



**MICROPROPAGAÇÃO DE PEQUIZEIRO**  
*(Caryocar brasiliense Camb.)*

**BRENO RÉGIS SANTOS**

2004



**BRENO RÉGIS SANTOS**

**MICROPROPAGAÇÃO DE PEQUIZEIRO**  
*(Caryocar brasiliense Camb.)*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Renato Paiva

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2004

ACERVO DE LICENÇAS E PATENTES

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

**Santos, Breno Régis**

**Micropropagação de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) / Breno Régis Santos. – Lavras : UFLA, 2005.**

**239 p. : il.**

**Orientador: Renato Paiva.  
Tese (Doutorado) – UFLA.  
Bibliografia.**

**1. Pequi. 2. Micropropagação. 3. Cultura de tecido. 4. Germinação. 5. Desinfestação. 6. Oxidação fenólica. 7. Cultura de antera. 8. Organogênese. 9. Enraizamento. 10. Aclimatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-634.973166**

**BRENO RÉGIS SANTOS**

**MICROPROPAGAÇÃO DE PEQUIZEIRO**

**(*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, área de concentração  
em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de  
“Doutor”.

**APROVADA em 21 de Dezembro de 2004**

**Dr. Jeferson Luiz Dallabona Dombroski, UFMT.**

**Dr. Leonardo Ferreira Dutra, EMBRAPA Florestas.**

**Dr. Guilherme Canella Gomes, Kimberlit.**

**Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto, FEAD.**



**Prof. Renato Paiva, Ph.D.**

**DBI/UFLA (ORIENTADOR)**

**LAVRAS - MINAS GERAIS**

**2004**

**A Deus,**

**Luz do meu caminho e Torre forte do meu viver,**

**OFEREÇO.**

**Aos meus pais, Américo dos Santos**

**Alzira Maria das Graças Santos.**

**À minha esposa, Liliane Isabel Silva Régis Santos.**

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que tem sido muito bom para mim em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em minhas decisões, dando o incondicional apoio para o meu crescimento e felicidade. À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida para realização do curso, e ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro que tanto auxiliou nesta caminhada. Ao Professor Renato Paiva PhD., pela orientação, amizade e por ter me ensinado a ver o mundo por um prisma diferente. À Professora Patrícia Paiva pelo auxílio memorável, como co-orientadora, na superação desta etapa de grandes mudanças e definições de minha vida. Ao Professor Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela ajuda e sugestões na área de Anatomia Vegetal e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos. Aos funcionários do Setor de Fisiologia: Izonel, Evaristo, Dartagnan, Joel, Odorêncio, Maria Helena, Mauro e Solange. Aos amigos Leonardo Dutra, Ana Hortência, Sandro Barbosa, Cíntia, Cláudio, Gustavo, Cláudia, Fabiano, Cristiano, Ednabel, Álvaro, Rodrigo, Raírys, André, Márcia Alminda, Marcelo Cirillo, Itamar, Márcia e Muriel pela empatia e ajuda nos momentos difíceis, e a todos os colegas de curso. Aos alunos de iniciação científica, Patrícia, Fernanda, Emanuelle, Letícia, Luciano, Diogo, Eduardo, Lucas, Guilherme e Isabel, por estarem sempre dispostos, pela valiosa ajuda na montagem dos experimentos, coleta de dados e análises laboratoriais. A minha esposa, Liliane, pelo amor, pelo carinho, paciência e compreensão, por dedicar sua vida à nossa felicidade. Aos irmãos do Grupo de Perseverança e Partilha São Benedito de Lavras (GPP), pela amizade sincera e pelas orações. Aos membros da banca examinadora, pela valiosa contribuição neste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

**BRENO RÉGIS SANTOS**, filho de Américo dos Santos e Alzira Maria das Graças Santos, nasceu em 1 de novembro de 1976, em Bom Despacho, MG. Realizou seus estudos colegiais na Escola Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais, onde concluiu o ensino fundamental. Em 1992 ingressou no Centro de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF – UFV), onde se formou Técnico em Agropecuária em 1994. No início de 1995 foi aprovado no vestibular para Agronomia na Universidade de Alfenas (UNIFENAS), concluindo o curso no final de 1998. Durante o período de realização do curso de graduação desenvolveu projetos de pesquisa como bolsista de iniciação científica (FAPEMIG), em cultura de tecidos. Logo após a graduação, em março de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras (UFLA), concluído em fevereiro de 2001. Em março de 2001, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, MG, defendendo a tese em 21/12/2004.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
<b>CAPÍTULO I INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	2
2 O PEQUIZEIRO .....	4
3 PROPAGAÇÃO .....	8
3.1 Propagação sexuada .....	8
3.2 Propagação assexuada <i>in vitro</i> .....	9
3.2.1 Propagação <i>in vitro</i> de plantas lenhosas .....	12
3.2.2 Meios nutritivos .....	13
3.2.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	14
3.2.4 Calogênese .....	17
3.2.5 Cultura de anteras .....	18
3.2.6 Enraizamento .....	20
3.2.7 Aclimatização .....	22
4 TESTES ESTATÍSTICOS .....	23
4.1 Regressão Logística .....	23
4.2 Kruskal-Wallis .....	23
4.3 Box-Plot .....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	25
<b>CAPÍTULO II GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE SEMENTES</b> .....	33
1 RESUMO .....	34
2 ABSTRACT .....	35
3 INTRODUÇÃO .....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
6 CONCLUSÃO .....	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
<b>CAPÍTULO III CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES</b> .....	43
1 RESUMO .....	44
2 ABSTRACT .....	45
3 INTRODUÇÃO .....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
4.1 Material vegetal .....	47

4.2 Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes foliares .....	48
4.3 Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes caulinares .....	49
4.4 Estabelecimento de segmentos caulinares e explantes foliares em meio de cultivo acrescido com diferentes concentrações de Benlate .....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1 Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes foliares .....	51
5.2 Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes caulinares .....	55
5.3 Estabelecimento de segmentos caulinares e explantes foliares acrescido com diferentes concentrações de Benlate .....	59
6 CONCLUSÕES .....	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	61

**CAPÍTULO IV CONTROLE DA OXIDAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES .....**

1 RESUMO .....	65
2 ABSTRACT .....	66
3 INTRODUÇÃO .....	67
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
4.1 Material vegetal .....	69
4.2 Efeito do tempo de lavagem na oxidação de explantes foliares e caulinares .....	69
4.3 Efeito da consistência do meio de cultivo na oxidação de explantes foliares e caulinares .....	71
4.4 Efeito de antioxidantes no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes foliares e caulinares .....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
5.1 Efeito do tempo de lavagem na oxidação de explantes foliares e caulinares .....	73
5.2 Efeito da consistência do meio de cultivo na oxidação dos explantes foliares e caulinares .....	79
5.3 Efeito de antioxidantes no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes foliares e caulinares .....	90
6 CONCLUSÕES .....	93
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

<b>CAPÍTULO V INDUÇÃO DE CALOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM EXPLANTES FOLIARES</b> .....	95
1 RESUMO .....	96
2 ABSTRACT .....	97
3 INTRODUÇÃO .....	98
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	99
4.1 Efeito das combinações BAP + ANA e 2,4D + TDZ na calogênese em explantes foliares .....	99
4.2 Influência de três combinações de reguladores de crescimentos na indução de calos <i>in vitro</i> .....	102
4.3 Influência do tipo de explante na indução de calogênese em explantes foliares .....	103
5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	104
5.1 Estudo da influência do BAP + ANA e TDZ + 2,4D na calogênese em explantes foliares .....	104
5.2 Influência de três combinações de reguladores de crescimento na indução de calos <i>in vitro</i> .....	109
4.3 Influência do tipo de explante na indução de calogênese em explantes foliares .....	112
6 CONCLUSÕES .....	114
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114
<b>CAPÍTULO VI INDUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CALOS EM ANTERAS</b> .....	117
1 RESUMO .....	118
2 ABSTRACT .....	119
3 INTRODUÇÃO .....	120
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	120
4.1 Efeito da posição de inoculação e carvão ativado no estabelecimento <i>in vitro</i> de anteras de pequiheiro .....	122
4.2 Efeito de antioxidantes no estabelecimento <i>in vitro</i> de anteras de pequiheiro .....	123
4.3 Efeito da cinetina, BAP e 2,4D na indução de calos em anteras .....	124
4.4 Efeito do BAP e combinações de antioxidantes na indução de calos em anteras .....	126
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	127
5.1 Efeito da posição de inoculação e do carvão ativado no estabelecimento <i>in vitro</i> de anteras .....	127
4.2 Efeito de antioxidantes no estabelecimento <i>in vitro</i> de anteras .....	128
4.3 Efeito da cinetina, BAP e 2,4D na indução de calos em anteras .....	129
4.4 Efeito do BAP e combinações de antioxidantes na indução de calos em anteras .....	131
6 CONCLUSÕES .....	134

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	135
<b>CAPÍTULO VII EFEITO DO BAP E ANA NA INDUÇÃO <i>IN VITRO</i></b> <b>DE BROTAÇÕES .....</b>	<b>137</b>
1 RESUMO .....	138
2 ABSTRACT .....	139
3 INTRODUÇÃO .....	140
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	141
4.1 Material vegetal .....	141
4.2 Influência do BAP na indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro .....	142
4.3 Influência da interação entre BAP e ANA na indução de brotações de pequizeiro .....	143
5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	145
6 CONCLUSÕES .....	155
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	156
<b>CAPÍTULO VIII INFLUÊNCIA DA POLARIDADE DOS</b> <b>EXPLANTES DURANTE O CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>159</b>
1 RESUMO .....	160
2 ABSTRACT .....	161
3 INTRODUÇÃO .....	162
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	163
4.1 Efeito da polaridade de explantes foliares na obtenção de calos <i>in</i> <i>vitro</i> .....	163
4.2 Efeito da polaridade dos segmentos nodais na obtenção de brotações <i>in vitro</i> .....	164
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	165
5.1 Efeito da polaridade de explantes foliares na obtenção de calos <i>in</i> <i>vitro</i> .....	165
5.2 Efeito da polaridade dos segmentos nodais na obtenção de brotações <i>in vitro</i> .....	169
6 CONCLUSÕES .....	174
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	174
<b>CAPÍTULO IX INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE NA</b> <b>INDUÇÃO DE CALOS E BROTAÇÕES <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>177</b>
1 RESUMO .....	178
2 ABSTRACT .....	179
3 INTRODUÇÃO .....	180
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	181
4.1 Efeito da luminosidade na obtenção de calos <i>in vitro</i> a partir de explantes foliares .....	181

4.2 Efeito da luminosidade na indução de brotações em segmentos nodais de pequiheiro .....	183
5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	184
5.1 Efeito da luminosidade na obtenção de calos <i>in vitro</i> a partir de explantes foliares .....	184
5.2 Efeito da luminosidade na indução de brotações em segmentos nodais de pequiheiro .....	187
6 CONCLUSÕES .....	191
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	191

<b>CAPÍTULO X ORGANOGÊNESE DIRETA E INDIRETA EM CALOS E EXPLANTES FOLIARES .....</b>	<b>195</b>
1 RESUMO .....	196
2 ABSTRACT .....	197
3 INTRODUÇÃO .....	198
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	199
4.1 Indução de brotações em calos de explantes foliares .....	199
4.2 Indução de raízes em calos de explantes foliares .....	201
4.3 Indução de raízes em explantes foliares .....	202
5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	203
5.1 Indução de brotações em calos de explantes foliares .....	203
5.2 Indução de raízes em calos de explantes foliares .....	205
5.3 Indução de raízes em explantes foliares .....	211
6 CONCLUSÕES .....	217
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	218

<b>CAPÍTULO XI ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE BROTAÇÕES E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS .....</b>	<b>221</b>
1 RESUMO .....	222
2 ABSTRACT .....	223
3 INTRODUÇÃO .....	224
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	225
4.1 Efeito do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações .....	225
4.2 Efeito do carvão ativado na indução de raízes <i>in vitro</i> .....	226
4.3 Aclimatização de Plântulas .....	227
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	229
5.1 Efeito do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações de pequiheiro ..	229
5.2 Efeito do carvão ativado na indução de raízes <i>in vitro</i> .....	232
5.3 Aclimatização de Plântulas .....	235
6 CONCLUSÕES .....	237
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	237

## RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). 2004. 239p. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

O interesse mundial por frutas nativas do Brasil vem se intensificando a cada ano e o Cerrado é um dos biomas brasileiros que mais contribuem para o fornecimento destas frutas. O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é um exemplo desta realidade, considerada uma espécie bastante promissora que pode ser empregada em programas de revegetação de áreas degradadas e em programas de renda familiar, por possuir frutos oleaginosos muito apreciados pela população do Cerrado e madeira de ótima qualidade. A crescente ocupação do Cerrado pela expansão agrícola tem levado à destruição do pequizeiro para o qual, apesar da grande produção de frutos, não se observa a regeneração natural em escala significativa. Um dos problemas encontrados no desenvolvimento dessa espécie é a produção de mudas, pois, além de possuir espinhos, o que dificulta o manuseio, as sementes apresentam baixo índice de germinação devido à dormência tegumentar e à presença de inibidores. Este trabalho teve como objetivo estudar os fatores da propagação *in vitro* de pequizeiro, propiciando a obtenção de um protocolo otimizado passível de utilização para a produção de mudas. De acordo com os resultados deste trabalho observou-se que uma maior porcentagem de germinação e um maior IVG foram obtidos com o cultivo *in vitro* das sementes do pequizeiro. Para a obtenção de calos, o tratamento mais eficiente foi o cultivo dos explantes em meio WPM acrescido com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D. Na indução de calos em anteras, o melhor tratamento foi a utilização de  $4\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $2\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado +  $400\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico. A presença de BAP no meio de cultivo é essencial para a indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro, sendo a combinação de BAP e ANA mais efetiva. Também foram obtidas brotações adventícias a partir de calos por meio da utilização de  $2\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,05\text{mg L}^{-1}$  de ANA. Para a indução de raízes em brotações obtidas *in vitro*, foi necessária a utilização de AIB. Ao fim deste trabalho, foi possível obter plântulas de pequizeiro aclimatizadas.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA.

## ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Pequi tree micropropagation In: Pequi tree (*Caryocar brasiliensis* Camb.) micropropagation 2004. p.239. (Doctorate in Plant Physiology). Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG.<sup>1</sup>

The world interest in brazilian native fruit is increasing every year and the cerrado is one of the brazilian biome that contribute with these fruits. The pequi tree (*Caryocar brasiliensis* Camb.) is one of these fruits, considered a promising specie that can be used in vegetation program of degraded areas and in program for farmers with low income tax. It is a oleaginous fruit very appreciated by Cerrado population and also has a high quality wood. The growing Cerrado occupation by agricultural expansion has caused the pequi tree destruction, despite the high fruit production, there is no natural regeneration in significative scale. One of the problems found during this specie development is the seedling production, due the thorn presence and the low germination index (IVG) due tegument dormancy and inhibitors presence. This research aimed to study the pequi tree propagation factors *in vitro* in order to obtain a optimized protocol to produce seedlings. According to the results of this research it was observed a higher germination percentage and higher IVG with *in vitro* cultivation seeds of pequi tree. To obtain callus the most efficient treatment was to inoculate explants removed from donor plants in WPM with  $1\text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $2\text{ mg L}^{-1}$  of 2,4-D. The callus induction in anthers the best treatment used was  $4\text{ mg L}^{-1}$  of BAP +  $2\text{ mg L}^{-1}$  of activated charcoal +  $400\text{ mg L}^{-1}$  of citric acid. For shoot induction in pequi tree nodal segment it was observed that the presence of BAP in the cultivation medium is essential for the shooting induction of pequi tree being the combination of BAP and ANA the most effective shooting induction. There were also obtained adventitious shooting from callus using  $2\text{ mg L}^{-1}$  of BAP +  $0,05\text{ mg L}^{-1}$  of ANA. For root induction in shooting obtained *in vitro* it was necessary the AIB utilization. In the of this research was possible to obtain acclimatized pequi tree seedlings.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Orientador: Renato Paiva – UFLA (Major Professor), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA.

**CAPÍTULO I**

**INTRODUÇÃO GERAL**

# 1 INTRODUÇÃO

O interesse mundial por frutas nativas do Brasil vem se intensificando a cada ano e o Cerrado é um dos biomas brasileiros que mais contribuem para o fornecimento destas frutas.

A região do Cerrado apresenta uma das diversidades mais ricas dentro da vegetação savânica do mundo, na qual uma vegetação rasteira, formada principalmente por gramíneas, coexiste com árvores esparsas, baixas, tortuosas, casca grossa, folhas largas e sistemas radiculares profundos. Esta vegetação apresenta estratégias de adaptação à seca, como raízes alcançando profundidades superiores à 10m, germinação de sementes na época das chuvas e crescimento radicular pronunciado nos primeiros estádios de desenvolvimento (Sano & Almeida, 1998; Pinto, 1993).

O Cerrado é considerado um recurso natural renovável que, se for manejado adequadamente, pode gerar ocupação permanente para um grande número de pessoas, além de fornecer matéria-prima para a indústria e preservar a biodiversidade, garantindo a conservação da fauna e flora nativas, bem como a manutenção da qualidade da água (Pozo, 1997).

No Brasil, muitos são os produtos explorados de forma extrativista, como borrachas, gomas não elásticas, ceras, fibras, oleaginosas, tanantes, alimentícias, aromáticas, corantes, medicinais, tóxicas, madeira, caça e pesca, entre outros. Para alguns destes produtos, evidencia-se o esgotamento das reservas naturais existentes (Homma, 1993).

Pozo (1997), em estudos realizados nas comunidades do Norte de Minas Gerais, observou que a vegetação do Cerrado nas proximidades destas comunidades é explorada de forma extrativista. O pequizeiro é um exemplo desta realidade, considerada uma espécie bastante promissora, que pode ser empregada em programas de revegetação de áreas degradadas e em programas

de renda familiar, por possuir frutos oleaginosos muito apreciados pela população do Cerrado e madeira de ótima qualidade, (Carvalho, 1994; Gribel & Hay, 1993; Melo, 1987).

A crescente ocupação do Cerrado pela expansão agrícola tem levado à destruição do pequi para o qual, apesar da grande produção de frutos, não se observa à regeneração natural em escala significativa (Melo, 1987).

O pequi é uma das espécies mais conhecidas no estado de Minas Gerais. Como é típica do Cerrado, e este aparece em cerca de 80% do território mineiro, a maioria da população conhece esta espécie e, principalmente, seu fruto. No ano de 2001, em concurso realizado pelo Instituto Estadual de Floresta - MG, o pequi foi eleito à árvore símbolo do estado de Minas Gerais (IEF, 2004).

Sua importância está expressa pela Portaria Federal 54, de 05 de março de 1987, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que impede o corte e a comercialização de sua madeira em todo o território nacional (Ribeiro, 2003; Werneck, 2001).

Enfatizando o valor econômico do pequi, Pozo (1997) relata a presença de fábricas de licor de pequi no norte de Minas Gerais, responsáveis pela produção de milhares de caixas de licor por ano, o que representa dezenas de empregos permanentes e uma expressiva contribuição anual em ICMS e IPI.

A castanha, outro subproduto do pequi, pode ser utilizada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, e é comercializada *in natura* a R\$1,00 / medida (medida = 20 a 24 castanhas). Das castanhas também se extrai óleo, que pode ser obtido a um preço de R\$ 20,00 / litro. O fruto *in natura* sem casca é ofertado por dúzia ou por litro. Uma dúzia de pequi pode atingir o preço de R\$4,00 no início da safra (novembro), chegando a cair a R\$1,00 no final da safra (fevereiro) (Melo, 2004; comunicação pessoal).

Para os produtores rurais do Norte de Minas Gerais, o pequi chega a contribuir com 17,73% da renda familiar, atrás apenas do feijão (33,52%) e da mandioca (32,64%) (Pozo, 1997).

A exploração do pequizeiro fundamenta-se na coleta de frutos, o que caracteriza uma ação extrativista. Tendo em vista que o produto mais extraído do pequizeiro é o fruto e que a tendência tem sido o crescimento da quantidade extraída, pode-se especular sobre o seu possível aniquilamento no futuro (Pozo, 1997).

Um dos problemas encontrados no desenvolvimento dessa espécie é a produção de mudas, pois, além de possuir espinhos, o que dificulta o manuseio, as sementes apresentam baixo índice de germinação devido à dormência tegumentar e presença de inibidores (Miranda et al., 1987, Dombroski, 1997; Melo & Gonçalves, 1991).

Paralelamente às ações conservacionistas, o cultivo *in vitro* é uma alternativa de propagação do pequizeiro, sendo uma ferramenta importante para sua propagação, técnica essa de eficiência comprovada para muitas espécies lenhosas de difícil propagação sexuada.

Este trabalho teve como objetivo estudar os fatores da propagação *in vitro* de pequizeiro, propiciando a obtenção de um protocolo otimizado passível de utilização para a produção de mudas.

## 2 O PEQUIZEIRO

O pequizeiro (Figura 1) é uma espécie arbórea nativa dos Cerrados brasileiros pertencente à família Caryocaraceae (Araújo, 1995). É também conhecido, de acordo com a região de ocorrência, por pequi, piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim, suari e piquiá.



FIGURA 1 Aspecto visual de um pequizeiro adulto. Lavras, UFLA, 2004.

O nome pequi se origina da palavra tupi “pyqui”, em que Py significa casca e qui, espinho (Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, citado por Almeida & Silva, 1994).

É uma planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, sendo assim característica do Cerrado brasileiro. Ocorre geralmente em agrupamentos mais ou menos densos, tanto em formações primárias como secundárias e pioneiras Sua ocorrência abrange todo o Cerrado brasileiro, com distribuição nos estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins. (Lorenzi, 2000).

O pequizeiro floresce nos meses de agosto a novembro, com os frutos iniciando a maturação em meados de novembro, podendo ser encontrados até o início de fevereiro (Lorenzi, 2000; Almeida et al., 1998).

O pequizeiro é considerado uma espécie de interesse econômico, principalmente devido ao uso de seus frutos na culinária, como fonte de vitaminas e na extração de óleos para a fabricação de cosméticos (Almeida & Silva, 1994). Na medicina popular, é utilizado para tratamento de problemas respiratórios, como afrodisíaco e suas folhas são adstringentes, além de estimular a produção da bÍlis (Almeida & Silva, 1994; Brandão et al., 2002).

A casca do pequizeiro, além de ser utilizada em curtume, é tintorial, fornecendo tinta amarelo-castanha, bastante empregada pelos tecelões mineiros (Brandão et al., 2002).

Sua madeira é de ótica qualidade e alta resistência (Almeida & Silva, 1994), moderadamente pesada e de boa durabilidade, sendo utilizada na fabricação de moirões e lenha, própria para xilografia, construção civil e naval, dormentes, fabricação de móveis e fonte de carvão para siderurgias (Ribeiro, 1996).

Segundo Almeida et al. (1998), essa espécie também é considerada planta ornamental pela beleza de suas copas e das flores alvas (Figura 2).



FIGURA 2 Flor de pequizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

FIGURA 2 Flor de pequizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

Devido à presença de espinho, seu plantio não é recomendado em pastagens, pela possibilidade de ocasionar acidentes em bovinos (Brandão et al., 2002).

Os frutos (Figura 3) são utilizados na alimentação humana e na indústria caseira para a extração de óleos e produção de licores. O caroço com a polpa (mesocarpo) pode ser cozido com arroz, feijão, galinha, batido com leite, usado para o preparo de licor e para extração de manteiga (Lorenzi, 2000; Almeida et al., 1998).



FIGURA 3 Ilustração demonstrativa dos frutos do pequizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

O óleo da polpa apresenta efeito tonificante, além de atuar contra bronquites, gripes, resfriados e no controle de tumores. Os frutos contêm vitamina A e C, tiamina, proteínas e sais minerais. O óleo de pequi é utilizado na medicina popular para sanar problemas oftalmológicos relacionados à deficiência de vitamina A, uma vez que o fruto apresenta altíssimo teor de carotenóides (Ribeiro, 1996; Brandão et al., 2002). Na indústria cosmética, fabricam-se cremes para a pele tendo o pequi como componente (Almeida et al., 1998).

A parte do pequi utilizada na indústria e culinária é a estrutura denominada de pireno, encontrada no interior de frutos drupáceos, com cinco lóculos. Os pirenos, em números de 1 a 4, se desenvolvem nos lóculos e são compostos de mesocarpo, endocarpo, tegma e embrião hipocotiledonar. O

o endocarpo, onde ocorre grande quantidade de espinhos. O mesocarpo é carnoso e corresponde à parte comestível do fruto (Barradas, 1972, 1973).

Os frutos são consumidos por várias espécies da fauna, auxiliando a disseminação da espécie. O caroço é lenhoso e formado por uma grande quantidade de espinhos (Lorenzi, 2000).

## **3 PROPAGAÇÃO**

### **3.1 Propagação sexuada**

Entre os momentos mais críticos de um ciclo do desenvolvimento de um vegetal está o da germinação, caracterizada por Bewley & Black (1994) como sendo um processo fisis-metabólico de natureza complexa que leva à retomada do crescimento do eixo embrionário da semente e à protrusão da radícula no tegumento.

Santana (2003) comenta que a germinação é basicamente composta por três fases: embebição (quando acontece à reativação do metabolismo), indução de crescimento e protrusão da radícula.

Segundo Bewley & Black (1994), a embebição pode ser definida como o conjunto de processos físicos que ocorrem em função das propriedades dos colóides e suas dimensões variam com a permeabilidade do tegumento, composição química da semente, da área de contato entre a semente e a água, com a pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente.

Sob condições adequadas de temperatura e umidade, a semente de pequi inicia a germinação a partir de um mês de plantio, podendo levar de 6 a 11 meses para concretizar o processo (Miranda, 1987). A utilização de tratamentos de quebra de dormência proporcionou taxas de 30% de germinação quando se

utilizou tratamento a frio (2°C por 24h) (Miranda, 1987) e 36% utilizando pirenos sem espinhos e condicionamento a 4°C por 24h (Melo, 1987). Dombroski (1997), comparando níveis de escarificação e efeito de GA<sub>3</sub>, observou que a germinação ocorreu até 56 dias após a semeadura, indicando que a utilização de reguladores de crescimento pode ter efeito benéfico na germinação do pequiizeiro.

A obtenção de explantes para a experimentação *in vitro* pode ser realizada por meio da germinação *in vitro*, os quais são especialmente utilizados quando o estabelecimento de culturas via material oriundo do campo ou de casa de vegetação apresenta o problema de contaminação endógena severa (Santana, 2003).

### **3.2 Propagação assexuada *in vitro***

Devido às dificuldades encontradas no processo de propagação do pequiizeiro por meio de sementes, a cultura de tecidos aparece como uma solução que pode favorecer a obtenção de mudas de pequiizeiro.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas principalmente quando a propagação sexuada é insatisfatória, quando a progênie obtida é muito heterogênea ou em casos em que a propagação por sementes não ocorre naturalmente. Na multiplicação *in vitro* há grande economia de tempo e possibilidade de produção de clones promissores e livres de patógenos por meio de cultura de meristemas (Pierik, 1990; George, 1993).

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

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

Nas plantas, a maioria das divisões celulares coordenadas ocorre em áreas concentradas conhecidas como meristemas e estes estão distribuídos em vários pontos do organismo, durante o seu desenvolvimento. O funcionamento dos meristemas pode ser ativado ou suprimido, de acordo com os padrões de diferenciação ditados por mecanismos de controle genéticos e / ou ambientais (Wareing, 1982).

Células em fases relativamente iniciais do desenvolvimento, tais como os tipos quiescentes de parênquima e as células dos meristemas, os tecidos do câmbio vascular e os tecidos embrionários, estão num estado definido como indeterminado. As células indeterminadas são, por definição, capazes de mudar para diferentes vias do desenvolvimento, dependendo das condições da planta e das características ambientais impostas a elas. As células indeterminadas podem também proliferar rapidamente para produzir massas celulares conhecidas como calos (Yeoman & Forche, 1980).

Por outro lado, as células que já chegam a um estado de desenvolvimento, além do qual elas são destinadas a produzir diferentes tipos de células especializadas, por exemplo, elemento do sistema vascular lignificado do xilema e floema e células suberizadas córtex, já atingiram um estado determinado. Conseqüentemente, células vegetais indeterminadas podem exibir totipotência, além de apresentarem um alto grau de plasticidade em sua resposta a estímulos fisiológicos e ambientais, sendo que as células determinadas podem, às vezes, desdiferenciar-se (Matthell et al., 1994).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas por meio da cultura de tecidos têm como base os mesmos princípios fisiológicos das plantas desenvolvidas em outras condições.

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

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

O sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, predominantemente, a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e calos e vice-versa. Em geral, a rizogênese é induzida pela presença isolada de auxina ou em combinação com uma citocinina em baixa concentração (Santana, 2003).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1967).

As diversas técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser divididas em dois grupos: organogênese e embriogênese somática (Pasqual et al., 1997). A organogênese é definida como a formação de estruturas a partir de tecidos e células, podendo ocorrer por duas vias: direta, pela regeneração de plantas provenientes de tecidos não meristemáticos, sem passar pela indução de calos, apresentando alta fidelidade genética e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo. A partir das células do calo

surgem gemas adventícias capazes de desenvolver novas estruturas, tanto parte aérea e raízes quanto embriões (Grattapaglia & Machado, 1998).

Após o desenvolvimento das brotações oriundas de gemas cultivadas *in vitro*, essas são repicadas e transferidas para um meio de cultura suplementado com auxina e carvão ativado para favorecer o desenvolvimento do sistema radicular, resultando, assim, na formação de novas plântulas, que seguem para a fase de aclimatização. A aclimatização se caracteriza pela mudança de uma condição heterotrófica para autotrófica. Plântulas oriundas do cultivo *in vitro* podem apresentar algumas deficiências anatômicas, morfológicas e fisiológicas. Isto contribui para a rápida desidratação da plântula quando transferida para ambiente normal, comprometendo, assim, seu estabelecimento *ex vitro* (George, 1993).

A manutenção do crescimento ativo das brotações é importante porque a aclimatização e o desenvolvimento de condições autotróficas dependem do novo crescimento após a transferência para o ambiente *ex vitro*. Imediatamente após o transplante, as plântulas devem ser mantidas em alta umidade e gradualmente expostas às condições ambientais para prevenir a desidratação (Zimmerman, 1988).

### **3.2.1 Propagação *in vitro* de plantas lenhosas**

Vários estudos têm sido realizados visando à produção de mudas de plantas lenhosas, principalmente frutíferas nativas, para serem utilizadas na expansão comercial e no reflorestamento de áreas degradadas. No entanto, vários problemas, como alta perecibilidade dos frutos, assincronia no amadurecimento, alternância de safras e dificuldades de propagação, têm inviabilizado a exploração racional de várias espécies. Algumas destas

dificuldades podem ser superadas utilizando mudas uniformes, não originadas de sementes, principalmente através da cultura de tecidos (Paiva et al., 2002).

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores, a qual tem sido feita principalmente via gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos.

Dentre os vários trabalhos de micropropagação e cultura de tecidos com espécies lenhosas, o Laboratório de Propagação de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) vem apresentando trabalhos pioneiros nesta área do conhecimento, dedicando esforços para solucionar problemas encontrados na produção de mudas de espécies lenhosas frutíferas. Por exemplo, destacam-se os estudos realizados por Dombroski (1997) com pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), Gomes (1999) com moreira (*Maclura tinctoria* (L.) Gaudichaud), Decceti (2000) com *Annona glabra*, Nogueira (2003) com muricipequeno (*Bysornima intermedia*), Soares (2003) com ingá [*Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.].

### 3.2.2 Meios nutritivos

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas). A composição do meio de cultura tem importante papel nas respostas de crescimento de células e tecidos *in vitro* (Borgatto et al., 2002).

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas. Assim, ao excisar parte da planta, para cultivo *in vitro*, observa-se que

os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (Torres et al., 2001).

Assim, o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é um dos mais utilizados na cultura de tecidos da grande maioria das espécies, sendo realizadas algumas alterações de acordo com o explante utilizado (Caldas et al., 1998).

Os meios de cultura podem ser ainda modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie na qual se está trabalhando, sendo importante deter o conhecimento da importância de cada elemento contido em um meio de cultivo. Como é o caso do meio WPM (Wood Plant Medium) desenvolvido por Lloyd & McCown (1980), o qual foi desenvolvido em especial para plantas lenhosas.

### **3.2.3 Estabelecimento *in vitro***

O estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas, tais como oxidação e contaminação (Sato et al., 2001).

A aplicação da técnica de propagação vegetativa *in vitro* em espécies arbóreas freqüentemente encontra o problema de contaminação no início das culturas (Murashige, 1977).

Um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana ou fúngica, principalmente presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. É freqüente deparar-se com contaminação presente no interior dos tecidos e que é conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (Teixeira, 2004).

Os principais compostos utilizados para a desinfestação são o etanol e o cloro. O modo de ação do etanol consiste na rápida desnaturação protéica e dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas e age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor irritante e também baixa atividade contra esporos (Pasqual et al., 2002).

A desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais pode ser feita com álcool etílico comercial na concentração de 50% a 70%, por um período de 1 a 3 minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio 0,5% a 2% (P/V) por 5 a 20 minutos e de 3 a 5 lavagens com água destilada autoclavada por um período mínimo de 5 minutos (Teixeira, 2004).

Quando a descontaminação tradicional é ineficiente, ela pode ser melhorada com o uso de fungicidas e bactericidas (Alves Júnior et al., 2003).

A contaminação por fungos endógenos pode ser eventualmente controlada com cultivos na presença de Benomyl, na concentração de 500 a 2000mg L<sup>-1</sup>. O Benomyl pode ser autoclavado no meio de cultura (Teixeira, 2004). Este é um fungicida o que possui atividades preventivas, curativa e sistêmica contra numerosos grupos de fungos, apresenta baixa toxicidade e, de modo geral, não provoca fitotoxicidade (Sato et al., 2001). No entanto este fungicida não é mais comercializado, havendo a necessidade de se utilizar outros fungicidas tais como o Captan.

Para se tentar eliminar a contaminação, o meio de cultura também pode ser enriquecido com antibióticos. Vários antibióticos podem ser utilizados, mas, a cefatoxima é uma das mais utilizadas em concentrações de 100 a 250mg L<sup>-1</sup> e deve ser adicionada ao meio de cultura após a autoclavagem. A sua esterilização deve ser feita via filtração, em filtros de poros iguais ou menores que 0,22µm de diâmetro (Teixeira, 2004).

No estabelecimento da cultura, dependendo do tipo de explante usado, microrganismos superficiais e endofíticos podem ser levados para a cultura *in vitro*. Na cultura de meristema, a maioria dos microrganismos pode ser eliminada, enquanto que na folha, pecíolo ou explantes nodais, muitos ou quase todos os microrganismos podem ser levados para a cultura (Cassells et al., 1988).

A oxidação fenólica representa um dos mais sérios problemas, especialmente durante a fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas. As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo destas espécies, bem como na defesa contra predadores e microrganismos (Teixeira, 2004).

Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

Alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis à oxidação fenólica que outros, evidenciando que esse processo é altamente dependente do genótipo e também do tipo de explante utilizado, sendo que explantes jovens em geral oxidam menos que os velhos. A época do ano é outro fator importante que influencia o teor de polifenóis e, conseqüentemente, a oxidação *in vitro*. Em geral, na época de crescimento existe menor concentração de polifenóis nos tecidos (Teixeira, 2004).

Uma das técnicas possíveis para reduzir esse problema inclui a lavagem, em água corrente, dos explantes coletados antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação de compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Os danos da oxidação fenólica podem ser reduzidos pelo cultivo em meio líquido, no qual os produtos da oxidação se diluem. A redução da concentração de ágar de 0,8% a 0,4% pode resultar numa redução substancial da oxidação

fenólica. O carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas. O uso de carvão ativado, contudo, pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo como, por exemplo, os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo. O PVP (polivinilpirrolidona) é uma poliamida capaz de adsorver os fenóis por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica (Teixeira, 2004).

O estabelecimento das culturas pode ter melhores resultados caso os explantes sejam cultivados no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo (Durand-Cresswell et al., 1982).

O acúmulo de polifenóis pode se dar devido a uma inadequação do meio nutritivo. Frequentemente, o cultivo em meios salinos diluídos é mais apropriado ao cultivo de explante, resultando em menor síntese e oxidação fenólica (Teixeira, 2004).

### **3.2.4 Calogênese**

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

O cultivo de calos é um método que possibilita a propagação em massa de uma espécie, sendo também utilizado para a produção de metabólitos secundários e é também pré-requisito para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética.

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

Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explantes, a composição do meio de cultura e as condições físicas de incubação como luz e temperatura. Os melhores resultados de calogênese são obtidos utilizando tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão do que células adultas.

Desdiferenciação, indução e regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo (Grattapaglia & Machado, 1998).

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e, geralmente, dependendo da concentração, causam alongação celular e expansão ou divisão celular. Em geral, com o uso de baixas concentrações de auxinas, predomina a formação de raízes adventícias, enquanto que altas concentrações induzem a formação de calos. A interação entre auxinas e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese (Gomes, 1999).

A morfogênese de calos nem sempre leva à formação de plântulas viáveis. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, pode não ocorrer uma conexão vascular entre eles, o que é de extrema necessidade para a viabilização da plântula (Wetmore & Rier 1963).

### **3.2.5 Cultura de anteras**

A androgênese é o fenômeno no qual um grão de pólen é capaz de alterar sua rota de desenvolvimento e originar um esporófito haplóide. Este processo

ontogenético alternativo ainda é pouco conhecido, apesar de sua potencialidade tanto para estudos básicos como para aqueles aplicados para o melhoramento de plantas (Kaltchuk-Santos & Bodanese-Zanettini, 2004).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos vêm sendo feitos visando à regeneração de plantas haplóides a partir da cultura *in vitro* de células gametofíticas. Atualmente, a cultura de anteras, por meio do processo de androgênese, tem sido a técnica mais empregada para a obtenção de haplóides (Kaltchuk-Santos & Bodanese-Zanettini, 2004).

A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante, pois possibilita a obtenção de linhagens homozigóticas em uma única etapa, acelerando assim a obtenção de novas cultivares (Pasqual et al., 2002; Andrade, 1998). Segundo Dufour et al. (1995), ao se utilizar cultura de anteras, o número de plantas necessárias para a obtenção de uma nova cultivar é sensivelmente menor, chegando à raiz quadrada do número de plantas utilizadas no melhoramento convencional.

Uma planta haplóide tem somente a metade do patrimônio genético, a duplicação de seu número cromossômico de maneira espontânea, ou induzida pela aplicação de colchicina, recupera a condição diplóide e restaura a fertilidade. Esta planta, chamada de duplo-haploide será totalmente homozigota, uma vez que cada cromossomo terá sua cópia exata (Moraes-Fernandes, 1990). Ao eliminar o mascaramento causado pela heterozigose, a produção do duplo-haploide traz outra vantagem, que é a de ampliar a eficiência de seleção, tanto de caracteres qualitativos quanto de quantitativos, facilitando, portanto, a identificação de genótipos superiores (Kaltchuk-Santos & Bodanese-Zanettini, 2004).

O uso de haplóides para a obtenção de plantas homozigóticas, por meio de duplicação do número de cromossomos, pode auxiliar os programas de melhoramento nesta cultura no que diz respeito à obtenção mais rápida de

linhagens endogâmicas. A melhor técnica para a obtenção de haplóides é a cultura de antera (Luz et al., 2000).

Atanassov et al. (1995) relatam que a técnica de produção de haplóides androgenéticos pode ser empregada em trabalhos envolvendo a obtenção de mutantes, na fusão somática e, ainda, como alvo para transferência de genes.

### 3.2.6 Enraizamento

O enraizamento de espécies herbáceas é geralmente fácil, porém, o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas. Esse problema se agrava à medida que não se utiliza material jovem, uma vez que a capacidade de formar raízes adventícias, ao aproximar-se a fase adulta de sua vida, é reduzida (Torres et al., 1998).

No caso das maiorias das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil da micropropagação (Hu & Wang, 1983).

Lopes et al. (2001) relatam que a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongação. A duração destas fases pode ser de uma a três semanas.

