura de tecidos. Segundo Kochba et al. (1974), a presença do ácido giberélico, no meio de cultura, proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. Em diversas espécies, os melhores resultados *in vitro*, podem ser obtidos com uso de 0,1 a 2,0 mg/L de GA_3 (Pasqual, 1997).

Enquanto que, para diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência; para outras, indicam pequena resposta ou não possuem efeito algum. Takaki, Dietrich e Furtado (1979), Maestri e Vieira (1961) observaram que sementes tratadas com GA_3 tiveram redução na percentagem de germinação. Para esses autores, a redução ocorreu devido ao aumento na atividade de algumas enzimas (celulases e outras), proporcionado pelo regulador, que atuam degradando material de parede celular. Carvalho (1997) também observou que o ácido giberélico não contribuiu para acelerar a germinação *in vitro*, de sementes de cafeeiro e o desenvolvimento final das mudas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

5.1.1 OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES

Esse trabalho foi realizado no laboratório de Propagação de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram coletadas no jardim clonal do CPATU/EMBRAPA, Belém-PA, em dezembro de 1999, sendo, então, acondicionadas, com teor de umidade de 8,6%, em envelope de papel e mantidas no escuro, à temperatura ambiente. Foram conduzidos dois experimentos com as sementes armazenadas: um após 2 e outro após 6 meses da coleta.

Para a instalação dos experimentos, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, através da imersão em água destilada/autoclavada com gotas de detergente, por 10 minutos, seguidos de imersão em álcool 70% (v/v), por 1 minuto e, em hipoclorito de sódio 50% (v/v) durante 10 minutos. Após a realização do processo de desinfestação, as sementes foram lavadas por três vezes, em água destilada e autoclavada, para a eliminação do excesso das soluções desinfestantes.

5.1.2. INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Após a realização do processo de desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos, contendo 30 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com diferentes

concentrações de sacarose (0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 g/L), combinados ou não com 2,0 mg/L de GA₃. O pH do meio foi ajustado para 6,0. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após inoculação, os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C e intensidade luminosa de 13 $\mu\text{mol. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ durante 40 dias. Após esse período, avaliou-se o número de sementes germinadas.

5.1.3. ACLIMATIZAÇÃO

Após a emergência das raízes, as plântulas foram retiradas dos frascos, lavadas com água destilada e autoclavada e transferidas para gerbox contendo vermiculita. Para evitar a transpiração excessiva, foi realizado o controle da umidade relativa do ar, através do uso de sacos plásticos transparentes envolvendo as plântulas. Nessas condições, as plântulas permaneceram em casa de vegetação, por 1 semana, sob sombrite 70%, seguido por 1 semana em sombrite 50%, até a obtenção da 4ª folha totalmente expandida. Após esse período, as plântulas foram transplantadas para sacolas plásticas de 4L, contendo terra, areia e esterco, na proporção de 3:1:1, além de vermiculita para manutenção da umidade e mantidas sob sombrite 30% por mais 1 semana. Depois desse período de aclimatização, o sombrite foi retirado e as plantas foram mantidas na bancada até que estivessem aptas à transferência para o campo (Figura 2).



FIGURA 2. Obtenção de mudas de *Annona glabra* L.: A) germinação *in vitro*; B) transferência para caixa tipo gerbox; C) cobertura das plântulas com saco plástico; D) transplântio para sacolas plásticas; E) mudas após 6 meses de cultivo. UFLA, Lavras-MG, 2000.

5.2. GERMINAÇÃO *IN VIVO*

As sementes foram desinfestadas, pela imersão rápida em solução contendo 4 g/L de benomyl e 3 g/L de quemictina, seguida de três lavagens em água destilada e autoclavada, para eliminação do excesso de soluções desinfestantes. Após a assepsia, as semente foram semeadas em caixa plástica, contendo areia lavada, onde permaneceram em bancada na sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, até a obtenção da 4ª folha totalmente expandida. Após esse período, as plântulas foram transplantadas para sacolas plásticas, contendo terra, areia e esterco, na proporção 3:1:1 e mantidas em bancada, na sala de crescimento, até que estivessem aptas à transferência para o campo.

5.3. AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

Para a germinação *in vitro*, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. No experimento conduzido com sementes armazenadas por 2 meses, foram utilizadas duas parcelas por tratamento, sendo que cada parcela (frasco) continha três sementes, totalizando 6 sementes por tratamento. No experimento conduzido com sementes armazenadas durante 6 meses, foram utilizadas três parcelas por tratamento, totalizando 9 sementes por tratamento. Após 40 dias, avaliou-se o número de sementes germinadas.

Como o número de sementes germinadas foi considerada uma variável binomial (não-normal), optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares

generalizados (Demétrio, 1993), utilizando-se a função logística, como função de ligação η (ligação canônica) ou seja:

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

onde “p” é a probabilidade de sucesso do modelo binomial.

O preditor linear “ η ” correspondeu ao seguinte modelo de regressão:

$$\eta = b_0 + b_1Z + b_2X + b_3XZ + b_4X^2 + b_5X^2Z$$

em que “Z” = 0 para as parcelas sem GA₃, e 1 para àquelas com GA₃ e “X” o efeito das concentrações de sacarose. Isso permitiu um ajuste simultâneo da probabilidade de germinação, em função da sacarose, nas duas condições de GA₃ (presença e ausência). A escolha do melhor modelo de regressão, foi baseado na qualidade do ajustamento e, se possível, na ausência de significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de “Deviance” (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

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

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

onde $f(x)$ é o modelo de regressão ajustado, que é função da concentração de sacarose com ou sem a adição de GA₃.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos resultados apresentados na figura 3, pode-se observar que o aumento na concentração de sacarose, tende a diminuir a percentagem de germinação e provavelmente, até inibir o processo. Segundo George (1996), decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura não possua

água disponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início do processo de germinação. Resultados semelhantes foram observados por Garelo e Le Page-Degivry (1995), onde a germinação de embriões de *Hopea odorata* foi inibida, pelo decréscimo, no potencial hídrico do meio de cultura.

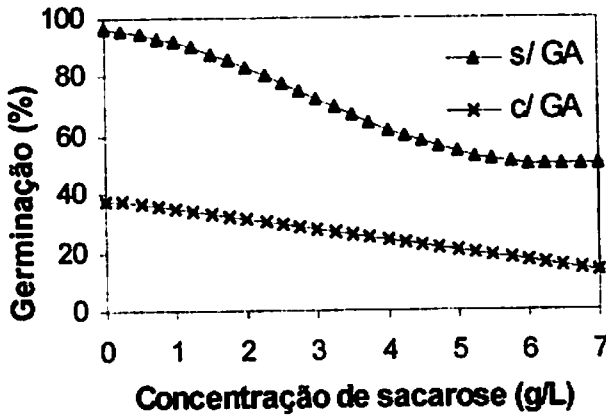


FIGURA 3. Modelo de regressão ajustado, representando a percentagem de germinação, *in vitro*, das sementes de *Annona glabra* L., armazenadas por 2 meses, em função da concentração de sacarose (g/L) no meio de cultura, na presença e na ausência de GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Segundo o modelo de regressão ajustado, a germinação máxima (96%) de sementes de *Annona glabra* L. armazenadas por 2 meses (Figura 3), pode ser obtida sem adição de sacarose no meio de cultura, sendo que, a utilização de concentrações inferiores à 1,2 g/L de sacarose, proporcionam percentagem de germinação acima de 90%. Gomes (1999), também obteve condições satisfatórias, para a germinação *in vitro*, de sementes de moreira (*Maclura tinctoria*), utilizando concentrações inferiores a 1,0 g/L de sacarose. Porém, segundo o autor, as plântulas obtidas nessas condições necessitavam ser transferidas para outro meio de cultivo, contendo concentrações mais elevadas

de sacarose, em função da necessidade de fonte exógena de carboidratos, para o desenvolvimento das plântulas.

A utilização de concentrações entre 1,2 e 2,3 g/L de sacarose proporcionaram boa percentagem de germinação (90 – 80%) e podem fornecer condições mais satisfatórias, para o desenvolvimento *in vitro* das plântulas, quando comparado a concentrações inferiores a 1,2 g/L, além de condicionar as plântulas durante a transferência para a casa de vegetação. No entanto, quando são utilizadas concentrações superiores a 2,3 g/L, a percentagem de sementes de *Annona glabra* L. que germinam é, gradativamente, reduzida até ao mínimo de 50%, quando se utiliza 7,5 g/L de sacarose.

Esses resultados são contraditórios ao de Carimi, De Pasquale e Puglia (1998), que obtiveram alta percentagem de germinação de embriões de *Citrus aurantium*, em diferentes estádios de desenvolvimento, utilizando altas concentrações de sacarose e observaram inibição ou redução da germinação, na ausência ou em concentrações reduzidas de sacarose.

Segundo o modelo de regressão ajustado, no experimento conduzido com sementes que permaneceram armazenadas durante 6 meses (figura 4), a máxima germinação (48%) pode ser obtida, utilizando-se a concentração de 2,4 g/L de sacarose, sendo que, a utilização de concentrações de sacarose entre 1,7 e 2,9 g/L, proporcionam resultados semelhantes de germinação. No entanto, concentrações mais elevadas de sacarose reduzem a germinação, visto que diminuem a disponibilidade de água para embebição das sementes. Concentrações inferiores, entre 0,9 e 1,7 g/L de sacarose proporcionam germinação acima de 40%.

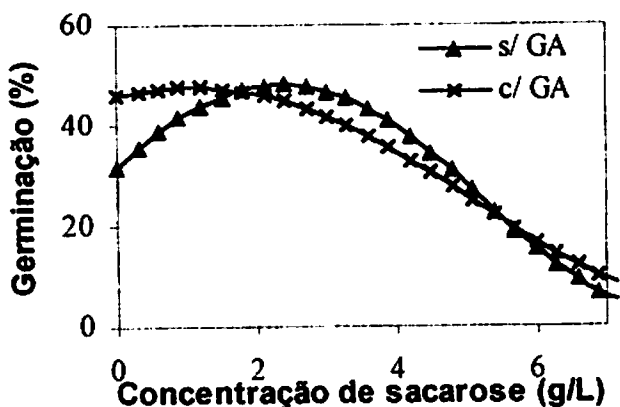


FIGURA 4. Modelo de regressão ajustado, representando a percentagem de germinação, *in vitro*, das sementes de *Annona glabra* L., armazenadas por 6 meses em função da concentração de sacarose (g/L) no meio de cultura, na presença e na ausência de GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2000.

A drástica redução, na percentagem de germinação das sementes, que permaneceram armazenadas durante 6 meses, pode estar associada à perda de viabilidade das mesmas, em função do potencial genético da espécie ou a inadequada condição de armazenamento das sementes. Lauzer e Laberge (1996) e Preece Bates e Van Sambeek (1995), também associaram à baixa percentagem de germinação *in vitro*, de embriões de *R. carolina* (60%) e de sementes de *F. angustifolia* spp. *oxycarpa*. (< 50%), respectivamente, à perda de viabilidade das sementes, em função da pobre conservação destas. De acordo com Preece, Bates e Van Sambeek (1995), a utilização do sistema *in vitro* permite, de forma prática e eficiente, avaliar a viabilidade de sementes e selecionar aquelas realmente aptas para a cultura (que apresentam acima de 80% de germinação).

A vantagem de se cultivar sementes *in vitro*, na ausência ou em concentrações reduzidas de sacarose no meio, é que se favorece o desenvolvimento da mixotrofia, mecanismo de nutrição do carbono

ário, entre as condições autotróficas (naturais) e heterotróficas já que a reduzida atividade fotossintética das plantas *in vitro*, se deve grande parte, à inibição da enzima Ribulose-1,5-Bifosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), pela sacarose presente no meio de cultura (Serret, 1997; Kozai, Koyama e Watanabe 1988), facilitando o processo posterior de aclimatização (Fortes, 1992). Além do que, reduz as perdas por contaminação de fungos e bactérias, permitindo que se utilizem grandes recipientes (Kozai, Koyama e Watanabe 1988; Hayashi, Nakayama e Kozai, 1988). Embora, o açúcar não seja o componente de custo mais elevado, no preparo do meio de cultura, a redução de sua concentração, pode ser, economicamente interessante, especialmente, em sistemas de produção comercial de mudas (Hoffmann, 1999).

Por outro lado, concentrações superiores de sacarose, embora possam reduzir a germinação, condicionam a plântula na transferência para a casa de vegetação, aumentando a reserva dos tecidos, o que é importante para as etapas iniciais da aclimatização (Wainwright e Scrace, 1989). Em ambas situações, a aclimatização e o crescimento das plântulas em ambiente natural são favorecidas.

Para as sementes, que permaneceram armazenadas por 2 meses, a suplementação do meio de cultura com 2,0 mg/L de GA₃ reduziu a germinação das sementes, principalmente, em combinação com concentrações elevadas de sacarose. A redução na germinação pode ter ocorrido, devido ao aumento na atividade de algumas enzimas (celulases e outras), proporcionado pelo regulador, que atuam degradando material de parede celular (Takaki, Dietrich e Furtado, 1979; Maestri e Vieira, 1961).

Entretanto, na ausência de sacarose, a utilização de 2,0 mg/L de GA₃, proporciona aumento na percentagem de germinação das sementes armazenadas por 6 meses, quanto comparada ao meio sem a presença do GA₃, indicando que na ausência de sacarose, a mobilização dos açúcares armazenados, na forma de

amido, pode favorecer o processo germinativo. Entretanto, segundo George (1996), logo que os embriões iniciam seu crescimento, as plântulas necessitam ser transferidas para meio sem giberelina, caso contrário, as partes aéreas se tornam frágeis e estioladas.

A utilização de concentrações de sacarose superiores a 1,7 g/L dispensam o uso de GA₃. Esses resultados também foram obtidos por Vieira, citado por Frigeri (1998), onde a utilização desse regulador não pareceu necessário à germinação de sementes de estilosantes. Preece, Bates e Van Sambeek (1995) e Arrillaga, Marzo e Segura (1992), também observaram pouco ou nenhum efeito da suplementação do meio com GA₃ sobre a germinação *in vitro* de embriões de *Fraxinus* spp.

De acordo com Preece, Bates e Van Sambeek (1995), a sacarose do meio de cultura, como fonte disponível de carboidrato, pode ser suficiente para germinação e o desenvolvimento da plântula, assim, a mobilização do açúcar armazenado, na forma de amido, pode não ser necessário para o sistema *in vitro*.

Os resultados da análise de “Deviance” (Tabelas 1 e 2) apresentam desvios não significativos, indicando que o modelo de regressão adotado foi satisfatório.

Tabela 1. Análise de “Deviance”, do experimento conduzido em fevereiro, referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Regressão	5	22,5437 **
Desvios	6	5,3210 NS

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

Tabela 2. Análise de “Deviance”, do experimento conduzido em maio, referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Regressão	5	14,1023 **
Desvios	6	4,4857 NS

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

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que as condições *in vitro*, proporcionam uma germinação de sementes de *Annona glabra* L. mais expressiva, quantitativamente, mais rápida e uniforme, quando comparada à germinação convencional (Tabela 3). Gomes (1999) e Preece, Bates e Van Sambeek (1995), também observaram superioridade da germinação *in vitro*, em relação à germinação convencional. De acordo com os autores do último trabalho citado, as vantagens do cultivo *in vitro* de sementes, são a alta percentagem de germinação, a uniformidade das condições *in vitro* para a germinação e a uniformidade inicial das plântulas.

TABELA 3. Percentagem de germinação e número de dias necessários para a formação de mudas de *Annona glabra* L., cujas sementes foram germinadas *in vitro* e em areia (convencional). UFLA, Lavras-MG, 2000.

	IN VITRO	AREIA
% Germinação	96	46
Germinação	20*	40-80*
Frasco/Sementeira	4	30
Aclimatização	21	-
Sala de cresc. → campo	40	40
Total	85	150

* valores em dias.

A variação da concentração de sacarose, do meio de cultura, promoveu uma sincronia maior na emergência das raízes, afetando a germinação das sementes e a conversão dessas a plântulas.

Pode-se verificar, na Tabela 3, que sementes *in vitro*, germinam em média aos 20 dias e após 14 dias (4 dias que permanecem no frasco após a germinação e 10 dias de aclimatização) estão aptas (apresentando a 4^a folha totalmente expandida) à transferência para sacolas plásticas, enquanto que, sementes na areia, germinam entre 40 e 80 dias e só se tornam aptas à transferência para sacolas plásticas após 30 dias. Portanto, a utilização da metodologia de germinação, *in vitro*, possibilita a redução em 43% (65 dias) do período necessário para a formação de mudas de *Annona glabra* L. A redução do tempo, para a obtenção de mudas, pode ser atribuído ao maior desenvolvimento inicial das plântulas obtidas *in vitro* (George, 1996) e, segundo Gomes (1999), essa é a principal vantagem da utilização da metodologia de germinação *in vitro*.

Através de observações experimentais, a germinação *in vitro* das sementes de *Annona glabra* L. proporcionou a emissão de um sistema radicular pouco ramificado e com poucos pêlos absorventes, quando comparado ao sistema radicular formado através do método convencional (Figura 5). Embora não tenha sido observado nesse experimento, Preece, Bates e Van Sambeek (1995) observaram que as plântulas germinadas *in vitro* não sobreviveram bem, quando transferidas para a casa de vegetação, porque murcharam e depois morreram; presumiram que a radícula alongada, *in vitro*, não funcionou, eficientemente, na casa de vegetação. O fenômeno do pobre funcionamento radicular foi postulado por Preece, Zhao e Kung (1989).

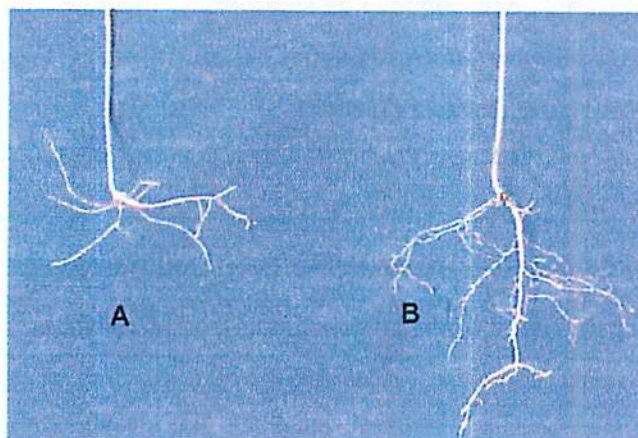


FIGURA 5. Sistema radicular de plântulas de *Annona glabra* L., obtidos através de germinação *in vitro* (A) e em areia (B). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Segundo Díaz-Pérez, Shackel e Sutter (1995) e Harbage, Stimart e Evert (1993), o substrato, que é o meio de sustentação ou suporte durante o cultivo *in vitro*, é um dos fatores externos de maior influência sobre a morfologia e a qualidade das raízes, que desenvolvem *in vitro*. De maneira geral, o sistema radicular emitido, em meio solidificado, com ágar ou produto equivalente, é pouco ramificado, quebradiço e com poucos pêlos radiculares, de modo que, as raízes assim formadas, podem ser menos eficientes na absorção de água e nutrientes, podendo afetar a sobrevivência e o desenvolvimento das plântulas após a transferência.

Além do pobre desenvolvimento radicular de plântulas de *Annona glabra* L., obtidas através de germinação *in vitro* também foi observada a necrose do ápice da raiz, embora, a sobrevivência não tenha sido afetada. Lauzer e Laberge (1996), também observaram necrose no ápice das raízes de plântulas de espécies de *Rosa*, após 5 semanas de cultivo, em meio de germinação, embora ela, não tenha afetado a aclimatização das plântulas.

7. CONCLUSÕES

- O aumento na concentração de sacarose, no meio de cultura, diminui a percentagem de germinação de sementes de *Annona glabra* L.;
- O maior percentual de germinação de sementes é obtido na ausência de sacarose no meio de cultura;
- Concentrações inferiores a 1,2 g/L de sacarose, proporcionam acima de 90% de germinação, em sementes armazenadas por 2 meses;
- A utilização de germinação *in vitro*, possibilita a formação de mudas de *Annona glabra* L. em 85 dias, o que representa uma redução de 43%, no tempo necessário para a formação das mudas, em relação à germinação convencional em areia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRILLAGA, I.; MARZO, T.; SEGURA, J. Embryo culture of *Fraxinus ornus* and *Sorbus domestica* removes seed dormancy. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.4, p.371, 1992.
- ASHUBURNER, G.R.; THOMPSON, W.K.; BURCH, J.M. Effect of α -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.35, p.157-163, 1993.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BRAGA, M.F.; CALDAS, L.S.; HABE, M.H. Estabelecimento de acerola (*Malpighia glabra* L.) *in vitro*: efeito do clone e do explante. *Revista brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.19, n.3, p.335-346, 1997.

- CARIMI, F.; DE PASQUALE, F.; PUGLIA, A.M. *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus auranticum* L., and their detection based on RFLP analysis. **Plant Breeding**. England, v.117, n.3, p.261-266, 1998.
- CARVALHO, G.R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas 'in vitro'**. Lavras: UFLA, 1997. 64p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Semente, ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.
- DEMÉTRIO, C.G.B. Modelos lineares generalizados na experimentação agronômica. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 5., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: (S.n.), 1993. 125p.
- DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SHACKEL, K.A.; SUTTER, E.G. Effects of in vitro-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.3, p.435-440, 1995.
- FORTES, G.R. de L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 1992. 163p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- FRIGERI, R. B. C. **Efeito do pH na germinação de sementes dormentes de *Stylossanthes humilis* HBK**. Viçosa: UFV, 1998. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GARELLO, G.; LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Desiccation-sensitive *Hopea odorata* seeds: Sensitivity to abscisic acid, water potential and inhibitors of gibberellin biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.95, n.1, p.45-50. 1995.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – the technology.** 2 ed. Edington: Exegetics limited, 1996. 1574p.

GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*).** Lavras: UFLA, 1999. 91p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

HARBAGE, J.F.; STIMART, D.P.; EVERT, R.F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.680-688, 1993.

HAYASHI, M.; NAKAYAMA, M.; KOZAI, T. An application of the acclimatization unit for growth of carnation explants, and for rooting and acclimatization of the plantlets. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.189-194, 1988.


HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimação de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira "Marubakaido" e "M-26".** Lavras: UFLA, 1999. 240p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination.** New York: Marcel Dekker, 1995. 853p. (Books in soils, plant, and the environment).

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenini sulphate. **Annals of Botany**, London, v.38, p.795-802, 1974.

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

- KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p. 121-127, 1988.
- LAUZER, D.; LABERGE, C. Establishment of collection of *Rosa* species through *in vitro* embryo culture. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.3, p.458-459, 1996.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L.; ASOKAN, P.M. Tropical and subtropical fruits and vegetables. In: Zimmerman, R.A. (ed). **Tissue culture as a plant production system for agricultural crops**. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff, 1986. p.237-251.
- MAESTRI, M.; VIEIRA, C. Nota sobre a redução da percentagem de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. bourbon), por efeito do ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, v.10, n.59, p.324-331, jul. 1961.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Meios de Cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 127p. (Apostila).
- PREECE, J.E.; BATES, S.A.; VAN SAMBEEK, J.W. Germination of cut seeds and seedling growth of ash (*Fraxinus spp.*) *in vitro*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.25, n.8, p.1368-1374, 1995.
- PREECE, J.E.; ZHAO, J.; KUNG, F.H. Callus production and somatic embryogenesis of white ash. **HortScience**, Alexandria, v.24, p.377-380, 1989.



SERRET, M.D. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, n.3, p.217-230, 1997.

STREET, H.E.; OPIK, H. **Fisiologia das angiospermas** - crescimento e desenvolvimento. São Paulo: EDUSP, 1974. 332p.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C.; FURTADO, J.S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberelic acid treated coffee seeds during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.2, n.1, p.103-106, 1979.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings or *in vivo* establishment. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v.38, n.3/4, p.261-267, 1989.

CAPÍTULO III. INDUÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES ATRAVÉS DA PROLIFERAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM SEGMENTOS NODAIS DE *Annona glabra* L.

I. RESUMO

Como primeira etapa, no estabelecimento de uma metodologia para a micropropagação da *Annona glabra* L., foi induzida a proliferação e o crescimento de brotações axilares, através da inoculação de segmentos nodais em meio MS, solidificado com 7 g/L de ágar, suplementado com 20 g/L de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L), combinados com diferentes concentrações de ANA (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L), com ou sem a adição de 1,0 mg/L de GA₃. Após inoculação, os frascos contendo as segmentos foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, durante 15 dias. Após esse período, foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C e intensidade luminosa de 13 μ mol.s⁻¹m⁻² durante 30 dias. De acordo com a análise dos resultados, não houve diferença significativa entre os tratamentos, quanto ao número médio de brotações obtidas por segmento nodal, sendo produzidas em média 1,5 brotações/explante. Segmentos inoculados em meio desprovido de reguladores de crescimento, também responderam pela proliferação de brotações. Entretanto, brotações com comprimento superior à 1 cm, ideais para a fase de enraizamento, podem ser obtidas, utilizando-se até 0,75 mg/L de BAP, sem a adição de GA₃, o qual mostrou ser prejudicial ao desenvolvimento das brotações. A espécie mostrou ser sensível à deficiência de cálcio e ao acúmulo de etileno, durante o cultivo *in vitro* das brotações.

2. ABSTRACT

Induction and *in vitro* shoot growth through axillary bud proliferation in nodal segments on *Annona glabra* L.

As a first step for the establishment of a micropropagation methodology for *Annona glabra* L. the proliferation and growth of axillary shoots were induced through the inoculation of nodal segments in MS medium with 7.0 g/L agar supplemented with 20.0 g/L sucrose and different concentrations of BAP (0; 0.05; 0.5; 1.0 and 1.5 mg/L) in combination with different concentrations of NAA (0; 0.05; 0.1; 0.5 and 1.0 mg/L) in the presence or absence of 1.0 mg/L GA₃. After inoculation, explants were maintained in a growth room in the

absence of light for 15 days. After this period, explants were transferred to a growth room with 16 hours photoperiod, temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and light intensity of $13 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ for 30 days. The results indicated no significant differences between the treatments regarding shoot formation from nodal segments obtaining an average of 1.5 shoot/explant. Segments inoculated in the absence of growth regulators also induced shoot formation. However, shoots with length superior to 1.5 cm can be obtained using up to 0.75 mg/L BAP without GA₃, whose presence inhibited shoot development. The species showed to be sensitive to calcium deficiency and ethylene accumulation during *in vitro* shoot cultivation.

3. INTRODUÇÃO

↳ A propagação assexuada ou vegetativa de espécies de *Annona* é, usualmente, por enxertia de mudas selecionadas sobre porta-enxertos, formados a partir de sementes ou por estaquia. Entretanto, os porta-enxertos são altamente heterogêneos no vigor e na resistência a doenças e, conseqüentemente, o crescimento e a produtividade das mudas também são variáveis. Dessa forma, com exceção de algumas cultivares, a propagação clonal de espécies de *Annona* por métodos convencionais não tem obtido sucesso.

↳ Em diversas espécies, o uso da micropropagação tem possibilitado a obtenção de grande quantidade de mudas livres de doenças e mais homogêneas, em tempo e espaço físico bastante reduzidos, em comparação aos métodos de propagação convencionais. Por essa razão, a definição de uma metodologia para a micropropagação da espécie, pode apresentar uma contribuição efetiva, no desenvolvimento da cultura, tanto de matrizes como de porta-enxertos.

O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma metodologia para indução e crescimento de brotações de *Annona glabra* L., a partir da proliferação de gemas axilares, em segmentos nodais, como primeira etapa, na definição de uma metodologia para micropropagação da espécie.

4.REFERENCIAL TEÓRICO

A multiplicação, através da proliferação de gemas axilares, é o processo mais utilizado para conduzir a micropropagação de diversas espécies, principalmente lenhosas, visto que, esse sistema é mais facilmente controlado e apresenta uma fidelidade genética muito alta (Grattapaglia e Machado, 1998).

A fidelidade genética é a principal vantagem da utilização da micropropagação, em programas de melhoramento, porque permite a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais de variedades recém-melhoradas (Guerra et al., 1999).

A técnica consiste em estimular o crescimento de gemas axilares, através do isolamento destas e da superação da dominância apical, com a aplicação de citocininas e/ou giberelinas (Grattapaglia e Machado, 1998). As partes aéreas ou brotações assim produzidas são enraizadas e transplantadas.

Os explantes mais usados para a micropropagação são os segmentos nodais e os ápices caulinares. Diversas espécies lenhosas são regeneradas através de segmentos nodais, sendo que, a juvenilidade desses explantes, pode ser um fator importante na capacidade de brotação e desenvolvimento da cultura *in vitro* (Braga, Caldas e Habe, 1997).