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo de rizogênese, principalmente nas espécies lenhosas que possuem dificuldades para enraizar (Gaspar & Hofinger, 1988). Gattapaglia & Machado (1998) comentam que a auxina é importante nas duas fases iniciais da rizogênese e que esta pode ser inibidora na última fase, e que o uso desse regulador de crescimento no meio de cultivo e a posterior transferência do explante para outro isento de auxina são indicados para a indução e o desenvolvimento de raízes.

As auxinas mais utilizadas para a indução de raiz *in vitro* são o AIA, ANA e o AIB, sendo estes normalmente utilizados em baixas concentrações no

meio de cultura (Zimmerman, 1981; George & Sherrington, 1984). Segundo Pasqual et al. (2000), o regulador de crescimento mais indicado para induzir o enraizamento de brotos é o ácido indolbutírico (AIB).

A obtenção de uma plântula com um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento nas novas condições ambientais (Pio et al., 2002).

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, o que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatização.

A fase de enraizamento *in vitro* se caracteriza pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplante da plântula para condições *ex vitro*.

Com o aumento da concentração de auxina no meio, George (1996) percebeu um aumento no número de raízes de várias espécies herbáceas, formadas por explante. No entanto, quando concentrações elevadas foram utilizadas, a formação de calos foi verificada.

O enraizamento de espécies lenhosas, quando comparado ao de espécies herbáceas, geralmente é mais difícil e se agrava à medida que não se utiliza material jovem, 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 (Deccetti, 2000).

Alguns compostos podem ser adicionados ao meio de cultivo para auxiliar a indução da rizogênese. Uma das substâncias mais utilizadas é o carvão ativado em concentrações que variam em torno de 0,1% a 2% (p/v).

O carvão ativado é utilizado para estimular a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Em termos químicos, o carvão ativado exerce um efeito de retenção de alguns componentes do meio de cultivo, como a

fixação de citocininas residuais liberadas pelos tecidos vegetais e compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Gomes, 1999). O carvão ativado pode fixar também auxinas e reter fenóis oxidantes, sendo, de uma forma geral, benéfico, promovendo o alongamento das raízes.

### 3.2.7 Aclimatização

A aclimatização envolve o transplântio da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação, que, geralmente, consiste de uma fase crítica e que pode ser um fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998).

Entre os vários fatores que podem estar envolvidos no processo de aclimatização, pode-se relacionar o genótipo, o estresse hídrico, a alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, a infecção por patógenos e o estresse pela alteração na radiação (Deccetti, 2000). A mudança repentina da umidade à qual a plântula estava exposta pode causar danos mesmo em plantas que apresentem o aspecto normal.

Assim, torna-se obrigatório que a plântula, ao sair da condição *in vitro*, deva passar por um processo de aclimatização antes de ser levada para o campo. Este processo pode ser dispendioso e levar um tempo considerável, limitando-se, assim, o uso de micropropagação em escala comercial (Gomes, 1999).

Segundo McCown (1988), o período de aclimatização varia de 1 a 4 semanas e corrige as alterações ou anormalidades induzidas *in vitro*, o que inclui a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e o estabelecimento de relações hídricas normais, por meio da regulação da perda e da absorção de água.

A eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* pode ser vantajosa do ponto de vista econômico (Torres et al. 1998). No entanto, a obtenção de

enraizamento *ex vitro* é considerada fácil em espécies herbáceas, mas difícil em espécies lenhosas. Segundo McCown (1988), o enraizamento varia de acordo com a espécie, desde o fácil enraizamento e crescimento radicular, até a inibição completa.

## 4 TESTES ESTATÍSTICOS

### 4.1 Regressão Logística

A regressão Logística pode ser utilizada para modelar dados binários em função dos parâmetros representando as covariáveis (Balakrishnan, 1992).

Segundo Balakrishnan (1992) o modelo é dado por:

$$prob(y = 1 | \beta_0, \beta_1, \dots, \beta_i) = \frac{e^{-\beta_0 + \beta_1 + \dots + \beta_i}}{1 + e^{-\beta_0 + \beta_1 + \dots + \beta_i}}$$

Em que o valor que  $y$  assume represente o evento de interesse, isto é, a resposta de “sucesso a ser modelado”.

A avaliação da qualidade do ajuste do modelo pode ser feito mediante ao estudo de significâncias dos parâmetros e do valor da “deviance” (Balakrishnan, 1992).

### 4.2 Kruskal-Wallis

Segundo Triola (1999) o teste Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico utilizado para comparar médias de tratamentos, mais especificamente esse teste é um competidor do teste F (paramétrico) aplicado ao

Delineamento Inteiramente Casualizado, assim, analogamente as hipóteses são as mesmas, isto é,  $H_0$ : “Os tratamentos apresentam médias iguais” versus  $H_1$ : “Pelo menos um dos tratamentos difere dos demais” porém a estatística do teste é dada pela seguinte expressão:

$$T = \frac{12}{N(N+1)} \left( \frac{R_1^2}{n_1} + \frac{R_2^2}{n_2} + \dots + \frac{R_k^2}{n_k} \right) - 3(N+1)$$

Onde: N= Número total de observações; k= número de amostras;  $R_i$  soma dos postos do i-ésimo tratamento e  $n_i$  número de observações na i-ésima amostra.

A regra de decisão é dada por rejeitar  $H_0$  caso o valor da estatística T seja superior ao quantil da distribuição Qui-Quadrado com  $k-01$  graus de liberdade.

### 4.3 Box-Plot

O Box-plot auxilia a ter uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si. Segundo Bussab & Morettin (1987), o gráfico Box-Plot permite ter uma idéia da posição, dispersão, assimetria e dados discrepantes.

O esquema de um Box-Plot está descrito na Figura 4.

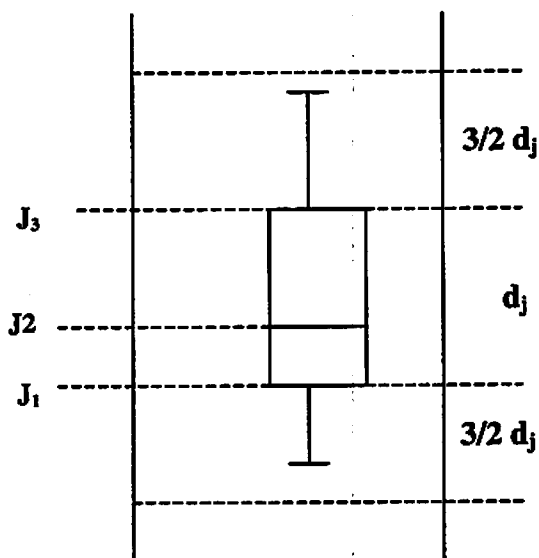


Figura 4 Esquema de um Box-Plot. A posição central dos valores é dada pela mediana ( $J_2$ ) e a dispersão por ( $d_j$ ), as posições  $J_1$ ,  $J_2$  e  $J_3$  dão uma noção de assimetria da distribuição. Os comprimentos das caudas são dados pelas linhas que vão do retângulo aos valores mais afastados que não sejam outliers, ressaltando que os outliers, ou seja, observações discrepantes são consideradas as observações que sejam menores que  $J_1 - 3/2d_j$  ou maiores que  $J_3 + 3/2d_j$ .

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A. J.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. Oxford: Blackwell Science, 1977. p. 267-287.

ALMEIDA, S. P. de. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico – química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 248-285.

ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. **Piqui e Buriti: Importância alimentar para a população dos cerrados.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p. (EMBRAPA-CPAC. Documentos, 54).

ALVES JUNIOR, J.; SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; LEMOS, E. E. P. de; NICIOLI, P. M.; SANTOS, B. R. **Uso de antibiótico e fungicida para controlar contaminações *in vitro* de segmentos foliares de *Annonaceae*.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 27., 2002, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA, 2003.

ARAUJO, F. D. **A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian cerrados.** **Economic Botany**, Bronx, v. 49, n. 1, p. 40-48, Jan./Mar. 1995.

ATANASSOV, A.; ZAGORSKA, N.; BOYADJIEV, P. ***In vitro* production of haploid plants.** **World Journal of microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 400-408, July 1995.

BALAKRISHANAN, N. **Handbook of the logidtic distribution. Statistics: Textbooks and monographs,** New York, 1992, 602p.

BARRADAS, M. M. **Informações sobre a floração, frutificação e dispersão do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.) (Caryocaraceae).** **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 24, n. 11, p. 1063-1068, nov. 1972.

BARRADAS, M. M. **Morfologia do fruto e da semente de *Caryocar Brasiliense* (piqui) em várias fases de desenvolvimento.** **Revista de Biologia**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 69-84, 1973.

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

BORGATTO, F.; DIAS, C. T. dos S.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. **Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chryanthemum morifolium* cv. "Bi Time" and Callogenesis *in vitro*.** **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 669-693, out./dez. 2002.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J. P.; MACEDO, J. F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528 p.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica.** São Paulo Editora Atual, 1987.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Paraná: EMBRAPA, 1994. 640 p.

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

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

DOMBROSKI, J. L. D. **Estudos sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 1997. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DUFOUR, M.; JIMENEZ, M.; DURIS, D. Haplomethods: factors controlling callus obtention on *Coffea arabica* anthers. In: COLLOQUE DE L'ASIC, 16., 1995, Kyoto. *Annals... Kyoto*, 1995. p. 765-770.

DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAYL, M.; FRANCLLET, A. Vegetative propagation of Eucaliptus. In: BONGA & DURAZAN (Ed.). **Tissue culture in forestry**. The Hague: MartinusNijhoff, 1982. p. 15-151.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSING, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides, 1988. v. 2, p. 88-101.

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: Part 2 in practice**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories.** Eversley, Exegtics 1984.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*).** 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.  
GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.

GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* in Central Brazil cerrado vegetation. **Journal of Tropical Ecology,** Cambridge, v. 9, n. 2, p. 199-211, May 1993.

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

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. et al. **Handbook of plant cell cultures.** New York : Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

IEF, **Pequi vence concurso para eleição da Árvore Símbolo de Minas Gerais.** Disponível em: <[http://www.arvore.com.br/noticia/n2111\\_5.htm](http://www.arvore.com.br/noticia/n2111_5.htm)>. Acessado em: 10 fev. 2004.

KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: Uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 165-173, jan./fev. 2002.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings,** Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). *Cerne*, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v. 1, p. 78.

LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. F.; PEREIRA, I. A.; MESQUITA. Caracterização histológica da indução embriogênica em anteras de pimentão. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 1, p. 17-21, jan./mar. 2000.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 344p. 1994.

McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p. 289-302.

MELO, J. T. **Fatores relacionados com a dormência da semente de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 1987. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MELO, J. T. de; GONÇALVES, A. N. **Inibidores de germinação no fruto e em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1991. 11 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de pesquisa, n. 34).

MIRANDA, J. de S.; SILVA, H.; MATOS, M. A. de O. Emergência e vigor de sementes de pequi submetidas a pré-tratamentos mecânicos e térmicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. p. 647-651.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Obtenção de plantas haplóides através de cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/ABCTP, 1990. p. 311-332.

MURASHIGE, T. Clonal crops through tissue culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENCK, M. H. (Eds.). **Plant tissue culture and its biotechnological application**. New York: Springer-Verlag, 1977. p. 392-406.

**NOGUEIRA, R. C. Propagação in vivo e in vitro de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.) 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, P. D. de O.; DOMBROSKI, J. L. D.; SANTOS, R. S. Espécies frutíferas com potencial econômico: avanços no processo de propagação. Informe Agropecuário: produção e certificação de mudas de plantas frutíferas, Belo Horizonte: EPAMIG, v. 23, n. 216, p. 78-84. 2002.**

**PASQUAL, G.; MANES, F.; MONACELLI, B.; NATALE, L.; ANSELMI, S. Effects of the culture medium pH and ion uptake in vitro vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. Plant Science, Clare, v. 162, p. 947-955, 2002.**

**PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFPA/FAEP, 1997. 159 p.**

**PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; MACIEL, A. L. R.; PEREIRA, A. B.; ALVES, J. M. C. Enraizamento in vitro de um porta – enxerto de macieira em diversos substratos. Scientia Agrícola, Piracicaba, v. 57, n. 4 p. 781-784, out./dez. 2000.**

**PIERIK, R. L. M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.**

**PINTO, M. N.; Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 1993. 681p.**

**POZO, O. V. C. O Pequi (Caryocar brasiliense): Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado no Norte de Minas Gerais. 1997. 100 p. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**RIBEIRO, A. E. O espaço, o homem e o seu destino no norte de Minas. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Departamento de Administração e Economia. Manejo sustentado do Cerrado para uso múltiplo: sub-projeto agroecologia e desenvolvimento, 1996. p. 11-18.**

**RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. Cerrado: ambiente e flora. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 89-152.**

RIBEIRO, L. Lei impede colheita de pequi verde. **Estado de Minas**, segunda-feira 12 de outubro, 2003.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556 p.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 237 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001 .

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

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Synposia of the society for Experimental Biology**, Heidelberg, v. 11, p. 118-131. 1967.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [*Inga vera* WILLD. Subsp. *Affinis* (DC.) T. D. PENN. ]**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. EMBRAPA-DF. Disponível em:  
<<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc.2001/simposios/s-joao%20batista%20teixeira./palestra%20jo%e30%20batista%teixeira>>. Acesso em: 17 out. 2004.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA M. P.; FERREIRA C. F.; PAIVA S. A. V. de **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas**. 19 p. Brasília – DF, 2001. 19 p. (Circular Técnica, n. 24).

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.

**TRIOLA, M. F. Introdução a Estatística. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.**

**WAREING, P. F. Determination and related aspects of plant development. In: SMITH, H.; GRIERSON, D. (Ed.). The molecular biology of plant development. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982. p. 517-539.**

**WETMORE, R. H.; RIER, J. P. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. American Journal of Botany, Columbus, v. 50, n. 5, p. 418-430, 1963.**

**YEOMAN, M. M.; FORCHE E. Cell proliferation and growth in callus cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture. 1980. Suplemnet of the International Review of Cytology, v. 11A, p. 1-24.**

**ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. Acta Horticulturae, Wageningen, n. 120, p. 217-222. 1981.**

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

## **CAPÍTULO II**

### **GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE SEMENTES**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes. In: **Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense camb.*)**. 2004. p.33 – 42. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Dentre várias espécies frutíferas encontradas no cerrado brasileiro, o pequizeiro vem se destacando no cenário nacional por possuir frutos comestíveis e madeira de alta qualidade. Por estas características, o pequizeiro tem um grande potencial de atingir mercados internacionais. As dificuldades encontradas no processo de propagação do pequizeiro por meio de sementes, devido, principalmente, à baixa taxa de germinação e presença de espinhos, valoriza a busca por soluções alternativas para a produção de mudas, de maneira rápida e eficiente. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da germinação de sementes de pequizeiro em condições *in vitro* e *ex vitro*, tendo como precedente a obtenção de explantes para posterior utilização no cultivo *in vitro*. Para a germinação *in vitro*, as sementes desprovidas de endocarpo foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) e embebidas por 24 horas em solução de GA<sub>3</sub> na concentração de 500mg L<sup>-1</sup>. Em seguida, as sementes foram transferidas para frascos de vidro (122,5cm<sup>3</sup>) contendo água destilada e autoclavada, acrescida com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5g L<sup>-1</sup> de Benlate e solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar, onde permaneceram por 5 dias para observar o grau de contaminação destas. As sementes que não contaminaram (80%) foram transferidas para o meio WPM acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5g L<sup>-1</sup> de Benlate e 7,0g L<sup>-1</sup> de ágar. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25±1°C e fotoperíodo de 16 h (36 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Para a germinação *ex vitro*, as sementes foram colocadas para embeber em papel de filtro umedecido com solução de GA<sub>3</sub> 500mg L<sup>-1</sup>, durante 24 horas. Em seguida, as sementes foram transferidas para rolos de papel de filtro umedecidos com água destilada e mantidos em germinador a 25°C e fotoperíodo de 16 horas. Maior percentagem de germinação e um maior índice de velocidade de germinação (IVG) para as sementes de pequizeiro foram obtidos no cultivo *in vitro*.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Seed germination *in vitro* and *ex vitro*. In: Pequiizeiro (*Cariocar brasiliense* Camb.) propagation 2004. p.33 - 42. (Doctorate in Plant Physiology Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG).

Among the various species found in Brazilian Cerrado the pequi tree has an important role in Brazilian agriculture of edible fruits and also has a high quality wood. For these characteristics this species has a great potential in international market. The difficulties found in the propagation process by seeds, due mainly to the low germination rate and the presence of thorn, cause the search for efficient and quick alternative solutions for seedlings production. The objective of this research was to study the pequi tree seeds germination *in vitro* and *ex vitro*, having as goal to obtain the explant for later utilization *in vitro* cultivation for *in vitro* germination, the seeds without endocarp were disinfested with sodium hypochlorite (1,5% active chlorine) and embedded during 24 hours in GA<sub>3</sub> solutions in concentration of 500mg L<sup>-1</sup>. In the next step, the seeds were transferred for glass bottle (122,5cm<sup>3</sup>) containing distilled and autoclaved water with 30g L<sup>-1</sup> of sucrose, 0,5g L<sup>-1</sup> of Benlate and solidified with agar where were kept for 5 days to observe the contamination levels of those samples. The seeds without contamination (80%) were transferred to WPM medium with 30g L<sup>-1</sup> of sucrose, 0,5g L<sup>-1</sup> of Benlate and 7,0g L<sup>-1</sup> of agar. The bottles were kept in growth room at 25±1°C and 16h (36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) photoperiod. For *ex vitro* germination the seeds were embedded in filter paper wet to GA<sub>3</sub> (500mg L<sup>-1</sup>) solution during. After this time, the seeds were transferred paper filter wet with distilled water and kept in at 25°C and 16h photoperiod. The higher germination percentage and germination speed index (IVG) for pequi tree seeds were obtained *in vitro* cultivation.

### 3 INTRODUÇÃO

Dentre várias espécies frutíferas encontradas no cerrado brasileiro, o pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.) vem se destacando no cenário nacional por possuir frutos comestíveis e madeira de alta qualidade. Seus frutos são muito utilizados na alimentação humana e na indústria caseira para a extração de óleos, e produção de doces, sorvetes e licores. Por estas características o pequi tem grande potencial de atingir mercados internacionais.

Um dos problemas encontrados no desenvolvimento do pequi é a produção de mudas, pois, além de possuir sementes espinhosas, o que dificulta o manuseio, as sementes apresentam um baixo índice de germinação devido à dormência (Miranda, 1987; Melo & Gonçalves, 1991); que pode ser ocasionada por dormência tegumentar e presença de inibidores da germinação (Dombroski, 1997; Melo & Gonçalves, 1991; Miranda, 1987). As dificuldades encontradas no processo de propagação do pequi por meio de sementes valoriza a busca por soluções alternativas para a produção de mudas, de maneira rápida e eficiente, o que, sem dúvida, pode significar um maior estímulo do desenvolvimento do pequi como cultura de valor econômico.

Uma ferramenta que vem sendo amplamente utilizada para a propagação de espécies lenhosas que apresentam dificuldade de germinação é a cultura de tecidos, que pode propiciar a produção de mudas de forma efetiva. Assim, a cultura de tecidos se torna uma opção real para se tentar propagar o pequi.

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da germinação de sementes de pequi em condições *in vitro* e *ex vitro*, tendo como precedente a obtenção de explantes para posterior utilização no cultivo *in vitro*.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros de pequizeiro foram coletados de plantas adultas localizadas no município de Bom Despacho, MG e utilizados como fonte de sementes. A epiderme e a parte externa do mesocarpo foram retiradas manualmente, restando apenas a semente. Para retirada do mesocarpo interno e espinhos (parte externa do endocarpo) foi utilizado o método que utiliza uma escova de aço acoplada em um motor, que ao girar faz a remoção destes. (Dombroski,1997). A obtenção das sementes se deu pela retirada do endocarpo com o auxílio de uma tesoura de poda.

Para a germinação *in vitro*, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) e embebidas em solução de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) na concentração de 500mg L<sup>-1</sup>, permanecendo nesta condição durante 24 horas. Em seguida, as sementes foram transferidas para frascos de vidro (122,5cm<sup>3</sup>) contendo água destilada e autoclavada, acrescida com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5g L<sup>-1</sup> de Benlate e solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar, onde permaneceram por 5 dias para observar o grau de contaminação destas. As sementes que não contaminaram (80%) foram transferidas para o meio WPM (Wood Plant Médium - Lloyd e McCown, 1980) acrescido de 30mg L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5g L<sup>-1</sup> de Benlate e 7,0g L<sup>-1</sup> de ágar. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 36 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Para a germinação *ex vitro*, as sementes foram colocadas para embeber em papel de filtro umedecido com solução de GA<sub>3</sub> 500mg L<sup>-1</sup> durante 24 horas. Em seguida, as sementes foram transferidas para rolos de papel de filtro umedecido com água destilada e mantidos em germinador a 25°C e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliados a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) até o 50º dia após o início do experimento. A obtenção do IVG foi realizada por meio de um modelo matemático sugerido por Maguire (1962), citado por Nakagawa (1994), em que:

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n ,$$

sendo IVG índice de velocidade de germinação;  $G_1, G_2, G_n$  o número de plântulas germinadas, computadas na primeira, segunda, até a última contagem;  $N_1, N_2, N_n$  o número de dias da semeadura à primeira, segunda até a última contagem.

O trabalho foi conduzido em delineamento estatístico inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 4 repetições compostas por 100 sementes. Para a análise dos dados utilizou a estatística descritiva ter comparação apenas em dois níveis (*in vitro* e *ex vitro*).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes embebidas em GA<sub>3</sub> e germinadas em condições *ex vitro* apresentaram porcentagem de germinação de 78%, enquanto as sementes *in vitro* apresentaram 100% de germinação (Tabela 1), indicando que a embebição destas em GA<sub>3</sub> e seu cultivo *in vitro* em meio WPM favoreceram a germinação.

TABELA 1 Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de pequizeiro cultivadas em ambiente *in vitro* e *ex vitro*. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Germinação (%)	IVG
Ambiente <i>in vitro</i>	100	7,0
Ambiente <i>ex vitro</i>	78	4,75

O IVG foi maior para as sementes que foram germinadas no cultivo *in vitro* (7,0), em comparação ao encontrado para as sementes germinadas na condição *ex vitro* (4,75). Este resultado pode estar relacionado à germinação ocorrer em ambiente asséptico, à presença de substâncias minerais e orgânicas não encontradas no ambiente *ex vitro* de germinação.

Coelho et al. (2001) também obtiveram melhores resultados na germinação de sementes *in vitro* sem tegumento (96,6%) do que em condições *ex vitro* sem tegumento (55%) em sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.], apresentando ainda maior velocidade de germinação em sementes *in vitro*.

O aspecto visual das sementes de pequizeiro germinadas *in vitro* pode ser observado na Figura 1.

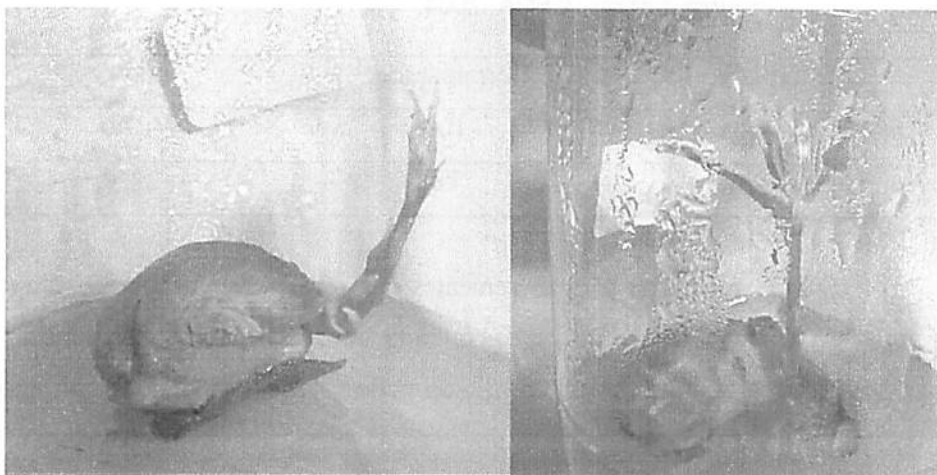


FIGURA 1 Aspecto visual das sementes germinadas *in vitro*. Lavras, UFLA – 2004.

Bhattacharya & Khuspe (2001) encontraram melhores resultados na germinação de sementes de diferentes cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na condição *in vitro*, tanto na velocidade de germinação quanto na porcentagem final, do que em condição *ex vitro*.

## 6 CONCLUSÃO

Maior porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de pequiwereiro foram obtidos no cultivo *in vitro*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae*, Wageningen, v. 91, n. 1/2, p. 39-49, Nov. 2001.
- COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.) in vitro e ex vitro. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 01, p. 38-48, jan./mar. 2001.
- DOMBROSKI, J. L. D. Estudos sobre a propagação do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 1997. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. *HortScience*, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.
- MELO, J. T. de; GONÇALVES, A. N. Inibidores de germinação no fruto e em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1991. 11 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de pesquisa, n. 34).
- MIRANDA, J. S.; SILVA, H.; MATOS, M. A. O.; SILVA, A. A. Q. Emergência e vigor de sementes de pequi submetidas a pré-tratamentos mecânicos e térmicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. Anais... Campinas: RBF, 1987. v. 1, p. 315-318.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: Funep, 1994. p. 49-85.

### **CAPÍTULO III**

## **CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares e caulinares. In: **Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. p. 43 – 64. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Dentre as inúmeras espécies nativas do cerrado brasileiro de interesse, o pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) destaca-se por contribuir para a recomposição da flora e fauna nas áreas de ocorrência. Suas sementes apresentam dormência, dificultando sua propagação, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas por via assexuada. Neste contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada. No entanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas associados à contaminação bacteriana ou fúngica. O presente trabalho teve como objetivo obter a desinfestação de explantes foliares e caulinares obtidos de plântulas germinadas e cultivadas em sala de crescimento, a fim de promover o estabelecimento *in vitro* do pequiheiro. Foram testados tempos de imersão em álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e Benlate. Após os tratamentos de desinfestação, os explantes foram inoculados em meio WPM, sem regulador de crescimento, acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, os explantes foram transferidos e mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 25±1°C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Aos 15 dias da inoculação, avaliou-se o número de explantes contaminados e a porcentagem de queimaduras ocasionadas pelos tratamentos e tipos de contaminação. O álcool etílico 70% combinado com hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) teve efeito sinérgico na desinfestação dos explantes. Deve-se utilizar o hipoclorito de sódio 2,5% nos tempos de 5 a 15 minutos para se evitar a queimadura dos explantes foliares. Recomenda-se utilizar, para a desinfestação dos segmentos caulinares, álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2,5% a um tempo de 10 minutos para se obter uma menor porcentagem de queimadura dos explantes e uma desinfestação mais eficiente. O benlate nas concentrações acima de 100mg L<sup>-1</sup> inibe o crescimento de fungos em explantes foliares e segmentos caulinares.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Control of contamination during *in vitro* establishment of shoot and leaf explants. In: Pequi tree micropropagation (*Caryocar brasiliensis* Camb.) 2004. p. 43 - 64. (Doctorate in Plant Physiology). Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG.

Among the various native species from Brazilian cerrado with agricultural potential, the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.) has been used for flora recomposition in some areas. Those seeds show dormancy, difficulting the propagation, that become necessary the studies to obtain seedlings by asexual via. In this context, *in vitro* cultivation is an alternative to be used. Although the establishment of native species *in vitro*, in fraction of their characteristics show problems associated with bacterial or fungal contamination. The present work aimed to disinfect the leaf and shoot explants obtained from germinated plantlets and cultivated in growth room, in order to promote the *in vitro* establishment of pequi tree. There were tested the immersion time in ethanol (70%), sodium hypochlorite (2,5% of active chlorine) and Benlate. After the disinfection treatments the explants were inoculated in WPM medium, without growth regulator, containing 30g L<sup>-1</sup> of sucrose and 6g L<sup>-1</sup> of agar, being the pH adjusted to 5,8 and autoclaved for 20 minutes at 121°C and 1 atm. Lately, the explants were transferred and kept in growth room with mean temperature of 25±1°C, whit 16h photoperiod and DFFFA of 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After 15 days of inoculation, it was evaluated the contaminated explants and the percentage of black explants caused by treatments and types of contamination. The ethanol 70% combined with sodium hypochlorite (2,5%) had synergistic effect in explant disinfection. It is advisable to use sodium hypochlorite 2,5 in the times of 5 and 15 minutes to avoid the burning of leaf explants. For shoot segments disinfection, ethanol 70% during 1 minute and sodium hypochlorite for 10 minutes obtained the lower percentage of explant burning. The benlate in concentrations higher than 100mg L<sup>-1</sup> inhibit fungi growth in leaf and shoot explants.

### 3 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de frutas vem, cada vez mais, buscando novas espécies que produzam frutos de sabor exótico e de alta qualidade alimentícia. O cerrado brasileiro vem sendo fornecedor de uma ampla variedade de espécies frutíferas com potencial econômico e que produzem frutos de alto valor nutricional. No entanto, a demanda de frutas nativas do Brasil tem superado a oferta, forçando uma exploração extrativista sem um planejamento sustentado dos seus recursos naturais.

Dentre as inúmeras espécies nativas do cerrado brasileiro de interesse, o pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.) se destaca por contribuir para a recomposição da flora e fauna nas áreas de ocorrência (Carvalho, 1994; Gribel & Hay, 1993) e pela produção de frutos oleaginosos, muito apreciados pela população do cerrado. Inúmeras famílias têm também na colheita e venda de seus frutos, uma importante fonte de renda (Melo, 1987)

A exploração indiscriminada do cerrado pelas atividades agropastoris expõe o pequi a um alto risco de extinção pois, apesar de produzir grande quantidade de frutos, apresenta regeneração natural reduzida. A germinação das sementes do pequi é irregular e lenta. Estas limitações inviabilizam tanto a produção racional de mudas como sua utilização silvicultural (Melo, 1987). Suas sementes apresentam algum tipo de dormência, dificultando sua propagação, o que torna evidente a necessidade da obtenção de mudas por via assexuada. Neste contexto, o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa a ser utilizada. No entanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas associados à contaminação bacteriana ou fúngica, principalmente presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. A contaminação endógena é mais

freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (Teixeira, 2004).

A desinfestação superficial de explantes pode ser feita utilizando-se álcool etílico comercial, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio (Teixeira, 2004). No controle da contaminação endógena, o meio de cultura normalmente é enriquecido com antibiótico e fungicida. O fungicida Benomyl tem sido amplamente utilizado para inibir o crescimento de várias espécies de fungos, sem ter efeito inibitório sobre a cultura de tecidos (Shields et al., 1984).

O presente trabalho teve como objetivo obter a desinfestação de explantes foliares e caulinares, a fim de promover o estabelecimento *in vitro* do pequiizeiro.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

Ramos de pequiizeiro foram retirados de plantas germinadas e cultivadas em salas de crescimento com fotoperíodo de 16h, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de  $67\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , localizadas no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os ramos foram levados para o Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas do Setor de Fisiologia Vegetal (DBI – UFLA), onde se realizou o toalete, constituindo-se na retirada das folhas e dos segmentos caulinares que foram utilizados como explantes.

## 4.2 Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares

As folhas foram submetidas a um tratamento com hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) e álcool etílico 70% antes da inoculação. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e 10 repetições, contendo um explante em cada recipiente. Os tratamentos constituíram-se da interação entre o hipoclorito e o álcool etílico 70%, descritos na Tabela 1.

TABELA 1 Tratamentos obtidos por meio da interação entre o hipoclorito de sódio (2,5%) e álcool etílico 70%. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Hipoclorito 2,5% (minutos)	Álcool etílico 70% (segundos)
T0	10	0
T1	10	15
T2	10	30
T3	10	60
T4	15	0
T5	15	15
T6	15	30
T7	15	60
T8	20	0
T9	20	15
T10	20	30
T11	20	60

Após a aplicação de cada tratamento, os explantes foram levados para ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar, onde foram lavados três vezes com água destilada e autoclavada. As folhas foram excisadas em segmentos de aproximadamente 3cm<sup>2</sup> e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo WPM (Wood Plant Medium; Lloyd & McCown, 1980), sem regulador de crescimento, acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH

ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram transferidos e mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 25±1°C sob um fotoperíodo de 16 horas e DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Após 15 dias da inoculação, avaliou-se o número de explantes contaminados, a porcentagem destes com queimadura ocasionada pelos tratamentos utilizados e o tipo de contaminação apresentada.

Utilizou-se a regressão logística para modelar os dados binários em função dos parâmetros representando as covariáveis. A avaliação da qualidade do ajuste do modelo foi feito mediante ao estudo de significâncias dos parâmetros e do valor da “deviance” (Balakrishnan, 1992).

Foi realizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5% para a porcentagem de queimadura dos explantes foliares.

#### **4.3 Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares**

Segmentos caulinares, de aproximadamente 1cm, foram desinfestados em câmara de fluxo laminar por imersão em álcool etílico 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) em 4 tempos diferentes: T0= sem utilização de hipoclorito de sódio, T1= hipoclorito de sódio por 5 minutos, T2= hipoclorito de sódio por 10 minutos e T3= hipoclorito de sódio por 15 minutos.

Em seguida, os explantes foram lavados por três vezes em água destilada e autoclavada, e inoculados em meio de cultura WPM, sem regulador de crescimento, acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com

temperatura média de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas e DFFFA de  $36\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ .

Aos 15 dias da inoculação, foram avaliados o número de explantes contaminados e a porcentagem de queimaduras ocasionadas pelos tratamentos e tipos de contaminação.

A regressão Logística foi utilizada com o propósito de modelar dados binários em função dos parâmetros representando as covariáveis. A avaliação da qualidade do ajuste do modelo foi feito mediante ao estudo das significâncias dos parâmetros e do valor da “deviance” (Balakrishnan, 1992).

Foi realizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5% para a porcentagem de queimadura dos segmentos nodais.

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si foi utilizado a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

#### **4.4 Estabelecimento de segmentos caulinares e explantes foliares em meio de cultivo acrescido com diferentes concentrações de Benlate**

Segmentos caulinares (1cm) e explantes foliares ( $3\text{cm}^2$ ) foram coletados, desinfestados em álcool etílico 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) por 5 minutos, e após foram lavados em condições assépticas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos caulinares de aproximadamente 1cm e explantes foliares com  $3\text{cm}^2$  foram inoculados em meio de cultivo WPM sem regulador de crescimento acrescido com 0, 100, 200, 400, 600, 800 e  $1000\text{mg L}^{-1}$  de Benlate, solidificado com  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar e com pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1,0 atm. Posteriormente, foram mantidos em sala de crescimento a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 16 h e DFFFA de  $36\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ .

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 10 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio. Após 15 dias, avaliou-se o número de explantes contaminados por fungos. Em função dos resultados foi realizada apenas uma análise descritiva nas respostas obtidas em função dos tratamentos utilizados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares

O modelo proposto foi o modelo logístico, dado pela equação (1). A interpretação deste modelo é feita por meio da probabilidade fornecida para a presença de contaminação, dada uma dosagem de hipoclorito de sódio e álcool etílico 70% conhecida.

$$\text{prob}(y = 1 | H, A) = \frac{e^{-0.880 - 0.0116H + 0.0188A - 0.00437HA}}{1 + e^{-0.880 - 0.0116H + 0.0188A - 0.00437HA}} \quad (1)$$

Esta análise teve por objetivo avaliar a contaminação para o explante foliar em função dos fatores hipoclorito de sódio (10, 15 e 20 minutos) e álcool (0, 15, 30 e 60 segundos). Os tratamentos foram dados pela combinação destes fatores, totalizando assim 12 tratamentos.

Na análise observou-se a presença ou não de contaminação, caracterizando uma resposta binária cuja codificação é: 1 = apresentou contaminação e 0 não apresentou contaminação.

A qualidade do ajuste do modelo é representada por meio da "Deviance", cuja probabilidade obtida foi de 0,827. Com base neste valor pode-se afirmar que o modelo ajustado é apropriado para os dados observados.

Em função da interpretação realizada por meio da probabilidade de

porcentagem de queimadura dos explantes foliares aumentou, chegando ao seu máximo quando se utilizou hipoclorito de sódio por 20 minutos combinado com álcool etílico 70% por 60 segundos (Tratamento 11).

Teixeira (2004) relata que, para o controle da contaminação no estabelecimento *in vitro*, além do álcool, o hipoclorito de sódio pode ser utilizado na concentração de 0,5% a 2% de cloro ativo, por um período de 5 a 20 minutos. Para explantes foliares de pequi, a utilização de hipoclorito de sódio a 2,5% por um período de 20 minutos foi prejudicial, ocasionando queimaduras nos explantes acima de 40% da área.

Vários autores utilizam o álcool etílico 70% em combinação com o hipoclorito de sódio, com sucesso, para a desinfestação de explantes. Santana (2003) utilizou álcool etílico 70% por 30 segundos combinado com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 15 minutos para desinfestar e estabelecer *in vitro* explantes foliares de *Annona cauliflora*, *Annona bahiensis* e *Annona glabra*. Cerqueira et al. (2002) utilizaram álcool etílico 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio comercial a 30% por 10 minutos para a obtenção de explantes foliares desinfestados de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.). Suzuki et al. (2002) utilizaram hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por um período de 10 minutos para desinfestar explantes foliares de líliacea ornamental (*Agapanthus praecox* ssp.) e Tsuru et al. (2000), para a indução de calos em explantes foliares de *Lavandula Vera*, utilizaram o álcool etílico 70% por 1 minuto e o hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 20 minutos para desinfestar os explantes.

Com base nos resultados observados neste experimento sugere-se que se utilize o álcool etílico (70%) por 60 segundos e em seguida hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 15 minutos para se desinfestar explantes foliares de pequi.

O aspecto visual dos explantes foliares de pequizeiro estabelecidos *in vitro* pode ser observado na Figura 1.

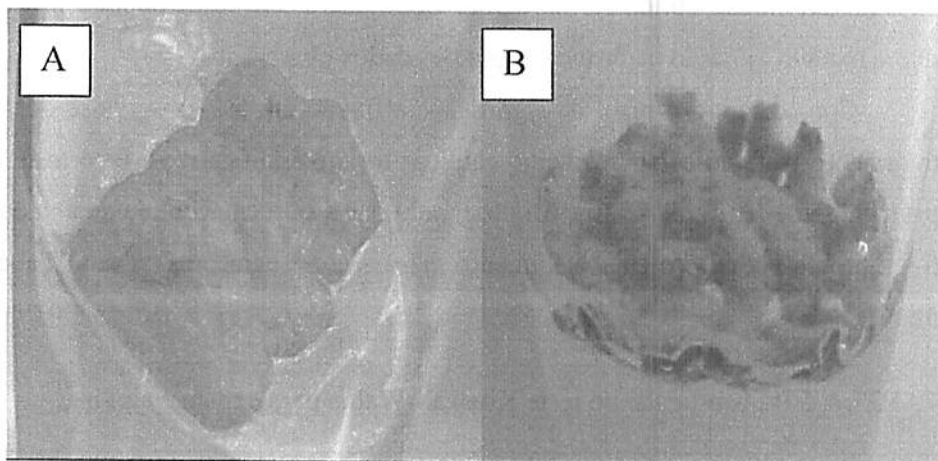


FIGURA 1 Explante foliar estabelecido *in vitro* sem contaminação (A) e contaminado por fungo (B). Lavras, UFLA, 2004.

## 5.2 Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares

Com o objetivo de se estudar a contaminação para o segmento caulinar em função do tratamento álcool etílico 70% + hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), avaliou-se os segmentos caulinares submetidos aos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos, de tal forma que se observou se o segmento nodal apresentou ou não contaminação, caracterizando uma resposta binária dada por 1 = apresentou contaminação e não apresentou contaminação.

Assim foi proposto o modelo logístico dado pela equação (2). A interpretação deste modelo é feita por meio da probabilidade fornecida para a presença de contaminação dado um tempo conhecido.

$$\text{prob}(y = 1 | T) = \frac{e^{0.3180 - 0.117T}}{1 + e^{0.3180 - 0.117T}} \quad (2)$$

A qualidade do ajuste do modelo é representada por meio da “Deviance”, cuja probabilidade obtida foi de 0,966. Com base neste valor pode-se afirmar que o modelo ajustado é apropriado para os dados observados.