O meio de cultura usado nas diversas fases da micropropagação deve proporcionar à planta, os nutrientes necessários ao metabolismo das células e os fatores de crescimento, responsáveis pela diferenciação de brotos e raízes (Schuch e Peters, 1993).

O meio MS (Murashige e Skoog, 1962), tem apresentado bons resultados para diversas espécies, entretanto, para algumas espécies lenhosas, composições mais diluídas em macronutrientes, como o meio de cultura WPM (Llyod e McCown, 1980) tiveram melhor desempenho (Grattapaglia e Machado, 1998).

De acordo com Sriskandarajah, Mullins e Nair (1982), na fase de multiplicação, é necessário que se tenha um meio rico em citocinina, para haver produção de um grande número de brotações, através do crescimento de meristemas laterais.

Em diversas espécies, o BAP tem sido a citocinina mais ativa para a multiplicação de brotações. Tanuwidjaja, Webb e Sagawa (1998) observaram que o número de brotações de macieira produzidas, aumentou linearmente com o aumento nas concentrações de BAP e o tempo requerido, para que ocorresse a proliferação das brotações, decresceu com o aumento nos níveis de BAP. No entanto, a exposição dos explantes ao BAP, sob altas concentrações ou durante tempo prolongado, promoveu a formação de brotações hiperidratadas, mal formadas e pouco desenvolvidas.

É, também, conhecido que altos níveis de BAP ou tempo prolongado do tratamento podem promover a formação de calos e brotações adventícias. As brotações assim produzidas são inadequadas à propagação clonal, porque podem não produzir plantas geneticamente uniformes (Tanuwidjaja, Webb e Sagawa, 1998).

Em algumas espécies, como a *Maclura tinctoria* (Gomes, 1999) e a *Syzygium travancoricum* (Anand, Rao e Balakrishna, 1999) é necessário a combinação entre citocininas e auxinas para a indução de brotações, ou para que, o processo de multiplicação seja mais eficiente. No entanto, segundo George (1996), o uso de concentrações elevadas de auxinas, não é apropriado à indução de brotações, porque pode induzir à formação de calos.

Outro grupo de reguladores de crescimento, utilizado na fase de multiplicação, são as giberelinas, que estimulam o crescimento, pois promovem a expansão celular (Schuch e Peters, 1993).

Diversos autores, entre os quais Yui et al. (1993) verificaram que a adição de giberelina ao meio MS, em concentrações que variam entre 0,1 e

1,0 mg/L, não apresentam efeitos significativos sobre a proliferação de brotações em porta-enxertos e cultivares de macieira. No entanto, de acordo com esses autores, quando o objetivo é a obtenção de brotos de macieira alongados, apropriados para a fase de enraizamento, é indicada a adição de giberelina em concentrações superiores à 0,1 mg/L.

Gomes (1999), também observou que o uso de GA₃, em concentrações que variam entre 1,0 – 6,0 mg/L, favorece o crescimento e o desenvolvimento, *in vitro*, de brotações de moreira, porém, observou que a utilização de 4,0 mg/L e 6,0 mg/L do regulador, promoveu a formação de calos na base do explante. Segundo George (1996), citado pelo mesmo autor, a formação de calos na base das brotações é indesejável, pois impede a conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea.

A formação de parte aérea é dependente de luz, mas a incubação dos explantes, no escuro total ou sob intensidade de luz reduzida, nos primeiros dias após o isolamento, pode ser útil por reduzir a oxidação fenólica. Segundo Miguel, Druart e Oliveira (1996), o período de escuro também pode influenciar os níveis endógenos de hormônios, que dessa forma, podem interagir com as citocininas e auxinas, aplicadas exogenamente e contribuir para o processo de indução.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. OBTENÇÃO E ASSEPSIA DOS EXPLANTES

Os segmentos nodais foram obtidos através da secção das hastes caulinares jovens (não lenhosas), contendo apenas uma gema e tamanho aproximado de 15 a 20 mm, retirados de plântulas germinadas, *in vitro*, após

6 meses de cultivo. Para a desinfestação, os segmentos nodais foram mantidos em água corrente, por 40 minutos e lavados com detergente. A seguir, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v), por 1 minuto, em associação com a imersão em hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, foram lavados, por três vezes, em água destilada e autoclavada para eliminação do excesso de soluções desinfestantes. Após a desinfestação, os explantes foram mantidos em solução de ácido ascórbico (200 mg/L) por 20 minutos.

5.2. INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Os segmentos nodais, foram inoculados em frascos, contendo 30 mL do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), solidificado com 7 g/L de ágar, suplementado com 20 g/L de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L), combinados com diferentes concentrações de ANA (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L), com ou sem a adição de 1,0 mg/L de GA₃.

O pH do meio cultura foi ajustado para 6,0. Em seguida, o meio de cultura foi autoclavado à 121°C por 20 minutos.

Foram inoculados 2 segmentos por frasco. Após inoculação, os frascos, contendo as segmentos, foram mantidos em sala de crescimento, no escuro durante 15 dias. Após esse período foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C e à intensidade luminosa de 13 μ mol.s⁻¹m⁻² durante 30 dias.

5.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o delineamento estatístico, inteiramente casualizado, com quatro parcelas por tratamento, sendo que cada parcela (frasco), continha dois segmentos, totalizando 8 segmentos por tratamento. Após 45 dias, avaliou-se o número de brotações por segmento e o comprimento da haste das brotações.

O número médio de brotações por segmento e o comprimento médio das brotações foram consideradas como tendo distribuição Poisson (não normal). A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de “Deviance” (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

Como os tratamentos são de natureza quantitativa, se detectadas diferenças significativas entre eles, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão múltipla (superfície de resposta) apropriados.

Para o comprimento médio das brotações, não foi possível adotar um modelo de regressão múltipla satisfatório e, o efeito dos tratamentos foi estudado por análise de regressão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de “Deviance” (Tabela 4), não foi observado efeito significativo dos tratamentos, sobre o número médio de brotações obtidas por segmento nodal de *Annona glabra* L., sendo produzidos em média 1,5 brotos/explante, em todas as concentrações de BAP utilizadas, ou em combinação com ANA, na presença ou na ausência de GA₃.

Geralmente, altas concentrações de citocininas promovem a formação de um grande número de brotações (Tanuwidjaja, Webb e Sagawa, 1998) e,

provavelmente, as reduzidas concentrações de BAP utilizadas nesse experimento, tenham sido insuficientes, para promover diferenças na taxa de multiplicação.

TABELA 4. Análise de “Deviance”, para o número médio de brotações por segmento nodal de *Annona glabra* L., referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Tratamento	36	23,3013 NS
Regressão	11	10,2229 NS
Desvios	25	13,0784 NS
Erro	111	52,8201

** significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

Segmentos nodais inoculados em meio desprovido de reguladores de crescimento, também responderam pela proliferação de brotações. De acordo com Pinto et al. (1994), a emissão de brotações, na ausência de BAP, provavelmente, ocorra devido às citocininas inerentes ao próprio explante.

Tais resultados discordam de Gomes (1999) e Jordan, Velozo e Sabja (1996), que descrevem o efeito promotor do ANA, em associação com o BAP, na taxa de multiplicação em *Maclura tinctoria* e *Nothofagus* respectivamente. Em contrapartida, diferem de George (1996) e Pasqual e Barros (1991), que relatam o efeito inibitório desse regulador, sobre a proliferação de brotações de diversas espécies e de *Coffea arabica* L. respectivamente.

Em relação ao GA₃, a presença desse regulador no meio de cultura, não favorece à proliferação da brotações de *Annona glabra* L. De acordo com George (1996), o efeito da GA₃, na proliferação de brotações, varia de acordo

com a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo também da espécie que está sendo multiplicada. De maneira geral, o GA₃ tem pouco efeito sobre a proliferação das brotações, o que pode estar relacionado ao fato de que, as giberelinas são utilizadas em baixas concentrações, aliada ao fato de que perdem 90% da sua atividade biológica durante a autoclavagem (Yui et al., 1993).

De acordo com a análise de regressão, o comprimento médio das brotações de *Annona glabra* L. foi afetado apenas pelas concentrações de BAP, sendo a interação com GA₃ significativa (Tabela 5). Os resultados desse estudo indicam que a adição de ANA ao meio de cultura, em todas as concentrações testadas, não possui efeito significativo sobre o comprimento médio dos brotos. Esses resultados discordam de Grattapaglia e Machado (1998), os quais afirmam que as auxinas devem ser utilizadas no meio de multiplicação, porque estimulam o crescimento das partes aéreas, visto que, anulam o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas.

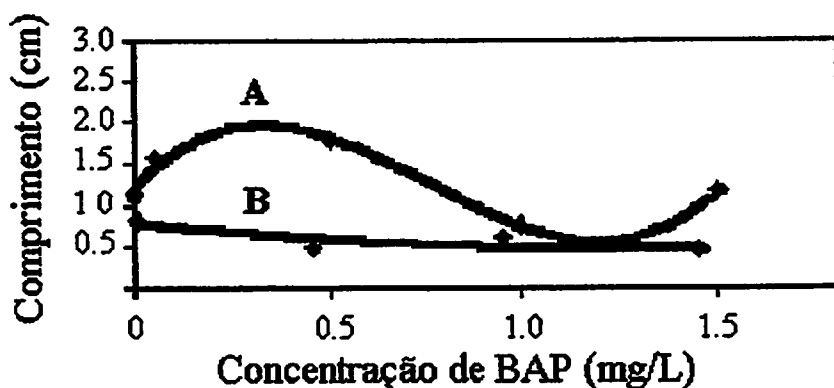
Resultados contraditórios, também, foram obtidos por Arello e Pinto (1993), que observaram necessidade da combinação entre BAP e ANA, para o maior desenvolvimento das brotações de *Kielmeyera coriacea*.

TABELA 5. Análise de variância para o comprimento médio das brotações em segmentos nodais de *Annona glabra* L. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Causas de variação	GL	SQ	QM	Prob >F
BAP	4	6,9191	1,7298	0,0599
ANA	4	3,9040	0,9760	0,2678
GA ₃	1	9,1511	9,1511	0,0006
BAP x ANA	12	13,6843	1,1403	0,1205
BAP x GA ₃	3	5,6453	1,8818	0,0600
ANA x GA ₃	3	2,4206	0,8069	0,3567
BAP x ANA x GA ₃	9	7,3706	0,8189	0,3646
Resíduo	111	82,2045	0,7406	
Total	147	135,7978		

Média geral - 1,05 cm Coef. Variação - 82,08%

Conforme é demonstrado na Figura 6, brotações mais alongadas (superiores a 1,0 cm), ideais para a fase de enraizamento, podem ser obtidas, utilizando-se concentrações inferiores a 0,75 mg/L de BAP, visto que, a utilização de concentrações superiores às citadas, reduzem o tamanho médio dos brotos. De acordo com Yui et al. (1993), a utilização de maiores concentrações de BAP promovem a formação de grande número de brotos, em detrimento, porém, de seu desenvolvimento. Dessa forma, se o objetivo é produzir brotos maiores, para posterior enraizamento, pode-se trabalhar com concentrações mais baixas.



Equações:	
$Y_A = 4,2696 x^3 - 9,765 x^2 + 5,0073 x + 1,2227$	$r^2 = 0,9621$
$Y_B = 0,1022 x^2 - 0,2663 x + 0,8202$	$r^2 = 0,6894$

FIGURA 6. Efeito das concentrações de BAP, sobre o comprimento médio das brotações de *Annona glabra* L., formadas a partir de segmentos nodais, na ausência (A) e na presença de GA₃ (B). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Em relação ao GA₃, a presença de 1,0 mg/L desse regulador de crescimento, no meio de cultura, não estimula o crescimento das brotações, demonstrando, ao contrário, ser prejudicial ao desenvolvimento das mesmas,

quando comparado ao meio sem adição de GA₃, produzindo brotos com comprimento médio inferior a 1,0 cm, em todas as concentrações de BAP (Figura 6). Resultados semelhantes foram obtidos por Biasi, Koller e Kampf (1994), durante a produção de brotações em segmentos nodais do abacateiro 'Ouro verde'.

O aspecto geral das brotações de *Annona glabra* L., formadas *in vitro*, em diferentes concentrações de BAP, pode ser visualizado na Figura 7.

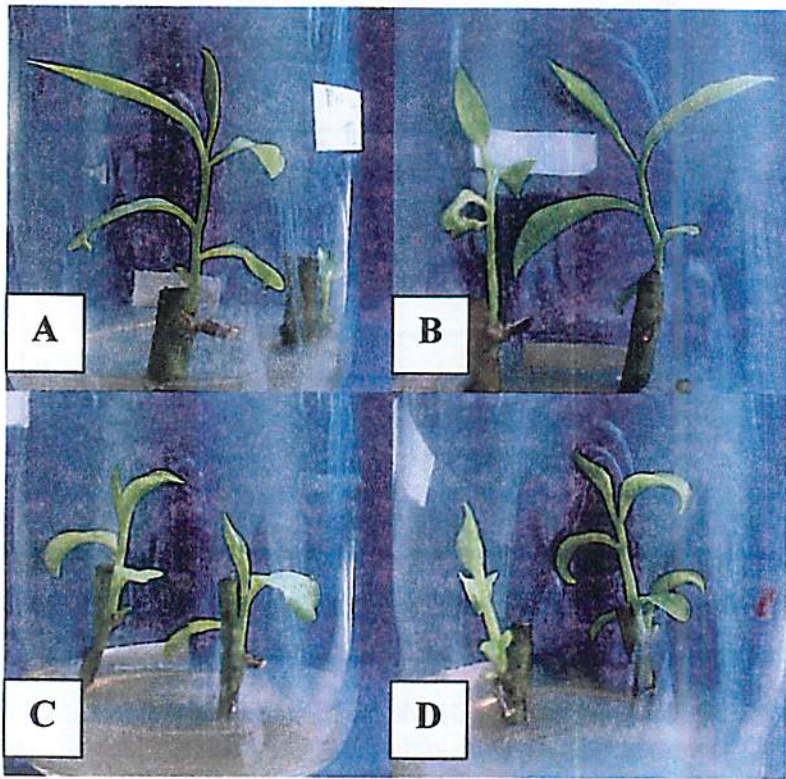


FIGURA 7. Aspecto geral do crescimento de brotações de *Annona glabra* L., obtidas *in vitro*, a partir de segmentos nodais inoculados na presença de BAP. A) Controle; B) 0,5 mg/L; C) 1,0 mg/L; D) 1,5 mg/L. UFPA, Lavras-MG, 2000.

Durante o cultivo *in vitro*, das brotações de *Annona glabra* L., observou-se necrose no ápice das brotações e abscisão foliar (Figura 8).



FIGURA 8. Aspecto visual de brotações de *Annona glabra* L., obtidas a partir de segmentos nodais, que apresentam necrose apical e abscisão foliar. UFLA, Lavras-MG, 2000.

A necrose apical e a abscisão foliar são desordens fisiológicas, frequentemente observadas em condições normais de microcultivo (Munhoz et al., 1999); têm sido associadas à deficiência de cálcio (Sha, McCown e Peterson, 1985) e ao acúmulo de gases, como o etileno (Lemos e Blake, 1996) respectivamente.

De acordo com esses autores, o tipo de recipiente de cultivo e o selamento deste, são os principais fatores responsáveis pelo desencadeamento desses distúrbios, visto que, mantém alta umidade relativa do ar, no interior do

recipiente, inibindo a transpiração, da qual depende o cálcio, para translocar no xilema da planta e impedem trocas gasosas com a atmosfera externa, facilitando o acúmulo de gases produzidos pelos tecidos a níveis fisiologicamente ativos. Como consequência, o crescimento é reduzido ou paralisado, impossibilitando que o processo de micropropagação continue ou levando à morte a brotação.

Segundo Biasi, Koller e Kampf (1994), a adição de GA₃ ao meio de cultura aumenta a porcentagem de brotações anormais, com folhas alongadas, retorcidas, cloróticas, quebradiças e de fácil abscisão.

Sha, McCown e Peterson (1985) reduziram a necrose apical em brotações de diferentes cultivares de *Solanum tuberosum*, aumentando a concentração padrão de cálcio do meio MS.

A utilização de técnicas, que reduzem o acúmulo de etileno, desde as mais simples, como o aumento no intercâmbio de gases com a atmosfera externa, através da retirada do parafilme (McClelland e Smith, 1990), ou a utilização de tampas, que permitam maiores trocas gasosas (Coelho, 1999), até as mais aprimoradas como o sistema de ventilação forçada, descrito por Armstrong et al. (1997), têm mostrado resultados satisfatórios no controle da abscisão foliar *in vitro*.

7. CONCLUSÕES

- Com base nos resultados não é necessária a adição de reguladores de crescimento, para induzir a proliferação de brotações, em segmentos nodais de *Annona glabra* L.;
- Esta metodologia possibilita a formação, em média, de 1,5 brotos por segmento nodal de *Annona glabra* L.;

- Brotações mais adequadas para a fase de enraizamento podem ser obtidas, utilizando-se até 0,75 mg/L de BAP, sem a adição de GA₃.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, A.; RAO, C.S.; BALAKRISHNA, P. *In vitro* propagation of *Syzygium travancoricum* Gamble – an endangered tree species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.56, p.59-63, 1999.
- ARELLO, E.F.; PINTO, J.E.B.P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*: I – efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.25-31, 1993.
- ARMSTRONG, J.; LEMOS, E.E.P.; ZOBAYED, S.M.A.; JUSTIN, S.H.F.W.; ARMSTRONG, W. A humidity-induced convective through flow ventilation system benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut calloid. **Annals of Botany**, New York, v.79, p.31-49, 1997.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C.; KÄMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro ‘Ouro Verde’ a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.7, p.1051-1058, 1994.
- BRAGA, M.F.; CALDAS, L.S.; HABE, M.H. Estabelecimento de acerola (*Malpighia glabra* L.) *in vitro*: efeito do clone e do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.3, p.335-346, 1997.
- COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. Lavras: UFLA, 1999. 119p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).

- DEMÉTRIO, C.G.B. Modelos lineares generalizados na experimentação agrônômica. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 5., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: (S.n.), 1993. 125p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – The technology.** 2.ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574p.
- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*).** Lavras: UFLA, 1999. 91p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1998. p.331-353.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODAR, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.
- JORDAN, M.; VELOZO, J.; SABJA, A.M. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst., Fagaceae. **Plant Cell Reports,** New York, v.15, p.795-792, 1996.
- LEMOS, E.E.P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. **Journal of Horticultural Science,** Ashford, v.71, n.5, p.721-728, 1996.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience,** Alexandria, v.15, (abst. 321), p.416, 1980.

- McCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five wood species. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.7, p.787-800, 1990.
- MIGUEL, CM.; DRUART, P.; OLIVEIRA, M. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In vitro Cellular Developmental Biology*, Columbia, v.32, p.148-153, july-september 1996.
- MUNHOZ, A.B.; ENCINA, C.L.; PÉREZ, E.S.; ALFARO, F.P. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.58, p.11-17, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.437-497, 1962.
- PASQUAL, M.; BARROS, I. Efeito de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongação de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.2, p.201-204, 1991.
- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, jun. 1994.
- SCHUCH, M.W.; PETERS, J.A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Xilld, Borkh) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.4, p.433-437, abr. 1993.
- SHA, L.; McCOWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.6, p.631-634, 1985.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters, Ireland**, v.24, p.1-9, 1982.

TANUWIDJAJA, C.; WEBB, D.T.; SAGAWA, Y. Micropropagation of *Akia* (*Wikstroemia uva-ursi* A. Gray). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 53, p.85-90, 1998.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; NAGIG, N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J.S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira M-7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.28, n.5, p.597-602, 1993.

CAPÍTULO IV. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES, OBTIDAS A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE *Annona glabra* L.

1. RESUMO

Visando estabelecer uma metodologia para enraizamento, as brotações de *Annona glabra* L., obtidas a partir de segmentos nodais, foram inoculadas em meio WPM, com metade da concentração de sais, suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar, 4,0 g/L de carvão ativado e acrescido de diferentes concentrações de AIB (0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L). Para avaliar a influência do pH sobre o enraizamento, o pH do meio de cultura foi ajustado em três faixas diferentes: 5,0; 6,0 e 7,0. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $13 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ durante 30 dias. O maior percentual de brotações enraizadas e o maior número de raízes emitidas por explante podem ser obtidos sem a adição de AIB ao meio de cultura e em pH 5,0, sendo que nessa faixa de pH, a utilização de concentrações elevadas de sacarose inibiu o crescimento das raízes.

2. ABSTRACT

***In vitro* root formation of shoots obtained from nodal segments of *Annona glabra* L.**

With the objective to establish an *in vitro* rooting methodology, shoots from *Annona glabra* L. obtained from nodal segments were inoculated in 50% WPM medium supplemented with 3% sucrose, 0.65% agar, 4.0 g/L activated charcoal and the following concentrations of IBA (0; 2.0; 4.0 and 6.0 mg/L). The medium pH was adjusted to 5.0; 6.0 and 7.0. After inoculation, the explants were maintained in a growth room with 16 hours photoperiod, temperature of $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and light intensity of $13 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ for 30 days. Highest percentage of rooted shoots and root number per explant can be obtained in the absence of IBA and medium pH adjusted to 5.0. The use of high sucrose concentrations at pH 5.0 inhibited root growth.

3. INTRODUÇÃO

O enraizamento é uma etapa fundamental da micropropagação para a constituição da muda completa, com influência direta sobre a sobrevivência e o crescimento das mudas, durante a transferência para a casa de vegetação.

O controle adequado dos diversos fatores internos e externos, que controlam o enraizamento, determinam o sucesso da metodologia de micropropagação.

O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma metodologia para indução e crescimento de raízes, em brotações de *Annona glabra* L., obtidas *in vitro*, a partir de segmentos nodais, como uma etapa para a obtenção de mudas micropropagadas da espécie.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

Essa etapa da micropropagação, caracteriza-se pela formação de raízes adventícias, nas partes aéreas ou brotações, provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplântio para condições *ex vitro*. Portanto, constitui uma etapa essencial e, muitas vezes limitante para a constituição da muda completa (Haissig, Davis e Riemenschneider, 1992).

O enraizamento pode ocorrer *in vitro* (dentro do frasco de cultura), ou *ex vitro* (após a transferência da brotação do frasco de cultura e simultânea à aclimatização). De acordo com Pierik (1988), quando o enraizamento ocorre *in vitro*, há maior sobrevivência e percentual de brotações enraizadas,

especialmente, em espécies de difícil enraizamento. Porém, implica em uma fase adicional de aclimatização após o enraizamento.

Independente do método de enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*), os princípios morfofisiológicos são os mesmos. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a rizogênese pode ser dividida em três fases distintas: indução, iniciação e alongamento. De acordo com Harbage *et al.* (1993), as duas primeiras fases são dependentes de auxina e a terceira fase inibida pela presença da mesma.

Além da aplicação exógena de reguladores de crescimento, a formação de raízes adventícias depende da influência de outros fatores externos como temperatura, umidade, substrato, pré-condicionamento, além de fatores internos como balanço hormonal, condições fisiológicas da planta matriz e nutrição.

O enraizamento de espécies lenhosas, quando comparado ao de espécies herbáceas, geralmente é mais difícil e se agrava, à medida que se utiliza material menos juvenil, uma vez que, a restauração da competência de enraizamento diminui, ao aproximar-se da fase adulta.

A qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação, determina, em geral, o sucesso do enraizamento. Partes aéreas pequenas não enraizam bem e necessitam de uma fase intermediária de alongamento.

A absorção da auxina exógena e a conseqüente resposta ao enraizamento, segundo Rubery e Sheldrake (1973), pode ser influenciada pelo pH do meio de cultura, em função da natureza acidica das moléculas de auxina, utilizadas para estimular o enraizamento. Harbage, Stimart e Auer (1998), observaram que a absorção de AIB pelos propágulos foi inversamente proporcional ao pH do meio de cultura, indicando que a maior formação de raízes observada em pH reduzido, pode ter ocorrido como resultado do aumento na absorção do regulador de crescimento.

Outro fator relevante é que altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente, o crescimento das raízes

(Centellas et al., 1999). Concentrações de sais no meio diluídas para 1/2 , 1/3 ou 1/4, podem possibilitar melhor enraizamento. Em adição, segundo Munhoz et al. (1999), concentrações de sais utilizadas na fase de multiplicação, também podem afetar o enraizamento das brotações, sendo que, menores concentrações de sais podem proporcionar melhores resultados na etapa de enraizamento.

Embora, a sacarose seja essencial como fonte de energia para a formação de raízes adventícias (Fortes, 1992), de acordo com Hoffmann (1999), a redução no teor de sacarose do meio de cultura de 30 para 10-20 g/L, em geral, beneficia o enraizamento de brotações de macieira, visto que, altas concentrações de sacarose tendem a desfavorecer a morfogênese e o crescimento *in vitro* e afetar o estado hídrico do explante, contribuindo para ocorrência de vitrificação (Hayashi, Nakayama e Kozai, 1988). Biasi (1996), também, observou benefícios na redução da concentração de sacarose de 3% para 1%, na micropropagação de videira, sendo que, utilizando-se 3% de sacarose as brotações enraizaram pouco e formaram raízes de baixa qualidade.

Compostos como o carvão ativado, em concentrações de 0,1 a 2% (p/v), são comumente utilizados em meios de cultura para enraizamento, porque estimulam a condição de escuro, no qual as raízes, normalmente, se desenvolvem, absorvem compostos tóxicos inibidores do enraizamento e fixam auxinas, o que é, em geral, benéfico para o alongamento das raízes (Gomes, 1999). De acordo com Jouira et al. (1998), o carvão ativado pode ser essencial para o processo de enraizamento, além de prevenir a formação de calos na base do explante.

Segundo Rasai, George e Kantharajah (1995), a utilização de carvão ativado, aumenta o potencial de enraizamento de outras espécies de *Annona*, principalmente, porque reduz o problema de oxidação, muito freqüente nessas espécies.

O substrato, que é o meio de sustentação, ou suporte durante o cultivo *in vitro*, é um dos fatores externos de maior influência sobre o enraizamento das brotações e sobre a qualidade das raízes adventícias (Hoffmann, 1999). O método convencional de micropropagação consiste no enraizamento *in vitro* de brotações, em meio solidificado com ágar, ou produto equivalente. Embora, o ágar, durante a fase de indução, proporcione a emissão de maior número de raízes, quando comparado a outros substratos como vermiculita, areia e perlita, em função de maior facilidade de acesso aos nutrientes e pela condição física uniforme, em todo o meio de cultura, pode afetar o crescimento das raízes (Hutchinson, 1984) e condicionar o padrão morfológico das mesmas (Simões, 1988). De acordo com Leite (1995), o sistema radicular adventício emitido em ágar é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares, podendo ser menos eficientes na absorção de água e nutrientes durante a transferência para a casa de vegetação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

Foram utilizados como explantes brotações apicais, obtidas a partir de segmentos nodais, com no mínimo 2 cm de comprimento, retirando-se as folhas inferiores e mantendo-se o meristema apical e as 2-3 folhas mais próximas do meristema.

As brotações foram transferidas para frascos, contendo 30 mL do meio Wood Plant Medium (Lloyd e McCown, 1980), com metade da concentração de sais, suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar, 4,0 g/L de carvão ativado e acrescido de diferentes concentrações de AIB (0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L).

O pH do meio de cultura foi ajustado em três faixas diferentes: 5,0; 6,0 e 7,0. Após o ajuste do pH, os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C.

Inoculou-se, em câmara de fluxo laminar, apenas um explante (brotação) em cada frasco. Posteriormente, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25°C ± 1, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 13 μ mol.s⁻¹m⁻², durante 30 dias, quando foi avaliado o percentual de enraizamento, número médio de raízes por brotação e o comprimento médio das raízes.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

Os parâmetros a serem avaliados foram considerados como tendo distribuição Poisson (não-normal) e, assim, optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (Demétrio, 1993), utilizando-se a função logística como ligação canônica “η”, ou seja:

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

onde “λ” é o parâmetro da distribuição Poisson. O preditor linear “η” corresponde a:

$$\eta = \mu + t_i$$

em que “μ” é o efeito de uma constante e “t_i” o efeito do tratamento i. Como os tratamentos são de natureza quantitativa, se detectadas diferenças significativas entre eles, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão múltipla apropriados (superfícies de resposta). A escolha do melhor modelo de regressão, baseou-se na qualidade do ajustamento e, se possível, na ausência de

significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de “Deviance” (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

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

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

em que $F(x)$ é o modelo de regressão ajustado, que é função X_1 (concentração de AIB) e X_2 (Faixa de pH).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, o percentual de brotações enraizadas e o número médio de raízes emitidas por brotação foram afetados pela concentração de AIB e pelo pH do meio de cultura.