Considerando o nível de significância fixado em 5%, observa-se que os tratamentos referentes ao segmento caulinar foram significativos. Pelo teste de probabilidade Kruskal-Wallis, foi observado que a porcentagem de queimadura foi significativa para o estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais (Tabela 5).

**TABELA 5** Probabilidade do teste Kruskal-Wallis para explante caulinar.

Variável	Prob. do teste Kruskal-Wallis
Segmento nodal	0,056

Observa-se na Tabela 6, que a utilização do hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) foi capaz de reduzir a porcentagem de contaminação.

**TABELA 6** Porcentagens de contaminação e de queimadura dos explantes em relação ao tratamento aplicado. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Porcentagem de contaminação (%)	Porcentagem de queimadura (%)
T0= sem hipoclorito de sódio	60	2
T1= hipoclorito de sódio 5 minutos	40	3
T2= hipoclorito de sódio 10 minutos	30	9
T3= hipoclorito de sódio 15 minutos.	20	60

Para uma melhor visualização dos resultados, construiu-se o gráfico box-plot baseado nos postos de observação, para comparar quais tratamentos diferem entre si (Figura 2). Foi observado que, com o aumento do tempo de exposição dos explantes ao hipoclorito de sódio, a porcentagem de queimadura tamb

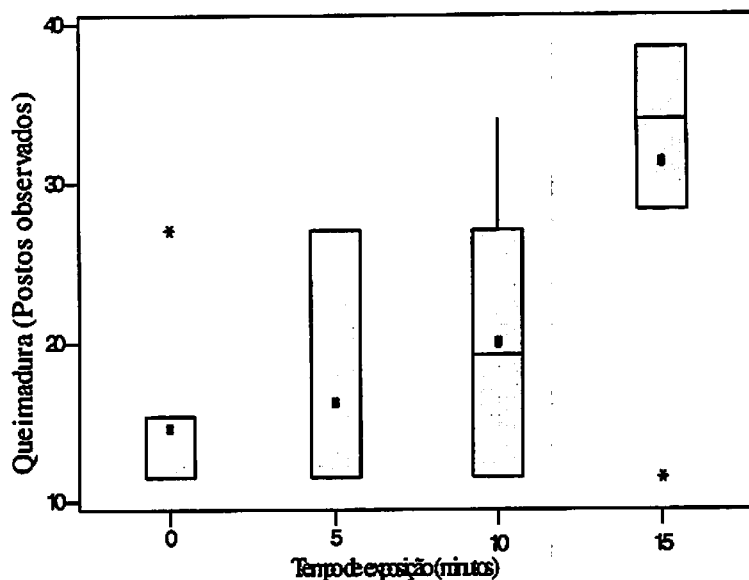


FIGURA 2 Box plot (postos de observação do teste Kruskal-Wallis) para a queimadura dos segmentos caulinares de pequiheiro em função do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo). Lavras, UFLA, 2004.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 3, pode-se observar que a utilização do hipoclorito de sódio (2,5%) ocasiona um aumento na porcentagem de queimadura nos explantes à medida que o tempo de exposição aumenta, atingindo o seu máximo ao se utilizar o hipoclorito de sódio por um período de 15 minutos. Os resultados apresentados evidenciam que os

tratamentos 5 e 10 foram similares. Entretanto, pode-se conferir que os tratamentos 0 e 15 diferem estatisticamente, em virtude de apresentarem médias discrepantes.

A análise estatística dos coeficientes estimados para o estudo da contaminação em segmentos nodais de pequiizeiro está apresentada na Tabela 7.

TABELA 7 Análise estatística das estimativas dos coeficientes ajustados para o modelo logístico proposto para estudo de contaminação em segmentos nodais.

Preditor	Coefficiente	Erro padrão	p-valor
Intercepto	0,318	0,5432	0,558
Tempos	-0,117	0,0638	0,065

Os resultados apresentados na Tabela 6, considerando um nível de significância fixado em 5%, evidenciam que as características avaliadas não foram significativas. Entretanto, estes resultados não se inviabilizam em função do alto valor da probabilidade apresentada pela “Deviance”.

De acordo com os dados apresentados anteriormente (Tabela 6), observa-se que a contaminação e queimadura dos explantes apresentaram um comportamento inversamente proporcional em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo).

Al-Bahrany (2002), em seu trabalho com *Citrus aurantifolia*, utilizou, para desinfestar os segmentos nodais, álcool etílico 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (20% de cloro ativo) por um período de 15 minutos. Para os segmentos caulinares do pequiizeiro, este tempo de exposição nesta concentração de cloro ativo é letal. Já Silva et al. (2003) utilizaram concentração e tempo semelhantes aos utilizados neste trabalho para desinfestar segmentos nodais de pessegueiro (*Prunus* sp.), realizando a desinfestação destes

com álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (1,25%) por 15 minutos.

O aspecto visual dos segmentos caulinares de pequiizeiro estabelecidos *in vitro* pode ser observado na Figura 3.

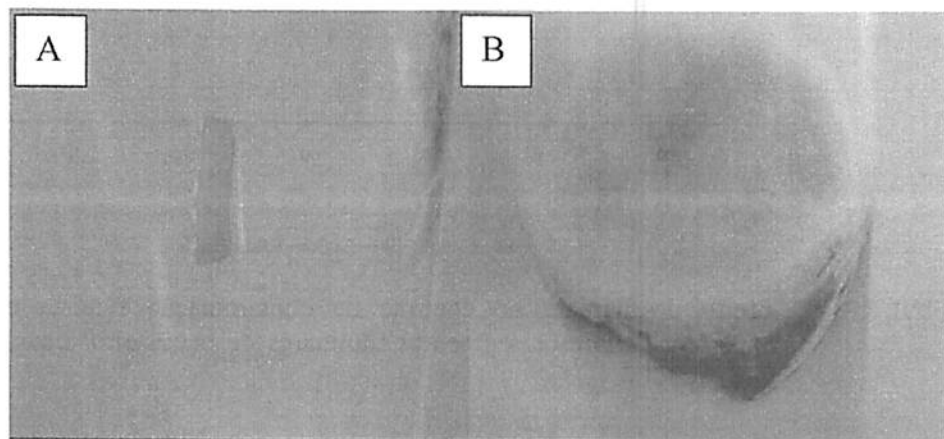
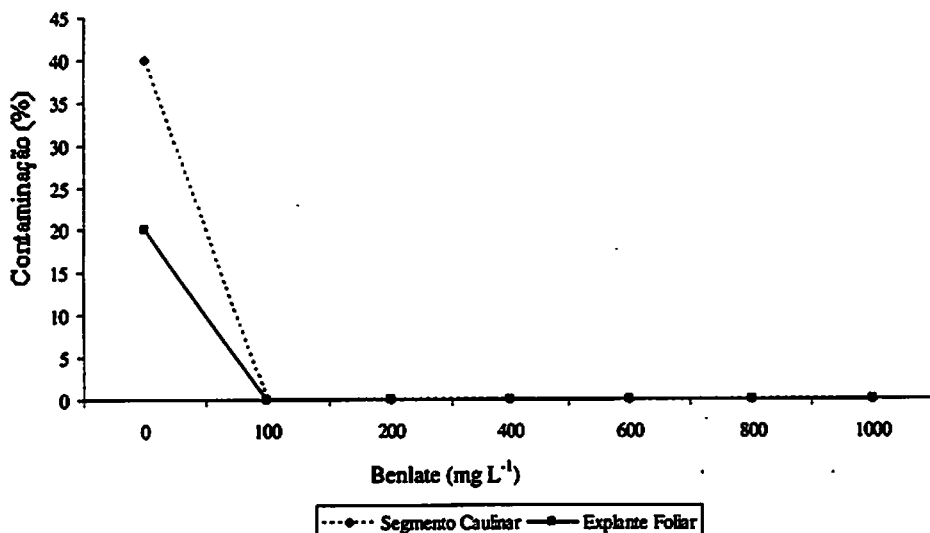


FIGURA 3 Segmento caulinar de pequiizeiro estabelecido *in vitro* sem contaminação (A) e contaminado por fungo (B). Lavras, UFLA, 2004.

### 5.3 Estabelecimento de segmentos caulinares e explantes foliares em meio de cultivo acrescido com diferentes concentrações de Benlate

Apenas o tratamento que não utilizou o Benlate no meio de cultivo apresentou contaminação por fungo, apresentando 40% de contaminação para segmentos caulinares e 20% de contaminação para os explantes foliares. Os demais tratamentos que utilizaram 100, 200, 400, 600, 800 e 1000mg L<sup>-1</sup> de Benlate no meio de cultivo foram eficientes no controle da contaminação por fungos tanto para segmentos nodais quanto para explantes foliares (Figura 4).



**FIGURA 4** Efeito do benlate no controle da contaminação fúngica em explantes foliares e segmentos caulinares de pequiheiro. Lavras, UFLA, 2004.

Estes resultados indicam que o Benlate foi eficiente no controle dos fungos nas concentrações utilizadas. Assim, para auxiliar no estabelecimento de explantes de pequiheiro *in vitro*, recomenda-se o uso de benlate na concentração de 100mg L<sup>-1</sup>, que apresentou o mesmo desempenho das demais concentrações. Sato et al. (2001) recomendam o uso do Benlate na concentração de 200mg L<sup>-1</sup> para controlar a contaminação no estabelecimento *in vitro* de juazeiro-de-bode (*Celtis* sp.).

A descontaminação tradicional dos explantes pode ser melhorada com a utilização de fungicidas. Os resultados obtidos neste trabalho com pequiheiro corroboram com os obtidos por Alves Júnior et al. (2003) com segmentos foliares de anonáceas, onde o uso do Benlate contribuiu para a redução significativa da contaminação fúngica.

## 6 CONCLUSÕES

A utilização de álcool etílico 70% em combinação em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) tem efeito sinérgico na desinfestação dos explantes.

Recomenda-se utilizar, para a desinfestação dos segmentos foliares, hipoclorito de sódio 2,5% nos tempo de 5 a 15 minutos para se obter uma menor porcentagem de queimadura dos explantes e uma desinfestação mais eficiente.

Recomenda-se utilizar, para a desinfestação dos segmentos caulinares, álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2,5% a um tempo de 10 minutos para se obter uma menor porcentagem de queimadura dos explantes e uma desinfestação mais eficiente.

O Benlate, nas concentrações acima de 100mg L<sup>-1</sup>, inibe o crescimento de fungos em explantes foliares e segmentos caulinares.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES JUNIOR, J.; SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; LEMOS, E. E. P. de; NICIOLI, P. M.; SANTOS, B. R. Uso de antibiótico e fungicida para controlar contaminações *in vitro* de segmentos foliares de *Annonaceae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. Anais... Belém, PA, 2003.

AL-BAHRANY, A. M. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 95, n. 4, p. 285-295, Nov. 2002.

BALAKRISHANAN, N. Handbook of the logidtic distribution. Statistics: Textbooks and monographs, New York, 1992, 602p.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. *Estatística Básica*. São Paulo Editora Atual, 1987.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Paraná: EMBRAPA, 1994. 640 p.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de Calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar/abr. 2002.

GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* in Central Brazil cerrado vegetation. *Journal of Tropical Ecology*, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 199-211, May 1993.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. *HortScience*, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.

MELO, J. T. **Fatores relacionados com a dormência da semente de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).** 1987. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae.** 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação *Cerne*, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001 .

SILVA, A. L.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *prunus* *Revista brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 297-300, ago. 2003.

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

SUSUKI, S.; OOTA, M.; NAKANO, M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *Orientalis* (Leighton) Leighton Histological study and response to selective agents. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 123-132, Aug. 2002.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. EMBRAPA - DF. Disponível em:  
<<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc.2001/simposios/s-joao%20batista%20teixeira./palestra%20joao%20batista%teixeira>>  
Acesso em: 17 out. 2004.

TRIOLA, M. F. **Introdução a Estatística**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

TSURO, M.; KODA, M.; INOUE, M Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 81-88, Sept. 2000.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONTROLE DA OXIDAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES E CAULINARES**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Controle da oxidação no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares e caulinares. In: **Micropropagação de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2004. p. 65 – 94. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A oxidação fenólica representa um dos mais sérios problemas durante a fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de espécies lenhosas. O escurecimento tem sido atribuído à liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante. O presente trabalho teve como objetivo o estudo de técnicas de controle da oxidação dos explantes de pequiizeiro durante o cultivo *in vitro*. Explantes foliares e caulinares foram lavados, durante 0, 15, 30, 45, 60 e 720 minutos, em água corrente, sendo inoculados em meios de cultivo WPM e MS. Os mesmos explantes foram inoculados em meio de cultivo WPM e MS, acrescidos de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com diferentes concentrações de ágar (0, 2, 4, 5 e 7g L<sup>-1</sup>). foram também inoculados em meio WPM acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6g L<sup>-1</sup> de ágar, diferentes concentrações de ácido cítrico (0, 50, 100, 200, 400 e 800mg L<sup>-1</sup>) e PVP (0, 50, 100, 200, 400 e 800mg L<sup>-1</sup>). A lavagem dos explantes em água corrente por um tempo de 720 minutos (12 horas) auxilia no controle da oxidação de explantes foliares. O tempo de lavagem não auxiliou no controle da oxidação em segmentos caulinares. Com o aumento da consistência do meio de cultivo ocorre o aumento da oxidação dos explantes e do meio de cultivo diminuindo a sobrevivência dos explantes. Em geral, o meio MS é mais propenso à oxidação do que o meio WPM, possivelmente, devido à maior concentração de sais de sua composição, ocasionando uma menor taxa de sobrevivência dos explantes. Bons resultados no controle da oxidação de explantes foliares e caulinares de pequiizeiro foram obtidos com a utilização de PVP nas concentrações de 400 e 800mg L<sup>-1</sup>.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis, Oxidation control of *in vitro* establishment of leaf and shoot explants In: Pequi tree Micropagation (*Caryocar brasiliense* Camb.) 2004. p. 65 – 94. (Doctorate in plant Physiology – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The phenolic oxidation is one of the main problems during the establishment *in vitro* of woody plants. The browning has been attributed to phenolic compounds oxidation that inhibit the explant growth. The present work aimed to study the techniques to control oxidation in explants of pequi tree during the cultivation *in vitro*. Leaf and shoot explants were washed during 0, 15, 30, 45, 60 and 720 minutes, in taping water, being inoculated in WPM and MS medium. The same explants were inoculated in WPM and MS medium, containing  $30\text{g L}^{-1}$  of sucrose and solidified with different concentrations of agar (0, 2, 4, 5 and  $7\text{g L}^{-1}$ ). There were also inoculated in WPM medium with  $30\text{g L}^{-1}$  of sucrose,  $6\text{g L}^{-1}$  of agar, different concentrations of citric acid (0, 50, 100, 200, 400 and  $800\text{mg L}^{-1}$ ). The explants were washed in taping water for 12h that decreased the oxidation in leaf explants. The washing time did not reduce the oxidation in shoot segments. Concomitantly with the increase in medium consistence occurred the augment in explants oxidation and in cultivation medium decreasing the explants survival. The MS medium showed more oxidation than WPM medium, possibly due a higher salt concentration in its composition, causing a lower explant survival rate. Some promising results in control of oxidation in leaf explants and shoot explants from pequi tree were obtained with the PVP utilization in the concentrations of 400 and  $800\text{mg L}^{-1}$ .

### 3 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos apresenta potencial para o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas de importância econômica e ecológica, como o pequizeiro. No entanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresentam problemas, tais como a oxidação (Sato et al., 2001).

Como exemplo, a oxidação do explante é considerado um dos aspectos mais sérios na cultura de tecidos de palmeiras. O escurecimento tem sido atribuído à liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante (Melo et al., 2001).

Uma das técnicas possíveis para reduzir esse problema inclui a lavagem, em água corrente, dos explantes coletados antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação de compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Os danos da oxidação fenólica podem também ser reduzidos pelo cultivo em meio líquido, no qual os produtos da oxidação se diluem e pela redução da concentração de ágar. E o carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas evitando a oxidação dos explantes. O PVP (polivinilpirrolidona) é capaz de adsorver os fenóis o que previne a oxidação. Uma solução de ácido cítrico e ácido ascórbico é comumente usada para lavar tecidos isolados visando reduzir a oxidação (Teixeira, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo de técnicas de controle da oxidação dos explantes de pequizeiro durante o cultivo *in vitro*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

Foram retirados ramos de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento localizadas no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos DFFFA de  $67\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Efetuuou-se, no Laboratório de Propagação de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal (DBI / UFLA), a separação das folhas e dos segmentos caulinares dos ramos, os quais foram utilizados como fonte de explante foliar ( $3\text{cm}^2$ ) e explante caulinar (1,0cm).

### **4.2 Efeito do tempo de lavagem na oxidação de explantes foliares e caulinares**

Os explantes foliares e caulinares foram acondicionados em recipiente plástico e lavados em água corrente durante 0, 15, 30, 45, 60 e 720 minutos. Após a lavagem em água corrente, os explantes foram inoculados nos meios de cultivo WPM (Wood Plant Médium; Loyd & McCow, 1980) e MS (Murashig & Skoog, 1962). O meio de cultivo foi acrescido com  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose, tendo seu pH ajustado para 5,8 e solidificado utilizando  $6\text{g L}^{-1}$  de ágar e autoclavado a uma temperatura de  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos a 1,0 atm. Cada tubo de ensaio (23 x 137mm) continha 10 mL dos meios de cultivo.

A inoculação dos explantes foi efetuada em câmara de fluxo laminar e, após, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e DFFFA de  $36\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos e 20 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio.

Após 15 dias de incubação, foi avaliada a porcentagem de oxidação dos explantes por meio da observação da área do explante oxidada. Também foi avaliada a aparência do meio de cultura em função do grau de oxidação determinado por meio de notas (Tabela 1).

**TABELA 1** Notas obtidas pela média de três avaliadores para a oxidação do meio de cultivo e da concentração de ágar. Lavras, UFLA, 2004.

Nota	Área oxidada (%)
0	Sem oxidação
1	Até 10%
2	De 10% a 20%
3	De 20% a 40%
4	De 40% a 60%
5	De 60% a 80%
6	Mais de 80%

Utilizou-se o teste de probabilidade Kruskal-Wallis para comparar as médias das respostas obtidas neste experimento, considerando significância de 5% (Triola, 1999).

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si, foi utilizada a construção de Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

### 4.3 Efeito da consistência do meio de cultivo na oxidação de explantes foliares e caulinares

Os explantes foliares e os segmentos caulinares, após a desinfestação com álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio por 10 minutos em câmara de fluxo laminar, foram lavados três vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, foram inoculados em meio de cultivo WPM e MS, acrescidos de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com diferentes concentrações de ágar (0, 2, 4, 5 e 7g L<sup>-1</sup>).

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado constando de 10 tratamentos (Tabela 2) e 20 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio.

TABELA 2 Tratamentos utilizados em função do tipo de meio de cultivo e da concentração de ágar. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Meio de cultivo	Concentração de ágar (g L <sup>-1</sup> )
T0	WPM	0
T1	WPM	2
T2	WPM	4
T3	WPM	6
T4	WPM	7
T5	MS	0
T6	MS	2
T7	MS	4
T8	MS	6
T9	MS	7

Foram avaliadas após 15 dias de incubação, a oxidação dos explantes, a oxidação do meio de cultivo e a porcentagem de sobrevivência dos explantes. Para a determinação do grau de oxidação dos explantes e do meio de cultivo, foi utilizado sistema de notas de acordo com a Tabela 1.

Com o propósito de modelar dados binários, foi utilizada a regressão Logística em função dos parâmetros representando as covariáveis (Balakrishnan, 1992).

Para se analisar dados não paramétricos foi realizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis, considerando significância de 5% (Triola, 1999).

#### 4.4 Efeito de antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares e caulinares

Explantes foliares e segmentos caulinares foram inoculados em meio WPM acrescido de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6g L<sup>-1</sup> de ágar, diferentes concentrações de ácido cítrico (0, 50, 100, 200, 400 e 800mg L<sup>-1</sup>) e Polivinilpirrolidona - PVP (0, 50, 100, 200, 400 e 800 mg L<sup>-1</sup>), num total de 11 tratamentos (Tabela 3) e 20 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio.

TABELA 3 Tratamentos utilizados em função do tipo dos antioxidantes adicionados ao meio de cultura. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Antioxidantes	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
T1	Controle	0
T2	Ácido cítrico	50
T3	Ácido cítrico	100
T4	Ácido cítrico	200
T5	Ácido cítrico	400
T6	Ácido cítrico	800
T7	PVP	50
T8	PVP	100
T9	PVP	200
T10	PVP	400
T11	PVP	800

Foram avaliadas após 15 dias de incubação, a porcentagem de oxidação dos explantes, a oxidação do meio de cultivo e a sobrevivência dos explantes.

Utilizou-se o teste de probabilidade Kruskal-Wallis para comparar as médias das respostas obtidas neste experimento, considerando significância de 5% (Triola, 1999).

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si, foi utilizada a construção de Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do tempo de lavagem na oxidação de explantes foliares e caulinares

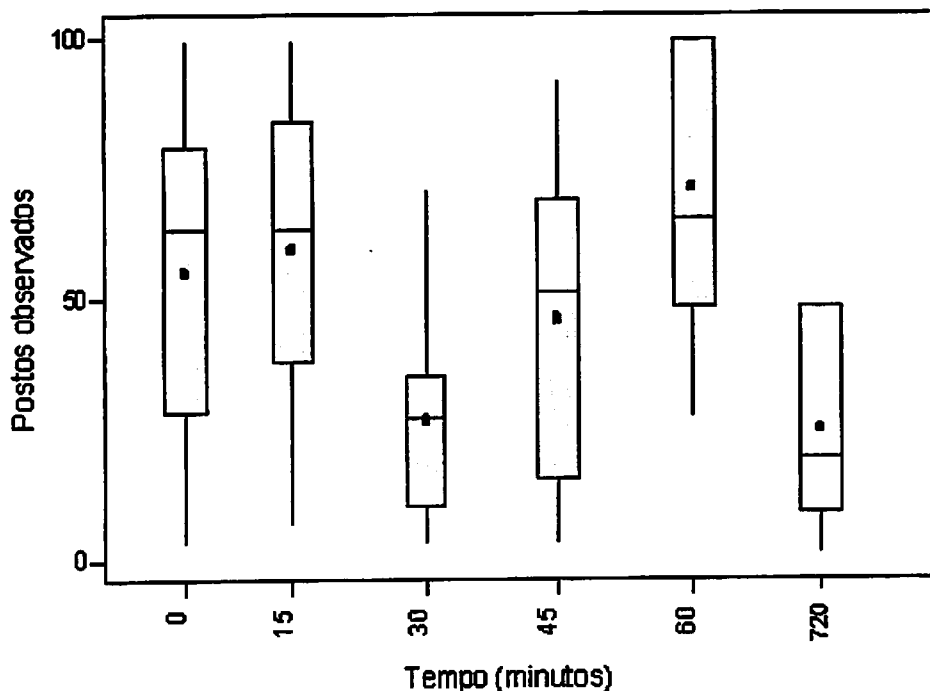
O resultado apresentado por meio do teste Kruskal-Wallis refere-se à oxidação observada nos explantes foliares e segmentos caulinares em função do tempo de lavagem e posterior inoculação nos meios de cultivo WPM e MS.

TABELA 4 Probabilidades do teste Kruskal-Wallis para a oxidação dos explantes foliares e segmentos caulinares submetidos a diferentes tempos de lavagem. Lavras, UFLA, 2004.

	WPM	MS
Explante foliar	0,000	0,103
Segmentos caulinares	0,381	0,090

Considerando o nível de significância fixado em 5%, os resultados apresentados na Tabela 5 evidenciam que apenas para os explantes foliares inoculados no meio de cultivo WPM, houve respostas significativas em relação ao tempo de lavagem influenciando a oxidação dos explantes. Em decorrência deste resultado realizou-se a montagem do gráfico box-plot para a oxidação em

função do tempo de lavagem dos explantes foliares inoculados no meio WPM (Figura 1).



**FIGURA 1** Box-plot para a oxidação dos explantes foliares inoculados em meio WPM em função do tempo de lavagem. Lavras, UFLA, 2004.

Os explantes foliares que foram lavados em água corrente por 720 minutos e inoculados em meio de cultivo WPM apresentaram o menor índice de oxidação (10,17%). Este resultado pode ter ocorrido em função da lixiviação dos compostos fenólicos exsudados pelo explante. No entanto, os explantes lavados por 30 minutos apresentaram um índice de oxidação (11,75%) estatisticamente semelhante aos lavados por 720 minutos (Tabela 5). Grattapaglia & Machado (1998) corroboram estes resultados quando afirmam que a lavagem dos

explantes em água corrente auxilia na diminuição da oxidação, principalmente para espécies lenhosas.

Observa-se que a oxidação do meio de cultivo WPM foi menor nos tratamentos em que os explantes foram lavados por 30, 45 e 720 minutos, obtendo as notas 1,79, 1,69 e 1,83, respectivamente (Tabela 6).

**TABELA 5** Oxidação dos explantes foliares submetidos a diferentes tempos de lavagem e inoculados em meio WPM e MS, e análise da oxidação do meio de cultivo em função da área oxidada. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento		Oxidação do explante (%)	Oxidação do meio de cultivo (Nota)
Meio de cultivo	Tempo de lavagem (minutos)		
WPM	0	41,25	2,35
WPM	15	45,2	2,57
WPM	30	11,75	1,79
WPM	45	28,75	1,69
WPM	60	56,71	2,59
WPM	720	10,17	1,83
MS	0	100	3,7
MS	15	89,19	3,25
MS	30	100	4,21
MS	45	85,74	3,16
MS	60	99,65	3,8
MS	720	99,07	3,93

Para os explantes foliares que foram inoculados no meio de cultivo MS, após os tratamentos de lavagem em água corrente, não houve diferença estatística para a porcentagem de oxidação dos explantes e do meio de cultivo. Estes explantes apresentaram alta porcentagem de oxidação em todos os tempos de lavagem e o meio de cultivo MS também apresentou alto índice de oxidação (Tabela 5).

Ao analisar o comportamento isolado dos meios de cultivo WPM e MS, observou-se que o meio MS ocasionou maior oxidação dos explantes foliares (95,05%) em relação ao meio de cultivo WPM (37,19%) uma porcentagem de oxidação quase três vezes maior (Tabela 6). Em relação à oxidação do meio de cultivo, o meio MS também se apresentou mais oxidado em comparação ao meio WPM (nota de oxidação de 3,65 e 2,24, respectivamente).

**TABELA 6** Estatística descritiva (média) da porcentagem de oxidação de explantes foliares e análise da oxidação do meio de cultivo em função dos meios de cultivo. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Oxidação do explante (%)	Oxidação do meio de cultivo (Nota)
WPM	37,19	2,24
MS	95,05	3,65

Importante observar que se optou por uma análise descritiva em função da inviabilidade em aplicar um procedimento inferência, que se em suposições, dentre elas destacam-se a normalidade e homogeneidade de variâncias.

A maior concentração de sais na composição do meio MS (o dobro da concentração de sais encontrada no meio WPM) favoreceu uma maior oxidação dos explantes. Este resultado corrobora Teixeira (2004), quando comenta que o acúmulo de polifenóis pode se dar devido a uma inadequação do meio nutritivo. Segundo o mesmo autor, o cultivo em meios salinos diluídos é mais apropriado ao cultivo de explante, resultando em menor síntese e oxidação fenólica.

Na Tabela 7 constam as médias da oxidação dos explantes e do meio de cultivo para o efeito isolado do tempo de lavagem. Menor porcentagem de oxidação (54,98%) foi obtida lavando-se os explantes foliares durante 720 minutos em água corrente. Na ausência de lavagem (tempo 0), 70,63% dos explantes apresentaram oxidação. Em relação à oxidação do meio de cultivo,

observou-se que a lavagem durante 45 e 720 minutos proporcionou menores índices de oxidação (2,46 e 2,88, respectivamente).

O aumento no tempo de lavagem dos explantes foliares propiciou redução de oxidação, possivelmente devido à lixiviação de substâncias fenólicas exsudadas pelo explante.

**TABELA 7 Média da porcentagem de oxidação dos explantes foliares e análise da oxidação do meio de cultivo em função dos tempos de lavagem. Lavras, UFLA, 2004.**

Tempo (minutos)	Oxidação do explante (%)	Oxidação do meio de cultivo (Nota)
0	70,63	3,03
15	67,2	2,91
30	55,88	3
45	57,25	2,46
60	77,89	3,2
720	54,98	2,88

Para os segmentos caulinares não houve diferença entre o tipo de meio utilizado e o tempo de lavagem. Apenas a lavagem dos explantes não é suficiente para reduzir a oxidação dos segmentos caulinares. Na Tabela 8 são apresentadas a porcentagem de oxidação dos explantes caulinares e a análise da oxidação do meio de cultivo em função do tempo de lavagem e do meio de cultivo utilizado.

**TABELA 8** Oxidação dos segmentos caulinares submetidos a diferentes tempos de lavagem e inoculados em meio WPM e MS e análise da oxidação do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento		Oxidação do explante (%)	Oxidação do meio de cultivo (Nota)
Meio de cultivo	Tempo de lavagem (minutos)		
WPM	0	86,17	2,67
WPM	15	93,91	3,09
WPM	30	96,29	2,29
WPM	45	93,78	3,11
WPM	60	96,67	2,22
WPM	720	80,23	2,85
MS	0	100	3
MS	15	100	3,5
MS	30	78,5	3
MS	45	93,55	2,82
MS	60	95	2,91
MS	720	98,46	3,92

A lavagem do material vegetal não diminuiu a oxidação dos explantes caulinares, os quais apresentaram altas porcentagens de oxidação em todos o tratamentos estudados. Sato et al. (2001), ao realizarem estudos com *Celtis* sp., observaram que a lavagem dos segmentos caulinares não alterou a resposta de oxidação dos explantes. Grattapaglia & Machado (1998) recomendam utilizar a lavagem de explantes para auxiliar no controle da oxidação, principalmente para espécies lenhosas. Deschamps & Pinto (1993) relatam que, em algumas espécies, o tempo de lavagem não influencia na intensidade da oxidação.

Segundo Sato et al. (2001), em explantes caulinares que apresentam facilidade para liberar fenóis, a oxidação ocorrerá independente do tempo de lavagem.

## 5.2 Efeito da consistência do meio de cultivo na oxidação dos explantes foliares e caulinares

A análise dos dados de oxidação dos explantes foliares ajustou-se ao modelo logístico dado pela equação (1). A interpretação deste modelo é feita por meio da probabilidade fornecida para o explante vivo dada uma concentração de ágar no meio de cultura.

$$\text{prob}(y = s | C) = \frac{e^{4,096 - 0,8164C}}{1 + e^{4,096 - 0,8164C}} \quad (1)$$

A qualidade do ajuste do modelo é representada por meio da “Deviance”, cuja probabilidade obtida foi de 0,697. Com base neste valor pode-se afirmar que o modelo ajustado é apropriado para os dados observados.

O modelo proposto para a oxidação dos explantes foliares inoculados em meio MS com diferentes concentrações de ágar foi o logístico, dado pela equação (2). A interpretação deste modelo é feita por meio da probabilidade fornecida para o explante vivo dada a uma consistência do meio de cultura.

$$\text{prob}(y = s | C) = \frac{e^{1,547 - 1,363C}}{1 + e^{1,547 - 1,363C}} \quad (2)$$

A qualidade do ajuste do modelo é representada por meio da “Deviance”, cuja probabilidade obtida foi de 0,816. Com base neste valor pode-se afirmar que o modelo ajustado é apropriado para os dados observados.

O modelo logístico foi proposto para os dados de oxidação dos segmentos caulinares em função da consistência do meio de cultivo WPM, dado pela equação (3). A interpretação deste modelo foi feita por meio da probabilidade de se obter segmentos caulinares vivos em função dos tratamentos utilizados.

$$\text{prob}(y = s | C) = \frac{e^{1.910 - 0.1824C}}{1 + e^{1.910 - 0.1824C}} \quad (3)$$

A qualidade do ajuste do modelo é representada por meio da “Deviance”, cuja probabilidade obtida foi de 0,316. Com base neste valor pode-se afirmar que o modelo ajustado é apropriado para os dados obtidos.

Para a análise estatística dos resultados de oxidação em função da consistência do meio de cultura MS foi proposto o modelo logístico dado pela equação (4). A interpretação deste modelo foi feita por meio da probabilidade de se encontrar segmentos caulinares vivos em uma determinada consistência.

$$\text{prob}(y = s | C) = \frac{e^{8.708 - 1.362C}}{1 + e^{8.708 - 1.362C}} \quad (4)$$

A qualidade do ajuste do modelo é representada por meio da “Deviance”, cuja probabilidade obtida foi de 0,760. Com base neste valor pode-se afirmar que o modelo ajustado é apropriado para os resultados obtidos.

A interpretação dos resultados referentes ao estudo do efeito da consistência do meio de cultivo na oxidação dos explantes foliares foi feita por meio da probabilidade fornecida para os explantes vivos em função dos tratamentos utilizados. A análise estatística dos coeficientes estimados para os resultados obtidos para as consistências do meio de cultivo WPM é demonstrada na Tabela 9 e para o meio de cultivo MS na Tabela 10.

**TABELA 9** Análise estatística das estimativas dos coeficientes ajustados para o modelo logístico referente aos explantes foliares inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de ágar. Lavras, UFLA, 2004.

Preditor	Coeficiente	Erro padrão	p-valor
Intercepto	4,096	0,9238	0,000
Consistência	-0,8164	0,1764	0,000

**TABELA 10** Análise estatística das estimativas dos coeficientes ajustados para o modelo logístico referente aos explantes foliares inoculados em meio MS com diferentes concentrações de ágar. Lavras, UFLA, 2004.

Preditor	Coeficiente	Erro padrão	p-valor
Intercepto	1,547	0,645	0,016
Consistência	-1,363	0,3589	0,000

Para se analisar os resultados referentes à oxidação dos explantes foliares e do meio de cultivo, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis (KW), descrito na Tabela 11.

**TABELA 11** Probabilidades do teste Kruskal-Wallis para oxidação do explante foliar e do meio cultivo. Lavras, UFLA, 2004.

Meio	Oxidação	p-valor
WPM	Explante	0,000
	Meio	0,000
MS	Explante	0,000
	Meio	0,000

Os resultados referentes à oxidação do meio de cultivo e dos explantes foliares em função dos tratamentos utilizados foram significativos (Tabela 11).

A porcentagem de sobrevivência dos explantes foliares diminuiu com o aumento da consistência dos meios de cultivo WPM e MS, sendo uma maior sobrevivência observada no meio de cultivo WPM (Figura 2). Uma redução mais acentuada na porcentagem de sobrevivência é observada quando os explantes são inoculados no meio de cultivo MS, onde concentrações de ágar superiores a  $4\text{ g L}^{-1}$  causaram a morte dos explantes.

Concentração elevada de ágar apresentou uma menor oxidação quando se utilizou o meio de cultivo WPM.

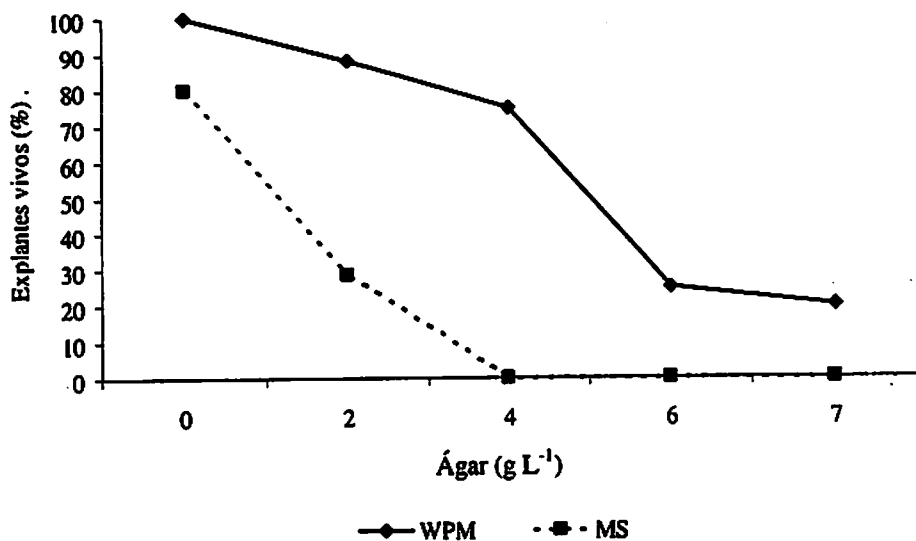


FIGURA 2 Porcentagem de sobrevivência obtida do modelo logístico ajustado para os explantes foliares de pequiheiro em função do meio de cultivo e sua consistência. Lavras, UFLA, 2004.

A maior sobrevivência dos explantes foliares (100%) foi obtida com o cultivo destes em meio WPM líquido. Máxima sobrevivência (80%) em meio MS também foi obtida na ausência de ágar.

Em relação à oxidação do explante, quanto maior a concentração de ágar no meio de cultivo maior foi a ocorrência de oxidação nos explantes foliares (Tabela 12). Observa-se também que a menor ocorrência de oxidação foi obtida

por meio da inoculação dos explantes em meio WPM líquido (índice de oxidação de 1,93). Para o meio de cultivo MS, o menor índice de oxidação dos explantes foliares (2,40) foi observado quando não houve o acréscimo de ágar ao meio de cultivo.

A maior oxidação dos explantes foliares (5,60) foi observada ao se inocular os explantes em meio de cultivo WPM solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar, resultado semelhante ao observado em explantes inoculados em meio MS acrescido com 7g L<sup>-1</sup> de ágar (5,50) (Tabela 12).

Objetivando fazer uma análise exploratória em relação ao índice de oxidação procedeu-se a estimação das médias de cada tratamento conforme é demonstrado na Tabela 12.

**TABELA 12** Resultados referentes à oxidação dos explante foliares, oxidação do meio de cultivo e porcentagem de sobrevivência. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Oxidação do explante	Oxidação do meio de cultivo	Porcentagem de explantes vivos
T0 = WPM	1,93	1,80	100
T1 = WPM + 2 g L <sup>-1</sup> de ágar	2,82	2,88	88,24
T2 = WPM + 4 g L <sup>-1</sup> de ágar	2,06	3,00	75
T3 = WPM + 6 g L <sup>-1</sup> de ágar	5,19	4,06	25
T4 = WPM + 7 g L <sup>-1</sup> de ágar	5,60	4,87	20
T5 = MS	2,40	2,13	80
T6 = MS + 2 g L <sup>-1</sup> de ágar	3,46	3,07	28,57
T7 = MS + 4 g L <sup>-1</sup> de ágar	4,94	4,75	0
T8 = MS + 6 g L <sup>-1</sup> de ágar	5,38	5,06	0
T9 = MS + 7 g L <sup>-1</sup> de ágar	5,50	5,57	0

O menor índice de oxidação do meio de cultivo foi obtido utilizando-se o meio de cultivo WPM na ausência de ágar (1,80). Para o meio MS, o menor índice de oxidação também foi obtido na ausência de ágar (2,13).

O meio de cultivo MS apresentou-se mais oxidado ao ser solidificado com  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar (índice de oxidação de 5,57), em comparação ao meio WPM (4,87) (Tabela 12).

Quanto maior a concentração de ágar no meio de cultivo menor foi a difusão dos compostos fenólicos, apresentando assim maior oxidação do meio e do explante.

Ao se analisar o efeito isolado dos meios de cultivo WPM e MS (Tabela 13) sobre o estabelecimento de explantes foliares observa-se que o meio MS apresenta maior oxidação, com índices de oxidação de 4,34 (explantes) e 4,12 (meio de cultivo) e menor sobrevivência dos explantes (21,71%), possivelmente devido à maior concentração de sais em sua composição em relação ao meio WPM (48% da concentração do MS). Segundo Caldas et al. (1998), a redução da concentração de sais do meio de cultivo tem sido uma das formas de controlar a oxidação em plantas lenhosas, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

**TABELA 13** Média geral dos resultados obtidos para o efeito isolado dos meios de cultivo WPM e MS no estabelecimento de explantes foliares. Lavras, UFLA , 2004.