Os modelos de superfície de resposta (Figuras 9 e 10) indicam que a utilização de AIB, principalmente em concentrações superiores a 1,0 mg/L, reduz o percentual de enraizamento e o número médio de raízes emitidas por brotação de *Annona glabra* L. O maior percentual de brotações enraizadas (90%) e o maior número de raízes (2 raízes/explante) pode ser obtido sem a adição de AIB ao meio de cultura.

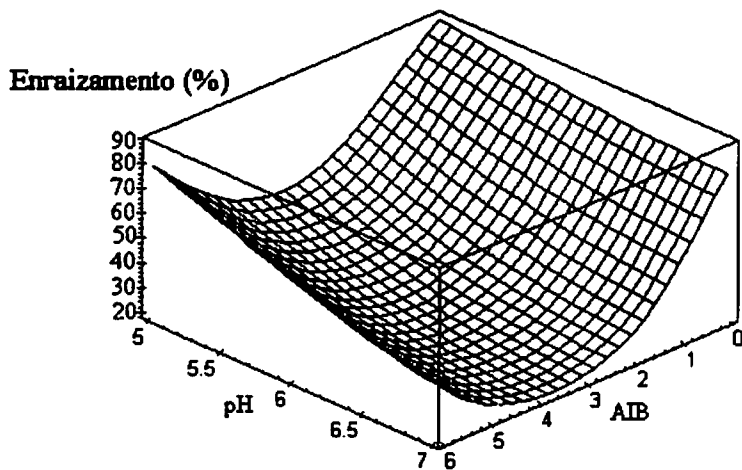


FIGURA 9. Modelo de superfície de resposta referente ao percentual de enraizamento de *Annona glabra* L., em função do pH do meio de cultura e da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

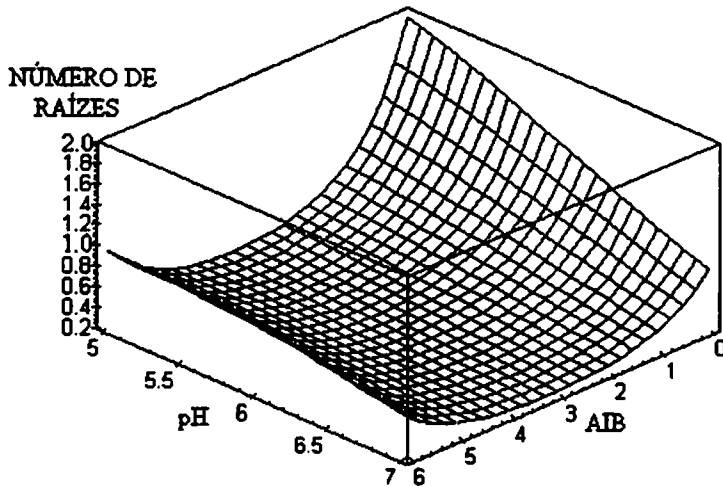


FIGURA 10. Modelo de superfície de resposta referente ao número médio de raízes emitidas em brotações de *Annona glabra* L., em função do pH do meio de cultura e da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

O alto percentual de enraizamento e o maior número médio de raízes formadas, na ausência do regulador de crescimento, sugerem que a formação de raízes adventícias, em brotações de *Annona glabra* L. não dependem do suprimento exógeno de AIB. Esse fato pode indicar o alto nível endógeno de auxina nos explantes e caracterizar a facilidade de enraizamento da espécie. De modo semelhante, Jordan, Velozo e Sabja (1996) observaram bom percentual de enraizamento, em explantes de *Nothofagus alpina*, na ausência de regulador de crescimento. Segundo Jouira et al. (1998), o conteúdo endógeno ou o balanço dos reguladores de crescimento pode ser mais importante para a resposta do explante.

O utilização no meio de cultura, de alta concentração de carvão ativado, pode ter influenciado a resposta dos explantes ao enraizamento, principalmente, na ausência do regulador de crescimento.

Esses resultados diferem dos resultados obtidos por Tanuwidjaja, Webb e Sagawa (1998), nos quais, o número de raízes em brotações de *Akia*, evoluiu em resposta ao aumento das concentrações de AIB no meio de cultura. Jouira et al. (1998), também observaram maior número de raízes por explante, utilizando concentrações mais elevadas de AIB.

Conforme é demonstrado na Figura 9, em todas as concentrações de AIB, a redução do pH de 7,0 para 5,0 aumenta o percentual de brotações enraizadas. O mesmo pode ser observado, quanto ao número de raízes obtidas por brotação (Figura 10).

De acordo com Pierik (1988), o número de raízes primárias é importante para a fixação das mudas, durante a aclimatização, embora, sua funcionalidade seja discutível, quando essas são emitidas em meio solidificado com ágar.

O efeito do pH sobre o enraizamento, também, foi relatado por Harbage, Stimart e Auer (1998), que observaram maior estímulo à formação de raízes, em brotações de macieira, quando o pH foi reduzido de 7,0 para 4,0.

De acordo com esses autores, a resposta dos propágulos à auxina exógena, freqüentemente, depende da concentração aplicada, nível de absorção e do subsequente metabolismo no tecido, sendo que a absorção de AIB, em função da natureza ácida dessas moléculas, pode ser regulada pelo pH do meio de cultura.

Esses resultados indicam que a resposta mais favorável ao enraizamento de brotações de *Annona glabra* L., observado em pH 5,0, pode ter ocorrido em função do aumento na absorção de AIB, proporcionado pelo pH ácido do meio de cultura. A influência do pH, em diferentes concentrações de AIB sobre o enraizamento, também, pode ser observado através dos diagramas de contornos correspondentes (Figura 11 e 12).

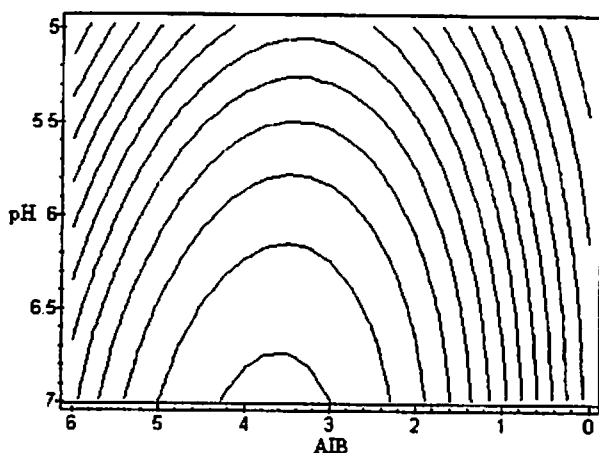


FIGURA 11. Diagrama de contornos, correspondente ao percentual de enraizamento de brotações de *Annona glabra* L., em função do pH do meio de cultura e da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

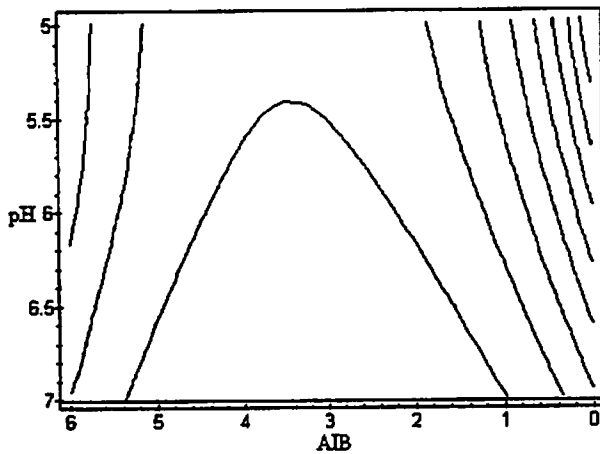


FIGURA 12. Diagrama de contornos, correspondente ao número médio de raízes em brotações de *Annona glabra* L., em função do pH do meio de cultura e da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

O aspecto geral das raízes formadas e das plântulas, obtidas em meio de enraizamento, com diferentes concentrações de AIB, nas três faixas de ajuste do pH, são demonstradas nas Figuras 13 e 14 respectivamente.

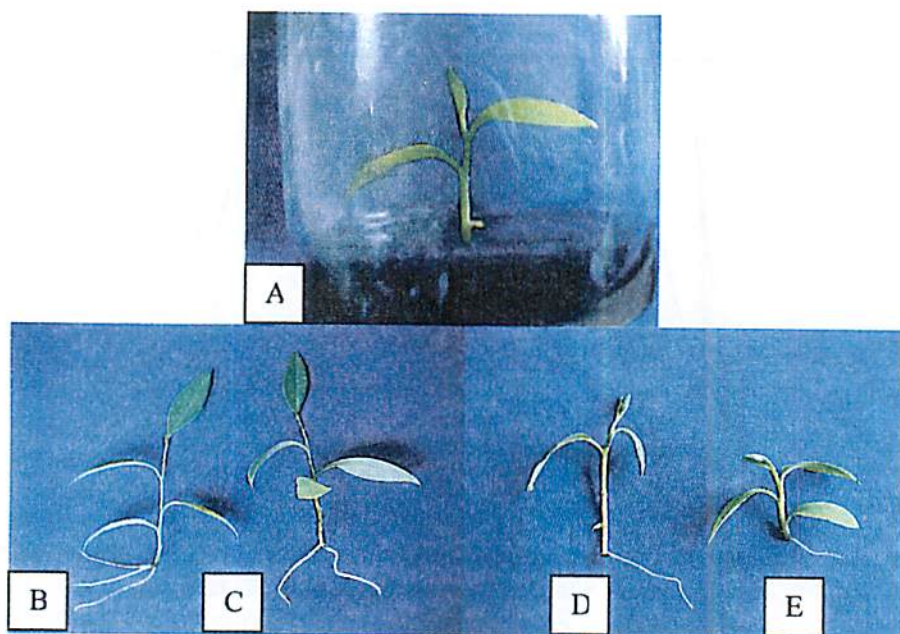


FIGURA 13. Enraizamento *in vitro* de brotações de *Annona glabra* L. A) Aspecto geral das brotações, em meio de enraizamento e plântulas obtidas em meio com B) 0; C) 2,0; D) 4,0 e E) 6,0 mg/L de AIB aos 30 dias. UFLA, Lavras-MG, 2000.

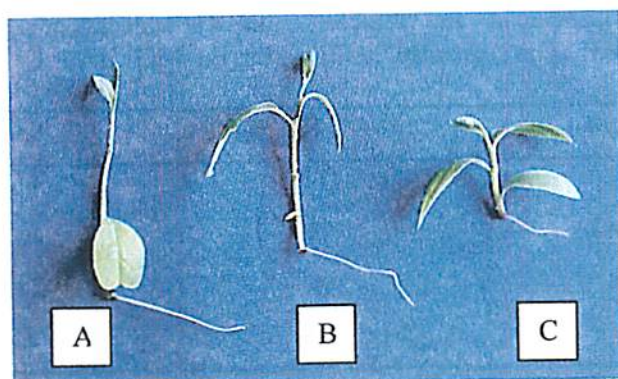


FIGURA 14. Aspecto visual de plântulas de *Annona glabra* L. formadas em meio de cultura sem adição de AIB e ajustado em diferentes faixas de pH: A) 5,0; B) 6,0; C) 7,0. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Os resultados da análise de “Deviance” (Tabela 6) para o número médio de raízes apresentam desvios não significativos, indicando que o modelo de regressão adotado foi satisfatório. No entanto, na análise de “Deviance” para o percentual de enraizamento (Tabela 7) não foi possível ajustar um modelo de regressão, biologicamente plausível, que apresentasse desvios não significativos.

Tabela 6. Análise de “Deviance”, para o número médio de raízes formadas, referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Tratamentos	(11)	35,2162*
Regressão	5	20,5343*
Desvios	6	14,6824NS
Resíduo	58	38,9206 NS

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

Tabela 7. Análise de “Deviance” para o percentual de enraizamento, referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Tratamentos	(11)	41,1426**
Regressão	5	16,4757**
Desvios	6	24,6669**
Resíduo	58	55,8409

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

O crescimento, *in vitro*, das raízes emitidas nas brotações de *Annona glabra* L., foi afetada pela concentração de AIB, somente em pH 5,0. Conforme pode ser observado na Figura 15, a presença do regulador de crescimento, principalmente, em concentrações mais elevadas, reduz o comprimento médio das raízes. Esses resultados, corroboram os relatos de Harbage, Stimart e Evert (1993), de que a presença de auxina, no meio de enraizamento, principalmente, em altas concentrações, pode inibir o crescimento das raízes.

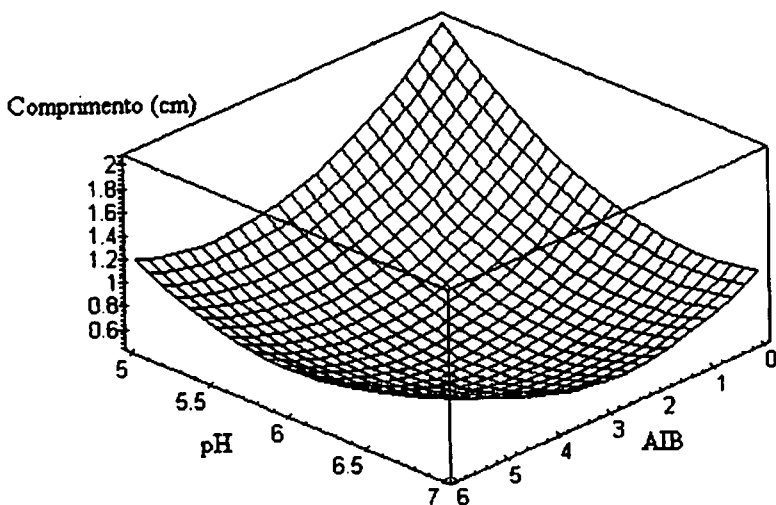


FIGURA 15. Modelo de superfície de resposta referente ao comprimento médio das raízes emitidas em brotações de *Annona glabra* L., em função do pH do meio de cultura e da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Os resultados indicam que em pH 6,0 e 7,0 não houve diferença significativa no comprimento médio das raízes, em função de diferentes concentrações de AIB. De qualquer maneira, esses resultados discordam de Harbage, Stimart e Auer (1998), pois de acordo com estes autores, o efeito do pH parece se limitar à fase de indução da formação de raízes adventícias, não possuindo efeito sobre o crescimento das mesmas.

Entretanto, segundo Gill et al. (1994), o número de raízes é mais importante que o tamanho das raízes durante a fase de aclimatização. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), raízes menores facilitam a repicagem para o substrato e a lavagem das mesmas para retirada do meio de cultura.

O efeito das diferentes concentrações de AIB, sobre o crescimento das raízes de *Annona glabra* L. em pH 5,0, também, pode ser observado através do diagrama de contornos correspondente (Figura 16).