Meio de cultivo	Oxidação do explante	Oxidação do meio de cultivo	Explantes vivos (%)
WPM	3,52	3,32	61,64
MS	4,34	4,12	21,71

A oxidação do explante foliar foi progressiva com o aumento da consistência do meio de cultura, de um índice de oxidação de 2,16 em meio líquido para 5,55 em meio solidificado com  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar (Tabela 14). Resultados semelhantes foram observados para a oxidação do meio de cultivo, que apresentou um índice de oxidação de 1,96 na ausência de ágar e de 5,22 ao se acrescentar  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar. Estes resultados estão em consonância com

Teixeira (2004), quando relata que o ágar parece contribuir para uma maior oxidação dos explantes e esta oxidação está associada à concentração de ágar utilizado no meio de cultivo.

**TABELA 14** Média geral dos resultados obtidos para o efeito isolado da consistência dos meios de cultivo no estabelecimento de explantes foliares. Lavras, UFLA, 2004.

Ágar (g L <sup>-1</sup> )	Oxidação do explante	Oxidação do meio de cultivo	Explantos vivos (%)
0	2,16	1,96	90
2	3,14	2,97	58,40
4	3,5	3,87	37,50
6	5,28	4,56	12,5
7	5,55	5,22	10

A interpretação dos resultados referentes ao estudo do efeito da consistência do meio de cultivo na oxidação dos segmentos caulinares foi feita por meio da probabilidade fornecida para os explantes vivos em função dos tratamentos utilizados. A análise estatística dos coeficientes estimados para os resultados obtidos para as consistências do meio de cultivo WPM é demonstrada na Tabela 15 e para o meio de cultivo MS, na Tabela 16.

**TABELA 15** Análise estatística dos resultados de oxidação referentes aos segmentos caulinares inoculados em meio WPM com diferentes consistências. Lavras, UFLA, 2004.

Preditor	Coefficiente	Erro padrão	p-valor
Intercepto	01,910	0,5912	0,000
Consistência	-0,1824	0,1130	0,106

A consistência do meio de cultivo teve baixa contribuição ao modelo proposto, no entanto, em virtude do modelo estar bem ajustado, este foi

considerado adequado para estimar a probabilidade dos segmentos caulinares vivos (Tabela 16).

**TABELA 16** Análise estatística dos resultados de oxidação referentes aos segmentos caulinares inoculados em meio MS com diferentes consistências. Lavras, UFLA, 2004.

Preditor	Coeficiente	Erro padrão	p-valor
Intercepto	8,708	3,166	0,006
Consistência	-01,362	0,4975	0,006

O efeito da consistência do meio de cultura MS apresentou uma importante contribuição ao estudo proposto (Tabela 16).

Para se analisar os resultados referentes à oxidação dos segmentos caulinares e do meio de cultivo utilizou-se o teste Kruskal-Wallis (KW) (Tabela 17).

**TABELA 17** Probabilidades do teste Kruskal-Wallis para a oxidação dos segmentos caulinares e do meio cultivo. Lavras, UFLA, 2004.

Meio	Oxidação	p-valor
WPM	Explante	0,082
	Meio	0,292
MS	Explante	0,000
	Meio	0,134

A oxidação para os segmentos caulinares e para o meio de cultivo em função das consistências do meio foi significativa apenas para os segmentos caulinares inoculados em meio de cultivo MS (Tabela 17).

Os segmentos caulinares inoculados em meio WPM sofreram pouca variação na porcentagem de sobrevivência, observando-se pouca influência da consistência do meio de cultivo sobre a oxidação (Figura 3). O índice de

sobrevivência dos explantes variou de 92,86% em meio WPM líquido para 70%, em meio de cultivo acrescido com 7g L<sup>-1</sup> de ágar.

Para o meio de cultivo MS foi observou-se 100% de sobrevivência até a concentração de 4mg L<sup>-1</sup> de ágar, com decréscimo em concentrações superiores, chegando a 35,71% em meio de cultivo acrescido com 7g L<sup>-1</sup> de ágar (Figura 3). Estes resultados corroboram os de Teixeira (2004), que recomenda a redução da concentração de ágar para 0,4%, a fim de reduzir a oxidação e seus efeitos.

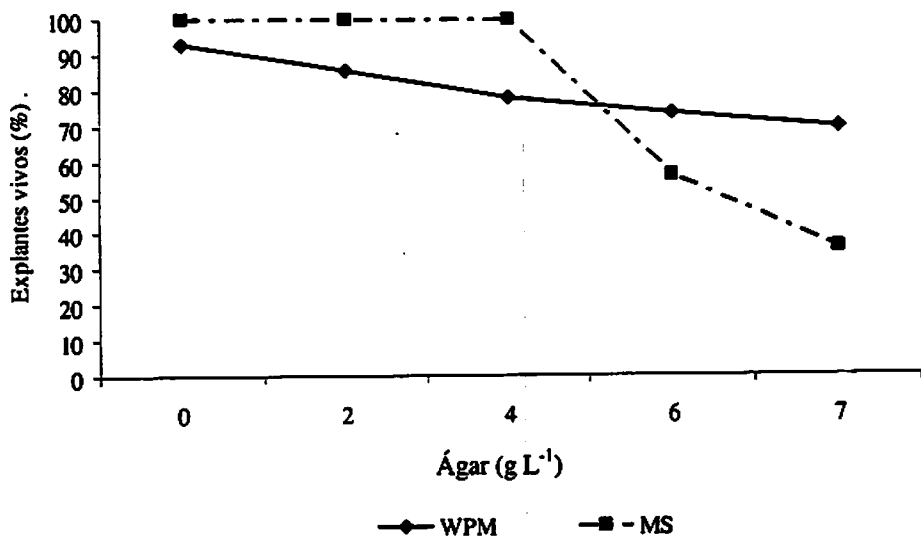


FIGURA 3 Sobrevivência dos segmentos nodais em função do meio de cultivo e sua consistência. Lavras, UFLA, 2004.

A menor oxidação dos segmentos caulinares foi obtida ao se inocular os explantes em meio de cultivo MS sem a suplementação com ágar (índice de oxidação de 1,73). Entretanto, a maior oxidação dos explantes (4,71) também foi observada no meio de cultivo MS, quando este foi acrescido com 7g L<sup>-1</sup> (Tabela 18).

A variação da consistência no meio de cultivo WPM, aparentemente, não influenciou na oxidação dos segmentos caulinares, apresentando resultados não

significativos (índice de oxidação para o meio sem acréscimo de ágar de 3,43 e 3,22 para o meio acrescido de 7g L<sup>-1</sup>) (Tabela 18).

Objetivando fazer uma análise exploratória em relação ao índice de oxidação procedeu-se a estimação das médias de cada tratamento conforme é demonstrado na Tabela 18.

**TABELA 18** Resultados referentes à oxidação dos segmentos caulinares, oxidação do meio de cultivo e porcentagem de explantes vivos. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Oxidação do explante	Oxidação do meio de cultivo	Explantes vivos (%)
T0 = WPM	3,43	2,79	92,86
T1 = WPM + 2 g L <sup>-1</sup> de ágar	2,86	3,07	85,71
T2 = WPM + 4 g L <sup>-1</sup> de ágar	4,50	3,00	78
T3 = WPM + 6 g L <sup>-1</sup> de ágar	3,82	2,41	74
T4 = WPM + 7 g L <sup>-1</sup> de ágar	3,22	2,83	70
T5 = MS	1,73	2,13	100
T6 = MS + 2 g L <sup>-1</sup> de ágar	2,07	2,29	100
T7 = MS + 4 g L <sup>-1</sup> de ágar	2,88	3,00	100
T8 = MS + 6 g L <sup>-1</sup> de ágar	3,94	3,63	56,25
T9 = MS + 7 g L <sup>-1</sup> de ágar	4,71	3,57	35,71

Em relação à oxidação dos meios de cultivo inoculados com segmentos caulinares e solidificados com diferentes concentrações de ágar observou-se que o meio MS apresentou o menor índice de oxidação ao permanecer em estado líquido (2,79) e o maior índice de oxidação (3,79) foi observado quando este foi solidificado com 7g L<sup>-1</sup> (3,79) (Tabela 18).

O meio WPM apresentou pouca variação em sua oxidação (apresentando um índice de oxidação de 2,79 na ausência de ágar e 2,83 quando foram acrescentados 7g L<sup>-1</sup> de ágar ao meio) (Tabela 18). Estes resultados sugerem que o gradiente de consistência ao qual o meio de cultivo WPM foi submetido pouco influenciou na oxidação.

O efeito isolado do meio de cultivo sobre a oxidação dos segmentos caulinares demonstrou que a maior oxidação dos explantes foi obtida em meio WPM (índice de 3,56) em comparação ao meio MS (índice de 3,07). Apesar destes resultados, respostas contrárias foram observadas para a oxidação do meio de cultivo, em que o meio WPM apresentou menor índice (2,82) em relação ao meio MS (2,12). Em relação à sobrevivência dos explantes caulinares, o meio WPM apresentou 80,11% de explantes vivos, e o meio MS, 78,39% (Tabela, 19).

**TABELA 19** Média geral dos resultados obtidos para o efeito isolado dos meios de cultivo WPM e MS no estabelecimento de segmentos caulinares. Lavras, UFLA , 2004.

Meio de cultivo	Oxidação do explante	Oxidação do meio de cultivo	Explantes vivos (%)
WPM	3,56	2,82	80,11
MS	3,07	3,12	78,39

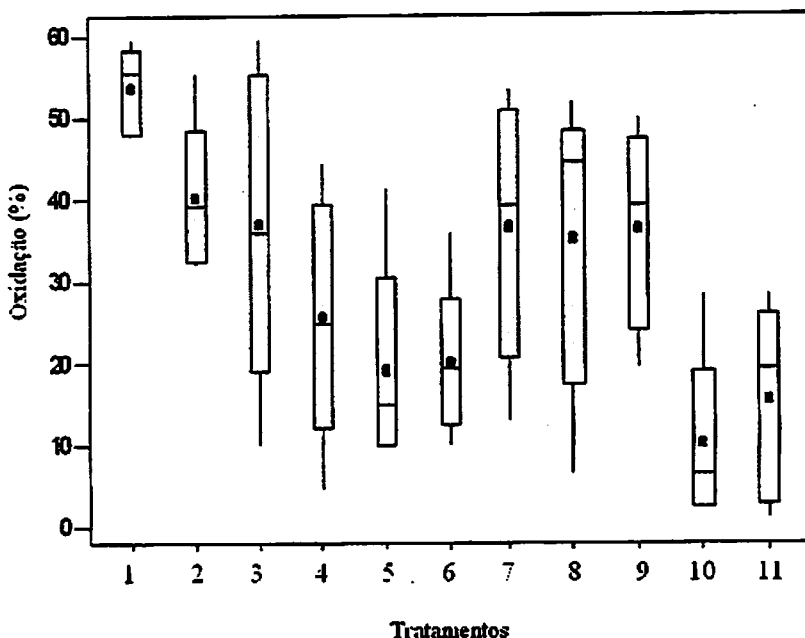
Ao se analisar o efeito isolado das concentrações de ágar utilizadas para solidificar os meios de cultivo, observa-se que os melhores resultados foram obtidos na ausência de ágar, o que proporcionou maior taxa de sobrevivência dos segmentos caulinares (96,43%) e menores índices de oxidação do explante e do meio de cultura (2,58 e 2,46, respectivamente) (Tabela 20).

**TABELA 20** Média geral dos resultados obtidos para o efeito isolado da consistência dos meios de cultivo no estabelecimento de segmentos caulinares. Lavras, UFLA , 2004.

Ágar (g L <sup>-1</sup> )	Oxidação do explante	Oxidação do meio de cultivo	Explantos vivos
0	2,58	2,46	96,43
2	2,46	2,68	92,85
4	3,69	3,00	89,00
6	3,88	3,02	65,12
7	3,95	3,20	45,98

### **5.3 Efeito de antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares e caulinares**

Com o objetivo de comparar o efeito da utilização dos antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) e ácido cítrico no controle da oxidação dos explantes foliares, realizou-se o teste Kruskal-Wallis. Por meio da probabilidade fornecida pelo teste (0,003), verificou-se que pelo menos um tratamento difere dos demais (Figura 4).



**FIGURA 4** Oxidação dos explantes foliares em função dos tratamentos utilizados, onde: T1= controle, T2 = ácido cítrico (Ac.) 50mg L<sup>-1</sup>, T3 = Ac. 100mg L<sup>-1</sup>, T4 = Ac. 200mg L<sup>-1</sup>, T5 = Ac. 400mg L<sup>-1</sup>, T6 = Ac. 800mg L<sup>-1</sup>, T7 = PVP 50mg L<sup>-1</sup>, T8 = PVP 100mg L<sup>-1</sup>, T9 = PVP 200mg L<sup>-1</sup>, T10 = PVP 400mg L<sup>-1</sup>, T11 = PVP 800mg L<sup>-1</sup>. Lavras, UFLA, 2004.

Com o aumento da concentração dos dois antioxidantes, a porcentagem de oxidação dos explantes foliares diminuiu. O uso de 800mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico promoveu uma oxidação de 16%, o que não diferiu estatisticamente do uso de 400mg L<sup>-1</sup>, que resultou em 17,6% de oxidação (Figura 4).

No entanto, o melhor resultado foi obtido com o uso de PVP nas concentrações de 400mg L<sup>-1</sup> e 800mg L<sup>-1</sup>, os quais respectivamente, apresentaram 10,2% e 12,2% de oxidação dos explantes foliares (Figura 4). Melo et al. (2001), em seus estudos com guarirôbeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.], observaram resultados contrários ao deste trabalho, relatando que o PVP foi pouco eficiente no controle da oxidação.

A avaliação do efeito dos antioxidantes no estabelecimento dos segmentos caulinares por meio do teste Kruskal-Wallis (KW) demonstrou que pelo menos um dos tratamentos diferiu dos demais, porque foi verificado por meio da significância apresentada pelo teste KW (0,001), a 5% de significância. Para uma melhor compreensão, montou-se o gráfico box-plot apresentado na Figura 5.

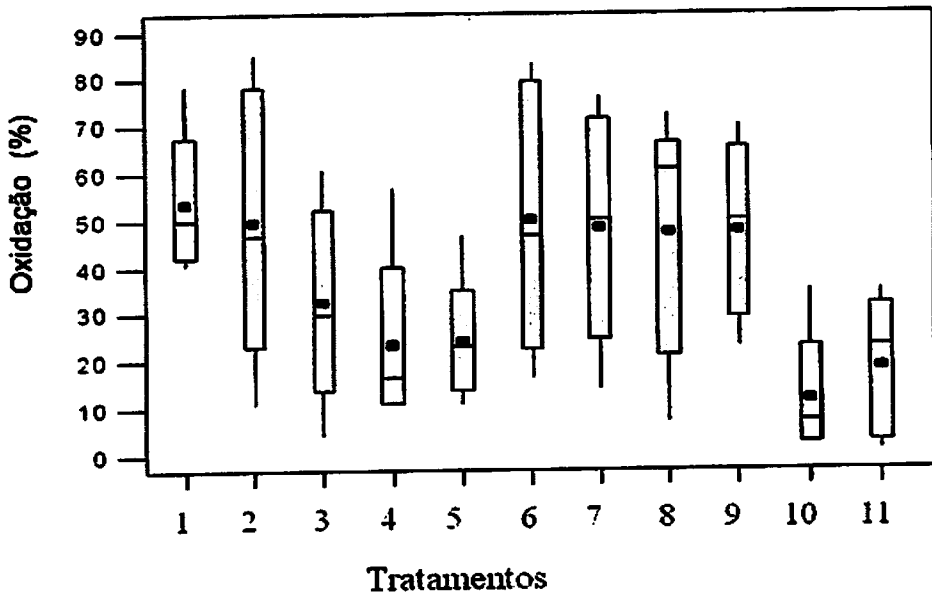


FIGURA 5 Oxidação dos segmentos caulinares em função dos tratamentos utilizados, Onde: T1= controle, T2 = ácido cítrico (Ac.) 50mg L<sup>-1</sup>, T3 = Ac. 100mg L<sup>-1</sup>, T4 = Ac. 200mg L<sup>-1</sup>, T5 = Ac. 400mg L<sup>-1</sup>, T6 = Ac. 800mg L<sup>-1</sup>, T7 = PVP 50mg L<sup>-1</sup>, T8 = PVP 100mg L<sup>-1</sup>, T9 = PVP 200mg L<sup>-1</sup>, T10 = PVP 400mg L<sup>-1</sup>, T11 = PVP 800mg L<sup>-1</sup>. Lavras, UFLA, 2004.

Observou-se uma redução da oxidação com o aumento das concentrações dos antioxidantes, comportamento este também observado para os segmentos caulinares (Figura 5).

Na ausência de antioxidante no meio de cultivo, observou-se 80% de oxidação (Tratamento 1). Maior controle da oxidação em explantes caulinares de pequiheiro foi obtido com o uso de 400 e 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, que promoveu um índice de oxidação de aproximadamente 10% (Figura 5).

De acordo com os resultados deste trabalho, o PVP demonstrou ser melhor no controle da oxidação de explantes foliares e segmentos caulinares de pequiheiro. Este resultado concorda com Teixeira (2004), este autor relata que o PVP é uma poliamida capaz de adsorver os fenóis por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica (quinonas).

## 6 CONCLUSÕES

A lavagem dos explantes em água corrente por um tempo de 720 minutos (12 horas) auxiliou no controle da oxidação de explantes foliares, possivelmente pela lixiviação dos compostos fenólicos.

O aumento da consistência do meio de cultivo ocasionou o aumento da oxidação dos explantes e do meio de cultivo.

O meio de cultivo MS foi mais propenso à oxidação fenólica do que o meio WPM, quando inoculados com explantes foliares e caulinares.

A utilização de 400 e 800mg L<sup>-1</sup> de PVP foi mais eficiente no controle da oxidação de explantes foliares e caulinares de pequiheiro estabelecidos *in vitro*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. São Paulo Editora Atual, 1987.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132.

DECHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. Controle de oxidação e contaminação para o estabelecimento *in vitro* de brotações de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell.) In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA ESAL, 1993, Lavras.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-169.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXTO, J. R.; JULIATTI, C. F. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura de *in vitro* de embriões da guarirobeira. [*Syagus oleraceae* (Mart.) Becc. ]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1306, nov./dez. 2001.

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

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. EMBRAPA - DF. Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc.2001/simposios/s-/joao%20batista%20teixeira./palestra%20joao%20batista%20teixeira>>. Acesso em: 17 out. 2004.

TRIOLA, M. F. **Introdução a Estatística**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

**CAPÍTULO V**

**INDUÇÃO DE CALOS *IN VITRO* EM EXPLANTES FOLIARES**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Indução de calos *in vitro* em explantes foliares. In: **Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 95 - 116. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O pequiheiro apresenta uma baixa regeneração natural, sendo sua germinação irregular e lenta. Estas limitações podem inviabilizar tanto a produção racional de mudas como sua utilização silvicultural. O cultivo *in vitro* do pequiheiro é uma ferramenta importante que pode auxiliar sua propagação de forma eficaz. No cultivo *in vitro*, um dos métodos que possibilitam a propagação em massa de uma determinada espécie é o cultivo de calos, que pode também ser utilizado para a produção de metabólitos secundários e para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética. Este trabalho teve como objetivo estudar a indução de calos do pequiheiro em explantes *in vitro*. Foram utilizados como explantes folhas jovens retiradas de plantas matrizes. As folhas permaneceram em água corrente por 12 horas, sendo levadas em seguida para a câmara de fluxo laminar, onde foram desinfestadas utilizando-se álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo por 10 minutos e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes. As folhas permaneceram em água destilada até o momento da inoculação, sendo seccionadas em fragmentos. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio meio de cultura WPM, suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes combinações de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Estudou-se o efeito de diferentes combinações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 4,0mg L<sup>-1</sup>) + ANA (0; 0,5; 1,0; 2,0 4,0mg L<sup>-1</sup>) e de 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 2,0 4,0mg L<sup>-1</sup>) + TDZ (0; 0,5; 1,0; 2,0 4,0mg L<sup>-1</sup>), na indução de calogênese em explantes foliares. Observou-se também o efeito de três combinações de reguladores de crescimento já utilizadas para a indução de calos em explantes foliares de pequiheiro 1,0mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 2,0mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0mg L<sup>-1</sup> de ANA. Os meios de cultivo foram solidificados com 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A inoculação de explantes retirados de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento em meio WPM acrescido com 1mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi mais eficiente para a obtenção de calos, proporcionando a obtenção de uma porcentagem de 90,27% de formação de calos e 0,86g de matéria fresca.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. *In vitro* callus induction on leaf explants. In: **Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 95 - 116. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The pequi presents a low natural regeneration, and its germination is slow and irregular. These limitations may become enviable both the rational production of seedlings and its silvicultural utilization. The *in vitro* cultivation of the pequi tree is an important tool that can aid its propagation in a efficient way. In the *in vitro* cultivation, one of the methods which enables the mass propagation of a particular species is callus cultivation, which may be also utilized for the production of secondary metabolites and for the development of a system of genetic transformation. These work objectived to study the *in vitro* induction of the pequi tree's callus induction. Young leaves taken from the donor plants were utilized as explants. The leaves remained in taping water for 12 hours, they being taken, next, to the laminar flush chamber, where they were disinfected by utilizing 70% ethylic alcohol for one minute and commercial 2.5% sodium hypochlorite of active chorine for 10 minutes and washed in sterilized water distilled for three times. The leaves remained in distilled water up to the moment of inoculation, they being sectioned into fragments. The explants were inoculated in test tubes, WPM culture medium, supplemented with 30g L<sup>-1</sup> of sucrose, 7g L<sup>-1</sup> of agar and different combinations of growth regulators. pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. The effect of different combinations BAP (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0mg L<sup>-1</sup>) + ANA (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0mg L<sup>-1</sup>) and of 2.4-D (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0mg L<sup>-1</sup>) + TDZ (0; 0.5; 1.0; 2.0 4.0mg L<sup>-1</sup>), in callus induction on leaf explants. Also the effect of three combinations of growth regulators already utilized for induction of calluses on leaf explants of pequi tree 1.0mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 2.0mg L<sup>-1</sup> de 2.4-D; 1.0mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1.0mg L<sup>-1</sup> de 2.4-D and 0.5mg L<sup>-1</sup> of BAP + 1.0mg L<sup>-1</sup> of ANA was investigated. The cultivation media were solidified with 7g L<sup>-1</sup> of agar. The pH of the cultivation medium was adjusted to 5.8 before autoclaving. The inoculation of explants taken from donor plants were kept in growth room WPM medium containing of 1mg L<sup>-1</sup> of TDZ + 2mg L<sup>-1</sup> of 2.4-D, that was the most efficient for callus obtaining, giving the percentage of 90.27% of callus formation and 0.86g of fresh matter.

### 3 INTRODUÇÃO

Uma espécie nativa do cerrado brasileiro de grande interesse para a utilização como produtora de frutos e para os programas de auxílio à renda familiar é o pequizeiro (*Caryocar brasiliense*). Esta espécie se sobressai entre várias outras do cerrado pela produção de frutos oleaginosos muito apreciados pela população do cerrado (Melo, 1987).

O pequizeiro não apresenta regeneração natural em escala significativa, sendo sua germinação irregular e lenta. Estas limitações podem inviabilizar tanto a produção racional de mudas como sua utilização silvicultural (Melo, 1987).

O cultivo *in vitro* do pequizeiro é uma ferramenta importante que pode auxiliar sua propagação de forma eficaz. No cultivo *in vitro*, um dos métodos que possibilitam a propagação em massa de uma determinada espécie é o cultivo de calos, que pode também ser utilizado para a produção de metabólitos secundários e para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética.

Calos são definidos como tecidos que podem apresentar diferenciação parcial, os quais são constituídos por uma massa de células irregulares que se multiplicam desordenadamente em resposta a injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciarem em tecidos e órgãos (Torres & Caldas 1990).

Vários fatores podem influenciar a formação de calos em uma espécie, sendo os principais o tipo de explante, a composição do meio de cultura e as condições de luz e temperatura (Santana, 2003).

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e, geralmente, dependendo da concentração, causam alongação celular e expansão ou divisão celular. Em geral, com o uso de baixas concentrações de auxinas, predomina a formação de raízes adventícias, enquanto que altas concentrações induzem a formação de calos. A interação entre auxinas

e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese (Gomes, 1999).

Este trabalho teve como objetivo estudar a indução de calos *in vitro* em explantes de pequiizeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Efeito das combinações BAP + ANA e 2,4-D + TDZ na calogênese em explantes foliares

Foram utilizados como explantes folhas jovens retiradas de plantas matrizes de 3 anos de idade mantidas em sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de aproximadamente  $67\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , localizada no setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As folhas permaneceram em água corrente por 12 horas, sendo levadas em seguida para a câmara de fluxo laminar onde foram desinfestadas utilizando-se álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio comercial a 2,5% de cloro ativo por 10 minutos e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes. As folhas permaneceram em água destilada até o momento da inoculação, sendo seccionadas em fragmentos de aproximadamente  $3\text{cm}^2$ .

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15 ml do meio de cultura Wood Plant Medium - WPM (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar, e diferentes combinações de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que foi efetuada a  $121^\circ\text{C}$ , pressão de 1,0 atm e por um período de 20 minutos.

Estudou-se o efeito de diferentes combinações entre BAP + ANA (Tabela 1) e de 2,4-D + TDZ (Tabela 2), na indução de calogênese em explantes foliares.

TABELA 1 Tratamentos utilizados para a indução de calos em explantes foliares de pequiheiro em função da combinação de BAP + ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )
T0	0,0	0,0
T1	0,0	0,5
T2	0,0	1,0
T3	0,0	2,0
T4	0,0	4,0
T5	0,5	0,0
T6	0,5	0,5
T7	0,5	1,0
T8	0,5	2,0
T9	0,5	4,0
T10	1,0	0,0
T11	1,0	0,5
T12	1,0	1,0
T13	1,0	2,0
T14	1,0	4,0
T15	2,0	0,0
T16	2,0	0,5
T17	2,0	1,0
T18	2,0	2,0
T19	2,0	4,0
T20	4,0	0,0
T21	4,0	0,5
T22	4,0	1,0
T23	4,0	2,0
T24	4,0	4,0

**TABELA 2** Tratamentos utilizados para indução de calos em explantes foliares de pequiheiro em função da combinação de 2,4-D + TDZ. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	TDZ (mg L <sup>-1</sup> )
T0	0,0	0,0
T1	0,0	0,5
T2	0,0	1,0
T3	0,0	2,0
T4	0,0	4,0
T5	0,5	0,0
T6	0,5	0,5
T7	0,5	1,0
T8	0,5	2,0
T9	0,5	4,0
T10	01,0	0,0
T11	01,0	0,5
T12	01,0	1,0
T13	01,0	2,0
T14	01,0	4,0
T15	2,0	0,0
T16	2,0	0,5
T17	2,0	1,0
T18	2,0	2,0
T19	2,0	4,0
T20	4,0	0,0
T21	4,0	0,5
T22	4,0	1,0
T23	4,0	2,0
T24	4,0	4,0

Os experimentos foram montados em delineamento experimental inteiramente casualizado com 25 tratamentos e 20 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio. Ao final de 30 dias, foi realizada avaliação visual, que consistiu em observar a ocorrência de calos e calos friáveis.

Para a análise dos dados foi feito o intervalo de confiança de 95% para a diferença de duas proporções (Triola, 1999).

## **4.2 Influência de três combinações de reguladores de crescimento na indução de calos *in vitro***

Foram utilizados como explantes segmentos foliares de aproximadamente 3cm<sup>2</sup> retirados de folhas excisadas de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento sob DFFFA de média de 67µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e de brotações obtidas por cultivo *in vitro*.

Antes da retirada dos explantes, as folhas provenientes das plantas matrizes permaneceram em água corrente por 12 h. Na sequência, foram levadas para câmara de fluxo laminar onde foi realizada a desinfestação destas utilizando álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio comercial (2,5%) por 10 minutos, tendo os explantes sido lavados por três vezes em água destilada autoclavada.

Os explantes foliares provenientes das plantas matrizes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio WPM, acrescido com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e três combinações de reguladores de crescimento já utilizadas para indução de calos em explantes foliares de pequi: 1,0mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 2,0mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (resultado obtido em experimentos anteriores); 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (Dombroski, 1997) e 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0mg L<sup>-1</sup> de ANA (Landa, 2000). Os meios de cultivo foram solidificados com 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos sob DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes frias, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25±1°C.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 tratamentos (três combinações de reguladores de

**TABELA 5** Distribuição da frequência de formação de calos. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	Sim	Não	Totais
BAP * ANA	39	211	250
2,4D * TDZ	75	175	250
Total	114	386	500

**TABELA 6** Distribuição da frequência de formação de calos friáveis. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	Sim	Não	Totais
BAP * ANA	128	122	250
2,4D * TDZ	153	97	250
Total	281	219	500

Por meio das frequências mostradas nas Tabela 5 e 6, comparou-se a proporção das respostas obtidas em relação à formação total de calos e de calos friáveis, se relacionado os tratamentos. Para a realização desta análise estimou-se um intervalo de confiança para cada tratamento. Ao se comparar cada intervalo, verificou-se que ambas as proporções não estavam sobrepostas, portanto, concluiu-se que os tratamentos diferem significativamente, os resultados são apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Ao observar a interação dos reguladores de crescimento BAP + ANA e TDZ + 2,4-D foi possível induzir calos em explantes foliares de pequi, sendo os resultados diferentes entre si significativamente a 5% de probabilidade, tanto para a formação total de calos quanto para a formação de calos friáveis (Tabelas 7 e 8).

**TABELA 7** Proporção da formação de calos mediante a utilização das combinações de TDZ + 2,4-D e BAP + ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	Sim
BAP * ANA	0,455 a
2,4D * TDZ	0,544 b

**TABELA 8** Proporção da formação de calos friáveis mediante a utilização das combinações de TDZ + 2,4-D e BAP + ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	Sim
BAP * ANA	0,342 a
2,4D * TDZ	0,657 b

Observa-se que a ausência dos reguladores de crescimento não promoveu a formação de calos (Figura 1). Pode-se observar também que a ausência de auxinas foi prejudicial para a formação dos calos, sendo o aumento de sua concentração favorável à formação de calos. Gomes (1999) relata que as auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e que a interação entre auxinas e citocininas também tem sido amplamente utilizada. Santana (2003) relata que o sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*.

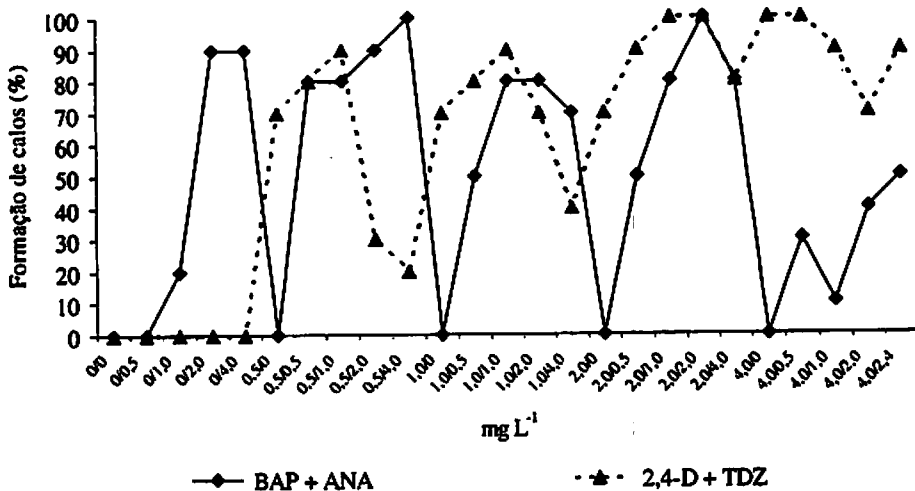


FIGURA 1 Gráfico descritivo da porcentagem de calos formados em função da combinação dos reguladores de crescimento BAP + ANA e 2,4-D + TDZ. Lavras, UFLA, 2004.

Os resultados referentes à utilização da combinação de BAP + ANA demonstram que a maior formação de calos (100%) foi obtida ao inocular os explantes foliares em meio WPM acrescido com 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2mg L<sup>-1</sup> de ANA. Nos tratamentos ausentes de ANA, não foi observada a formação de calos, a qual aumentou gradativamente com o aumento da concentração de ANA (Figura 1). O resultado encontrado neste trabalho concorda com Landa (2002) que, ao estudar a calogênese em pequizeiro obteve resultados positivos com a utilização de 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0mg L<sup>-1</sup> de ANA, o que caracteriza uma relação alta entre auxina / citocinina.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por Cerqueira et al. (2002), que obteve 100% de formação de calos em explantes foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando 2mg L<sup>-1</sup> de BAP combinado com 2mg L<sup>-1</sup> de ANA.

O aumento da concentração de BAP, no entanto, foi prejudicial para a formação de calos (Figura 1). Segundo Nogueira (2003), este comportamento possivelmente se deve ao efeito da citocinina encontrada no meio de cultura (BAP) aliada ao conteúdo endógeno do explante foliar proporcionar um aumento na concentração deste regulador em relação ao conteúdo de auxinas, ocasionando uma diminuição na ocorrência de calos.

Com relação à combinação entre 2,4-D + TDZ os melhores resultados para a indução de calos foram obtidos com a utilização de 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1mg L<sup>-1</sup> de TDZ; 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2mg L<sup>-1</sup> de TDZ; 4mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,5mg L<sup>-1</sup> de TDZ, os quais proporcionaram 100% de formação de calos. Também para a utilização da combinação 2,4-D + TDZ, uma maior relação entre auxina / citocinina foi mais eficiente para a indução de calos (Figura 1). Nogueira (2003) comenta que o 2,4-D é a auxina mais frequentemente utilizada na indução de calos e que, em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), esse regulador apresentou efeito positivo na indução de calos em explantes foliares. No entanto, para este mesmo autor, a interação entre o 2,4-D e TDZ não potencializou a calogênese em explantes foliares de murici-pequeno, o que é antagônico aos resultados encontrados nesse trabalho.

Ao se comparar à influência da combinação dos reguladores de crescimento BAP + ANA e 2,4-D + TDZ na indução de calos em explantes foliares de pequiheiro, observou-se que a utilização de 2,4-D + TDZ foi mais eficiente (média de 61,2% de formação de calos) em relação ao uso de BAP + ANA (média de 50,8% de formação de calos).

Maior formação de calos friáveis (70%) pela combinação de BAP + ANA foi obtida utilizando-se as combinações 1mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2mg L<sup>-1</sup> de ANA (Figura 2). No entanto, 100% de calos friáveis foi obtido ao se utilizar a combinação de 2,4-D + TDZ nas

concentrações de 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

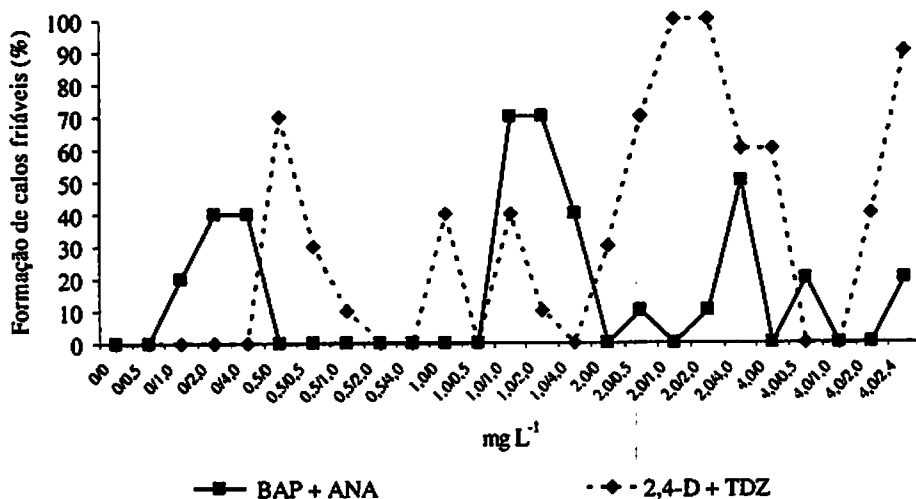


FIGURA 2 Gráfico descritivo da porcentagem de calos friáveis formados em função da combinação dos reguladores de crescimento BAP + ANA e 2,4-D + TDZ. Lavras, UFLA, 2004.

O efeito das diferentes combinações de 2,4-D + TDZ na formação de calos friáveis foi maior (média geral de 30%), em comparação com a utilização das combinações de BAP + ANA, as quais proporcionaram uma obtenção de 15,6% de calos friáveis.

## 5.2 Influência de três combinações de reguladores de crescimento na indução de calos *in vitro*

Os resultados referentes à porcentagem de indução de calos e do peso da matéria fresca dos calos obtidos em função das três combinações de reguladores de crescimento são apresentados nas Figuras 3 e 4.

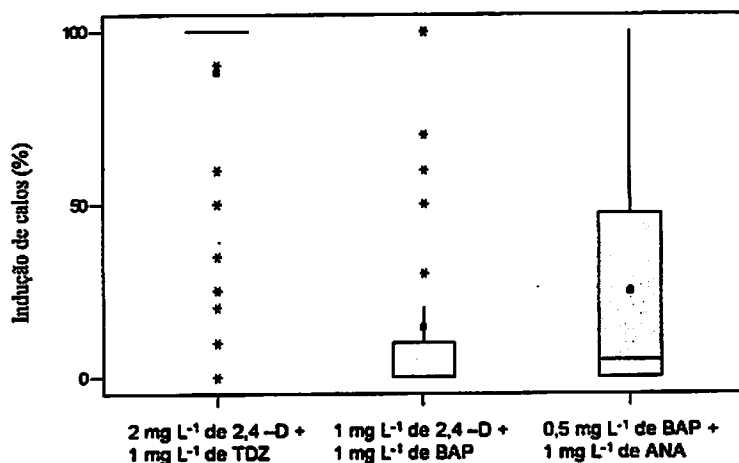


FIGURA 3 Box-plot para a porcentagem de calos formados em função dos tratamentos utilizados. Lavras, UFLA, 2004.

Maior porcentagem de formação de calos (Figura 3) e o maior peso da matéria fresca (Figura 4) foram obtidos por meio da inoculação dos explantes em meio de cultivo WPM acrescido com  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ. Ao estudar a calogênese em explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla* King), Albarrán et al. (1997) também obtiveram melhores resultados ao utilizar a combinação entre 2,4-D + TDZ, apesar de ser em concentrações superiores ( $10\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D e  $0,2\text{mg L}^{-1}$  de TDZ).

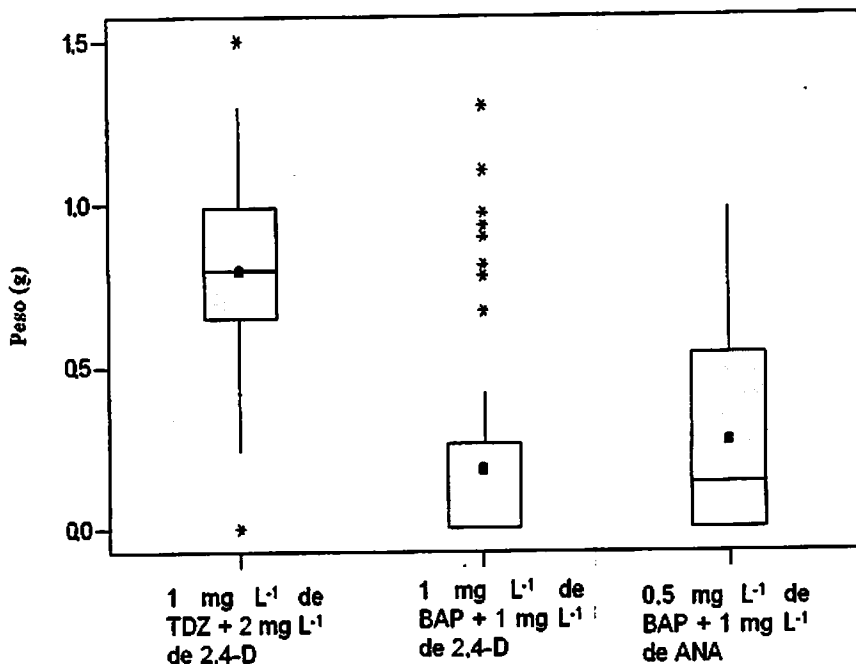


FIGURA 4 Box-plot para o peso da matéria fresca dos calos formados em função dos tratamentos utilizados. Lavras, UFLA, 2004.