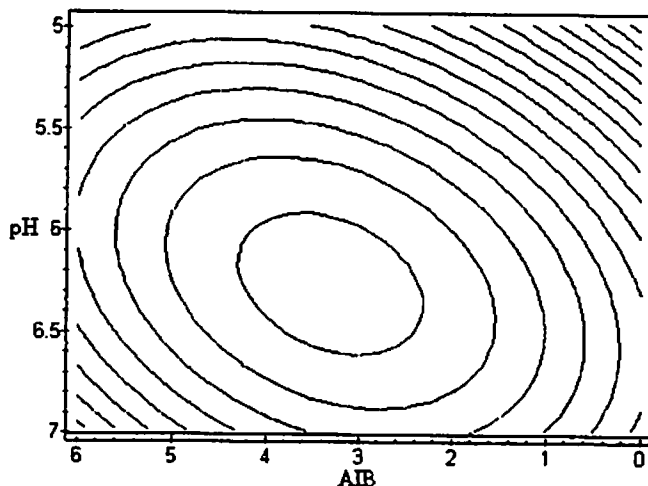


FIGURA 16. Diagrama de contornos, correspondente ao número médio de raízes emitidas em brotações de *Annona glabra* L., em função do pH do meio de cultura e da concentração de AIB (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

7. CONCLUSÕES

- É possível induzir, *in vitro*, a formação de raízes adventícias em brotações de *Annona glabra* L.;
- O melhor enraizamento é obtido na ausência do regulador de crescimento;
- Concentrações de AIB mais baixas e ajuste do pH do meio de cultura para 5,0, aumentam o percentual de brotações enraizadas e estimulam a formação de maior número de raízes no explante;
- Em pH 5,0, a presença de auxina no meio de cultura em concentrações elevadas, inibe o crescimento das raízes de *Annona glabra* L.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- BIASI, L.A. **Avaliação do desenvolvimento inicial de porta-enxertos e de mudas de videira obtidas através de diferentes métodos de propagação.** Piracicaba: ESALQ, 1996. 177p. (Tese – Doutorado em Agronomia).
- CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MULLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, fev. 1999.
- DEMÉTRIO, C.G.B. Modelos lineares generalizados na experimentação agrônoma. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRÔNOMICA, 5., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: (S.n.), 1993. 125p.
- FORTES, G.R. de L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos.** Viçosa: UFV, 1992. 163p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- GILL, M.I.S.; SINGH, Z.; DHILLON B.S.; GOSAL, S.S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedlings explants of “Kinnow” mandarin (*Citrus nobilis* x *citrus deliciosa* Tenore). **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.69, p. 231-236, 1994.
- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*).** Lavras: UFLA, 1999. 91p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1998, p.331-353.

- HAISSIG, B.E.; DAVIS, T.D.; RIEMENSCHNEIDER, D.E. Researching the controls of adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, p.310-317, 1992.
- HARBAGE, J.F.; STIMART, D.P.; AUER, C. pH affect 1H-indole-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induction in apple microcuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.1, p.6-10, 1998.
- HARBAGE, J.F.; STIMART, D.P.; EVERT, R.F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.680-688, 1993.
- HAYASHI, M.; NAKAYAMA, M.; KOZAI, T. An application of the acclimatization unit for growth of carnation explants, and for rooting and acclimatization of the plantlets. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.189-194, 1988.
- HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimação de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira "Marubakaido" e "M-26"**. Lavras: UFLA, 1999. 240p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.22, p.347-358, 1984.
- JORDAN, M.; VELOZO, J.; SABJA, A.M. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst., Fagaceae. **Plant Cell Reports**, New York, v.15, n.10, p.795-792, 1996.
- JOUIRA, H.B.; HASSAIRI, A.; BIGOT, C.; DORION, N. Adventitious shoot production from strips of stem in the Dutch elm hybrid 'Commelin': plantlet regeneration and neomycin sensitivity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.153-160, 1998.

- LEITE, G.B. Efeito de regulador de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação da pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. Pelotas: UFPEL, 1995. 50p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, Alexandria, v.15, (abst. 321), 1980. p. 416.
- MUNHOZ, A.B.; ENCINA, C.L.; PÉREZ, E.S.; ALFARO, F.P. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.58, p.11-17, 1999.
- PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large escale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.63-71, 1988.
- RASAI, S.; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.62, p.1-14, 1995.
- RUBERY, P.H.; SHELDRAKE, A.R. Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nature New Biology*, v.244, p.285-288, 1973.
- SIMÕES, M.O.M. Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbecck cv. Pêra cultivadas *in vitro*. Viçosa: UFV, 1988. 56p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- TANUWIDJAJA, C.; WEBB, D.T.; SAGAWA, Y. Micropropagation of *Albizia lebbekii* (Wikstroemia *uva-ursi* A. Gray). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.53, p.85-90, 1998.

CAPÍTULO V. ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE *Annona glabra* L. OBTIDAS POR MICROPROPAGAÇÃO

1. RESUMO

Em função da necessidade de garantir a sobrevivência e o crescimento satisfatório das plantas produzidas *in vitro*, após a transferência para a casa de vegetação, esse trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia, para a aclimatização de mudas de *Annona glabra* L. obtidas por micropropagação. Com esse objetivo, as plantas foram transferidas para caixa tipo gerbox, contendo vermiculita e envolvidas por sacos plásticos, para o controle da umidade relativa do ar. Em seguida, foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, onde permaneceram sob sombrite 70%, 50% e 30%. Os resultados indicaram que o controle da umidade relativa do ar e da intensidade luminosa no local de aclimatização, proporciona uma taxa de sobrevivência das plântulas de 100%.

2. ABSTRACT

Acclimatization of *Annona glabra* L. plantlets obtained through micropropagation

The objective of this work was to establish a methodology for the acclimatization of *Annona glabra* L. plantlets obtained through micropropagation in order to guarantee their survival and growth in a greenhouse. The obtained plantlets were transferred to gerbox containing vermiculite and wrapped with plastic in order control the air relative humidity. After this, the plantlets were maintained in a growth room with temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under 70, 50 and 30% light screen. The results indicated that with the control of air relative humidity and light intensity, 100% plantlet survival was obtained.

3. INTRODUÇÃO

A fase de aclimatização é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido. Para muitas espécies, esse estágio é considerado crítico, sendo que, o sucesso da transferência de plantas micropropagadas, para a casa de vegetação depende da interação e do manejo adequado dos diversos fatores envolvidos na adaptação da planta à mudança ambiental.

Infelizmente, a maioria dos trabalhos de micropropagação tem-se concentrado na indução de brotações e raízes. Relativamente, poucos trabalhos têm investigado a transferência das plantas, das condições *in vitro*, para a casa de vegetação e, conseqüentemente, pouca importância tem sido dada à sobrevivência e à qualidade final das mudas.

Este trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para a aclimatização de plantas de *Annona glabra* L., obtidas por micropropagação, que garanta alta taxa de sobrevivência, desenvolvimento satisfatório, além da qualidade das mudas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

A aclimatização é conceituada, como sendo a fase ou estágio da micropropagação, em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro*, para o ambiente natural, ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado (Debergh e Maene, 1981).

Os principais fatores envolvidos na aclimatização de mudas micropropagadas são: o genótipo, o estresse hídrico, a alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*), para autotrófico (*ex vitro*), a infecção por patógenos e o estresse pela luz (Hoffmann, 1999).

A perda de vigor e a subsequente morte, devido ao dessecamento são dois sérios problemas, que ocorrem com as plantas, que são transferidas das condições *in vitro* (Sutter e Hutzell, 1984).

Segundo Brainerd e Fuchigami (1981), o estresse hídrico é a principal causa do “choque no transplante”, sendo resultado da transpiração excessiva por todas as partes da planta, principalmente das folhas, e da inadequada absorção de água pelas raízes.

A alta umidade relativa do ar, no interior do recipiente de cultivo e a baixa irradiância são os principais fatores, que provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das mudas produzidas *in vitro*, de controlar as perdas de água, quando submetidas às condições adversas do ambiente natural, como o aumento da demanda evapotranspiratória (Preece e Sutter, 1991).

A excessiva perda de água, que contribui para a dessecação das plântulas, após a transferência, tem sido atribuída a diversas anormalidades induzidas pelas condições *in vitro*, como: pobre formação de cêra epicuticular (Sutter, 1988; Fuchigami, Cheng e Soeldner, 1981; Sutter e Langhans, 1979), aliada à alteração na composição química das cêras, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos (Sutter, 1983), deficiência no mecanismo de fechamento estomático (Shackel, Novello e Sutter, 1990; Sutter, 1988; Wardle, Dobbs e Short, 1983; Fuchigami, Cheng e Soeldner, 1981; Brainerd e Fuchigami, 1981), aumento na frequência de estômatos (Lee, Wetzstein e Sommer, 1988; Brainerd e Fuchigami, 1981); localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha (Capellades et al., 1990; Lee, Wetzstein e Sommer, 1988); alteração no desenvolvimento estomático, através do aumento na proporção estômatos totalmente desenvolvidos. (Wardle, Dobbs e Short, 1983); presença de hidatódios (Capellades et al., 1990; Donnelly, Skelton e Nelles, 1987; Donnelly e Skelton, 1987) e reduzida diferenciação do

mesofilo das folhas com alta proporção de espaços intercelulares (Dimassi-Theriou e Bosabalidis, 1997; Capellades et al., 1990; Lee, Wetzstein e Sommer, 1988; Smith, Palta e McCown, 1986; Donnelly e Vidaver, 1984; Brainerd et al., 1981).

De acordo com Shackel, Novello e Sutter (1990), o estresse hídrico das plantas, resulta da interação entre dois processos independentes: a regulação da perda de água e a sua eficiente absorção.

Fatores que aumentam a habilidade das plantas para transportar água, como a presença de raízes ou, a eficiência dessas raízes, podem ser tão importantes, quanto a regulação da perda de água pelos estômatos ou através da cutícula. Entretanto, diversos autores têm discutido a funcionalidade das raízes emitidas *in vitro*, após a transferência, em função do sistema radicular adventício, emitido em ágar ou produto equivalente ser, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares (Leite, 1995), ou a inadequada conexão vascular entre as raízes e as brotações (George, 1993). De acordo com esses autores estas situações reduzem a absorção, o fluxo de água e nutrientes, no sentido ascendente e podem contribuir para o estresse hídrico, visto que o déficit hídrico das plantas aumenta, quando a transpiração excede a absorção de água (Díaz-Pérez, Shackel e Sutter, 1995).

A perda de vigor observada nas plantas, após a transferência para a casa de vegetação, de acordo com Marin e Gella (1988), deve-se a inanição das plantas, causada pela baixa eficiência, na troca do metabolismo heterotrófico (com dependência total ou parcial de uma fonte externa de carbono), para o metabolismo autotrófico (com dependência total da fotossíntese).

Segundo Serret (1996), explantes ou plantas *in vitro*, apresentam estrutura e fisiologia do aparato fotossintético modificadas, resultante de algumas condições peculiares como baixa irradiância, altos níveis de sacarose e baixo teor de CO₂ disponível. Essas condições afetam a sobrevivência *ex vitro*,

visto que, diminuem a capacidade das plantas, em suprir a necessidade de energia e carbono através da fotossíntese.

A baixa taxa fotossintética, *in vitro*, tem sido atribuída a fatores como: baixa concentração de clorofila (Smith, Palta e McCown, 1986), reduzida atividade da Rubisco (Grout e Donkin, 1987) ou má formação dos cloroplastos (Lee, Wetzstein e Sommer, 1985).

O período de aclimatização, que varia de 1 a 4 semanas, tem por objetivo corrigir as alterações ou anormalidades, induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas normais, através da regulação da perda e da absorção de água (Smith, Palta e McCown, 1986; Wardle, Dobbs e Short, 1983). Dessa maneira, as plantas são submetidas à transição gradual do ambiente, de forma que elas não sofram estresses, que possam resultar em danos profundos, ou mesmo em sua morte.

Há vários métodos, que podem ser empregados para a aclimatização de mudas micropropagadas, os quais podem ser agrupados em três classes: a) métodos que aproximam as condições, *in vitro*, das condições naturais (pré-aclimatização ou endurecimento); b) métodos que aproximam às condições naturais daquelas *in vitro* (aclimatização *ex vitro*) e c) métodos que favorecem o crescimento após a aclimatização (Hoffmann, 1999).

Na classe dos métodos, que visam aproximar as condições naturais das condições *in vitro*, são mencionados o uso de ambientes com elevada umidade relativa do ar (acima de 90%), através da utilização de nebulização intermitente, coberturas plásticas ou de vidro sobre o recipiente de aclimatização (Gribaudo e Fronza, citados por Hoffmann, 1999).

A manutenção inicial das plântulas, após a transferência, sob alta umidade relativa tem sido essencial, para minimizar as perdas das plântulas

a redução gradativa da umidade relativa do ar, para que a planta seja aclimatizada.

Para evitar o estresse pela luz, é importante o controle da intensidade luminosa, através do sombreamento parcial, de modo que, a intensidade luminosa na casa de vegetação seja reduzida em 50-90%, para proporcionar luminosidade semelhante ou pouco superior à encontrada na sala de crescimento (George, 1993). Dessa forma, o período de decréscimo gradual da umidade relativa, deve ser acompanhado pelo incremento progressivo na irradiância.

O período de decréscimo gradual da umidade relativa, aumenta a capacidade de resposta dos estômatos, favorece à elaboração de cêras epicuticulares e reduz o murchamento após a transferência (Sciutti e Morini, 1995)

De acordo com Capellades et al. (1990), o período de aclimatização *ex vitro*, também permite a redução na frequência de estômatos, altera o formato e a topografia destes e de maneira geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

De acordo com Sutter e Langhans (1979), as novas folhas produzidas *ex vitro* (durante a aclimatização) possuem anatomia de transição, que pode conferir maior habilidade fotossintética e maior capacidade de regulação hídrica às plantas.

De acordo com diversos autores, entre estes Hoffmann (1999) e Kanechi et al. (1998), a modificação ainda *in vitro* de algumas condições físicas, que controlam essas alterações, como aumento na disponibilidade de CO₂ e na intensidade luminosa e redução na umidade relativa, no recipiente de cultivo, aliada à redução da concentração de sacarose, no meio de cultura, podem favorecer a sobrevivência e o desenvolvimento após a transferência e até reduzir ou eliminar o período de aclimatização *ex vitro*, reduzindo o tempo de obtenção da muda.

5. MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *Annona glabra* L. obtidas por micropropagação foram transferidas para caixas tipo gerbox contendo vermiculita (Figura 17).



FIGURA 17. Aspecto visual de plantas de *Annona glabra* L., obtidas por micropropagação e transferidas para caixa tipo gerbox, contendo vermiculita. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Após a transferência, as plantas foram envolvidas por sacos plásticos transparentes (Figura 18), para manutenção de alta umidade relativa no ambiente de aclimatização e mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.



FIGURA 18. Caixa tipo gerbox, contendo planta de *Annona glabra* L., envolvida por saco plástico. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Simultaneamente ao controle da umidade relativa e da temperatura, foi realizado o controle da intensidade luminosa. Com esse objetivo, nos primeiros 7 dias, após a retirada das plantas do frasco de cultivo *in vitro*, as mesmas foram mantidas sob sombrite 70% (Figura 19). Em seguida, o sombrite 70% ($14 \mu\text{mol. s}^{-1}\text{m}^{-2}$) foi substituído por sombrite 50% ($25 \mu\text{mol. s}^{-1}\text{m}^{-2}$) e as plantas foram mantidas, nestas condições, por 7 dias. Durante este período, a cobertura plástica foi parcialmente aberta, para redução gradual da umidade relativa.

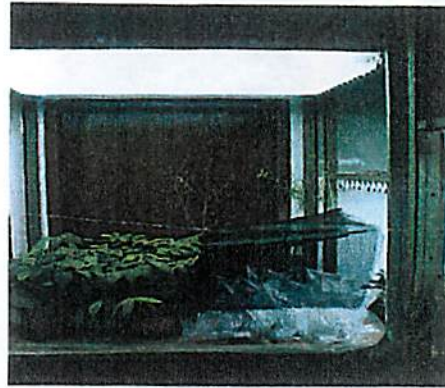


FIGURA 19. Aspecto geral da aclimatização de plantas de *Annona glabra* L., mantidas em sala de crescimento, sob sombrite 70%. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Após esse período, as plantas foram transferidas para sombrite 30% ($75 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}$), onde permaneceram por mais 7 dias. Ao final desse período, a cobertura plástica e o sombrite foram retirados, caracterizando o término da aclimatização. As plantas foram transplantadas para sacolas plásticas de 4L, contendo terra, areia e esterco, na proporção de 3: 2: 1, permanecendo nessas condições até que estivessem aptas à transferência para o campo

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de resultados, pode-se verificar que o controle ambiental, no local de aclimatização durante 21 dias após a transferência das condições *in vitro*, favoreceu o crescimento e o desenvolvimento das plantas de *Annona glabra* L. (Figura 20).

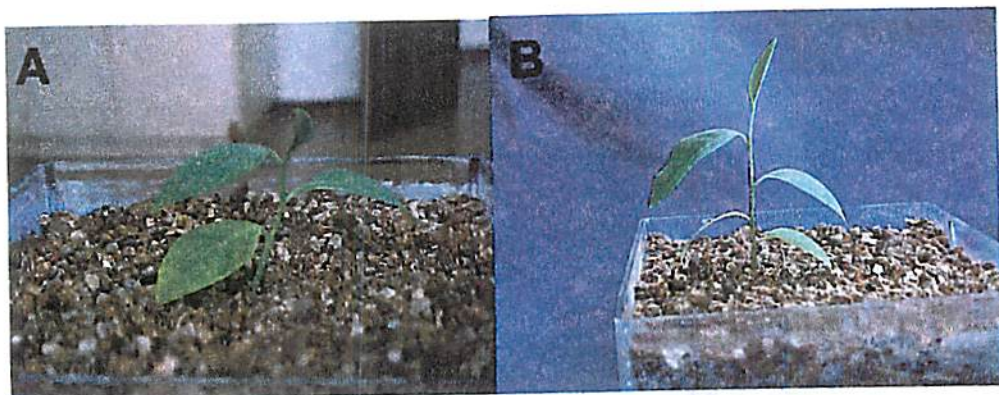


FIGURA 20. Aspectos visuais de plantas de *Annona glabra* L., antes (A) e após (B) o início do processo de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Os resultados indicam que o período de aclimatização foi eficiente para corrigir as alterações induzidas *in vitro*, como consequência, aumentou a capacidade de resposta dos estômatos, favoreceu à elaboração de cêras epicuticulares e reduziu o murchamento após a transferência (Sciutti e Morini, 1995).

O satisfatório “status” hídrico das plantas, após a transferência, pode indicar que, além da maior regulação da perda de água, pelas partes aéreas, as raízes foram funcionais e eficientes na absorção de água e nutrientes. Como resultado, o percentual de sobrevivência das plantas de *Annona glabra* L. após o transplântio para vasos plásticos foi de 100% (Figura 21).



FIGURA 21. Plantas de *Annona glabra* L. micropropagadas e transplantadas para vasos após a aclimatização. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Díaz-Pérez, Shackel e Sutter (1995), também observaram que a presença das raízes, aumentou o status hídrico e promoveu atividade fisiológica das plântulas de macieira durante a aclimatização, indicando que estas foram funcionais na absorção de água. De acordo com os autores, esse fato pode sugerir que as plântulas cultivadas *in vitro* comportam-se como uma unidade hidraulicamente integrada e que o coordenado controle entre a perda de água pela parte aérea e a absorção de água pelas raízes, pode manter o balanço hídrico da planta favorável.

Em adição, de acordo com Smith, Palta e McCown (1986), os fitohormônios sintetizados nas raízes, podem contribuir para aumentar a capacidade fotossintética das folhas.

Os resultados estão de acordo com o proposto por Dunstan e Turner (1984), em que, a aclimatização é constituída por dois fatores: enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*) e a transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas.

7. CONCLUSÕES

- É possível a aclimatização de mudas de *Annona glabra* L., obtidas por micropropagação.
- Recomenda-se para a aclimação de plantas de *Annona glabra* L., o controle da umidade relativa durante 21 dias, aliado ao controle da intensidade luminosa, através do uso de sombrites 70, 50 e 30%, respectivamente, durante 7 dias cada;
- O controle da umidade relativa e da intensidade luminosa permite um percentual de sobrevivência de 100 %.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, 1981.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C.S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.2, p.173-175, 1981.
- CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141-145, 1990.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.V. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.

- DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ – enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, n.5, p.846-851, 1987.
- DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SHACKEL, K.A.; SUTTER, E.G. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.3, p.435-440, 1995.
- DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, p.127-134, 1997.
- DONNELLY, D.J.; SKELTON, F.E. Hydathode structure of micropropagated plantlets and greenhouse-grown 'Totem' strawberry plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, n.5, p.755-759, 1987.
- DONNELLY, D.J.; SKELTON, F.E.; NELLES, J.E. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, n.3, p.566-569, 1987.
- DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.109, n.2, p.172-176, 1984.
- DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I.K. (ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants-laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.123-129.

FUCHIGAMI, L.H.; CHENG, T.Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.519-522, 1981.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.

GROUT, B.W.; DONKIN, M.E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture *in vitro* and at transplanting into soil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 212, p.323-327, 1987.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'**. Lavras: UFLA, 1999. 240p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).

KANECHI, M.; OCHI, M.; ABE, M.; INAGAKI, N.; MAEKAWA, S. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of Cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.2, p.176-181, 1998.

LEE, N.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Maryland, v.78, p.637-641, 1985.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* – and *in vivo* – developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, 1988.

- LEITE, G.B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x 97. Pelotas: UFPEL, 1995, 50p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).
- MARIN, J.A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. ? *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.105-112, 1988.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.) **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.70, n.2, p.221-228, 1995.
- SERRET, M.D. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.45, n.1, p.1-16, 1996.
- SHACKEL, K.A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E.G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.115, n.3, p.468-472, 1990.
- SMITH, M.A.L.; PALTA, J.P.; McCOWN, B.H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian White Birch. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.111, n.3, p.437-442, 1986.
- SUTTER, E. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.62, p.74-77, 1983.

SUTTER, E.G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and Sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.2, p.234-238, 1988.

SUTTER, E.G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization of tissue-cultured plants to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, n.4, p.303-312, 1984.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.104, n.4, p.493-496, 1979.

WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, 1983.

CAPÍTULO VI. INDUÇÃO DE FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E INTERNODAIS DE *Annona glabra* L.

1. RESUMO

Com o objetivo de induzir à formação de calos, visando a regeneração *in vitro* de *Annona glabra* L., segmentos foliares foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com 2% de sacarose, 0,65% de ágar e diferentes concentrações de TDZ (0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 mg/L) e 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L). Com o mesmo objetivo, segmentos internodais foram inoculados em meio WPM, suplementado com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes concentrações de BAP (0; 1,0; 3,0; 5,0 mg/L) e ANA (0; 0,1; 0,75; 1,0; 2,0 mg/L). Após a inoculação, os tubos de ensaio, contendo os explantes, foram mantidos no escuro, em sala de crescimento à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ por um período de 60 dias. O maior percentual de calos (90%) em segmentos foliares pode ser obtido, utilizando-se a combinação de TDZ e 2,4-D, ambos em concentrações superiores a 4,0 mg/L, enquanto que a partir de segmentos internodais, o maior percentual de calos (80%) foi obtido na ausência dos reguladores de crescimento BAP e ANA.

2. ABSTRACT

Induction of callus formation from leaf and nodal segments of *Annona glabra* L.

With the objective to induce callus formation in order to *in vitro* regenerate *Annona glabra* L., leaf segments were inoculated in WPM medium supplemented with 2% sucrose, 0.65% agar and the following concentrations of TDZ (0; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 and 10.0 mg/L) and 2,4-D (0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg/L). With the same objective, nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with 2% sucrose, 0.7% agar and the following concentrations of BAP (0; 1.0; 3.0 and 5.0 mg/L) and NAA (0; 0.1; 0.75; 1.0 and 2.0 mg/L). After inoculation, the explants were maintained in the absence of light in a growth room at temperature of $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 60 days. While, the highest percentage (90%) of callus formation from leaf segments was obtained using the combination of TDZ and 2,4-D with concentrations above 4.0 mg/L, the highest callus formation (80%) from nodal segments was obtained in the absence of BAP and NAA.

3. INTRODUÇÃO

A cultura de calos tem sido de grande importância para a propagação em larga escala de diversas espécies, mesmo possibilitando a obtenção de variações genéticas nos descendentes, o que constitui uma vantagem, quando se deseja garantir a biodiversidade, produção de metabólitos secundários, além de ser pré-requisito para o desenvolvimento de sistemas de transformação genética.

A dificuldade de obtenção de mudas de *Annona glabra* L., por sementes, ou por métodos convencionais de propagação vegetativa, justificam a busca de alternativas para a propagação da espécie.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia para a indução da formação de calos, a partir de segmentos foliares e internodais de *Annona glabra* L.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

Os calos são definidos como aglomerados de células não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas. Os calos possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos e órgãos (Torres e Caldas, 1990).

Na cultura de calos distinguem-se três fases: (1) indução de calos; (2) cultura de calos propriamente dita; (3) regeneração de órgãos adventícios (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese somática).

Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explante, composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura. Nessa fase, os melhores resultados são obtidos com o

uso de tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão, do que células adultas.

Para a indução da formação de calos, muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento (Viitez e San-José, 1996), sendo que, a necessidade de regulador, no que diz respeito ao tipo, concentração, relação auxina/citocinina, depende do genótipo e conteúdo endógeno de hormônio. Zheng et al. (1998) promoveram a indução e crescimento de calos a partir de embriões zigóticos, apenas na presença de 2,4-D (auxina), em baixas concentrações (1,0-2,0 mg/L), enquanto Cid et al. (1999) induziram 90 a 100% de calos a partir de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* em meio contendo 2,0 μ M TDZ (atua como citocinina).

λ A interação auxina e citocinina também é muito utilizada para a indução de calogênese (Gomes, 1999). De acordo com Viitez e San-José (1996,) explantes foliares de *Fagus sylvatica*, que crescem em meio suplementado com BAP ou TDZ combinados com AIA, respondem pela formação de calos na lâmina foliar. Cunha e Ferreira (1996) induziram calos em diferentes tipos de explantes de Flax (*Linum usitatissimum* L.), na presença de 2,4-D, ANA ou AIB combinados com Cinetina ou Zeatina.

As condições que possibilitam o crescimento dos calos são, usualmente similares àquelas para indução de calos, no entanto, as concentrações de auxinas e citocininas são normalmente menores.

A desdiferenciação dos calos em brotações e/ou radículas, geralmente, são processos difíceis de serem obtidos, principalmente, em plantas lenhosas, em função da menor capacidade regenerativa, menor taxa de multiplicação e maior concentrações de fenóis dessas espécies (Gomes, 1999).

Segundo Pinto et al. (1994), os calos formados a partir de tecidos jovens possuem maior potencial morfogenético, isto é, maior facilidade para emitir brotações novas e, principalmente, radículas. A utilização de tecidos de

plântulas, como o hipocótilo, cotilédone e radícula, têm aumentado grandemente a capacidade regenerativa de espécies lenhosas, incluindo espécies de *Annona* (Rasai, George e Kantharajah, 1995).

A regeneração de plantas tem sido obtida em trabalhos de cultura *in vitro*, por meio de um balanço hormonal e de condições de incubação adequadas (Cid, 1998). Por exemplo, a embriogênese somática e/ou a regeneração de plantas têm sido observadas em cultura de calos de *Maclura tinctoria* (Gomes, 1999), *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* (Cid et al., 1999), *Linum usitatissimum* L. (Cunha e Ferreira, 1996), *Notophagus alpina* (Jordan, Velozo e Sabja, 1996), *Allium* spp (Zheng et al., 1998; Van der Valk et al., 1992). No entanto, em muitas espécies, o conhecimento dos fatores que controlam a organogênese e a indução de embriogênese somática em calos é ainda escasso.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO E ASSEPSIA DOS EXPLANTES

Os explantes foliares foram constituídos por segmentos de, aproximadamente 1,0 cm², excisados de folhas jovens, retiradas de plantas matrizes, com 6 meses de idade e mantidas em casa de vegetação.

Para promover a desinfestação, os explantes foliares foram mantidos em água corrente por 30 minutos e lavados com detergente. A seguir, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados, por três vezes, em água destilada e autoclavada, para a eliminação do excesso da solução desinfestante.