A utilização de 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1mg L<sup>-1</sup> de TDZ propiciou uma porcentagem de formação de calos de 88,26%, significativamente maior do que os tratamentos que utilizaram 1mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1mg L<sup>-1</sup> de ANA, os quais obtiveram uma porcentagem de formação de calos de 14,20% e 22,51%, respectivamente (Figura 3). Esses resultados evidenciam o potencial de indução de calos da combinação 2,4-D + TDZ em relação ao BAP + ANA.

Embora o uso de BAP + ANA tenha proporcionado uma porcentagem de formação de calos de 22,51%, Landa (2000) reporta ter obtido 67% de formação de calos em explantes foliares nas mesmas concentrações. É possível que esta diferença possa ser atribuída à época em que os experimentos foram produzidos,

à fonte de explante utilizada, à origem e à idade do material vegetal utilizado, entre outros fatores.

A utilização da combinação de  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ formou calos com peso médio de matéria fresca de 0,808g. As demais combinações apresentaram resultados inferiores, respectivamente 0,165g e 0,248g para quando se utilizou  $1\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA (Figura 4).

### 5.3 Influência do tipo de explante na indução de calogênese em explantes foliares

A Tabela 9 apresenta a análise de variância dada pelo teste F, para a obtenção do peso da matéria fresca no tratamento em que o meio de cultivo WPM foi acrescido com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D e inoculado com explantes foliares provenientes do ambiente *ex vitro* e do cultivo *in vitro*.

TABELA 9 Análise de variância para peso da matéria fresca dos calos obtidos pela a utilização de  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ em meio de cultivo WPM inoculado com explantes de origem *ex vitro* e *in vitro*. Lavras, UFLA, 2004.

FV.	GL.	QM.	F	P-valor
Trat.	1	0,3379	4,79	0,032
Erro	62	0,0705		
Total	63			

Ao se analisar a variável porcentagem de formação de calos para a utilização de  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D variando-se o tipo de explante (*in vitro* e *ex vitro*), concluiu-se, por meio do teste Kruskal-Wallis ( $p=0,000$ ), que os tratamentos diferem entre si.

Em meio WPM acrescido com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D a utilização de explantes foliares provenientes de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento proporcionou 90,27% de formação de calos e o peso da matéria fresca de 0,86g. Estes resultados foram superiores aos encontrados com a utilização de explantes retirados de brotações desenvolvidas *in vitro*, os quais apresentaram 86,25% de formação de calos e 0,756g de peso da matéria fresca.

O aspecto visual do calo desenvolvido a partir de explante foliar proveniente do ambiente *ex vitro* inoculado em meio WPM suplementado com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D pode ser observado na Figura 5.

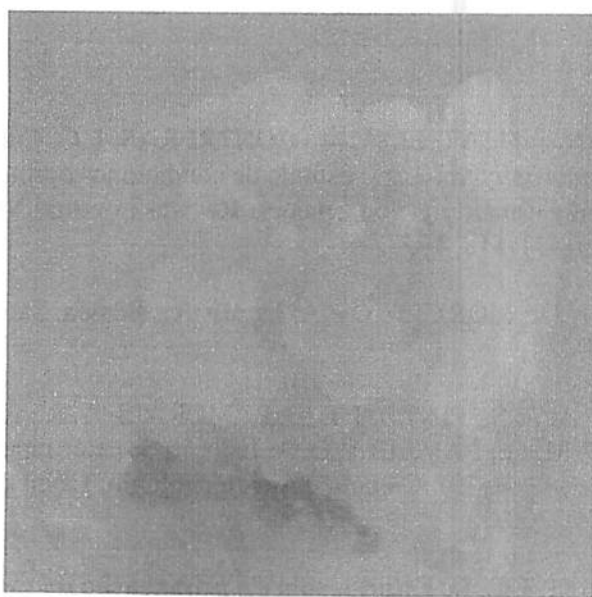


FIGURA 5 Aspecto visual do calo desenvolvido meio WPM suplementado com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D. Lavras, UFLA, 2004.

## 6 CONCLUSÕES

É possível induzir calos em explantes foliares de pequiheiro por meio da utilização de combinações de  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D.

A inoculação de explantes retirados de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento em meio WPM acrescido com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ +  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D foi mais eficiente para a obtenção de calos, proporcionando a obtenção de uma porcentagem de 90,27% de formação de calos e 0,86g de matéria fresca.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRÁN, J. G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I. G. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King. : estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. *Revista Forestal Venezolana*, Merida, v. 41, n. 2, p. 111-118, 1997

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. *Estatística Básica*. São Paulo Editora Atual, 1987.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva de touro (*Tridax procumbens* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar./abr. 2002.

DOMBROSKI, J. L. D. *Estudos sobre a propagação do pequiheiro (Caryocar brasiliense Camb.)*. 1997. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

LANDA, F. de S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; BUENO FILHO, J. S. de S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 24, p. 56-63, dez. 2002. (Edição Especial).

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. *HortScience, Alexandria*, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.

MELO, J. T. Fatores relacionados com a dormência da semente de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 1987. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

NOGUEIRA, R. C. Propagação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonimia intermedia* A. Juss). 2003. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTANA, J. R. F. Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *annonaceae*. 2003. p. 237. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.

TRIOLA, M. F. *Introdução a Estatística*. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

**CAPÍTULO VI**

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOS EM ANTERAS**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Indução *in vitro* de calos em anteras. In: **Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 117 - 158. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A cultura de tecidos vem sendo amplamente utilizada como alternativa para a propagação de plantas que apresentam dificuldades em sua reprodução natural. Apesar da grande produção de frutos, as sementes de pequizeiro apresentam dificuldades de germinação, o que torna a cultura *in vitro* uma alternativa importante a ser considerada para o auxílio na propagação do pequizeiro. Este trabalho teve como objetivo induzir a formação de calos em anteras de pequizeiro, auxiliando futuros estudos de melhoramento e propagação desta espécie. Avaliou-se o efeito da posição da inoculação e do carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de anteras de pequizeiro, utilizando-se meio WPM acrescido de diferentes concentrações de carvão ativado (0, 1, 2 e 4 g L<sup>-1</sup>), sendo as anteras inoculadas na superfície do meio de cultivo e sob esta. Avaliou-se também, o efeito dos antioxidantes carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP) e ácido cítrico sobre as anteras inoculadas em meio WPM. O estudo da indução de calos em anteras foi realizado com a inoculação destas em WPM acrescido de diferentes concentrações de cinetina (0, 1, 2 e 4mg L<sup>-1</sup>), BAP e 2,4-D (0, 1, 2 e 4mg L<sup>-1</sup>) e dos antioxidantes carvão ativado (4g L<sup>-1</sup>); PVP e ácido cítrico na concentração de 400mg L<sup>-1</sup>. Menor oxidação das anteras foi obtida inoculando-as abaixo da superfície do meio de cultura. A utilização de 4mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2g L<sup>-1</sup> de carvão ativado + 400mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico proporcionou o melhor controle da oxidação das anteras. O melhor tratamento para a indução de calos de anteras de pequizeiro foi a utilização de 4mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2g L<sup>-1</sup> de carvão ativado + 400mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, propiciando 18,75% de formação de calos.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. *In vitro* callus induction on anthers. In: **In: Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**, 2004. P. 117 - 158. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Tissue culture has been widely utilized as an alternative to propagation of plants which present difficulties in their natural reproduction. In spite of the great fruit yield, pequi tree seeds present germination troubles, which makes the *in vitro* culture an important tool to help the propagation of the pequi tree. This work was designed to induce callus formation on anthers of pequi tree, aiming future breeding studies and propagation of this species. The effect of the inoculation position and of the activated charcoal in the *in vitro* establishment of pequi tree anthers, by utilizing WPM medium added of varying concentrations of activated charcoal (0, 1, 2 and 4 g L<sup>-1</sup>) was evaluated, the anthers being inoculated on the surface of the culture medium and under this. Also the effect of the antioxidants activated charcoal, polyvinylpyrrolidone (PVP) and citric acid on the anthers inoculated in WPM medium was evaluated. The study of the callus induction on anthers was undertaken with the inoculation of these in WPM added of different concentrations of kinetin (0, 1, 2 and 4mg L<sup>-1</sup>), BAP and 2.4-D (0, 1, 2 and 4mg L<sup>-1</sup>) and of the antioxidants activated charcoal (4 g L<sup>-1</sup>); PVP and citric acid at the concentration of 400mg L<sup>-1</sup>. Lower oxidation of the anthers was obtained by inoculating below the surface of the culture medium. Use of 4mg L<sup>-1</sup> of BAP + 2g L<sup>-1</sup> of activated charcoal + 400 mg L<sup>-1</sup> citric acid provided the best control of the oxidation of the anthers. The best treatment for induction of pequi tree anther calluses was the utilization of 4mg L<sup>-1</sup> of BAP + 2g L<sup>-1</sup> of activated charcoal + 400mg L<sup>-1</sup> of citric acid, providing 18.75% of callus formation.

### 3 INTRODUÇÃO

Com a necessidade de propagação de espécies importantes para a economia mundial e para preservação ambiental das florestas, a cultura de tecidos vem sendo amplamente utilizada como alternativa para propagação de plantas, principalmente para as que apresentam dificuldades em sua reprodução natural.

Apesar da grande produção de frutos, as sementes de pequiheiro apresentam dificuldades de germinação, afetando a regeneração natural em escala significativa, o que torna a cultura *in vitro* uma alternativa importante a ser considerada para o auxílio na propagação do pequiheiro.

No cultivo *in vitro*, um dos métodos que possibilitam a propagação em massa de uma determinada espécie é o cultivo de calos, que pode também ser utilizado para a produção de metabólitos secundários e para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética.

Os calos podem ser obtidos por meio de cultivo *in vitro* de vários tipos de explantes, dentre estes as anteras.

Este trabalho teve como objetivo induzir a formação de calos em anteras de pequiheiro, auxiliando futuros estudos de melhoramento e propagação desta espécie.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Botões florais de pequiheiro (Figura 1) foram coletados de plantas adultas no município de Itutinga - MG. Durante a coleta dos botões florais (tamanho aproximado de 1,5 cm), estes permaneceram em caixa de isopor com ambiente refrigerado por gelo, sendo posteriormente transferidos para o Laboratório de

Propagação de Plantas Lenhosas do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, onde permaneceram em refrigerador durante 24 horas.

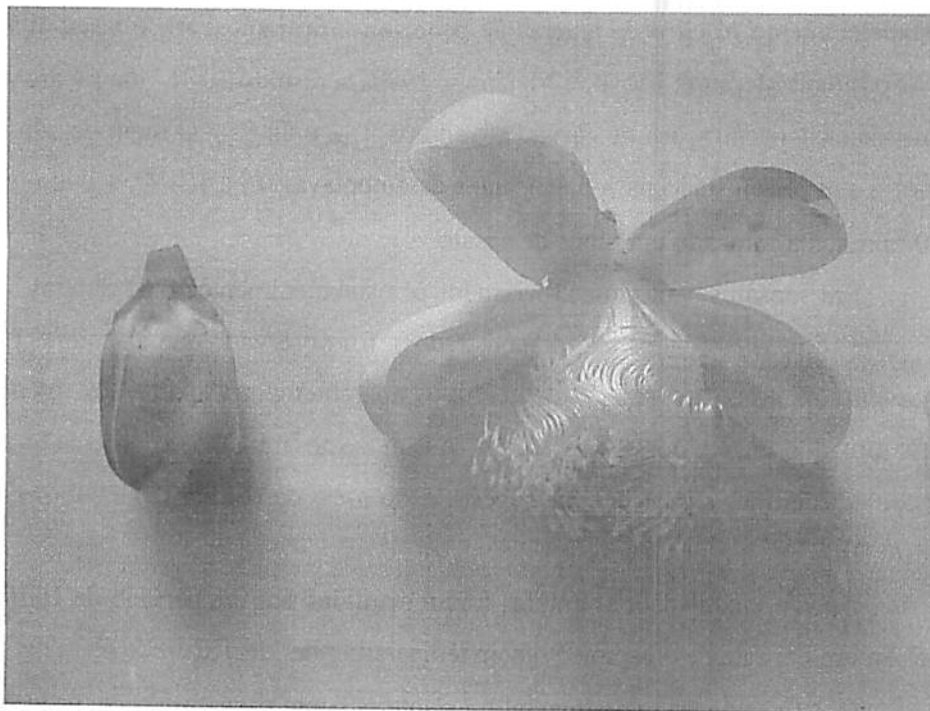


FIGURA 1 Botões florais de pequi utilizado para a retirada das anteras. Lavras, UFLA, 2004.

Os botões florais foram submetidos à desinfestação com etanol 70% por 60 segundos, hipoclorito de sódio comercial com 2,5% de cloro ativo por 15 minutos e lavados 3 vezes em câmara de fluxo em água destilada e autoclavada.

As anteras foram extraídas por meio de uma incisão no botão floral e removidas com auxílio de pinça e bisturi previamente esterilizados.

#### **4.1 Efeito da posição de inoculação e carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de anteras de pequiheiro**

Para se avaliar o efeito da posição da inoculação e do carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de anteras de pequiheiro, utilizou-se meio basal WPM (Wood Plant Medium; Lloyd & McCown, 1980) acrescido 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e diferentes concentrações de carvão ativado (0, 1, 2 e 4g L<sup>-1</sup>). O meio de cultura teve o seu pH ajustado para 5,8±1 antes da autoclavagem a 121°C, 1,0 atm por 20 minutos e colocado em tubos de ensaio.

Em ensaios anteriores, visando o estabelecimento das anteras de pequiheiro *in vitro* (dados não demonstrados), foi observado que as anteras que ficavam inclusas no meio de cultivo aparentemente oxidavam menos, apresentando uma maior sobrevivência. Assim, neste trabalho, as anteras foram inoculadas em duas posições, na superfície do meio de cultura (S) e submersas neste (I).

Após a inoculação, as anteras foram mantidas por um período de 15 dias no escuro em sala de crescimento com temperatura de 25±1°C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial com 2 x 4 (2 posições de inoculação e quatro concentrações de carvão ativado), perfazendo um total de 8 tratamentos com 10 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo 4 anteras.

Após 15 dias, avaliou-se a porcentagem de anteras oxidadas, sendo estas analisadas comparando-se as proporções por meio de intervalos de confiança de 95% do número de oxidação obtidas por tratamentos (Triola, 1999).

O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, 1,0 atm por 20 minutos e distribuído em tubos de ensaio (23 x 137mm). As anteras foram inoculadas abaixo da superfície do meio de cultivo e mantidas em sala de crescimento a 25±1°C na total ausência de luz. O delineamento experimental utilizado foi integralmente casualizado, contendo 10 tratamentos, com 20 repetições, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio contendo 4 anteras. Após 15 dias, avaliou-se a porcentagem de anteras oxidadas, sendo estas analisadas comparando as proporções por meio do intervalo de confiança de 95% do número de oxidação obtidas por tratamentos (Triola, 1999).

Tratamento	Antioxidante
T0	0
T1	1g L <sup>-1</sup> CA
T2	2g L <sup>-1</sup> CA
T3	4g L <sup>-1</sup> CA
T4	100mg L <sup>-1</sup> PVP
T5	200mg L <sup>-1</sup> PVP
T6	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T7	100mg L <sup>-1</sup> AC
T8	200mg L <sup>-1</sup> AC
T9	400mg L <sup>-1</sup> AC

TABELA 1 Tratamentos em função das concentrações utilizadas de carvão ativado (CA), polivinilpirrolidona (PVP) e ácido cítrico (AC). Lavras, UFLA, 2004.

Para avaliar o efeito dos antioxidantes carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP) e ácido cítrico, utilizou-se meio basal WPM adicionando-se PVP e ácido cítrico nas concentrações de 100, 200 e 400mg L<sup>-1</sup> e carvão ativado nas concentrações 0, 1, 2 e 4g L<sup>-1</sup> (Tabela 1).

#### 4.2 Efeito de antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de anteras de pequizeiro

### **4.3 Efeito da cinetina, BAP e 2,4-D na indução de calos em anteras**

As anteras foram submersas em meio WPM acrescido de diferentes concentrações de cinetina (0, 1, 2 e 4mg L<sup>-1</sup>), BAP e 2,4-D (0, 1, 2 e 4mg L<sup>-1</sup>) e dos antioxidantes carvão ativado (4g L<sup>-1</sup>); PVP e ácido cítrico na concentração de 400mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2).

Após a inoculação, as anteras foram mantidas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25±1°C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado contendo 28 tratamentos com 10 repetições, sendo cada repetição composta por 5 anteras as avaliações foram realizadas após 40 dias de cultivo por meio da porcentagem de anteras oxidadas e porcentagem de calos formados por tratamento.

A análise estatística referente à formação de calos foi feita utilizando-se o teste Kruskal-Wallis, considerando significância de 5% (Triola, 1999).

Para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si foi utilizado a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

TABELA 2 Tratamentos em função das concentrações utilizadas de cinetina (CIN), benzilaminopurina (BAP), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) carvão ativado (CA), polivinilpirrolidona (PVP) e ácido cítrico (AC). Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Regulador de crescimento	Antioxidante
T01	0	0
T2	1mg L <sup>-1</sup> CIN	4g L <sup>-1</sup> CA
T3	2mg L <sup>-1</sup> CIN	4g L <sup>-1</sup> CA
T4	4mg L <sup>-1</sup> CIN	4g L <sup>-1</sup> CA
T5	1mg L <sup>-1</sup> BAP	4g L <sup>-1</sup> CA
T6	2mg L <sup>-1</sup> BAP	4g L <sup>-1</sup> CA
T7	4mg L <sup>-1</sup> BAP	4g L <sup>-1</sup> CA
T8	1mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	4g L <sup>-1</sup> CA
T9	2mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	4g L <sup>-1</sup> CA
T10	4mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	4g L <sup>-1</sup> CA
T11	1mg L <sup>-1</sup> CIN	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T12	2mg L <sup>-1</sup> CIN	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T13	4mg L <sup>-1</sup> CIN	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T14	1mg L <sup>-1</sup> BAP	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T15	2mg L <sup>-1</sup> BAP	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T16	4mg L <sup>-1</sup> BAP	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T17	1mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T18	2mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T19	4mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	400mg L <sup>-1</sup> PVP
T20	1mg L <sup>-1</sup> CIN	400mg L <sup>-1</sup> AC
T21	2mg L <sup>-1</sup> CIN	400mg L <sup>-1</sup> AC
T22	4mg L <sup>-1</sup> CIN	400mg L <sup>-1</sup> AC
T23	1mg L <sup>-1</sup> BAP	400mg L <sup>-1</sup> AC
T24	2mg L <sup>-1</sup> BAP	400mg L <sup>-1</sup> AC
T25	4mg L <sup>-1</sup> BAP	400mg L <sup>-1</sup> AC
T26	1mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	400mg L <sup>-1</sup> AC
T27	2mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	400mg L <sup>-1</sup> AC
T28	4mg L <sup>-1</sup> 2,4-D	400mg L <sup>-1</sup> AC

#### 4.4 Efeito do BAP e combinações de antioxidantes na indução de calos em anteras

As anteras foram incluídas em meio basal WPM acrescido de BAP na concentração de  $4\text{mg L}^{-1}$  e da combinação dos antioxidantes carvão ativado ( $4\text{g L}^{-1}$ ) + PVP ( $400\text{mg L}^{-1}$ ) e carvão ativado ( $4\text{g L}^{-1}$ ) + ácido cítrico ( $400\text{mg L}^{-1}$ ).

Após a inoculação, as anteras foram mantidas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, contendo 28 tratamentos com 10 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo contendo 5 anteras.

As avaliações foram realizadas após 40 dias de cultivo, por meio da porcentagem de anteras oxidadas e porcentagem de calos formados por tratamentos. Os resultados foram comparados por meio de intervalos de confiança de 95%.

Objetivando comparar o efeito do BAP combinado com carvão ativado, PVP e ácido cítrico na formação de calos, realizou-se o teste qui-quadrado (Triola, 1999) (Tabela 3), o qual avaliou a seguinte hipótese: existe uma independência entre os tratamentos e a resposta observada na oxidação e formação de calos ( $H_0$ ).

TABELA 3 Tabela de freqüências do teste qui-quadrado para os resultados de oxidação e de formação de calos em anteras.

	Tratamentos			Total
	T1	T2	T3	
Oxidação	60	37	55	152
Calos	4	15	5	24
Total	64	52	60	176

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da posição de inoculação e do carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de anteras

O resultado encontrado constatou que o efeito dos tratamentos na calogênese das anteras de pequiizeiro foi significativo ( $p < 0,001$ ).

De acordo com a análise de comparação das proporções de oxidação, pôde-se observar que os melhores resultados foram obtidos ao se inocular as anteras em meio WPM abaixo da superfície e com acréscimo de 2 e 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, não diferindo estatisticamente entre si, apresentando valores da proporção de 0,3, diferindo dos demais tratamentos que apresentaram valores de proporção entre 0,8 a 0,9 (Tabela 4).

TABELA 4 Comparação dos tratamentos (anteras inoculadas na superfície - S e inclusas no meio de cultivo - I) por meio do intervalo de confiança de diferença entre duas proporções. Lavras, UFLA, 2004.

	Tratamento		Proporção de oxidação	
	Carvão ativado (g L <sup>-1</sup> )	Posição de inoculação		
Trat 5	1	I	0,9	a
Trat 3	4	S	0,8	a
Trat 2	2	S	0,8	a
Trat 7	4	I	0,3	b
Trat 6	2	I	0,3	b

\* Proporções seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

Os tratamentos 0, 1 e 4 foram retirados da análise por apresentarem respostas nulas, portanto ao serem comparados com os demais tratamentos seriam significativamente diferentes, sendo assim desnecessário compará-los com os demais.

O fato do carvão ativado nas concentrações de 2 e 4g L<sup>-1</sup> ter sido mais eficiente no controle da oxidação de anteras de pequiizeiro, corrobora com Teixeira (2004), quando recomenda o uso do carvão ativado para a redução da oxidação dos compostos fenólicos exsudados pelos explantes em um cultivo *in vitro*.

O aspecto das anteras de pequiizeiro oxidadas e não oxidadas pode ser observado na Figura 2.

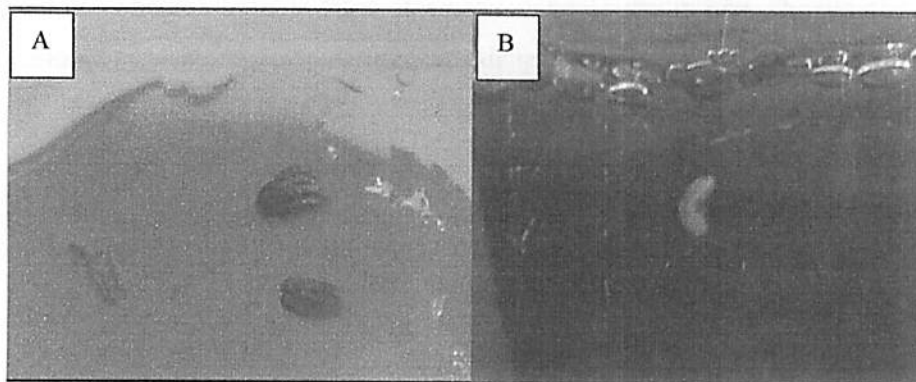


FIGURA 2 Anteras de pequiizeiro oxidadas (A) e antera não oxidada inclusa no meio de cultura (B). Lavras, UFLA, 2004.

## 5.2 Efeito de antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de anteras

O melhor antioxidante para o estabelecimento *in vitro* de anteras, de acordo com o teste de proporções de oxidação, foi o carvão ativado na concentração de 4g L<sup>-1</sup>. O uso de 2g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 400mg L<sup>-1</sup> de PVP e 400mg L<sup>-1</sup> de AC, não diferiram estatisticamente do melhor resultado (Tabela 5). A determinação de um antioxidante para o estabelecimento *in vitro* de anteras de pequiizeiro é de grande importância para a indução de calos, pois, segundo Sato et al. (2001), a oxidação é um problema inerente ao cultivo *in vitro*.

TABELA 5 Comparação dos tratamentos por meio do intervalo de confiança de diferença entre duas proporções. Lavras, UFLA 2004.

Tratamentos		Proporção de oxidação	
	Antioxidantes		
Trat 4	100mg L <sup>-1</sup> PVP	0,90	a
Trat 7	100mg L <sup>-1</sup> AC	0,85	a
Trat 1	1g L <sup>-1</sup> CA	0,80	a
Trat 5	200mg L <sup>-1</sup> PVP	0,75	a
Trat 8	200mg L <sup>-1</sup> AC	0,75	a
Trat 6	400mg L <sup>-1</sup> PVP	0,60	b
trat 9	400mg L <sup>-1</sup> AC	0,55	b
Trat 2	2g L <sup>-1</sup> CA	0,45	b
Trat 3	4g L <sup>-1</sup> CA	0,35	b

\* Proporções seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

Pasqual et al. (2002), em consonância com este trabalho, também obtiveram bons resultados ao utilizar PVP na concentração de 200mg L<sup>-1</sup>, em adição ao meio de cultura, ao estabelecerem anteras de cafeeiro *in vitro*. Estes autores ainda relatam que concentrações superiores a 200mg L<sup>-1</sup> de PVP foram prejudiciais ao desenvolvimento dos calos a partir de anteras de cafeeiro.

### 5.3 Efeito da cinetina, BAP e 2,4-D na indução de calos em anteras

Verificou-se que os tratamentos utilizados apresentaram respostas similares.

Por meio da análise de Kruskal-Wallis, foi observada a diferença estatística do tratamento que utilizou 4mg L<sup>-1</sup> de BAP (T7) para a indução de calos em relação os demais tratamentos utilizados (Figura 3).

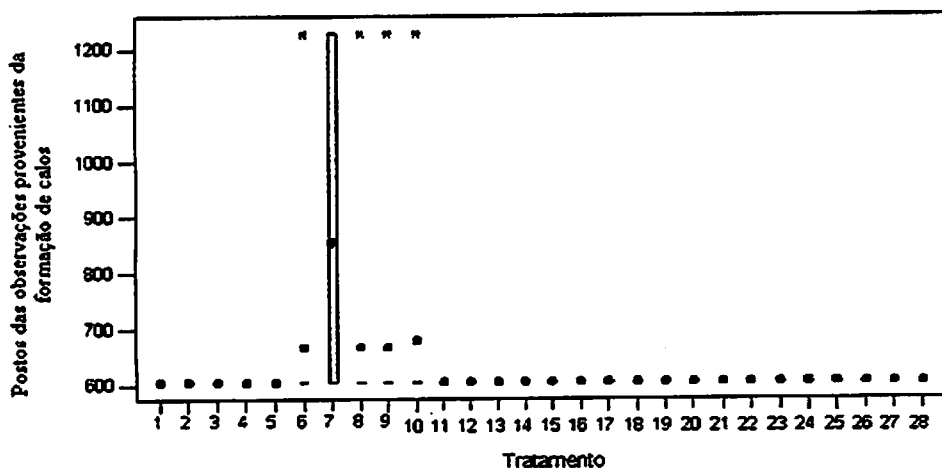


FIGURA 3 Box plot para a formação de calos a partir de anteras em função dos tratamentos utilizados. Lavras, UFLA, 2004.

As médias originais para a formação de calos em anteras foram de 40% para o tratamento 7 (4mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado), 10 % para os tratamentos 6 (2mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado), 8 (1mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado), 9 (2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado) e 10 (4mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado). Os demais tratamentos foram ineficientes na indução de calos em anteras de pequiheiro.

Apesar de apresentar baixa indução de calos (40%) em anteras de pequiheiro, o uso de WPM acrescido de 4mg L<sup>-1</sup> de BAP + 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado apresentou-se como sendo o melhor tratamento para a formação de calos. O BAP geralmente é associado com a auxina para a indução de calo. Landa et al. (2000) utilizaram o BAP associado com a auxina ANA para induzir calogênese em explantes foliares de pequiheiro.

Os resultados também demonstraram que o uso de 2,4-D nas concentrações 1, 2 e 4mg L<sup>-1</sup>, combinado com 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, também induziu calos em anteras de pequiheiro, no entanto, a porcentagem de indução foi muito reduzida (10%). O 2,4-D também foi utilizado por Luz et al. (2000) na

concentração de  $0,01\text{mg L}^{-1}$ , juntamente com  $0,01\text{mg L}^{-1}$  de cinetina e  $5\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  para a indução de calos em anteras de pimentão.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o regulador de crescimento cinetina não induziu a formação de calos em anteras de pequiheiro nas concentrações testadas, concordando com Pasqual et al. (2002) que concluiu em seu trabalho com anteras de cafeeiro, que a adição de cinetina diminui a formação de calos.

#### 5.4 Efeito do BAP e combinações de antioxidantes na indução de calos em anteras

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, segue-se a comparação das proporções dos tratamentos em função da oxidação e formação de calos.

TABELA 6 Comparação das proporções dos tratamentos utilizando-se “índice de confiança” de 95%. Lavras, UFLA, 2004.

Oxidação	Proporção
T1 = BAP $4\text{mg L}^{-1}$ + CA $2\text{g L}^{-1}$	0,394a
T3 = BAP $4\text{mg L}^{-1}$ + CA $2\text{g L}^{-1}$ CA + PVP $400\text{mg L}^{-1}$	0,361a
T2 = BAP $4\text{mg L}^{-1}$ + CA $2\text{g L}^{-1}$ CA + AC $400\text{mg L}^{-1}$	0,243 b
Calos	Proporção
T2 = BAP $4\text{mg L}^{-1}$ + CA $2\text{g L}^{-1}$ CA + AC $400\text{mg L}^{-1}$	0,625a
T3 = BAP $4\text{mg L}^{-1}$ + CA $2\text{g L}^{-1}$ CA + PVP $400\text{mg L}^{-1}$	0,208 b
T1 = BAP $4\text{mg L}^{-1}$ + CA $2\text{g L}^{-1}$	0,166 b

\* Proporções seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

O tratamento que proporcionou maior controle da oxidação foi a utilização de BAP  $4\text{mg L}^{-1}$  + CA  $2\text{g L}^{-1}$  CA + AC  $400\text{mg L}^{-1}$ , apresentando o valor da proporção 0,243.

O tratamento que melhor induziu a formação de calos em anteras de pequiheiro foi a utilização de  $4\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $4\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado, combinado com  $400\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico (T2), com um valor de proporção de 0,625 (Tabela 6). Este efeito benéfico da associação do carvão ativado e do ácido cítrico possivelmente se deve à atuação diferenciada destes compostos no controle da oxidação. Segundo George (1996), o carvão ativado age promovendo a adsorção dos exsudados liberados pelo explante e o ácido cítrico reage com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem.

A maior porcentagem de calos formados a partir de anteras de pequiheiro foi obtida por meio da utilização de  $4\text{mg L}^{-1}$  de benzilaminopurina (BAP) +  $2\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado (CA) +  $400\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico (AC), proporcionando 18,75% de formação (Tabela 7). O tratamento que utilizou apenas BAP não induziu a formação de calos, devido à oxidação de 100% dos explantes (Tabela 7).

A Tabela 7 demonstra as médias originais da porcentagem de oxidação e de formação de calos em anteras de pequiheiro, em função dos tratamentos utilizados.

TABELA 7 Médias originais da porcentagem de oxidação e da formação de calos em anteras de pequiheiro.

Tratamento	Oxidação	Calos		
	(%)		(%)	
T0 = BAP 4mg L <sup>-1</sup>	100,00	a	0	c
T1 = BAP 4mg L <sup>-1</sup> + CA 2g L <sup>-1</sup>	75,00	b	5,00	b
T2 = BAP 4mg L <sup>-1</sup> + CA 2g L <sup>-1</sup> + AC 400mg L <sup>-1</sup>	46,25	c	18,75	a
T3 = BAP 4mg L <sup>-1</sup> + CA 2g L <sup>-1</sup> CA + PVP 400mg L <sup>-1</sup>	68,75	b	6,25	b

\*Proporções seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente.

Observa-se, por meio da Tabela 7, que a porcentagem de formação de calos é inversamente proporcional à oxidação das anteras; quanto mais oxidadas as anteras se apresentam, menor é a formação de calos. Esta resposta concorda com Melo et al. (2001), que afirmam que a oxidação é um dos problemas mais sérios encontrado no cultivo *in vitro*.

O aspecto de um calo desenvolvido a partir do cultivo *in vitro* de anteras de pequiheiro pode ser observado na Figura 4.

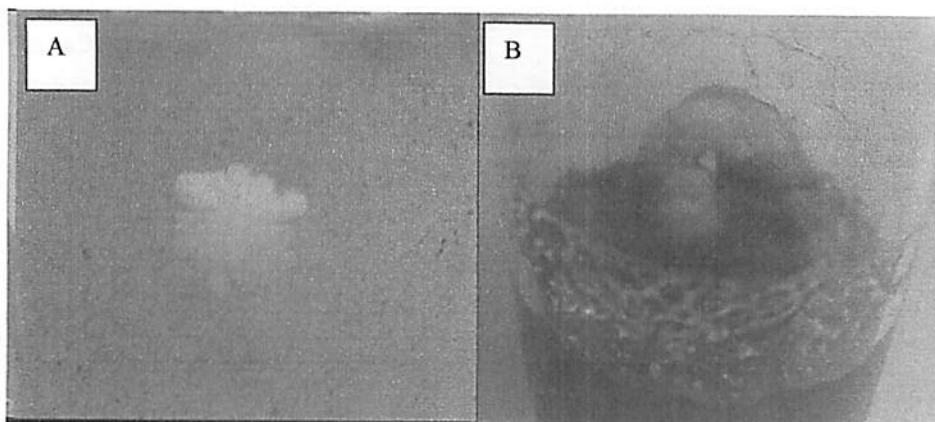


FIGURA 4 Antera de pequiheiro iniciando o processo de calogênese (A) e calo obtido por meio da cultura de antera de pequiheiro *in vitro*, aos 40 dias de cultivo (B). Lavras, UFLA, 2004.

## 6 CONCLUSÕES

Menor oxidação das anteras foi obtida inoculando-as abaixo da superfície do meio de cultura.

A utilização de  $4\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $2\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado +  $400\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico proporcionou o melhor controle da oxidação das anteras.

O melhor tratamento para a indução de calos de anteras de pequiheiro foi a utilização de  $4\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $2\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado +  $400\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico, propiciando 18,75 % de formação de calos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. Estatística Básica. São Paulo Editora Atual, 1987.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture*; part. 2; In Practice, 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb. ). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. Edição Especial.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. *HortScience*, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.

LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. F.; PEREIRA, I. A.; MESQUITA. Caracterização histológica da indução embriogênica em anteras de pimentão. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 1, p. 17-21, jan./mar. 2000.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXTO, J. R.; JULIATTI, C. F. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura de *in vitro* de embriões da guarirobeira. [*Syagus oleraceae* (Mart.) Becc.]. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1306, nov./dez. 2001.

PASQUAL, M.; MACIEL; CAMPOS, K. P.; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R. J. C. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arábica* L. ) cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 1, p. 71-76, jan./fev. 2002.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. *Cerne*, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. EMBRAPA-DF. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc.2001/simposios/s-joao%20batista%20teixeira/palestra%20jo%30%20batista%teixeira>. Acesso em: 17 out. 2004.

TRIOLA, M. F. *Introdução a Estatística*. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

## **CAPÍTULO VII**

### **EFEITO DO BAP E ANA NA INDUÇÃO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Efeito do BAP e ANA na indução *in vitro* de brotações. In: **Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 239. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Por apresentar dormência em suas sementes, a propagação do pequizeiro necessita de estudos para a obtenção de mudas por via assexuada. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do BAP e ANA na indução de brotações *in vitro* para posterior uso em trabalhos de micropropagação. Para se verificar o efeito do BAP na indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro, os explantes foram inoculados em meio WPM acrescido de 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g L<sup>-1</sup> de ágar e acrescido com diferentes concentrações de BAP (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 e 2mg L<sup>-1</sup>). Ao se estudar o efeito da interação entre BAP e ANA, o meio de cultivo WPM foi acrescido de 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0, 0,05; 0,1mg L<sup>-1</sup>) e as suas possíveis interações. A presença de BAP no meio de cultivo é essencial para a indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro sendo a combinação de BAP e ANA mais efetiva na indução das brotações. O melhor tratamento para a indução de brotações, número de gemas e taxa de multiplicação em segmentos nodais de pequizeiro foi a combinação dos reguladores de crescimento ANA e BAP, nas concentrações de 0,05mg L<sup>-1</sup> e 0,75mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Effect of BAP and ANA *in vitro* induction of shoots. In: **Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 239. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

For presenting dormancy in its seeds, the propagation of the pequi tree needs studies for obtaining seedlings by asexual via. This work was objectived to verify the effect of BAP and ANA in the induction of *in vitro* shoots for later use in micropropagation works. To verify the effect of BAP in the induction of shoots on nodal segments of pequi tree, the explants were inoculated in WPM medium, composed of 800mg L<sup>-1</sup> of PVP, 30g L<sup>-1</sup> of sucrose, 7g L<sup>-1</sup> of agar and added of different concentrations of BAP (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 1.75 and 2mg L<sup>-1</sup>). Considering the effect of the interaction between BAP and ANA, the WPM culture medium was added of 800mg L<sup>-1</sup> of PVP, 30g L<sup>-1</sup> of sucrose and different concentrations of BAP (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0, 0.05; 0.1mg L<sup>-1</sup>) and its possible interactions. The presence of BAP in the cultivation medium is essential to the induction of shoots on nodal segments of pequi tree, the combination of BAP and ANA being more effective in shooting induction. The best treatment for shooting induction, number of buds and multiplication rate on nodal segments of pequi tree was the combination of the growth regulators ANA and BAP, at the concentrations of 0.05mg L<sup>-1</sup> and 0.75mg L<sup>-1</sup>, respectively.

### 3 INTRODUÇÃO

Dentre os vários biomas existentes no Brasil, o cerrado é atualmente um dos mais importantes, contribuindo para o fornecimento de espécies frutíferas com potencial econômico.

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) é uma espécie que vem se destacando pelo seu alto valor econômico, porém, está em risco de extinção devido à destruição em ritmo acelerado das vegetações nativas pelo avanço das fronteiras agrícolas e pelo extrativismo de seus frutos. Como a espécie ainda é utilizada em programas de revegetação de áreas degradadas e como fonte geradora de renda (Melo, 1987), torna-se necessário uma produção contínua e em grande número de mudas. Por apresentar dormência em suas sementes, a propagação do pequizeiro necessita de estudos para a obtenção de mudas por via assexuada.

Santana (2003) comenta que técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas principalmente quando a propagação sexuada é insatisfatória e a reprodução por sementes não ocorrer naturalmente. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta útil para a propagação do pequizeiro e, pelo conhecimento de seu processo de crescimento e desenvolvimento, pode-se favorecer a formação de mudas em quantidade suficiente para atender à demanda do mercado, além de contribuir para o aumento de populações degradadas pelo extrativismo.

A propagação *in vitro* também denominada de micropropagação em função dos propágulos utilizados é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta da cultura de tecidos de órgãos vegetais (Santiago, 2003; Grattapaglia & Machado, 1998).

Os reguladores de crescimento são usados em micropropagação para suportar um nível de crescimento básico e são igualmente importantes para direcionar a resposta do propágulo ao desenvolvido. O sinergismo entre auxinas

e citocininas é determinante no controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, em geral, a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e, invertendo-se esta relação, as gemas são inibidas havendo indução de raízes (Santana, 2003).

Segundo Erig & Schuch (2002), é importante obter uma taxa de multiplicação média satisfatória, com o mínimo de variação de explante para explante. Para Grattapaglia & Machado (1998), outros fatores importantes a serem observados são a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois estes determinarão o sucesso no enraizamento.

Martinotto (2004) relata que as plantas nativas do cerrado vêm sendo amplamente utilizadas em estudos de micropropagação, para a multiplicação rápida de plantas selecionadas, obtenção de mudas livres de patógenos, conservação e transporte de germoplasma.

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do BAP e ANA na indução de brotações *in vitro* para posterior uso em trabalhos de micropropagação.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Segmentos caulinares de plantas obtidas por meio de germinação de sementes *in vitro* com tamanho aproximado de 1cm, consistindo de 2 gemas e com o ápice excisado, foram utilizados como explantes.

## 4.2 Influência do BAP na indução de brotações em segmentos nodais de pequiizeiro

Para verificar o efeito do BAP na indução de brotações em segmentos nodais de pequiizeiro, os explantes foram inoculados em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), acrescido de 800mg L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona), 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g L<sup>-1</sup> de ágar e acrescido com diferentes concentrações de BAP (Benzilaminopurina) (Tabela 1).

TABELA 1. Concentrações de BAP acrescidas ao meio de cultura para o estudo da indução de brotações em segmentos nodais de pequiizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T0	0
T1	0,25
T2	0,50
T3	0,75
T4	1,00
T5	1,25
T6	1,50
T7	1,75
T8	2,00

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15 mL de meio, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e, posteriormente, autoclavado a 121° C e 1,0 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C, com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Aos 40 dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações, o número de folhas, o número de gemas por explante, a taxa de multiplicação e a altura da

maior brotação. A taxa de multiplicação foi determinada dividindo-se o número de gemas por explante, obtido aos 40 dias, pelo número inicial de gemas do explante, no estabelecimento deste (Erig & Schuch, 2002). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 repetições, sendo cada repetição formada por um tubo e um explante por tubo de ensaio.

Foi realizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%. E para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si foi utilizado a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

#### **4.3 Influência da interação entre BAP e ANA na indução de brotações de pequizeiro**

Para verificar o efeito da interação entre BAP e ANA (ácido naftalenoacético), o meio de cultivo WPM foi acrescido de 7g L<sup>-1</sup> de ágar, 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, e diferentes concentrações de BAP (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0, 0,05; 0,1mg L<sup>-1</sup>), e as suas possíveis interações totalizaram 15 tratamentos (Tabela 2).

TABELA 2 Combinação entre os reguladores de crescimento BAP e ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Reguladores de crescimento	
	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T1	0,00	0,00
T2	0,05	0,00
T3	0,10	0,00
T4	0,00	0,25
T5	0,05	0,25
T6	0,10	0,25
T7	0,00	0,50
T8	0,05	0,50
T9	0,10	0,50
T10	0,00	0,75
T11	0,05	0,75
T12	0,10	0,75
T13	0,00	1,00
T14	0,05	1,00
T15	0,10	1,00

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15 mL de meio, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,0atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C, com DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Aos 40 dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações, o número de folhas, o número de gemas por explante, a taxa de multiplicação e a altura da maior brotação. A taxa de multiplicação foi determinada dividindo-se o número de gemas por explante, obtido aos 40 dias, pelo número inicial de gemas do explante (Erig & Schuch, 2002). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 repetições, e explante em cada tubo de ensaio.

Para a análise dos dados realizou-se o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%. Sendo que, para uma

melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si foi utilizado a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam, respectivamente, a probabilidade do teste Kruskal-Wallis referente à análise dos tratamentos na indução da brotação representados pela combinação dos níveis dos fatores e para os dados obtidos pela utilização de apenas concentrações de BAP.

TABELA 3 Probabilidades do teste Kruskal-Wallis para a avaliação da utilização do BAP isoladamente e em combinação com o ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamentos	Nº de brotos	Nº de folha	Comp. (cm)	Nº de gemas	Taxa de multiplicação (%)
ANA × BAP	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
BAP	0,634	0,651	0,191	0,103	0,109

Conforme se observa na Tabela 3, para todas as variáveis analisadas, considerando um nível de significância fixado em 5%, conclui-se que pelo menos um dos tratamentos difere em relação aos demais. Esta significância foi observada apenas para os tratamentos provenientes da interação ANA × BAP. No caso dos tratamentos condicionados apenas ao efeito de BAP, estes foram não significativos.

As médias originais obtidas pela influência do BAP na indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro estão descritas na Tabela 4.

TABELA 4 Médias obtidas em função da utilização do BAP no meio de cultivo. Lavras, UFLA, 2004.

BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Nº de brotos	Nº de folhas	Comp. (cm)	Nº de gemas	Taxa de multiplicação (%)
0	0,133	0,4	1,33	0,4	0,2
0,25	0,4	1,33	4,47	1,73	0,865
0,5	0,67	1,93	3,67	2,53	1,265
0,75	0,53	0,53	1,67	1,47	0,735
1,0	0,93	1,87	5,47	3,33	1,665
1,25	0,2	0,4	2	0,53	0,265
1,5	0,133	0,27	1,46	0,4	0,2
1,75	0,133	0,27	1,4	0,53	0,265
2,0	0,07	0,133	0,3	0,13	0,065

De acordo com a Tabela 4, apesar dos resultados não terem sido significativos para a utilização do BAP isoladamente, observa-se que, para o número de brotações, os tratamentos que se destacaram foram a utilização de 0,5, 0,75 e 1,0mg L<sup>-1</sup>, com as médias respectivas de 0,67, 0,53 e 1,87 brotações por explante. Concentrações superiores a 1,0mg L<sup>-1</sup> ocasionaram queda brusca na indução de brotações (Figura 1). Chitra & Padmaja (1999) encontraram respostas semelhantes ao induzirem brotações em ápices caulinares de amora (*Morus indica* L. cultivar M-5), obtendo, como melhor resultado, a utilização de BAP nas concentrações de 0,5 e 1,0mg L<sup>-1</sup>. Martinotto (2004), ao estudar a utilização do BAP na indução de brotações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), uma outra frutífera do cerrado, constatou que o melhor resultado foi obtido ao se utilizar 2mg L<sup>-1</sup>, o que para o pequizeiro causou inibição. Altas concentrações de BAP (5 a 10mg L<sup>-1</sup>) também inibiram o desenvolvimento de brotações de *Grevillea x superflorens* (Leonardi et al., 2001)

Os demais resultados também seguem essa tendência, havendo uma queda brusca dos valores do número de folhas, do comprimento da maior

brotção, do número de gemas e da taxa de multiplicação após a concentração de  $1\text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 3).

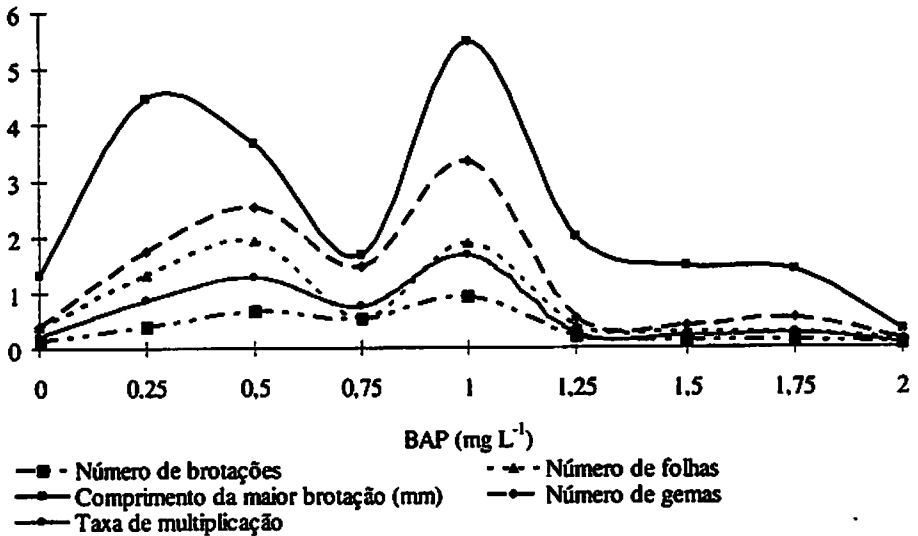


FIGURA 1 Resultados obtidos em segmentos nodais em função da concentração de BAP utilizada. Lavras, UFLA, 2004.

Com os resultados encontrados para a indução de brotações em segmentos nodais de salix (*Salix humboldtiana* Willd.), em função da utilização do BAP, Santos (2001) também obteve maior número de brotações ao utilizar  $1\text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Figura 1). Para o pessegueiro (*Prunus* ssp.), a indução de brotações *in vitro* foi eficiente ao se inocular segmentos nodais em meio de cultivo suplementado com  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Silva et al., 2003).

Os resultados da combinação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP estão descritas na Tabela 5.

TABELA 5 Médias dos resultados obtidos na indução de brotações em segmentos nodais de pequiheiro em função da interação BAP x ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Trat.	ANA	BAP	Nº de brotações	Nº de folhas	Comp. da maior brotação (mm)	Nº de gemas	Taxa de multiplicação (%)
T1	0,00	0,00	0	0	0	0	0
T2	0,05	0,00	0	0	0	0	0
T3	0,10	0,00	0	0	0	0	0
T4	0,00	0,25	0,3	0,6	3	1,4	0,7
T5	0,05	0,25	2,01	2,5	9,9	6	3
T6	0,10	0,25	1,5	1,7	7,9	4	2
T7	0,00	0,50	0,4	0,9	3,7	1,4	0,7
T8	0,05	0,50	0,7	1	6,1	2,8	1,4
T9	0,10	0,50	0,3	0,6	3,2	1,2	0,6
T10	0,00	0,75	2,8	1	9,5	8,4	4,2
T11	0,05	0,75	6	0,6	8,7	17,4	8,7
T12	0,10	0,75	1,3	1	7,1	5	2,5
T13	0,00	1,00	1,01	1,2	5,1	3,2	1,6
T14	0,05	1,00	3,01	1,9	11,5	7,4	3,7
T15	0,10	1,00	0	0	0	0	0

Na ausência de ANA e BAP não foi observado desenvolvimento de brotações, resultado semelhante aos tratamentos que continham apenas ANA, demonstrando que o BAP é essencial para a indução de brotações em segmentos nodais de pequiheiro.

Pode se observar, por meio da Tabela 5, que a auxina ANA utilizada em baixas concentrações, combinada com a citocinina BAP, foi favorável à indução de brotações em segmentos nodais de pequiheiro, caracterizando um comportamento sinérgico entre auxina e citocinina. Este sinergismo da combinação do BAP com baixas concentrações de ANA também foi observado por Bem-Jacov & Dax (1981), quando induziram brotações *in vitro* de *Grevillea rosmarinifolia*. Santana (2003) relata que o sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro* e que

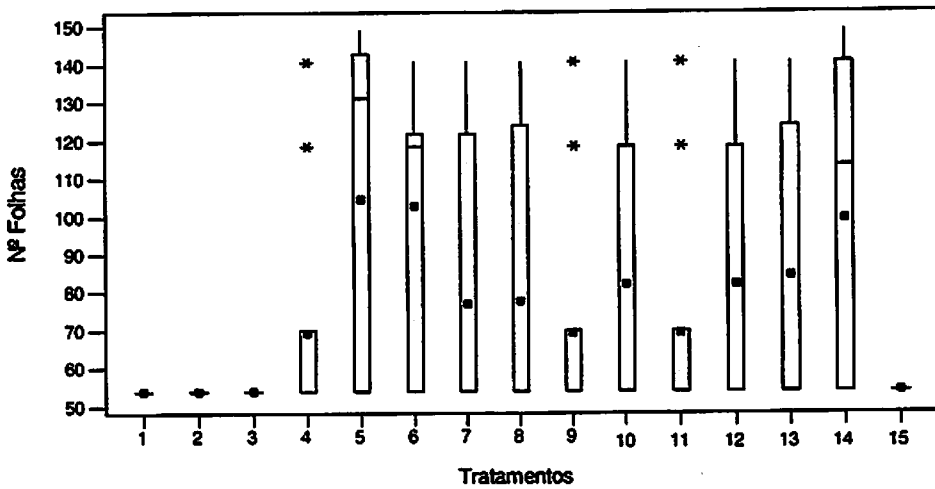


FIGURA 3 Box-plot para os postos observados referentes ao número de folhas induzidas pela interação entre ANA × BAP. Onde: T1 = controle; T2 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 = 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T5 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T6 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7 = 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T8 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T9 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T10 = 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T11 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T12 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T13 = 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T14 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T15 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. Lavras, UFLA, 2004.

O maior comprimento das brotações foi obtido no tratamento que utilizou 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA, combinado com 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP (T14), apresentando em média o comprimento de 11,5mm e destacando-se em relação aos demais tratamentos (Figura 4). Esta combinação é indicada quando se deseja obter plântulas que poderão ser utilizadas para a indução de raiz e aclimatizadas para a formação de mudas.

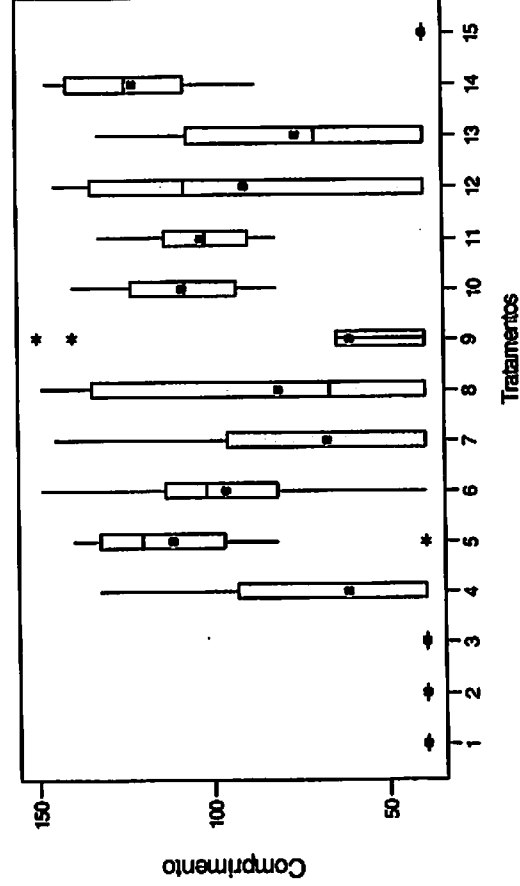
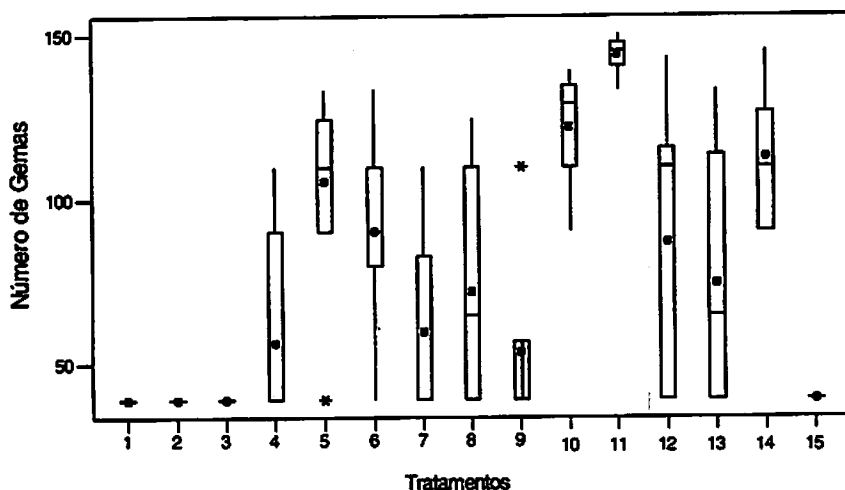


FIGURA 4 Box-plot para os postos observados referentes aos resultados obtidos para o comprimento das brotações através do efeito da Ana x BAP. Lavras, Onde: T1 = controle; T2 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 = 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T5 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T6 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7 = 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T8 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T9 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T10 = 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T11 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T12 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T13 = 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T14 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T15 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. UFLA, 2004.

Os resultados referentes aos postos obtidos pelas observações referente ao número de gemas desenvolvidas por explante e a taxa de multiplicação foram estatisticamente significativos em função dos tratamentos utilizados, sendo semelhantes aos resultados do número de brotações. A melhor concentração de indução foi a combinação de 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP (T11) (Figuras 5 e 6). Esta combinação entre auxinas e citocininas proporcionou o

desenvolvimento de 17,4 gemas, em média, por explantes, gerando uma taxa de multiplicação de 8,7.



**FIGURA 5** Box-plot para os postos observados do número de gemas em função dos tratamentos com interação ANA  $\times$  BAP. Onde: T1 = controle; T2 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 = 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T5 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T6 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7 = 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T8 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T9 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T10 = 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T11 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T12 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T13 = 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T14 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T15 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. Lavras, UFLA, 2004.

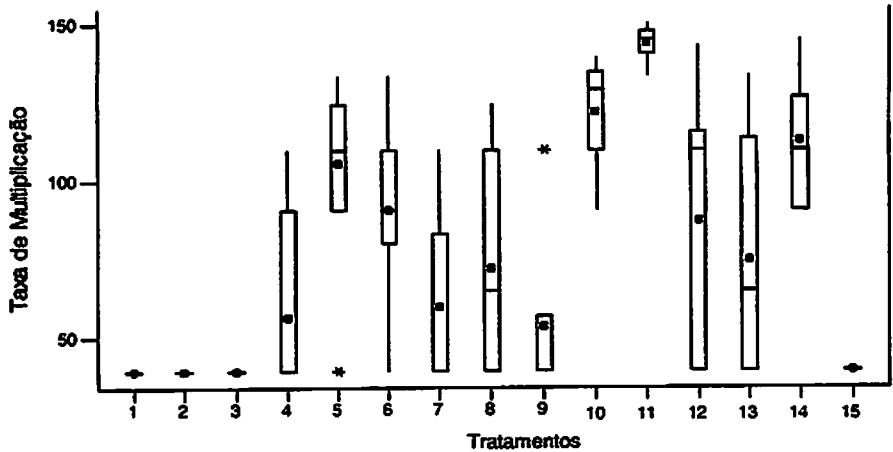


FIGURA 6 Box-plot para os postos observados para a taxa de multiplicação em função dos tratamentos com interação ANA x BAP. Onde: T1 = controle; T2 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA; T3 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA; T4 = 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T5 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T6 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,25mg L<sup>-1</sup> de BAP; T7 = 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T8 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T9 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP; T10 = 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T11 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T12 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP; T13 = 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T14 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP; T15 = 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP. Lavras, UFLA, 2004.

O aspecto visual das brotações de pequizeiro obtidas *in vitro* na presença de ANA + BAP pode ser observada na Figura 7.

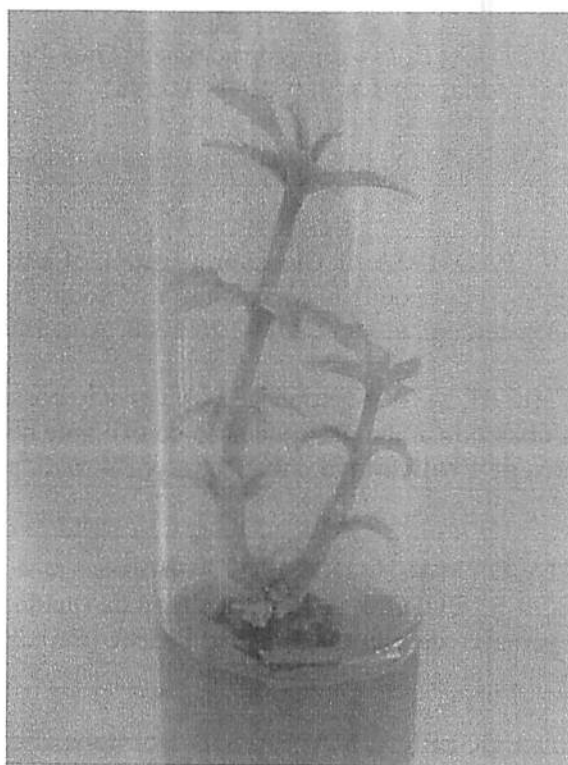


FIGURA 7 Aspecto visual de brotações desenvolvidas *in vitro* a partir de segmento nodal de piquizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

## 6 CONCLUSÕES

A presença de BAP no meio de cultivo é essencial para a indução de brotações em segmentos nodais de piquizeiro sendo a combinação de BAP e ANA mais efetiva na indução das brotações.

O melhor tratamento para a indução de brotações, número de gemas e taxa de multiplicação em segmentos nodais de piquizeiro foi a combinação dos reguladores de crescimento ANA e BAP, nas concentrações de  $0,05\text{mg L}^{-1}$  e  $0,75\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEM-JAACOV, J.; DAX, E. *In Vitro* propagation of *Grevillea rosmarinifolia*. *HortScience*, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 309-310, 1981.
- BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. *Estatística Básica*. São Paulo Editora Atual, 1987.
- CHITRA, D. S. V.; PADMAJA, G. Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) thorooung *in vitro* culturae of nodal explants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 80, n. 3/4, p. 289-298, Apr. 1999.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, ago. 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CBAB 1998. p. 331-353.
- LEONARDI, C.; RUGGERI, A; MALFA, S. L. Hormone effects on *in vitro* proliferation and rooting of *Grevillea* explants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 90, n. 3/4, p. 335-341, Nov. 2001.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. *HortScience*, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.
- MARTINOTTO, C. *Cultivo in vitro e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira (Eugenia dysenterica DC.)*. 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MELO, J. E. T. *Fatores relacionados com a dormência de sementes do pequi (Caryocar brasiliense Camb.)*. 1987. 92 p. Dissertação (Mestrado em ciências florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- RAMIREZ-MALAGON, R.; BORODANENKO, A.; BARRERA-GUERRA, J. L.; OCHOA-ALEJO, N. Shoot number and shoot size as affected by growth

regulators *in vitro* cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 227-236, July 2001.

SANTANA, J. R. F. Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *annonaceae*. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTIAGO, E. J. A. Caracterização morfológicas e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, de Caldolle). 2003. 162 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SILVA, A. L.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESTIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal ,v. 25, 2, p. 297-300, ago. 2003.

TRIOLA, M. F. *Introdução a Estatística*. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

**CAPÍTULO VIII**

**INFLUÊNCIA DA POLARIDADE DOS EXPLANTES DURANTE O  
CULTIVO *IN VITRO***

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Influência da polaridade dos explantes durante o cultivo *in vitro*. In: **Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 159 -176. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Devido à grande devastação do cerrado, a propagação natural do pequizeiro é comprometida e suas sementes apresentam sérios problemas de dormência tegumentar e uma possível presença de inibidores. Neste contexto, a cultura de tecidos torna-se uma ferramenta para a propagação do pequizeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da polaridade de explantes foliares e nodais durante o cultivo *in vitro*. O estudo do efeito da polaridade na calogênese foi observado por meio da inoculação de segmentos foliares retirados de plantas matrizes. Após a assepsia, as folhas obtidas das plantas matrizes foram excisadas em fragmentos e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio WPM, acrescido com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1mg L<sup>-1</sup> de TDZ, 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a inoculação do explante foliar foi realizada com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo e também com superfície adaxial voltada para o meio de cultivo. Para se estudar o efeito da polaridade na indução de brotações segmentos nodais de pequizeiro, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo WPM, acrescido de 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP, 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, sendo o meio solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar e tendo seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os segmentos nodais foram inoculados na posição vertical com a base do segmento incrustada no meio de cultivo e na posição horizontal, ficando toda a superfície em contato com o meio de cultivo. Para a indução de calos em explantes foliares de pequizeiro, mesmo não apresentando resultados significativos, recomenda-se fazer a inoculação destes com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo. A melhor resposta morfogênica foi obtida quando os segmentos nodais de pequizeiro foram inoculados na orientação horizontal. A inoculação dos explantes na posição vertical reduziu significativamente o potencial organogênico destes.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Influence of the polarity of the explants during *in vitro* cultivation. In: **Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 159 - 176. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Due to the great devastation of cerrado, the natural propagation of the pequi tree is endangered and its seeds present serious tegumental dormancy problems and a possible presence of inhibitors. In this context, tissue culture becomes a tool for propagation of the pequi tree. The objective of this work was to evaluate the effect of the polarity of leaf and nodal explants during *in vitro* cultivation. The study of the effect of polarity on callus formation was observed by means of the inoculation of leaf segments taken from donor plants. After aseptic treatment, the leaves obtained from stock plants were excised in fragments and inoculated in test tubes containing WPM medium, added of  $30\text{g L}^{-1}$  of sucrose,  $1\text{mg L}^{-1}$  of TDZ,  $2\text{mg L}^{-1}$  of .,4-D and solidified with  $7\text{g L}^{-1}$  of agar. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 before autoclaving, the inoculation of the leaf explant was performed with the abaxial surface turned toward the cultivation medium and also with the adaxial surface turned toward the cultivation medium. To study the effect of polarity on the induction of shoots, pequi tree nodal segments were inoculated in test tubes containing WPM cultivation medium, added of  $0.05\text{mg L}^{-1}$  of ANA and  $0.75\text{mg L}^{-1}$  of BAP,  $800\text{mg L}^{-1}$  of PVP, the medium being solidified with  $7\text{g L}^{-1}$  of agar and having its pH adjusted to 5.8 before autoclaving. The nodal segments were inoculated in the vertical position with their base of the segment incrustated in the cultivation medium and in the horizontal position, the whole of the surface kept in contact with the cultivation medium. For induction of calluses on pequi tree leaf explants, even not presenting significant results, it is recommended to do the inoculation of these with their abaxial surface turned toward the cultivation medium. The best morphogenic response was obtained when the nodal segments of the pequi tree were inoculated in the horizontal orientation. The inoculation of the explants in the vertical position reduced significantly their organogenic potential.

### 3 INTRODUÇÃO

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) destaca-se pelo uso de seus frutos na culinária, extração de óleos para a fabricação de cosméticos ou mesmo na medicina popular para tratamento de problemas respiratórios. Além disso, sua madeira é considerada de ótima qualidade e resistência, sendo utilizada de forma diversificada em marcenaria e carpintaria (Almeida & Silva, 1994).

Devido à grande devastação do cerrado e matas ciliares, a propagação natural do pequizeiro é comprometida e, além disso, suas sementes apresentam sérios problemas de dormência tegumentar e presença de inibidores (Dombroski, 1997; Melo & Gonçalves, 1991).

Neste contexto, a cultura de tecidos torna-se uma ferramenta para a propagação do pequizeiro. Para o sucesso da cultura de tecidos vegetais, todos os fatores, como pH, meio nutritivo, desinfestação e outros, devem ser perfeitos e adaptados ao tipo de planta cultivada *in vitro*. O caminho para a produção de mudas não depende apenas do sucesso de uma cultura *in vitro* mas também dos processos fisiológicos que atuam no explante em desenvolvimento.

A posição do explante durante a inoculação desempenha função importante no processo de calogênese e organogênese. Os explantes inoculados *in vitro* normalmente exibem uma acentuada polaridade na proliferação celular e na morfogênese, de maneira a estarem relacionados com a posição em que o órgão ou tecido se encontra na planta intacta e também com sua orientação dentro do recipiente de cultivo (Santana, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da polaridade de explantes foliares e nodais durante o cultivo *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Efeito da polaridade de explantes foliares na obtenção de calos *in vitro*

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Folhas retiradas de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento sob densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de  $67\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram utilizadas como fonte de explantes. Em seguida, as folhas foram mantidas em água corrente por 12 horas, sendo que, ao término deste período, efetuou-se a desinfestação em câmara de fluxo laminar utilizando álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) por 10 minutos, com subsequente lavagem, por três vezes, em água destilada e autoclavada.

Após a assepsia, as folhas foram excisadas em fragmentos de  $\pm 3\text{cm}^2$  e inoculadas em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 15 ml de meio WPM (Wood Plant Médium, Lloyd & McCown, 1980), acrescido com  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose,  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ,  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D e solidificado com  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a qual foi realizada a uma temperatura de  $121^\circ\text{C}$  e a uma pressão de 1,0 atm por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos sob DFFFA de  $36\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescente frias, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 2 tratamentos e 25 repetições, sendo cada tratamento composto por um tubo de ensaio contendo um explante. O tratamento 1 corresponde à

inoculação do explante foliar com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo e o tratamento 2 correlata-se à inoculação do explante foliar com a superfície adaxial voltada para o meio de cultivo.

Foram avaliados, aos 30 dias após a inoculação, a porcentagem de calos formados e o peso da matéria fresca dos calos formados.

Para a análise dos dados foram utilizados os testes de T-student, e o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%. E para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si foi utilizada a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

#### **4.2 Efeito da polaridade dos segmentos nodais na obtenção de brotações *in vitro***

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizados como explantes segmentos nodais de pequiizeiro, com aproximadamente 1cm, possuindo 2 gemas, obtidos de plântulas cultivadas *in vitro*.

Utilizaram-se 15ml do meio de cultivo WPM em tubos de ensaio (23 x 137mm), acrescidos de 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP, 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a qual foi realizada a uma temperatura de 121°C e uma pressão de 1,0 atm por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos sob DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescente frias, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constando de 2 tratamentos (posição de inoculação vertical com a base do segmento incrustada no meio de cultivo e horizontal) e 15 repetições.

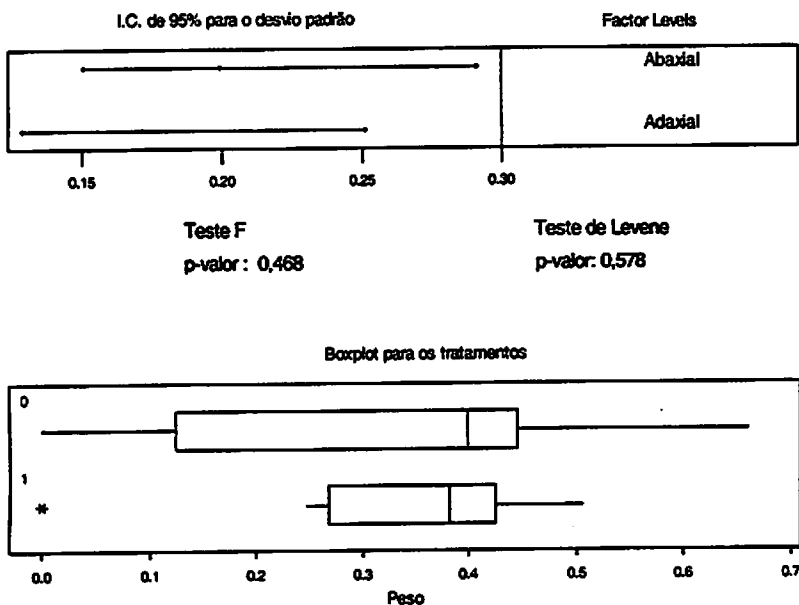
Aos 30 dias de cultivo, foram avaliados os números de brotações, o número de gemas por explantes, o número de folhas, o comprimento da maior brotação e a taxa de multiplicação que se refere à razão entre o número de gemas obtidas como resposta aos tratamentos empregados e o número de gemas iniciais contidas no explante utilizado, segundo metodologia descrita por Erig & Schuch (2000).

Foi realizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Efeito da polaridade de explantes foliares na obtenção de calos *in vitro***

A análise estatística dos resultados do fator polaridade do explante foliar (parte abaxial ou adaxial voltada para o meio de cultura) foi realizada inicialmente por um estudo sobre a homogeneidade das variâncias, mais especificamente pelos testes de Levene e Teste de F. Máximo de Hartley.. A importância destes testes é detectar se os tratamentos são ou não homogêneos implica na determinação do teste T-student a ser utilizado para comparar os dois tratamentos (Figura 1).



**FIGURA 1** Testes estatísticos e análise descritiva para verificação da homogeneidade dos tratamentos (Abaxial, Adaxial). Lavras, UFLA, 2004.

Considerando o nível de significância fixado em 5%, há evidências estatísticas de que os tratamentos apresentam variabilidade homogênea, sendo, portanto, um indicativo para a escolha do teste t-student, considerando homogeneidade entre variâncias (Tabela 1). É importante ressaltar que a análise da porcentagem das características avaliadas dada pelo teste Krukall-Wallis não depende da suposição de homogeneidade e sim de que as amostras são aleatórias e que a medida de escala é ordinal (Zimmerman, 1989).

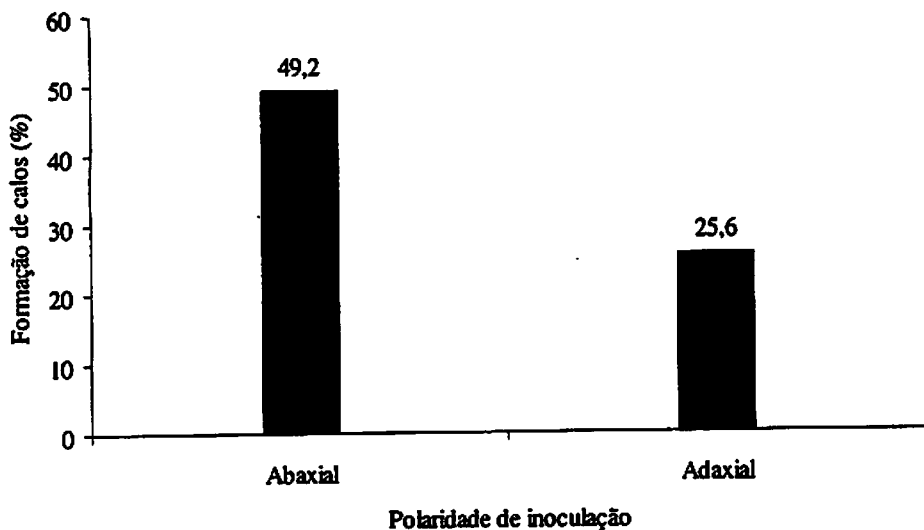
**TABELA 1** Estatísticas descritivas e significância do teste t-student considerando variâncias homogêneas. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	N	Média	Desvio Padrão
Abaxial (0)	25	0,319	0,199
Adaxial (1)	25	0,313	0,171
p-valor (Teste t-student)	0,186		
p-valor (Teste Kruskall-Wallis) para % de formação	0,140		

Os resultados apresentados na Tabela 1 referem-se a análise dos pesos obtidos por meio nos dois tratamentos. Conclui-se que os tratamentos não diferem entre si para um nível de significância fixado em 5%. Esta não significância também foi apresentada pelo teste Kruskall-Wallis referente à porcentagem de calos obtida dos mesmos tratamentos.

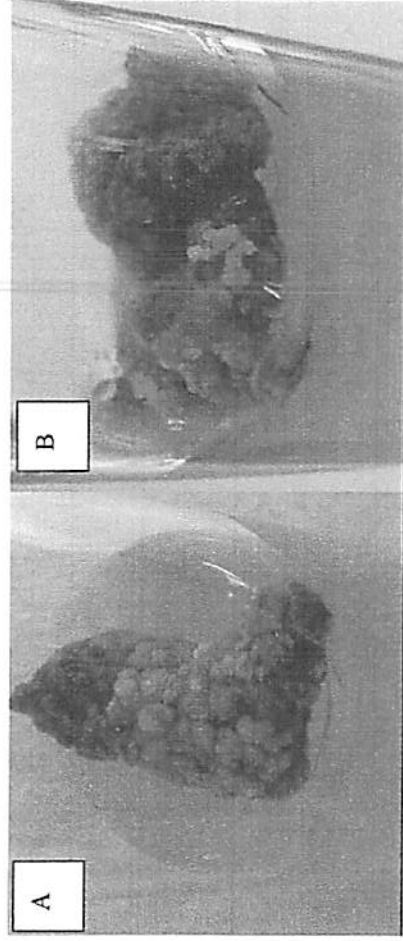
As médias de peso da matéria fresca obtida para os tratamentos foram de 0,319g para os explantes que ficaram com a face abaxial em contato com o meio de cultivo e de 0,313g para os explantes que ficaram com a superfície adaxial em contato com o meio de cultivo, não se observando diferença estatística entre elas. Esse resultado demonstra que, para a formação de calos em explantes foliares de pequiizeiro, não há a necessidade de se observar a posição em que este será inoculando no meio de cultivo.

Mesmo que os dados da porcentagem de indução de calos não tenham sido significativos a 5% de probabilidade, a diferença numérica da média de indução obtida quando se inoculam os explantes com a superfície abaxial em contato com o meio de cultivo (49,2%), chega a ser quase duas vezes maior do que a superfície adaxial no meio de cultivo (25,6%) (Figura 2). Contudo, do ponto de vista biológico, a polaridade influenciou a calogênese *in vitro* de explantes foliares de pequiizeiro, sendo observado que se deve inocular os explantes com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo.



**FIGURA 2** Médias da porcentagem de calos formados em função da polaridade de inoculação dos explantes foliares de pequiheiro. Lavras, UFLA, 2004.

Os calos desenvolvidos por meio do cultivo *in vitro* de explantes foliares inoculados em polaridades diferentes (abaxial e adaxial, voltadas ao meio de cultivo) podem ser observados na Figura 3.



**FIGURA 3** Calos desenvolvidos em função dos tratamentos de polaridade. A) calo desenvolvidido em explante foliar inoculado com a face abaxial para o meio de cultivo B) calo desenvolvidido em explante foliar inoculado com a face adaxial para o meio de cultivo. Lavras, UFLA, 2004.

### 5.2 Efeito da polaridade dos segmentos nodais na obtenção de brotações *in vitro*

A comparação entre os tratamentos de polaridade dos segmentos nodais de pequizeiro (Vertical ou Horizontal) por meio do teste Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância fixado em 5%, estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 Probabilidades do teste Kruskal-Wallis para avaliação da orientação dos segmentos nodais de pequizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

Variável	Probabilidade do teste KW	Tratamento	Média dos postos
Número de brotações	0,000	Vertical	8,00 a
		Horizontal	23,0 b
Número de folhas	0,156	Vertical	13,3 a
		Horizontal	17,7 a
Comprimento	0,114	Vertical	18,0 a
		Horizontal	13,0 a
Número de gemas	0,000	Vertical	9,00 a
		Horizontal	22,0 b
Taxa de multiplicação	0,000	Vertical	9,00 a
		Horizontal	22,00 b

Com os resultados obtidos pelas análises (Tabela 2), observa-se que a posição de inoculação dos segmentos nodais (vertical ou horizontal) influenciou a resposta morfogênica significativamente para o número de brotos formados por explante, número de gemas observado e taxa de multiplicação.

As características comprimento da maior brotação e número de folhas não apresentaram resultados significativos. McClelland & Smith (1990), testando a influência da orientação na indução de brotações em segmentos nodais de *Amelanchier spicata* Lam., *Acer rubrum* L., *Malus domestica* Borkh. e *Betula nigra* L., observaram que não houve diferença entre os comprimentos das brotações desenvolvidas a partir dos explantes inoculados na orientação horizontal e vertical. Erig & Schuch (2002) também observaram que não houve diferença estatística para o comprimento da maior brotação em segmentos nodais de macieira (*Malus prunifolia*), em função da orientação de inoculação vertical e horizontal.

Para todas as características avaliadas, com exceção do comprimento da maior brotação, os maiores valores foram obtidos quando se inoculou o segmento nodal na posição horizontal (Figura 4).

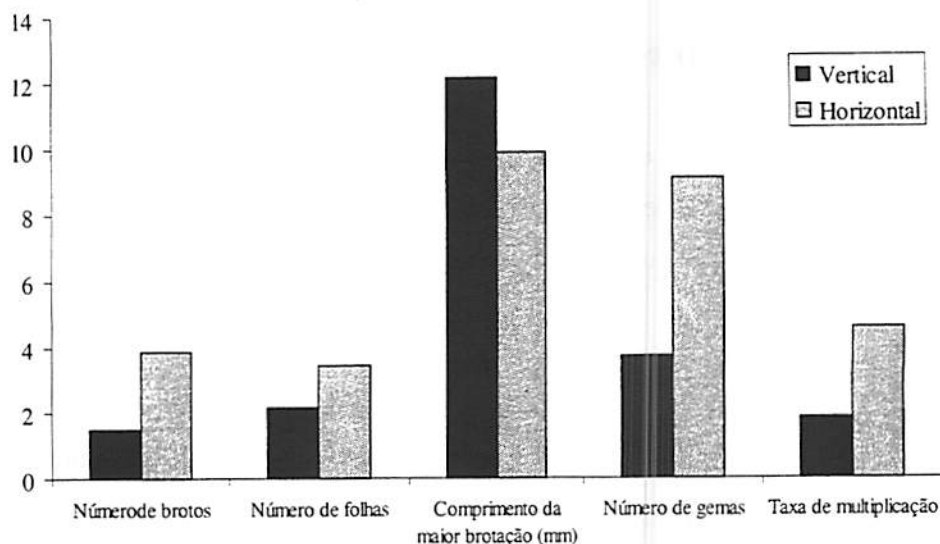


FIGURA 4 Médias dos resultados obtidos em função da orientação (vertical / horizontal) utilizada para a inoculação dos segmentos nodais de pequiheiro. Lavras, UFLA, 2004.