Os segmentos internodais foram obtidos através da secção das hastes caulinares jovens (não lenhosas) e tamanho aproximado de 15 a 20 mm, retirados de plântulas, cujas sementes foram germinadas *in vitro*, após 6 meses de cultivo e mantidas em casa de vegetação. Para a desinfestação, os segmentos internodais foram mantidos em água corrente, por 40 minutos e lavados com detergente. A seguir, em câmara de fluxo laminar esses explantes foram imersos em álcool 70% (v/v), por 1 minuto, em associação com a imersão em hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 15 minutos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados, três vezes, em água destilada e autoclavada, para eliminação do excesso de soluções desinfestantes. Em seguida, foram mantidos em solução de ácido ascórbico (200 mg/L) por 20 minutos.

5.2 INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES

Os segmentos foliares foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 20 mL dos meios de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980), ou MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementados com 2% de sacarose, 0,65% de ágar e a combinação entre diferentes concentrações de TDZ (0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 mg/L) e 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L).

Os segmentos internodais foram inoculados em meio WPM ou MS, suplementados com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes concentrações de BAP (0; 1,0; 3,0; 5,0 mg/L) e ANA (0; 0,1; 0,75; 1,0; 2,0 mg/L).

Os meios de cultura foram ajustados a um pH de 5,7 e autoclavados à 121°C por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos de ensaio, contendo os explantes foram mantidos no escuro, em sala de crescimento à temperatura de 25°C ± 1 por um período de 60 dias. Após esse período, foi avaliada a percentagem de indução de calogênese.

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que, com 12 repetições para o experimento de indução de calos, em segmentos foliares e com 8 repetições, para o experimento de formação de calos em segmentos internodais. Cada repetição (tubo de ensaio) foi constituída por apenas um explante.

Os percentuais de calos formados foram considerados como tendo distribuição Binomial (não-normal), e assim optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (Demétrio, 1993), utilizando-se a função logística como ligação canônica “ η ”, ou seja:

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

onde “p” é a probabilidade de sucesso do modelo binomial.

A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de “Deviance” (Demétrio, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo. Se detectadas diferenças significativas entre eles, o preditor linear passou a corresponder a modelos de regressão múltipla apropriados (superfícies de resposta). A escolha do melhor modelo de regressão, foi baseado na qualidade do ajustamento e, se possível, na ausência de significância dos desvios de regressão.

O preditor linear “ η ”correspondeu ao seguinte modelo de regressão:

$$\eta = \{ \alpha + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_1^2 + B_4X_2^2 + B_5X_1 X_2 + B_6X_2^2 + B_7X_1^2X_2 \}$$

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

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

onde $F(x)$ é o modelo de regressão ajustado, que é função X_1 (concentração de 2,4-D ou ANA) e X_2 (concentração de TDZ ou BAP).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

* De acordo com os resultados, foi observado calogenese somente em segmentos foliares e internodais inoculados em meio WPM, visto que, em meio MS, os explantes necrosaram após a inoculação.

Os resultados desse estudo indicaram que não ocorreu a formação de calos em segmentos foliares, na ausência dos reguladores de crescimento e que para a indução expressiva de calos foi necessária a utilização da combinação entre os reguladores de crescimento TDZ e 2,4-D.

Gomes (1999) e Cunha e Ferreira (1996), também observaram a necessidade de interação entre auxina e citocinina para a eficiente indução de calos, em explantes de *Maclura tinctoria* e *Linum usitatissimum* L. respectivamente.

Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 22), o maior percentual de calos (90%), em segmentos foliares de *Annona glabra* L., pode ser obtido, utilizando-se a combinação de ambos reguladores de crescimento, em concentrações superiores à 4,0 mg/L. O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos correspondente (Figura 23). O diagrama de contornos é outra forma de representar os resultados. Para melhor visualização dos resultados através do diagrama de contornos, deve-se considerar que a formação de calos em função dos reguladores de crescimento, é representada hipoteticamente por “curvas de nível”, sendo que os pontos mais baixos ou mais altos dessa “área com declive” representam os pontos de máxima ou mínima produção de calos.

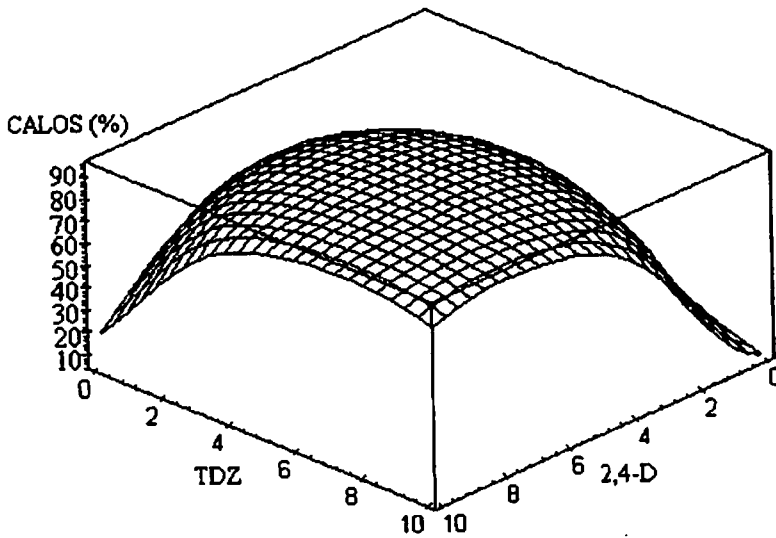


FIGURA 22. Modelo de superfície de resposta ajustado referente à indução de calos, a partir de segmentos foliares de *Annona glabra* L., em função de concentração de TDZ (mg/L) e 2,4-D (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

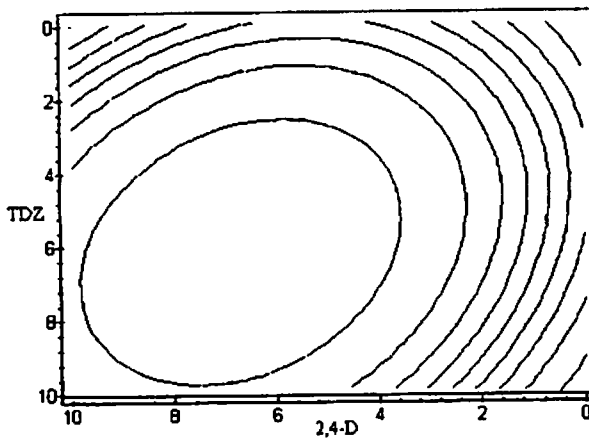


FIGURA 23. Diagrama de contornos, correspondentes à indução de calos, a partir de segmentos foliares de *Annona glabra* L., em função de concentração de TDZ (mg/L) e 2,4-D (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Em contrapartida, a partir de segmentos internodais, o maior percentual de calos (80%) foi obtido na ausência dos reguladores de crescimento BAP e ANA (Figura 24). Esses resultados indicam que não é necessária a utilização desses reguladores de crescimento, para a indução de calos a partir de segmentos internodais de *Annona glabra* L.

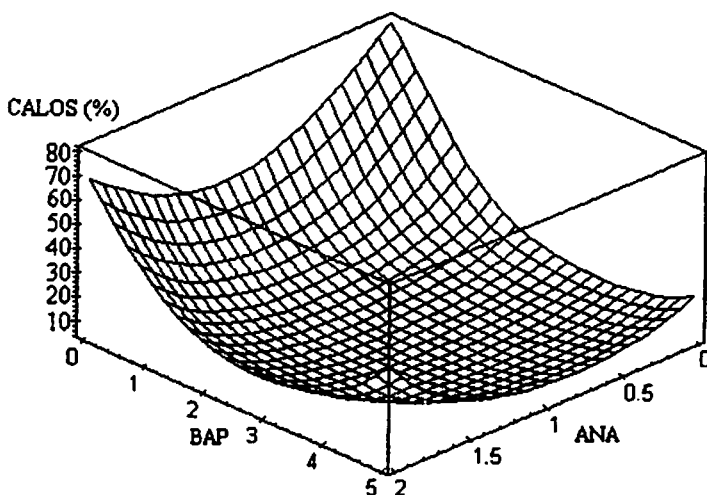


FIGURA 24. Modelo de superfície de resposta ajustado, referente à indução de calos, a partir de segmentos internodais de *Annona glabra* L., em função de concentração de BAP (mg/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

No entanto, de acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, um bom percentual de calos (70%), a partir de segmentos internodais, pode ser obtido utilizando-se 1,0 mg/L de BAP isolado ou em combinação ao ANA, entre as concentrações de 0,5 e 2,0 mg/L. Esses resultados diferem dos obtidos por Vietez e San-José (1996), que não observaram formação de calos em explantes de *Fagus sylvatica*, quando o BAP foi utilizado isolado. No entanto, a utilização do BAP em concentrações superiores a 1,0 mg/L, associado ou não ao ANA,

reduz a formação de calos nos explantes. O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos correspondente (Figura 25).

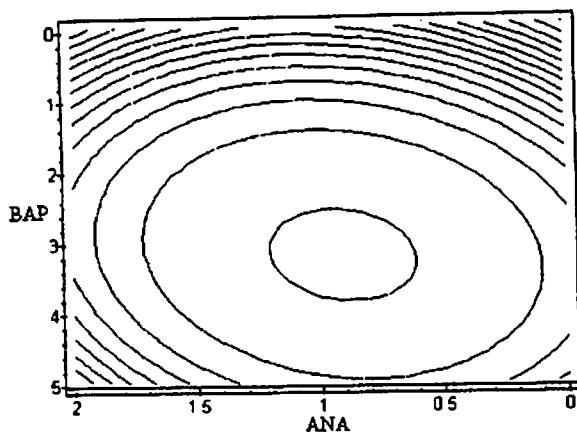


FIGURA 25. Diagrama de contornos, correspondentes a indução de calos, a partir de segmentos nodais de *Annona glabra* L., em função de concentração de BAP (mg/L) e ANA (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Segundo as análises de “Deviance” (Tabelas 8 e 9), não foi possível encontrar modelos de regressões múltiplas, biologicamente plausíveis, que apresentassem desvios não significativos.

TABELA 8. Quadro de Análise de “Deviance”, para a indução de calos a partir de segmentos foliares de *Annona glabra* L., referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Tratamento	17	195,147 **
Regressão	8	165,341 **
Desvios	9	29,806 **
Erro	198	96,842

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

TABELA 9. Quadro de Análise de “Deviance”, para a indução de calos. a partir de segmentos nodais de *Annona glabra* L., referente à decomposição da variação entre tratamentos em “Regressão” e “Desvios de regressão”. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Fontes de variação	GL	“Deviance”
Tratamento	15	53,291**
Regressão	5	24,861 **
Desvios	10	28,429 **
Erro	112	88,4278

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

O aspecto geral dos calos, obtidos a partir de segmentos foliares e segmentos internodais de *Annona glabra* L., podem ser visualizados na Figura 26.

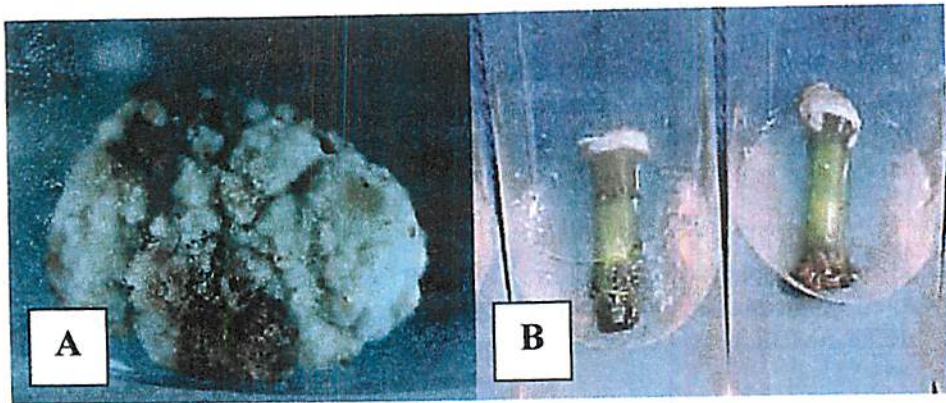


FIGURA 26. Aspecto geral de calos obtidos a partir de segmentos foliares (A) e segmentos internodais (B) de *Annona glabra* L. UFLA, Lavras-MG, 2000.

7. CONCLUSÕES

- Segmentos foliares inoculados em meio desprovido de reguladores de crescimento não apresentam formação de calos;
- A produção máxima de calos, em explantes foliares, pode ser obtidas utilizando-se a combinação entre os reguladores de crescimento TDZ e 2,4-D, ambos em concentrações superiores à 4,0 mg/L;
- A produção expressiva de calos, em segmentos internodais, é obtida em meio desprovido de BAP e/ou ANA;
- A utilização de concentrações de BAP superiores a 1,0 mg/L, isolado ou em combinação ao ANA, reduz a formação de calos em segmentos internodais de *Annona glabra* L.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CID, L.P.B.; MACHADO, A.C.M.G.; CARVALHEIRA, S.B.R.C.; BRASILEIRO, A.C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.56, p.17-23, 1999.
- CID, L.P.B. Suspensão Celular. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1998. p.331-353.
- CUNHA, A.C.G.; FERREIR, M.F. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth Kinetics of Flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, p.1-8,. 1996.
- DEMÉTRIO, C.G.B. **Modelos lineares generalizados na experimentação agronômica**. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 5., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: (S.n.), 1993. 125p.
- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*)**. Lavras: UFLA, 1999. 91p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- JORDAN, M.; VELOZO, J.; SABJA, A.M. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst., Fagaceae. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.15, n.10, p.795-798, 1996.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, (abst. 321), 1980. p.416.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.



PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de Benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.

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

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

VAN DER VALK, P.; SCHOLTEN, O.E.; VERSTAPPEN, F; JANSEN, R.C.; DONS, J.J.M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus of three *Allium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.181-191, 1992.

VIETEZ, A.M.; SAN-JOSÉ, M.C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.32, p.140-147, july-september 1996.

ZHENG, S.; HENKEN, B.; SOFIARI, E.; JACOBSEN, E.; KRENS, F.A.; KIK, C. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.99-105, 1998.

ANEXO

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

SAIS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
NH_4NO_3	1650,0
KNO_3	1900,0
KH_2PO_4	170,0
H_3BO_3	6,2
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,2
MIO-INOSITOL	100,0
TIAMINA.HCl	1,0
PIRIDOXINA	0,5
ÁC. NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0

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

SAIS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/L)
NH_4NO_3	400,0
KH_2PO_4	170,0
H_3BO_3	6,2
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{.EDTA}$	37,2
MIO-INOSITOL	100,0
TIAMINA.HCl	0,5
PIRIDOXINA	0,5
ÁC. NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0