Ao se inocular os segmentos nodais na orientação horizontal, induziu-se a formação de 3,88 brotos por explante, em média, o que foi mais de que o dobro de brotos obtidos nos explantes que foram inoculados na orientação vertical (1,5 broto/explante). A orientação horizontal promoveu um maior número de brotações por explantes em 5 espécies lenhosas estudadas por McClelland & Smith (1990) (*Amelanchier spicata* Lam., *Acer rubrum* L., *Malus domestica* Borkh., *Betula nigra* L., *Forsythia intermedia* Zab.), em relação à inoculação dos segmentos nodais na orientação vertical, corroborando os resultados encontrados neste trabalho.

Apesar da não significância estatística, as brotações provenientes dos segmentos nodais inoculados na orientação horizontal produziram 1,3 folha a mais do as brotações desenvolvidas a partir dos explantes inoculados na orientação vertical.

Antagonicamente aos demais resultados obtidos, apenas no comprimento da maior brotação os valores dos caracteres avaliados foram maiores nas brotações provenientes dos segmentos nodais inoculados na orientação vertical, apresentando média de 12,14mm, enquanto as brotações provenientes dos segmentos nodais inoculados na horizontal tiveram o comprimento médio de 9,88 mm.

Em relação ao número de gemas e à taxa de multiplicação, os resultados dos explantes inoculados na orientação horizontal foram quase três vezes maiores que os obtidos pela inoculação destes na posição vertical. O número de gemas por explante obtido pela inoculação na orientação horizontal foi de 9,13 e, para os inoculados na orientação vertical, 3,71. A taxa de multiplicação, que é um dos fatores mais importantes para a micropropagação de uma espécie por fornecer o número de subcultivos possíveis, foi em média, de 4,56 para os explantes que foram inoculados na orientação horizontal, e de e 1,86 para os segmentos nodais inoculados na orientação vertical. Erig & Schuch (2002) relatam que um maior número de brotações, maior número de gemas e maior taxa de multiplicação foram obtido ao se inocular explantes nodais de macieira (*Malus prunifolia*) na orientação horizontal, assim como os resultados encontrados para a indução de brotações em segmentos nodais de pequiizeiro.

Santana (2003), ao estudar a influência da orientação dos explantes na indução de brotações em *Annona squamosa*, observou resultados inversos ao encontrado neste trabalho, tendo o melhor resultado sido encontrado na inoculação dos explantes na posição vertical, com média de 8,3 brotos/explante.

O aspecto visual do início da indução de brotações em segmentos nodais em função das orientações horizontal e vertical no momento da inoculação pode ser observado na Figura 5.

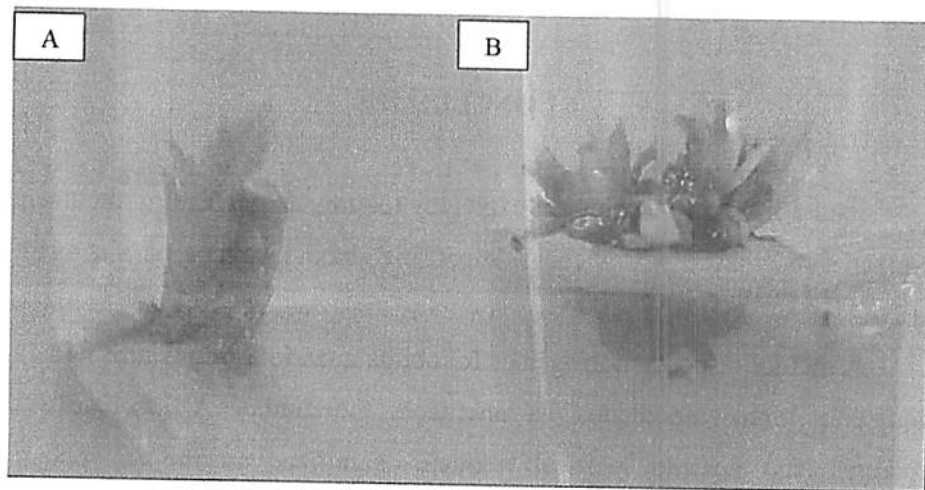


FIGURA 5 Aspecto visual das brotações no início do desenvolvimento em função da orientação de inoculação vertical (A) e horizontal (B). Lavras, UFLA, 2004.

Santana (2003) concluiu em seus estudos com anonáceas, que a influência da polaridade no potencial morfogênico é um fenômeno provavelmente ligado ao transporte de fitorreguladores no explante. Pelos resultados deste trabalho, pode-se sugerir que os segmentos nodais de pequizeiro inoculados na posição vertical têm predominância de auxinas endógenas, pois, segundo Taiz & Zeiger (2004), estas inibem a formação de múltiplas brotações, estabelecendo a dominância apical. A obtenção de um maior número de brotações com o segmento nodal na orientação horizontal deve-se, principalmente, à quebra da dominância apical (Erig & Schuch, 2002). Ao contrário, pode-se supor que os explantes que foram inoculados na orientação horizontal têm uma concentração endógena de citocininas, em detrimento do conteúdo de auxinas, o que explicaria o surgimento de várias brotações no mesmo explante. Taiz & Zeiger

(2004) comentam que a razão auxina / citocinina regula a morfogênese de tecidos cultivados *in vitro*, o que confirma a teoria de que, com a modificação da orientação do explante no cultivo *in vitro*, pode-se alterar a relação endógena de auxinas e citocininas, ocasionando respostas morfogênicas diferentes.

## 6 CONCLUSÕES

Para a indução de calos em explantes foliares de pequi, recomenda-se fazer a inoculação destes com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo.

A melhor resposta morfogênica foi obtida quando os segmentos nodais de pequi foram inoculados na orientação horizontal. A inoculação dos explantes na posição vertical reduziu significativamente o potencial organogênico destes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e Buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p. (EMBRAPA-CPAC. Documentos, 54).
- BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. São Paulo Editora Atual, 1987.
- DOMBROSKI, J. L. D. **Estudos sobre a propagação do pequi (Caryocar brasiliense Camb.)**. 1997. 80 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, ago. 2002.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.

McCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 7, p. 797-800, July 1990.

MELO, J. T. de; GONÇALVES, A. N. **Inibidores de germinação no fruto e em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1991. 11 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de pesquisa, n. 34).

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae.** 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TRIOLA, M. F. **Introdução a Estatística.** Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

ZIMMERMAN, F. S. P. **Introdução dos Processos Não Paramétricos, In: 3º Simpósio de Estatística Aplicada a Experimentação Agronômica.** Depto de Ciências Exatas, UFLA, MG, 1989, 104 p.

**CAPÍTULO IX**

**INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE NA INDUÇÃO DE CALOS E  
BROTAÇÕES *IN VITRO***

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Influência da luminosidade na indução de calos e brotações *in vitro*. In: **Micropropagação de pequi**zeiro (*Caryocar brasiliense* camb.). 2004. P. 177 - 194. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O pequi zeiro é uma espécie nativa do cerrado brasileiro que vem se destacando pelo seu alto valor econômico e pelo uso de seus frutos na culinária. Suas sementes apresentam dormência, dificultando sua propagação, tornando evidente a obtenção de mudas por via assexuada. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da luminosidade na calogênese e na indução de brotações *in vitro* de pequi zeiro, para posteriores utilizações em trabalhos de cultura de tecidos, enraizamento e aclimatização, possibilitando a produção de mudas micropropagadas. Estudou-se o efeito da luminosidade na calogênese por meio da inoculação de explantes foliares em meio WPM, acrescido com  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ e  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D, permanecendo os explantes após a inoculação sob a presença de luz e na ausência desta. Também se estudou o efeito da luminosidade na indução de brotações por meio da inoculação de segmentos nodais em meio WPM acrescido com  $0,75\text{mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,05\text{mg L}^{-1}$  de ANA, sendo após a inoculação os explantes mantidos na presença e ausência de luz. Uma maior formação de calos foi obtida por meio do cultivo dos explantes foliares na ausência de luz (70%). As brotações desenvolvidas na presença de luz apresentaram formação de folhas, as quais podem ser utilizadas para futuros experimentos *in vitro*. As brotações apresentaram maior comprimento ao serem cultivadas na ausência de luz, sendo mais propícias para a obtenção de explantes caulinares para estudos futuros.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Influence of luminosity in *in vitro* callus induction and shoots In: **Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 177 - 194. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG

The pequi tree is a native specie from Brazilian cerrado which has been standing out for its high economic value and for its edible. Its seeds present dormancy, making its propagation difficult the obtaining of seedlings by assexual via. This work was aimed to investigate the influence of luminosity on the callus induction *in vitro* shoots of pequi tree, for further utilization in works of tissue culture, rooting and acclimatization, making the production of micropropagated seedlings possible. The effect of luminosity on callus induction from inoculation of leaf explants in WPM medium added of  $1\text{ mg L}^{-1}$  of TDZ and  $2\text{ mg L}^{-1}$  de 2.4-D was investigated, the explants after inoculation remaining under the presence and absence of light of light. Also, the effect of luminosity on the induction of shoots by means of inoculation of nodal segments in WPM medium added of  $0.75\text{ mg L}^{-1}$  of BAP and  $0.05\text{ mg L}^{-1}$  of ANA was investigated, after inoculation, the explants were kept in the presence and absence of light. An increased formation of calluses was obtained by means of the cultivation of the leaf explants in the absence of light (70%). The shoots developed in the presence of light showed leaf formation, which may be utilized for future *in vitro* experiments. The shoots showed increased length in being cultivated in the absence of light, they being more favorable to obtain shoot explants for further studies.

### 3 INTRODUÇÃO

O Brasil possui importantes biomas mundiais, apresentando uma flora riquíssima com elevado potencial de fornecer espécies frutíferas nativas para exportação. O cerrado é indubitavelmente um dos biomas brasileiros com maior capacidade de fornecimento de espécies frutíferas, as quais vêm conquistando os mercados nacional e internacional, contribuindo para a geração de empregos, aumentando o PIB do país e a renda familiar dos produtores rurais.

O cerrado é considerado um recurso renovável se manejado adequadamente. Entretanto, vem sendo destruído e, com ele, as espécies frutíferas importantes que poderiam ser utilizadas com propósito econômico e social devido ao seu esgotamento pelo extrativismo e devastação (Pozo, 1997; Homma, 1993).

O pequiheiro (*Caryocar brasiliense*) é uma espécie nativa do cerrado brasileiro pertencente à família Caryocaraceae (Araújo, 1995). Ele que vem se destacando pelo seu alto valor econômico e pelo uso de seus frutos na culinária, como fonte de vitamina, na extração de óleos para fabricação de cosméticos, utilizado também para tratamento de problemas respiratórios, como afrodisíaco, sendo estimulante da biliar (Almeida & Silva, 1994; Brandão et al. 2002). Esta espécie ainda é utilizada em programas de revegetação de áreas degradadas e como fonte geradora de renda (Melo, 1987)

Suas sementes apresentam dormência, dificultando sua propagação (Miranda et al., 1987), tornando evidente a obtenção de mudas por via assexuada.

As dificuldades encontradas no processo de propagação do pequiheiro por meio de sementes valorizam a busca por soluções alternativas para a produção de mudas de maneira rápida e eficiente, o que, sem dúvida, pode significar um maior estímulo do desenvolvimento do pequiheiro como uma

cultura de valor econômico. Neste contexto, a cultura de tecidos aparece como uma solução que pode favorecer a obtenção de mudas de pequiizeiro, tornando possível a produção destas em grande quantidade.

Santana (2003) comenta que técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas principalmente quando a propagação sexuada é insatisfatória, devido à reprodução por sementes não ocorrer naturalmente.

Segundo Erig e Schuch (2002), na multiplicação *in vitro* não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa média satisfatória por explante. Para isso é necessário estudar os fatores que influenciam as respostas morfogênicas no cultivo *in vitro* de plantas.

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da luminosidade na calogênese e na indução de brotações *in vitro* de pequiizeiro, para posteriores utilizações em trabalhos de cultura de tecidos, enraizamento e aclimatização, possibilitando a produção de mudas micropropagadas.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Efeito da luminosidade na obtenção de calos *in vitro* a partir de explantes foliares**

Os experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Folhas foram retiradas de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento sob densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de  $67\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Em seguida, as folhas foram mantidas em água corrente por 12 horas, ao término das quais, efetuou-se a desinfestação em câmara de fluxo laminar utilizando álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito

de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) por 10 minutos, com subsequente lavagem por três vezes em água destilada e autoclavada.

Após a assepsia, as folhas foram excisadas em fragmentos de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> e inoculados em tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15 mL de meio WPM (Wood Plant Medium; Lloyd & McCown, 1980), acrescido com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1mg L<sup>-1</sup> de TDZ, 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 15 repetições, em que o tratamento 1 correspondeu à permanência dos explantes após a inoculação sob DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes frias, com fotoperíodo de 16 hora, o tratamento 2 correspondeu à permanência do explantes após a inoculação na ausência de luz. Ambos os tratamentos foram mantidos a uma temperatura de 25±1°C.

Foram avaliados, aos 30 dias após a inoculação a formação de calos, o peso da matéria fresca dos calos formados e o aspecto visual dos calos.

Para a análise dos dados foram utilizados os testes de T-student, Teste de F e o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%.

E para uma melhor visualização dos dados e para comparar quais tratamentos diferem entre si foi utilizada a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

#### **4.2 Efeito da luminosidade na indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro**

Os experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Segmentos nodais de plantas obtidas por meio da germinação de sementes, consistindo de 2 gemas e tamanho aproximado de 1cm, foram utilizados como explantes.

O meio utilizado foi o WPM, acrescido de 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, e 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,75mg L<sup>-1</sup> de BAP, sendo solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15 mL de meio, sendo o pH ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavado a 121°C e 1,0 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 25±1°C na ausência de luz e em fotoperíodo de 16h, DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Aos 30 dias de cultivo, foram avaliados os números de brotos, o número de gemas por explante, número de folhas, a taxa de multiplicação e o comprimento da maior brotação. A taxa de multiplicação foi determinada dividindo-se o número de gemas formadas por explante, obtidos aos 40 dias, pelo número de gemas do explante no momento da inoculação (Erig & Schuch, 2002).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 15 repetições, sendo a unidade amostral composta por um tubo contendo um explante.

Para a análise dos dados foram utilizados o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da luminosidade na obtenção de calos *in vitro* a partir de explantes foliares

A análise estatística dos resultados do fator luminosidade (claro e escuro) foi realizada inicialmente por um estudo sobre a homogeneidade das variâncias. A importância em se detectar se os tratamentos apresentam ou não variáveis homogêneas. Os testes propostos para a análise foi o teste de Levene e Hartley, os resultados via intervalo de confiança e significância desses testes são encontrados na Figura 1.

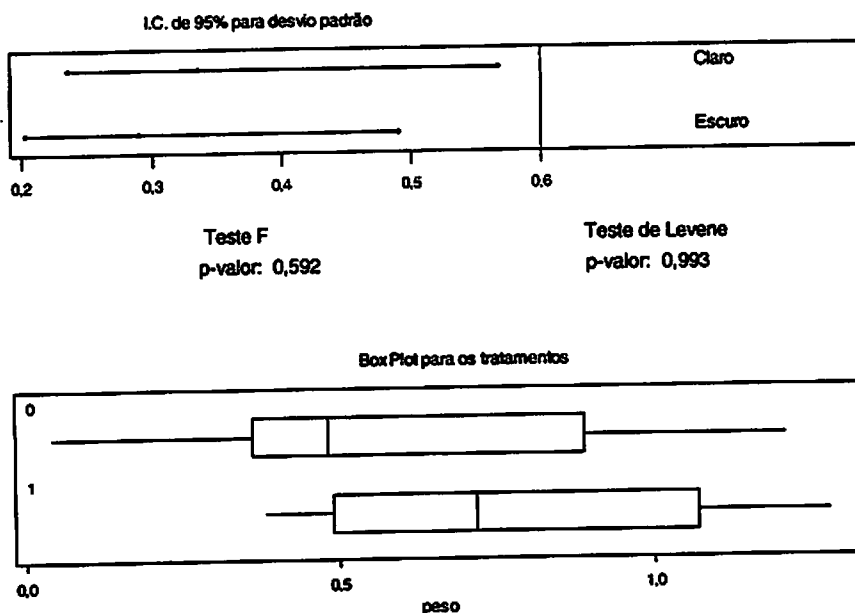


FIGURA 1 Testes estatísticos e análise descritiva para verificação da homogeneidade dos tratamentos. Lavras, UFLA, 2004.

De acordo com os testes apresentados anteriormente, relativos à homogeneidade de variâncias (Teste F de Hartley e Levene), pode-se verificar que os tratamentos claro e escuro apresentam variabilidade homogênea pois os referidos testes apresentam probabilidades não significativas. Em decorrência a este fato, utilizou-se o teste t-student (Tabela 1) para amostras independentes considerando variâncias homogêneas. Importante ressaltar que a análise da porcentagem dada pelo teste Kruskall-Wallis (KW) não depende da suposição de homogeneidade e sim de que as amostras são aleatórias e que a medida de escala é ordinal (Zimmerman, 1989).

**TABELA 1** Estatísticas descritivas e significância do teste t-student considerando variâncias homogêneas. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	N	Média	Desvio padrão
Claro	15	0,598	0,334
Escuro	15	0,784	0,289
p-valor (Teste t-student)	0,114		
p-valor (Teste Kruskall-Wallis) para a % de calos	0,079		

Considerando um nível de significância fixado em 5%, os resultados encontrados por meio da Tabela 1 evidenciam que os tratamentos claro e escuro são indiferentes em relação ao peso. Analogamente, tem-se para o resultado de porcentagem de formação de calos a mesma interpretação estatística dada para os resultados de peso da matéria fresca, cuja probabilidade Kruskall-Wallis é 0,079 (Tabela 1).

As médias obtidas para a porcentagem de formação de calos e para o peso da matéria fresca dos calos em função dos tratamentos utilizados estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2 Médias da porcentagem de formação de calos e peso da matéria fresca dos calos em função dos tratamentos utilizados. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	% de calogênese	Peso (g)
Claro	44,0	0,598
Escuro	71,33	0,784

Apesar das análises estatísticas demonstrarem resultados não significativos, não se pode ignorar a diferença da porcentagem de indução de calos entre os tratamentos. A indução de calos na ausência de luz foi 70% maior do que a indução de calos na presença de luz (71,33% e 44,0%, respectivamente). Nogueira (2003), trabalhando com murici-pequeno (*Byrsonimia intermedia*), também obteve maior porcentagem de indução de calos no cultivo *in vitro* na ausência de luz (90%), quando comparado com o cultivo *in vitro* na presença de luz (30%). Em estudos com o pequiizeiro, Landa (2000) obteve resultados semelhantes a estes, verificando maior formação de calos na ausência de luz após os 20 dias de inoculação utilizando como reguladores de crescimento combinações de ANA e BAP. Trabalhos com indução de calos em *Taxus spp.* demonstraram que estes, induzidos na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas), apresentaram pior aspecto visual e menor quantidade, quando comparados com a indução na ausência de luz (Wickremesinhe & Arteca, 1993).

O mesmo comportamento foi observado para o peso da matéria fresca dos calos obtidos. Os explantes que foram cultivados na ausência de luz obtiveram uma média de 0,784 g, o que representa mais de 60% de acréscimo em relação à média do peso da matéria fresca obtida pelos explantes cultivados na presença de luz. George (1996) comenta que o crescimento de tecidos vegetais organizados no cultivo *in vitro* geralmente não é inibido pela luz, entretanto pode ocorrer em alguns casos, no início das divisões celulares de explantes.

Visualmente, os calos desenvolvidos na ausência de luz apresentaram características de friabilidade (Figura 2A), com coloração clara. Em contrapartida, os calos desenvolvidos na presença de luz (Figura 2B) apresentaram coloração marrom-escura, e menos friáveis que os calos obtidos no cultivo com ausência de luz.

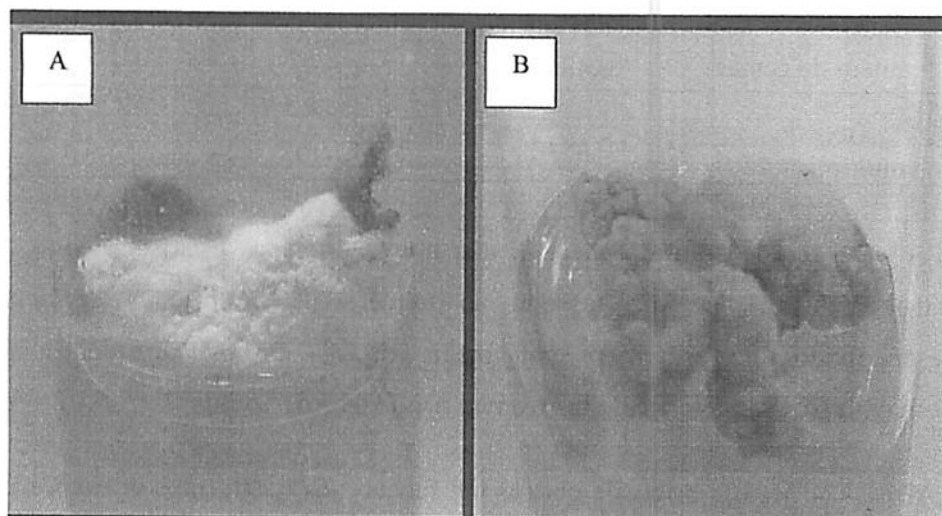


FIGURA 2 Calos de explantes foliares desenvolvidos na ausência de luz (A) e na presença de luz (B). Lavras, UFLA, 2004

## 5.2 Efeito da luminosidade na indução de brotações em segmentos nodais de pequizeiro

Os resultados demonstrados na Tabela 3 referem-se à comparação dos tratamentos que testam a influência da luz na indução de brotações de pequizeiro por meio do teste kruskall-wallis, considerando o nível de significância fixado em 5%.

TABELA 3 Probabilidades do teste Kruskal-Wallis para avaliação do efeito da luminosidade em brotos de pequizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

Variável	Probabilidade do teste KW	Tratamento	Média dos postos
Número de brotos	0,756	Escuro	15,0 a
		Claro	16,0 a
Número de folhas	0,001	Escuro	0,00 a
		Claro	19,5 b
Comprimento	0,001	Escuro	20,8 a
		Claro	10,2 b
Número de gemas	0,484	Escuro	16,6 a
		Claro	14,4 a
Taxa de multiplicação	0,484	Escuro	16,6 a
		Claro	14,4 a

De acordo com a Tabela 3, não houve diferença estatística entre os tratamentos no que diz respeito ao número de brotos. Os explantes desenvolvidos no escuro tiveram média de 3,4 brotos formados e os desenvolvidos na presença de luz tiveram média de 3,6.

TABELA 4 Médias originais obtidas em função dos tratamentos utilizados na obtenção de brotos. Lavras, UFLA, 2004.

Luminosidade	Nº de brotos	Nº de folhas	Comprimento	Números de gemas	Taxa de multiplicação
Ausência	3,40	0,00	28,13	8,80	4,40
Presença	3,60	2,27	9,67	9,07	4,53

As brotações desenvolvidas no escuro não apresentaram formação foliar diferindo significativamente das desenvolvidas na presença de luz, as quais apresentaram, em média, 2,27 folhas por brotação. Esses resultados demonstram que para a indução de brotações *in vitro*, os segmentos nodais devem ser cultivados na presença de luz.

Observa-se através da Tabela 4 que o comprimento médio da maior brotação apresentou diferença significativa em resposta ao tratamento de luminosidade utilizado. As brotações desenvolvidas no escuro apresentaram comprimento médio de 28,13 mm, que foi superior ao comprimento das brotações desenvolvidas na presença de luz, que apresentaram comprimento médio de 9,61mm.

Resultados referentes ao número de gemas obtidos pelos tratamentos utilizados caracterizam que não houve significância (Tabela 3) entre o número de gemas obtidas entre os tratamentos, apesar das brotações desenvolvidas na ausência de luz terem apresentado a média um pouco abaixo das brotações desenvolvidas na presença de luz, 8,80 e 9,07 gemas por explante, respectivamente (Tabela 4). O mesmo resultado foi observado para a taxa de multiplicação, observando que não há diferença estatística em se realizar o desenvolvimento das brotações na ausência ou na presença de luz, tendo sido obtidas as médias da taxa de multiplicação de 4,40 e 4,53, respectivamente (Tabela 4).

As brotações desenvolvidas na presença de luz apresentaram pigmentação verde normal, presença de folhas e um menor comprimento (Figura 3A). Pela Figura 3 B pode se observar que as brotações desenvolvidas na ausência de luz se apresentam estioladas e com pouca pigmentação verde, além de não apresentarem formação foliar.

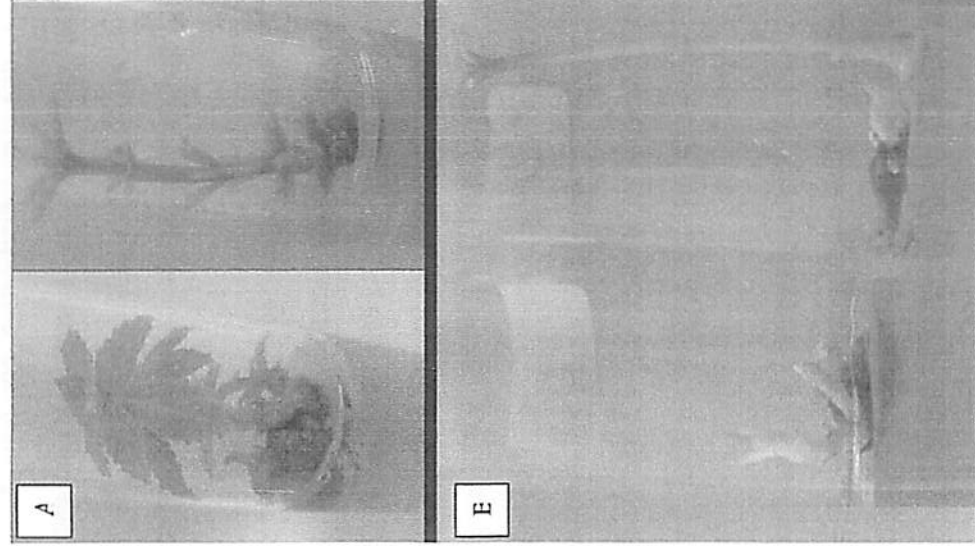


FIGURA 3 Brotações desenvolvidas na presença de luz (A) e na ausência de luz (B). Lavras, UFLA, 2004

## 6 CONCLUSÕES

Maior formação de calos foi obtida através do cultivo dos explantes foliares na ausência de luz .

As brotações desenvolvidas na presença de luz apresentaram formação de folhas, as quais podem ser utilizadas para futuros experimentos *in vitro*.

As brotações apresentaram maior comprimento ao serem cultivadas na ausência de luz, sendo mais propícias para a obtenção de explantes caulinares para estudos futuros.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; J.A SILVA. **Piqui e Buriti: Importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38p. (Documentos, 54).

ARAÚJO, F.D. A review of *caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): na economically valuable of central Brazilian cerrados. **Economic Botany**. v. 49, p. 40-48, 1995.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. Árvores Nativas e Exóticas do Estado de Minas Gerais. **EPAMIG**. Belo Horizonte, 528 p.; 2002.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. São Paulo Editora Atual, 1987.

ERIG, A.C. & SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Rev. Bras. Frutic.**, Ago 2002, vol.24, n.2, p.293-295.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture; part.2; In Practice**, 2nd Edition, 1996.

HOMMA, A.K.O.; **Estrativismo vegetal na Amazônia: limites e oportunidades**. Brasília: EMBRAPA – SPI, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. 201p. 1993.

LANDA, F. de S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D. de O.; BUENO FILHO, J. S. de S. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. *Ciência e Agrotecnologia*. V.24 (Edição Especial), p. 56-63. Lavras, dez. 2000.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. **Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp.** *HortScience*, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.

MELO, J.T. de. **Fatores relacionados com a dormência de sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Piracicaba:ESALQ, 1987. 92p.(Dissertação - Mestrado em Ciências Florestais).

MIRANDA, J.S.; SILVA, H.; MATOS, M.A.O. & SILVA, A.A.Q. **Emergência e vigor de sementes de pequi submetidas a pré-tratamentos mecânicos e térmicos**. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, n.9. 1987, Campinas. Anais. Campinas, RBF, 1987, v.1, p.315-318.

NOGUEIRA, R.C. **Propagação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonimia intermedia* A. Juss.)**. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia), UFLA – Lavras 2003.

POZO, O.V.C. **O Pequi (*Caryocar brasiliense*): Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado no Norte de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 1997, 100p. Dissertação de Mestrado.

SANTANA, J.R.F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *annonaceae***. Lavras – MG: UFLA, 2003. p.237 (Tese – Doutorado em Fisiologia Vegetal).

TRIOLA, M. F. **Introdução a Estatística**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

ZIMMERMAN, F. S. P. Introdução dos Processos Não Paramétricos, **In: 3º Simpósio de Estatística Aplicada a Experimentação Agronômica**. Depto de Ciências Exatas, UFLA, MG, 1989, 104 p.

WICKREMESINHE, E.R.M.; ARTECA, R.N. Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.35, p. 181- 193, 1993.

**CAPÍTULO X**

**ORGANOGENESE DIRETA E INDIRETA EM CALOS E EXPLANTES  
FOLIARES**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Organogênese direta e indireta em calos e explantes foliares In: **Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 195 - 220. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Dentre as várias espécies nativas de interesse econômico, destaca-se o pequiheiro, que vem sendo ameaçado pela devastação do cerrado comprometendo sua propagação natural. Além disso, suas sementes apresentam sérios problemas de dormência tegumentar e uma possível presença de inibidores. O objetivo deste trabalho foi estudar a organogênese direta e indireta em calos e explantes foliares de pequiheiro. Calos de explantes foliares de pequiheiro foram transferidos para o meio de cultivo WPM acrescido de BAP (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0, 0,05 e 0,1mg L<sup>-1</sup>) e suas possíveis interações. Calos de pequiheiro desenvolvidos por meio do cultivo *in vitro* de explantes foliares foram utilizados para a indução de raízes em meio WPM acrescido ANA (0; 1 e 2mg L<sup>-1</sup>) e BAP (0, 0,05 e 0,1mg L<sup>-1</sup>), e possíveis interações. Este trabalho também observou rizogênese direta em explantes foliares inoculados em meio de cultivo WPM acrescido com AIB (0; 1; 1,5; 3; 4,5 e 5mgL<sup>-1</sup>). A utilização de 2mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA induziu brotações adventícias em calos de pequiheiro. Obteve-se a formação de raízes em calos de pequiheiro por meio da inoculação de explantes foliares em meio acrescido com 2mg L<sup>-1</sup> ANA e 0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP. Para a indução de raiz via organogênese direta em explantes foliares recomenda-se a utilização de 3mg L<sup>-1</sup> de AIB.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. Direct and direct organogenesis on leaf explants and calluses In: **Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 195 - 220. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG

Out of the several native species of economic interest, the pequi tree stands out, which has been endangered of extinction by devastation of cerrado endangering its natural propagation. In addition, its seeds present serious tegumental dormancy problems and a possible presence of inhibitors. The objective of this work was to study direct and indirect organogenesis on leaf explants and calluses of pequi tree. Pequi tree leaf explant calluses were transferred to WPM cultivation medium containing BAP (0; 0.25; 0.5; 0.75 and 1.0mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0, 0.05 and 0.1mg L<sup>-1</sup>) and their possible interactions. Callus of pequi tree developed by means of the *in vitro* cultivation of leaf explants were utilized for root induction in WPM medium added of ANA (0; 1 and 2mg L<sup>-1</sup>) and BAP (0, 0.05 and 0.1mg L<sup>-1</sup>), and possible interactions. This work also observed direct rhizogenesis on leaf explants inoculated in WPM cultivation medium with AIB (0; 1; 1.5; 3; 4.5 and 5mgL<sup>-1</sup>). Use of 2mg L<sup>-1</sup> of BAP + 0.05mg L<sup>-1</sup> of ANA induced adventitious shoots on pequi tree calluses. The formation of roots on pequi tree callus by means of leaf explant inoculation in medium containing 2mg L<sup>-1</sup> ANA and 0.5mg L<sup>-1</sup> of BAP was obtained. For root induction via direct organogenesis on leaf explants, utilization of 3mg L<sup>-1</sup> of AIB is recommended.

### 3 INTRODUÇÃO

Dentre as várias espécies nativas de interesse econômico destaca-se o pequizeiro (*Caryocar brasiliense*), o qual é uma espécie frutífera, que também contribui para a recomposição da flora e fauna nas áreas de ocorrência (Carvalho, 1994; Gribel & Hay, 1993).

A devastação do cerrado e matas ciliares no Brasil está crescente, o que compromete a propagação natural do pequizeiro. Além disso, suas sementes apresentam sérios problemas de dormência tegumentar e presença de inibidores (Dombroski, 1997; Melo & Gonçalves, 1991). Neste contexto, as técnicas de cultura de tecidos apresentam-se como uma ferramenta importante na propagação do pequizeiro.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, destaca-se a indução organogênese (Pasqual et al., 1997). A organogênese é definida como a formação de estruturas a partir de tecidos e células, podendo ocorrer por via direta através da regeneração de plantas provenientes de tecidos não meristemáticos, sem passar pela fase de calo, apresentando alta fidelidade genética e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a partir das células do calo surgem gemas adventícias capazes de desenvolver novas estruturas (parte aérea ou raiz), as quais podem ser utilizadas para a propagação de várias espécies.

O objetivo deste trabalho foi estudar a organogênese direta e indireta em calos e explantes foliares de pequizeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Indução de brotações em calos de explantes foliares

Este experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Lenhosas do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Calos de pequizeiro obtidos através do cultivo *in vitro* de explantes foliares em meio WPM acrescido com  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $2\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D +  $1\text{mg L}^{-1}$  de TDZ, foram utilizados com fonte de explante.

Os calos foram transferidos em câmara de fluxo laminar para o meio de cultivo Wood Plant Medium (WPM, Loyd & McCown, 1980) acrescido de  $800\text{mg L}^{-1}$  de PVP,  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose, e diferentes concentrações de BAP (0; 0,25; 0,5; 0,75 e  $1,0\text{mg L}^{-1}$ ) e ANA (0, 0,05 e  $0,1\text{mg L}^{-1}$ ) (Tabela 1). O meio de cultivo foi solidificado com  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar.

TABELA 1 Tratamentos em função da combinação entre os reguladores de crescimento BAP e ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Reguladores de crescimento	
	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T01	0	0
T2	0,05	0
T3	0,01	0
T4	0	0,5
T5	0,05	0,5
T6	0,01	0,5
T7	0	01
T8	0,05	01
T9	0,01	01
T10	0	1,5
T11	0,05	1,5
T12	0,01	1,5
T13	0	2
T14	0,05	2
T15	0,01	2

Os calos foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15 mL de meio. Sendo o pH ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavado a 121° C e 1,0 atm por 20 minutos.

Após a transferência dos calos para os tubos, estes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±1°C, e DFFFA de 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Aos 90 dias de cultivo, foi avaliado o número de brotações formadas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 15 repetições e 10 tratamentos, sendo a unidade amostral composta por um tubo de ensaio contendo um explante cada.

Para se analisar os dados utilizou-se para comparar quais tratamentos diferem entre si, a construção de um Box-Plot (Bussab & Morettin, 1987).

## 4.2 Indução de raízes em calos de explantes foliares

Calos de pequiheiro desenvolvidos através do cultivo *in vitro* de explantes foliares em meio WPM acrescido com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e ANA + BAP, foram induzidos ao enraizamento.

Os calos foram formados em meio de cultivo Wood Plant Medium (WPM, Loyd & McCown, 1980) acrescido de 800mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, e diferentes concentrações de ANA (0; 1 e 2mg L<sup>-1</sup>) e BAP (0, 0,05 e 0,1mg L<sup>-1</sup>), e possíveis interações. (Tabela 2). O meio de cultivo foi solidificado com 7g L<sup>-1</sup> de ágar.

TABELA 2 Tratamentos em função da combinação entre diferentes concentrações dos reguladores de crescimento de ANA + BAP. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Regulador de crescimento	
	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T01	0	0
T2	1,0	0
T3	1,0	0,5
T4	1,0	1,0
T5	2,0	0
T6	2,0	0,5
T7	2,0	1,0

O experimento foi montado em delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos, 10 repetições e mantido no escuro em sala de crescimento à temperatura de 25±1°C.

Ao final de 30 dias, foi realizada avaliação observando a formação de calos, de raízes, o número de raízes, o número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz.

As análises dos dados foram realizadas por meio do teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5% e a correlação de Sperman (Zimmerman, 1989).

#### **4.3 Indução de raízes em explantes foliares**

Segmentos foliares de 3cm<sup>2</sup> retirados de folhas de plantas matrizes mantidas em sala de crescimento foram utilizados como explantes. Antes da retirada dos explantes, as folhas foram colocadas em água corrente por 12 horas e em seguida foi realizado a assepsia com álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo). Após a desinfestação, as folhas foram lavadas por três vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada, sendo então efetuada a retirada e transferência dos explantes foliares para tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15ml de meio Wood Plant Medium (WPM) (Lloyd & McCown, 1980), suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações de AIB (0; 1; 1,5; 3; 4,5 e 5mgL<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C, 1,0 atm por um período de 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes foliares foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de DFFFA luminosa à uma temperatura de 25±1°C.

Após 40 dias de cultivo foi avaliado a formação de raízes, o número de raízes, o número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz (mm).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 15 repetições, sendo que em cada tubo foi inoculado um explante foliar. Para a análise dos dados foi utilizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Indução de brotações em calos de explantes foliares

Aos 90 dias de cultivo foi observada formação de brotações apenas nos calos que foram inoculados em meio de cultivo WPM acrescido com  $2,0\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,05\text{mg L}^{-1}$  de ANA (Figura 1, T14). Essa combinação proporcionou a formação de brotações em 40% dos explantes inoculados. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que a desdiferenciação, indução e regeneração de plantas a partir de calos, são muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo, principalmente para espécies lenhosas.

A utilização de uma alta relação entre citocinina / auxina ( $2,0\text{mg L}^{-1}$  de BAP /  $0,05\text{mg L}^{-1}$  de ANA) propiciou o aparecimento de gemas adventícias formando em média 2,8 brotos / explante (Figura 1). Tsuru et al. (2000) comentam que obtiveram bons resultados ao utilizarem  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP para induzirem brotações em lavanda (*Lavandula Vera*).

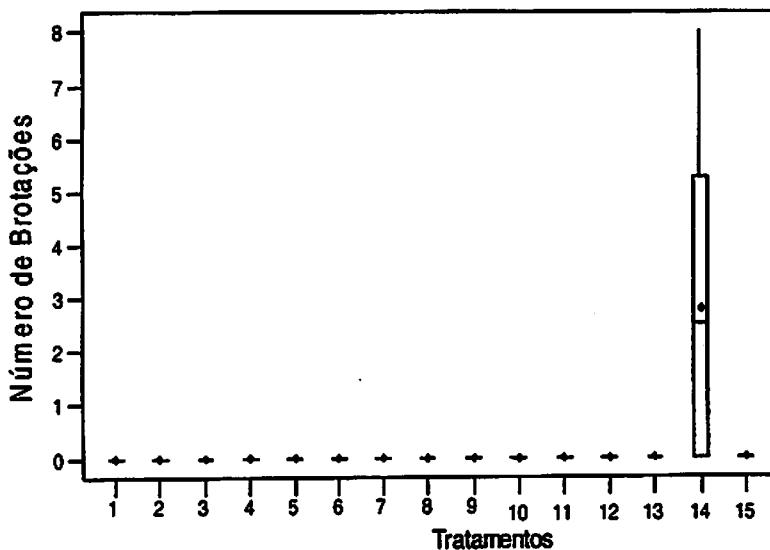


Figura 1 Número de brotações obtidos em função da combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA, sendo o T14 = 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA + 2mg L<sup>-1</sup>. Lavras, UFLA, 2004.

Landa et al. (2000), também conseguiram obter brotações em calos de pequiheiro ao utilizarem combinações entre ANA, BAP, extrato de malte e caseína hidrolisada.

A formação das gemas adventícias e o aspecto das brotações formadas a partir de calos de pequiheiro inoculados em meio de cultivo WPM acrescido com 2,0mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,05mg L<sup>-1</sup> de ANA podem ser observados na Figura 2.



FIGURA 2 Aspecto das gemas adventícias e das brotações desenvolvidas a partir de calos inoculados em meio WPM acrescido com  $2,0\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,05\text{mg L}^{-1}$  de ANA. Lavras, UFLA, 2004.

Os calos obtidos neste trabalho são caracterizados como organogênicos. Segundo Grando et al. (1993), os calos organogênicos apresentam centros meristemáticos capazes de regenerarem plantas pelo processo de organogênese. Os mesmos autores relatam que os calos embriogênicos são diferentes dos calos organogênicos por apresentarem a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea, visto que os mesmos são bipolares.

## 5.2 Indução de raízes em calos de explantes foliares

A correlação de Sperman (Zimmerman, 1989) para a presença de calos e a formação destes, foi de 0,422. Considerando o nível de significância fixado em 5% torna-se evidente que as respostas dadas a esses tratamentos apresentam uma baixa correlação linear o que indica que o aumento em média de uma das variáveis não tem consequência à outra.

A formação de calos em função dos tratamentos utilizados está demonstrada na Figura 3. Observa que na ausência de reguladores de

crescimento não houve formação de calos. Os melhores resultados foram obtidos ao se utilizar  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA,  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP e  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP, tendo esses tratamentos proporcionado 100% de formação de calos. Gomes (1999) afirma que interação entre auxina e citocininas tem sido utilizada para a indução de calogênese, e que em geral, o uso de diferentes concentrações de auxinas pode determinar a formação de raízes ou de calos.

A formação de calos aumentou em função do aumento das concentrações de ambos os reguladores de crescimento, ANA e BAP demonstrando a influência da interação entre estes dois reguladores na formação de calos (Figura 3).

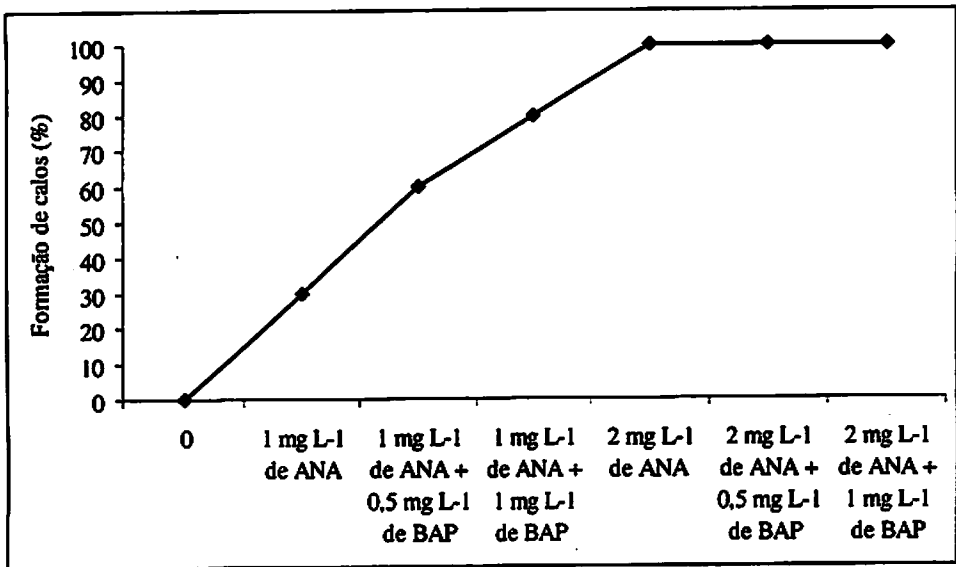


FIGURA 3 Formação de calos em função da combinação de diferentes combinações dos reguladores de crescimento ANA e BAP. Lavras, UFLA, 2004.

As respostas ao enraizamento em relação ao número de raízes formadas (Figura 4), número de raízes secundárias (Figura 5) e comprimento da raiz (Figura 6) são dadas pelos tratamentos que utilizaram  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA e  $2\text{mg}$

$L^{-1}$  de ANA +  $0,5mg L^{-1}$  de BAP (tratamentos 5 e 6, respectivamente). Por meio da matriz de correlação entre essas variáveis analisadas e sua significância (Tabela 3). Conclui-se que as variáveis são fortemente correlacionadas.

TABELA 3 Matriz de Correlação de Sperman. Lavras, UFLA, 2004.

	Nr	Nrs
Nrs	0,7385	
p-valor	0,0000	
Cmr	0,9853	0,7585
p-valor	0,0000	0,0000

O resultado apresentado por meio do teste Kruskal-Wallis refere-se à indução de raízes em calos de explantes foliares em função da utilização dos reguladores de crescimento ANA e BAP. A probabilidade do teste Kruskal-Wallis obtido para todas as características avaliadas em relação a rizogênese indireta foi igual a 0,000, o que evidencia que houve resposta significativa ao nível de 5% de probabilidade em função dos tratamentos utilizados. Em decorrência deste resultado, realizou-se a montagem de gráficos Box-plot para o número de raízes, número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz. (Figuras 4, 5 e 6).

A formação de raízes a partir de calos foi obtida apenas nos tratamentos que utilizaram  $2mg L^{-1}$  de ANA (T5),  $2mg L^{-1}$  de ANA +  $0,5mg L^{-1}$  de BAP (T6) (Figura 4). Uma alta relação entre auxina / citocinina, provavelmente favoreceu a indução e desenvolvimento de raízes. Landa et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes ao obterem enraizamento de calos formados de explantes foliares de pequiheiro cultivados na ausência de luz e em meio de cultivo WPM acrescido com  $1mgL^{-1}$  de BAP combinado com  $2mg L^{-1}$  de ANA.

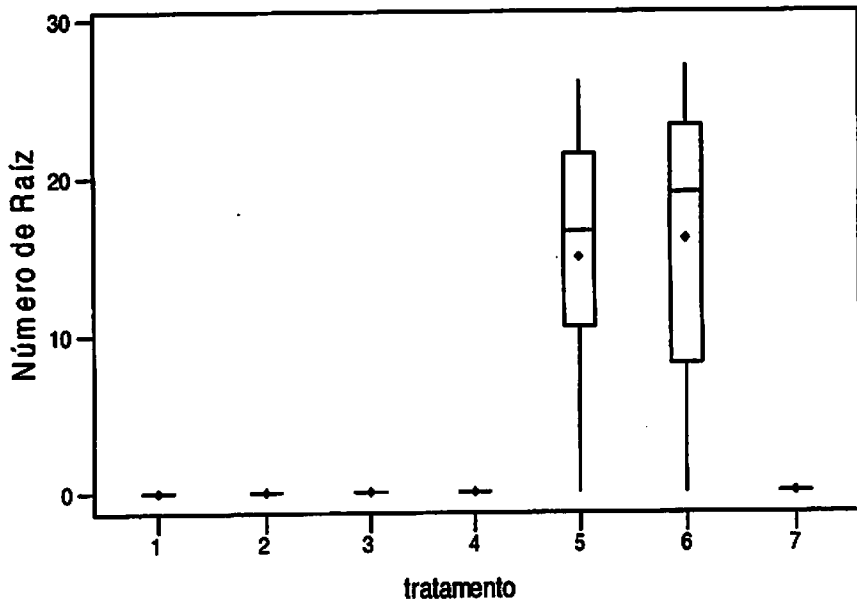


FIGURA 4 Número de raízes em função dos tratamentos utilizados. (T1) controle, (T2)  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA, (T3)  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP, (T4)  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP, (T5)  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA, (T6)  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP, (T7)  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP. Lavras, UFLA, 2004.

O maior número de raízes (16) foi obtido ao se utilizar  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP (Figura 4). O uso de  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA proporcionou a formação média de 14,9 raízes (Figura 4, T5). Apesar não ter havido diferença estatística entre estes dois tratamentos, a formação de um maior número de raízes no tratamento que combinou uma concentração maior de auxina em relação a citocinina (T6) possivelmente está relacionada a iniciação radicular pelo ANA e a multiplicação celular influenciada pelo BAP.

Ao contrário do número de raízes formados, o maior número de raízes secundárias (2,27) foi obtido ao se utilizar apenas ANA na concentração de  $2\text{mg L}^{-1}$  (Figura 5, T5). O uso de  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP proporcionado a formação de 2 raízes secundárias por explante (Figura 5, T6).

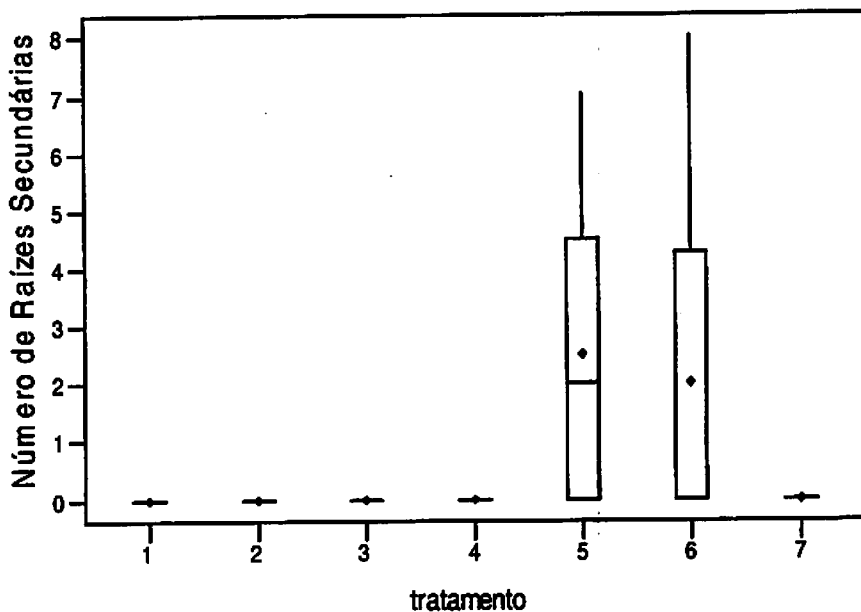
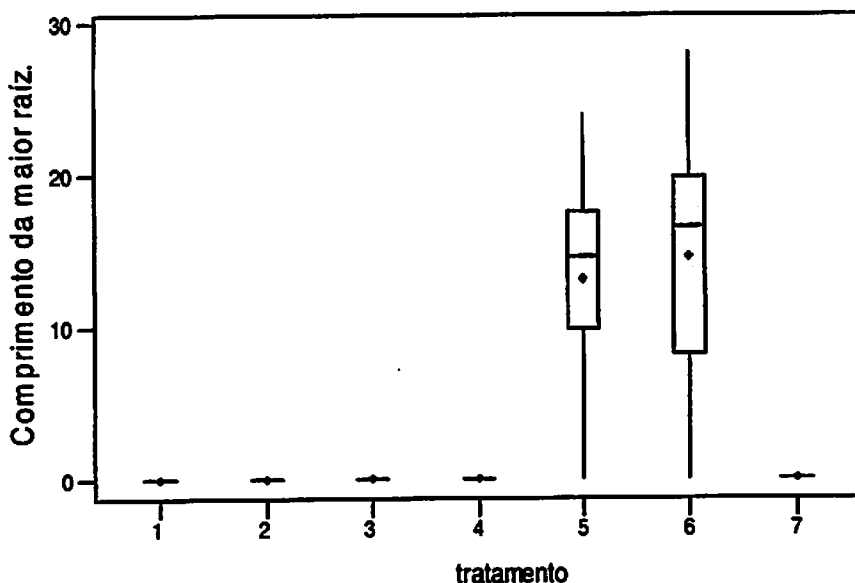


FIGURA 5 Número de raízes secundárias em função dos tratamentos utilizados. (T1) controle, (T2)  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA, (T3)  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP, (T4)  $1\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP, (T5)  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA, (T6)  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP, (T7)  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{mg L}^{-1}$  de BAP. Lavras, UFLA, 2004.

As raízes formadas a partir dos calos apresentaram seu maior comprimento ( $14,2$ ) na presença de  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP (Figura 6, T6). O uso de  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA promoveu o crescimento das raízes até o comprimento máximo de  $13,1$  mm (Figura 6, T5).



**FIGURA 6** Comprimento da maior raiz em função dos tratamentos utilizados. (T1) controle, (T2)  $1\text{ mg L}^{-1}$  de ANA, (T3)  $1\text{ mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, (T4)  $1\text{ mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, (T5)  $2\text{ mg L}^{-1}$  de ANA, (T6)  $2\text{ mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, (T7)  $2\text{ mg L}^{-1}$  de ANA +  $1\text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Lavras, UFLA, 2004.

O aspecto visual dos calos e das raízes obtidas na presença de ANA e BAP é observado neste trabalho pode ser observado por meio da Figura 7.

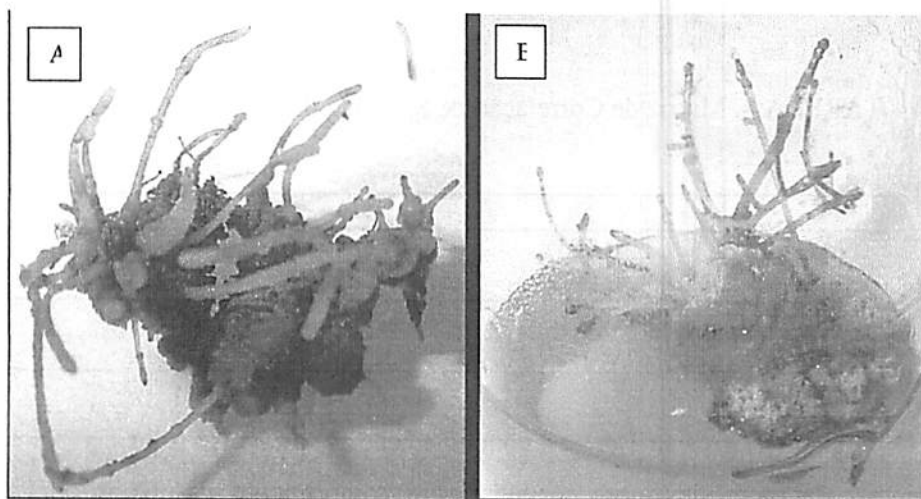


FIGURA 7 Aspecto visual dos calos formados e das raízes formadas em função da utilização de  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA (A), e  $2\text{mg L}^{-1}$  de ANA +  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP (B). Lavras, UFLA, 2004.

### 5.3 Indução de raízes em explantes foliares

A probabilidade do teste Kruskal-Wallis obtido para todas as características avaliadas em relação a formação de raízes em explantes foliares direta foi igual a 0,000, o que evidencia que houve resposta significativa ao nível de 5% de probabilidade em função dos tratamentos utilizados. Em decorrência deste resultado realizou-se a montagem de gráficos Box-plot para o número de raízes, número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz formadas diretamente do tecido foliar, (Figuras 9, 10, 11), respectivamente.

Conforme se pode observar na Figura 8 basicamente a resposta é obtida nos tratamentos que utilizaram 2, 3 e  $4\text{mg L}^{-1}$  de AIB, sendo que o tratamento que utilizou  $3\text{mg L}^{-1}$  é o que apresenta as maiores médias para todas as características avaliadas (formação de raiz, número de raízes, número de raízes secundárias e comprimento da maior raiz). Para melhor confirmação deste fato,

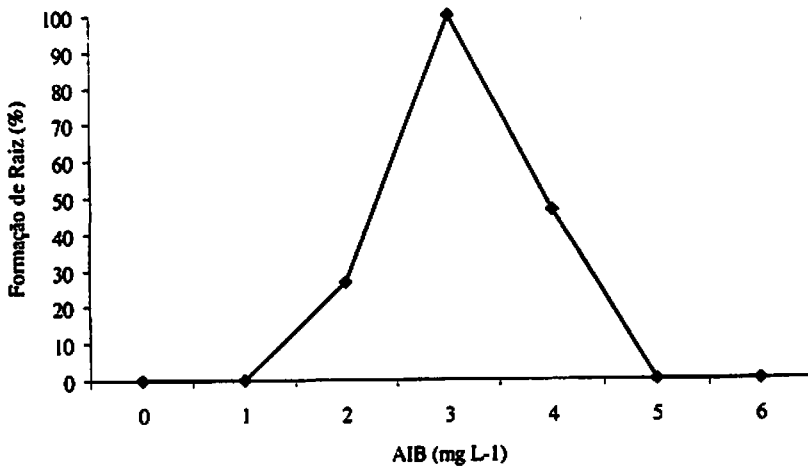
segue-se abaixo a matriz de correlação entre as variáveis analisadas e sua significância (Tabela 4).

TABELA 4. Matriz de Correlação de Sperman. Lavras, UFLA, 2004.

	Nr	Nrs
Nrs	0,9918	
p-valor	0,0000	
Cmr	0,9667	0,9667
Pvalor	0,0000	0,0000

Assim através da Tabela 4 conclui-se que as variáveis estudadas (Número de raiz, Numero de raízes secundárias e comprimento da maior raiz) são fortemente correlacionadas.

O uso de 3mg L de AIB propiciou 100% de formação de raízes em explantes foliares (Figura 8). Segundo Pasqual et al. (2000), Zimmerman, (1981); George & Sherrinton, (1984) o AIB é o regulador de crescimento mais indicado para induzir o enraizamento *in vitro*.



**FIGURA 8** Formação de raízes em explantes foliares em função das diferentes concentrações de AIB utilizadas. Lavras, UFLA, 2004.

Observa-se que o aumento na formação de raízes é progressivo até a concentração de  $3\text{mg L}^{-1}$  (Figura 8) com redução em concentrações superiores. Gattapaglia & Machado (1998) comentam que a auxina é importante para as fases iniciais da formação de raízes, mas pode ser inibitória em fases subsequentes. George (1996) relata que o aumento da concentração de auxinas no meio de cultivo pode induzir um aumento no número de raízes formadas em explantes de várias espécies, no entanto, quando as concentrações são elevadas, pode-se observar a formação de calos em detrimento da formação de raiz.

O maior número de raízes (2,29) foi obtido ao se inocular os explantes foliares em meio acrescido com  $3\text{mg L}^{-1}$  de AIB (Figura 9, T4). A utilização de  $2\text{mg L}^{-1}$  e  $4\text{mg L}^{-1}$  de AIB induziram a formação de 0,53 (Figura 9, T3) e 1,27 (Figura 9, T5) raízes, respectivamente.

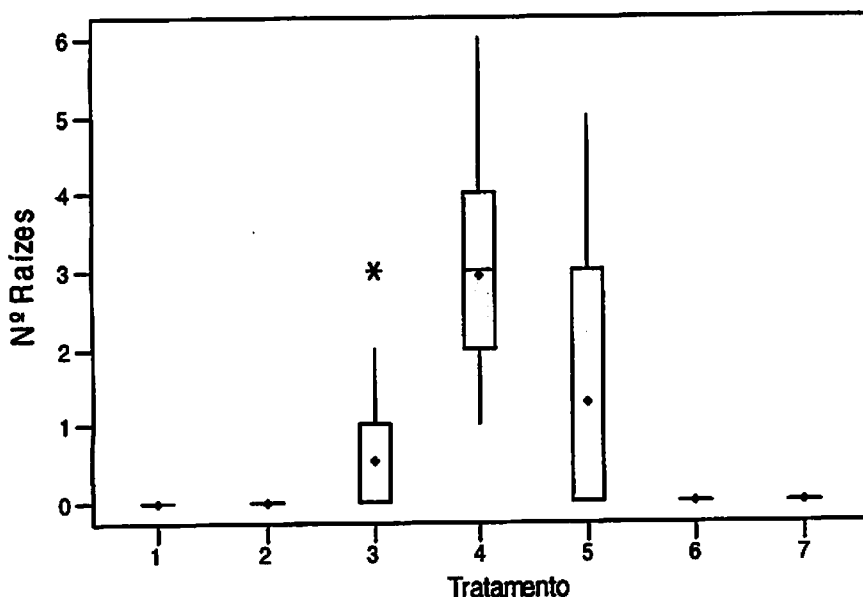
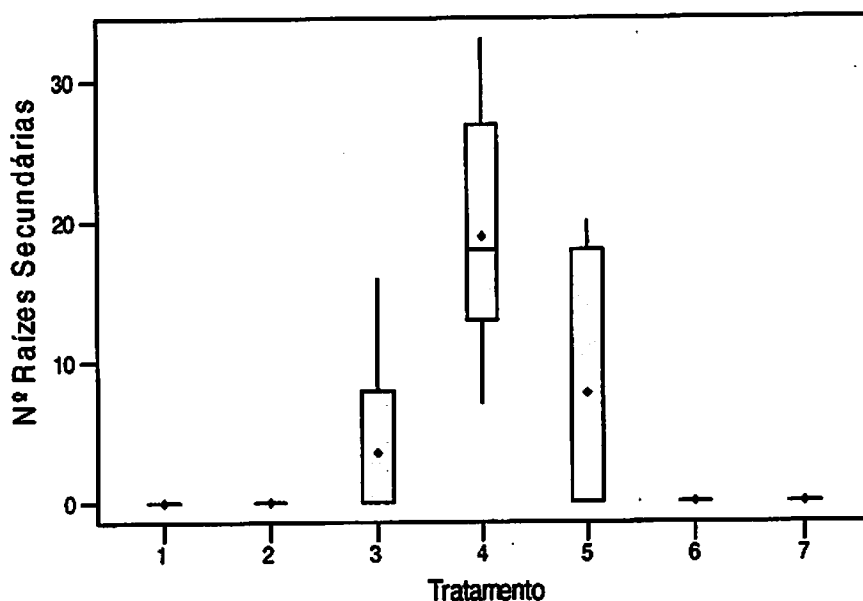


FIGURA 9 Número de raízes formadas em explantes foliares em função das diferentes concentrações de AIB utilizadas. (T1) controle, (T2) 1mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T3) 2mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T4) 3mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T5) 4mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T6) 5mg L<sup>-1</sup> de AIB e (T7) 6mg L<sup>-1</sup> de AIB. Lavras, UFLA, 2004.

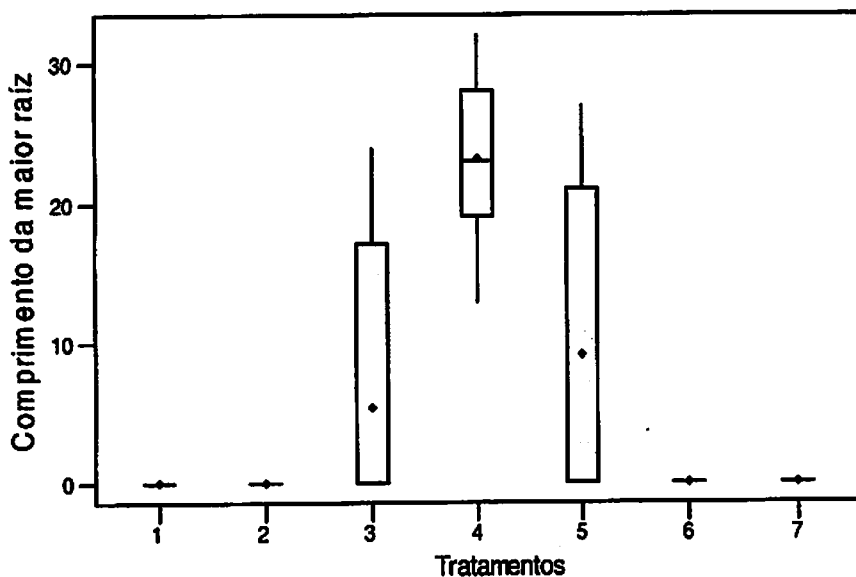
Paiva Neto et al. (1998) trabalhando com salgueiro do rio (*Salix humboldtiana* Willd.) induziram a formação de raízes adventícias em explantes foliares através do acréscimo da auxina ANA no meio de cultivo.

Resultados mais expressivos para a formação de raízes secundárias foram obtidos com a utilização de 3mg L<sup>-1</sup> de AIB apresentando uma média de 18,93 raízes secundárias por explante foliar (Figura 10, T10). Entre os tratamentos que induziram a formação de raízes, o menor resultado foi 3,53 raízes secundárias, obtido ao se utilizar 2mg L<sup>-1</sup> (Figura 10, T3).



**FIGURA 10** Número de raízes secundárias formadas em explantes foliares em função das diferentes concentrações de AIB utilizadas. (T1) controle, (T2) 1mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T3) 2mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T4) 3mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T5) 4mg L<sup>-1</sup> de AIB, (T6) 5mg L<sup>-1</sup> de AIB e (T7) 6mg L<sup>-1</sup> de AIB. Lavras, UFLA, 2004.

O maior comprimento de raízes (23,7mm) foi obtido através da utilização de 3mg L<sup>-1</sup> de AIB. A utilização de 2 e 4mg L<sup>-1</sup> de AIB, induziram o comprimento de 5,7mm (Figura 11, T3) e 9,13mm (Figura 11, T9) de comprimento respectivamente (Figura 11).



**FIGURA 11** Comprimento das raízes formadas em explantes foliares em função das diferentes concentrações de AIB utilizadas. (T1) controle, (T2)  $1\text{mg L}^{-1}$  de AIB, (T3)  $2\text{mg L}^{-1}$  de AIB, (T4)  $3\text{mg L}^{-1}$  de AIB, (T5)  $4\text{mg L}^{-1}$  de AIB, (T6)  $5\text{mg L}^{-1}$  de AIB, (T7)  $6\text{mg L}^{-1}$  de AIB. Lavras, UFLA, 2004.

O aspecto das raízes desenvolvidas por organogênese direta a partir de explantes foliares pode ser observado na Figura 12.

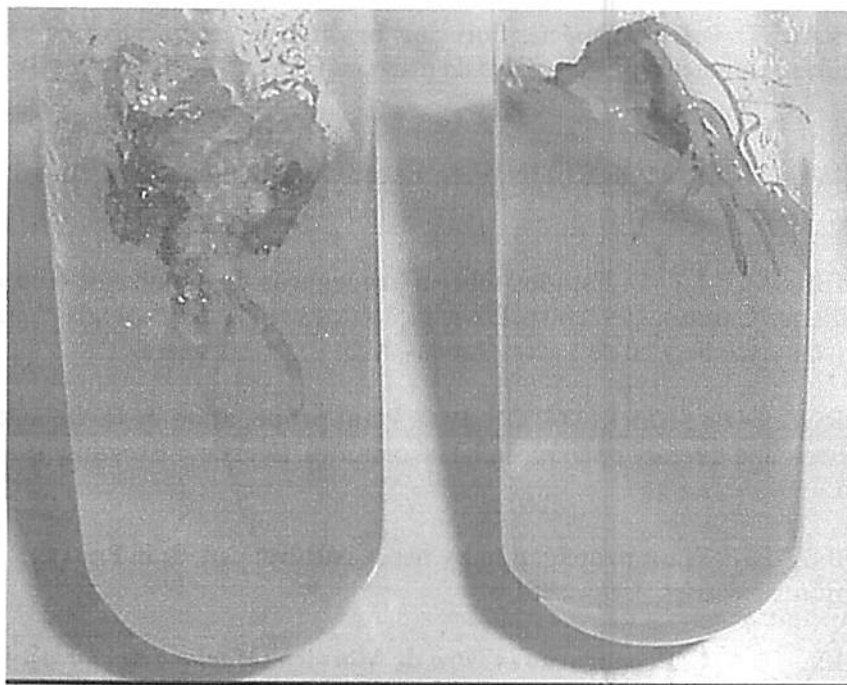


FIGURA 12 Aspecto visual das raízes desenvolvidas a partir de explantes foliares inoculados em meio WPM acrescido com  $3\text{mg L}^{-1}$  de AIB. Lavras, UFLA, 2004.

## 6 CONCLUSÕES

A utilização de  $2\text{mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,05\text{mg L}^{-1}$  de ANA induziu brotações adventícias em calos de pequizeiro.

Obteve-se a formação de raízes em calos de pequizeiro através da inoculação de explantes foliares em meio acrescido com  $2\text{mg L}^{-1}$  ANA e  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de BAP.

Para a indução de raiz via organogênese direta em explantes foliares recomenda-se a utilização de  $3\text{mg L}^{-1}$  de AIB.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Paraná: EMBRAPA, 1994. 640 p.
- BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica.** São Paulo Editora Atual, 1987.
- DOMBROSKI, J. L. D. **Estudos sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.).** 1997. 80 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories.** Eversley: Exegtics, 1984. 709 p.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture; part. 2; In Practice.** 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.
- GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*).** 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; TANABE, C. R.; SANTOS, J. F. dos; SANTOS, C. M. dos. **Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v. 5, n. 2, p. 139-144, dez. 1993.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.
- GRIBEL, R.; HAY, J. D. **Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* in Central Brazil cerrado vegetation.** *Journal of Tropical Ecology*, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 199-211, May 1993.
- LANDA, F. de S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; BUENO FILHO, J. S. de S. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense***

Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, dez. 2000. Edição especial.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstract. 321.

MELO, J. T. de; GONÇALVES, A. N. **Inibidores de germinação no fruto e em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1991. 11 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de pesquisa, n. 34).

PAIVA NETO, V. B.; PAIVA, R.; FURTADO, D. E. Indução de raízes adventícias em explantes de salix (*Salix humboldtiana* Willdenow). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 85-90, mar. 1998.

PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; MACIEL, A. L. R.; PEREIRA, A. B.; ALVES, J. M. C. Enraizamento *in vitro* de um porta – enxerto de macieira em diversos substratos. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4 p. 781-784, out./dez. 2000.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA, 1997. 159 p.

TRIOLA, M. F. **Introdução a Estatística**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.

TSURO, M.; KODA, M.; INOUE, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system” **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 81-88, Sept. 2000.

ZIMMERMANN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 217-222, 1981.

ZIMMERMAN, F. S. P. Introdução dos Processos Não Paramétricos, In: 3º Simpósio de Estatística Aplicada a Experimentação Agronômica. Depto de Ciências Exatas, UFLA, MG, 1989, 104 p.

## **CAPÍTULO XI**

### **ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS**

## 1 RESUMO

SANTOS, Breno Régis. Enraizamento *in vitro* de brotações e aclimatização de plântulas. In: **Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 221-239. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A propagação do pequiheiro via cultivo *in vitro* é uma alternativa promissora para a produção de mudas de qualidade e em larga escala. Dentro das etapas da cultura de tecidos, o enraizamento é fundamental para o sucesso da produção de plântulas capazes de serem aclimatizadas, formando mudas de qualidade e aptas para o campo. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do AIB e carvão ativado na indução de raízes em brotações de pequiheiro, bem como aclimatizar as plântulas obtidas. Para o estudo da indução de raízes, brotações foram transferidas para meio WPM suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g L<sup>-1</sup> de ágar, diferentes concentrações de AIB (0; 1,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 5mg L<sup>-1</sup>) e na presença ou não de carvão ativado. As plântulas obtidas foram transferidas para sacos de polietileno contendo o substrato, cobertas com uma garrafa tipo *pet* com tampa para manter umidade, a qual foi reduzida gradualmente até as plântulas estarem aclimatizadas. Foi observada a formação de raízes apenas nas brotações que foram inoculadas na presença de AIB. Na ausência de carvão ativado, as brotações apresentaram formação de calos em sua base. Os resultados indicam o uso de AIB na concentração de 3mg L<sup>-1</sup> e carvão ativado para a indução de raízes em brotações de pequiheiro. Foi possível aclimatizar plântulas de pequiheiro provenientes do cultivo *in vitro* aos 30 dias após o transplantio. As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* com carvão ativado apresentaram uma maior taxa de sobrevivência na aclimatização.

## 2 ABSTRACT

SANTOS, Breno Régis. *In vitro* rooting of shoots and seedling acclimatization. In: **Micropropagation of pequi tree (*Caryocar brasiliense* camb.)**. 2004. P. 221 - 239. (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG

The propagation of the pequi tree via *in vitro* cultivation is a promising alternative for production of high quality seedlings on large scale. Considering the steps of tissue culture, rooting is fundamental to the success of production of seedlings capable of being acclimatized, giving rise to seedlings of high quality and able to grow under field conditions. This work aimed to verify the effect of AIB and activated charcoal in inducing of roots on pequi tree shoots, as well as acclimatize the seedlings obtained. For the study of root induction, shoots were transferred to WPM medium supplemented with  $30\text{g L}^{-1}$  of sucrose,  $7\text{g L}^{-1}$  of agar, different concentrations of AIB (0; 1.0; 1.5; 3.0; 4.5 and  $5\text{mg L}^{-1}$ ) and in the presence and absence of activated charcoal. The seedlings obtained were transferred into polyethylene bags containing the substrate, covered with a *per* type bottle with a lid to maintain humidity, which was decreased gradually when the seedlings were acclimatized. The formation of roots was observed only on the shoots which were inoculated in the presence of AIB. In the absence of activated charcoal, the shoots presented callus formation on their bases. The results point out the use of AIB at the concentration of  $3\text{mg L}^{-1}$  and activated charcoal the best treatment for root induction on pequi tree shoots. It was possible to acclimatize pequi tree seedlings coming from *in vitro* cultivation at 30 days after transplanting. The seedlings coming from *in vitro* cultivation with activated charcoal presented an increased survival rate in acclimatization.

### 3 INTRODUÇÃO

A propagação do pequizeiro via cultivo *in vitro* é uma alternativa promissora para a produção de mudas de qualidade e em larga escala.

Dentro das etapas da cultura de tecidos, o enraizamento é fundamental para o sucesso da produção de plântulas capazes de serem aclimatizadas, formando mudas de qualidade e aptas para o campo. A fase de enraizamento *in vitro* caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplântio da plântula para condições *ex vitro*. A obtenção de uma plântula com sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento nas novas condições ambientais (Pio et al., 2002).

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo de rizogênese, principalmente nas espécies lenhosas que possuem dificuldades para enraizarem (Gaspar & Hofinger, 1988). Segundo Pasqual et al. (2000), o regulador de crescimento mais indicado para induzir o enraizamento de brotos é o ácido indolbutírico (AIB).

Alguns compostos podem ser adicionados ao meio de cultivo para auxiliar a indução da rizogênese. O carvão ativado é utilizado para estimular a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Em termos químicos, o carvão ativado exerce um efeito de retenção de alguns componentes do meio de cultivo e também é capaz de fixar citocininas residuais liberadas pelos tecidos vegetais ou absorver compostos tóxicos inibidores do enraizamento (Gomes, 1999).

Após a etapa de enraizamento as plântulas devem ser aclimatizadas para terem condições de sobreviverem em ambiente com alta luminosidade e baixa umidade. A aclimatização envolve o transplântio da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação, que, geralmente, consiste de uma fase crítica e que

pode ser um fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998).

Assim, torna-se essencial que a plântula, ao sair da condição *in vitro*, deva passar por um processo de aclimatização antes de ser levada para o campo.

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do AIB e carvão ativado na indução de raízes em brotações de pequi e aclimatizar as plântulas desenvolvidas *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações

Para o estudo da indução de raízes, brotações com aproximadamente 35mm de comprimento provenientes do cultivo *in vitro* de segmentos caulinares foram utilizadas como explantes. As brotações foram transferidas em câmara de fluxo laminar para tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15ml de meio WPM (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações de AIB (0; 1,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 5mgL<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que ocorreu a uma temperatura de 121°C, 1,0 atm por um período de 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo as brotações foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 36μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de densidade de fluxo fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) a uma temperatura de 25±1°C. Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes características: porcentagem de enraizamento, número de raízes (mm), comprimento da maior raiz e números de raízes secundárias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 15 repetições, sendo que em cada tubo foi inoculada uma brotação.

Para a análise dos dados foi utilizado o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%.

#### **4.2 Efeito do carvão ativado na indução de raízes *in vitro***

Para se verificar o efeito do carvão ativado na indução de raízes, brotações com aproximadamente 35 mm de comprimento provenientes do cultivo *in vitro* de segmentos caulinares foram utilizadas como explantes.

As brotações foram transferidas em câmara de fluxo laminar para tubos de ensaio (23 x 137mm) contendo 15ml de meio WPM (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g L<sup>-1</sup> de ágar 3,0mg L<sup>-1</sup> de AIB. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, que ocorreu a uma temperatura de 121°C, 1,0 atm por um período de 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo as brotações foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, 36μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de DFFFA luminosa à uma temperatura de 25±1°C. Aos 60 dias de cultivo as seguintes características foram avaliadas: porcentagem de enraizamento, número de raízes (mm), comprimento da maior raiz e números de raízes secundárias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 20 repetições, sendo que no primeiro tratamento o meio foi acrescido com 4g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e no segundo tratamento não foi adicionado carvão ativado ao meio de cultivo. Em cada tubo foi inoculada uma brotação.

Utilizou-se para a análise dos dados o teste de probabilidade Kruskal-Wallis (Triola, 1999), considerando significância de 5%.

### 4.3 Aclimatização de Plântulas

Plântulas desenvolvidas *in vitro* na presença ( $4\text{g L}^{-1}$ ) e ausência de carvão ativado em meio WPM suplementado com  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose, acrescido com  $3,0\text{mg L}^{-1}$  de AIB e solidificado com  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar, tendo seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, foram utilizadas como material vegetal.

Após serem mantidas 60 dias no meio de cultura, as plântulas foram transferidas para sacos de polietileno ( $577\text{ cm}^3$ ) contendo o substrato composto por terra de subsolo, areia lavada e esterco (2:1:1), o qual foi auto

clavado à uma temperatura de  $120\text{ }^\circ\text{C}$  e  $1,0\text{ atm}$  por 30 minutos antes de ser utilizado. Após a transferência, as plântulas foram cobertas com uma garrafa tipo *pet* com tampa (Figura 1) e colocadas sobre caixa tipo gerbox contendo água destilada para manter a umidade semelhante à encontrada nas condições *in vitro*, e mantidas em sala de aclimatização ( $12\text{ h}$  de DFFFA de fótons de  $60\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ).



Figura 1 Plântulas de pequizeiro em aclimatização. Lavras, UFLA – 2004

Durante o período de aclimatização a tampa da garrafa *pet* foi aberta gradativamente até a total remoção aos 20 dias após o transplântio. A cobertura plástica foi totalmente retirada com 30 dias quando se considerou a plântula totalmente aclimatizada. Ao final deste período foi avaliada a porcentagem de plantas vivas em função dos tratamentos dos quais as plântulas foram provenientes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado contando de 2 tratamentos (plântulas provenientes da etapa de enraizamento em meio de cultivo contendo carvão ativado e sem este) e 15 repetições. Ao fim de 30 dias foi observada a porcentagem de plantas vivas. A análise estatística foi realizada através do teste de médias através do método Scott-Knott.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações de pequiizeiro

Os resultados relativos à influência do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações de pequiizeiro (Tabela 1) referem-se à probabilidade do teste Kruskal-Wallis (KW) para os tratamentos avaliados. Considerando o nível de significância fixado em 5%, verificou-se, para as quatro variáveis analisadas, que os tratamentos diferem entre si, com exceção para o número de raízes secundárias, o qual não foi significativo.

TABELA 1 – Probabilidades do Teste Kruskal-Wallis (KW) para o efeito do AIB no enraizamento de brotações *in vitro* de pequiizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

Variável	Probabilidade do teste KW
Porcentagem de indução	0,000
Número de raízes	0,000
Comprimento de raiz	0,000
Número de raízes secundárias	0,066

Os resultados demonstram que não houve indução de raízes em brotações de pequiizeiro na ausência de AIB (Figura 1). Este resultado demonstra que a utilização do AIB é essencial neste processo de indução de raízes em brotações de pequiizeiro. Resultado semelhante foi relatado por Pio et al. (2002) ao obter enraizamento de brotações de *Tangerina sunki* x *Trifoliata english* utilizando 6mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Observou-se um acréscimo na porcentagem de indução de raízes nas brotações (de 0 a 100%) até a concentração de 3mg L<sup>-1</sup>, tendo concentrações superiores provocado a queda na indução de raízes, chegando a total inibição quando foram utilizadas 5mg L<sup>-1</sup>. Este resultado deve-se a uma possível inibição

do processo de rizogênese nas brotações de pequizeiro pela presença no meio de cultura de concentrações de AIB acima de  $3\text{mg L}^{-1}$ . Grattapaglia & Machado (1998) comentam que a auxina é importante nas duas fases iniciais da rizogênese (indução e iniciação), mas pode ser inibitória na última fase (alongação).

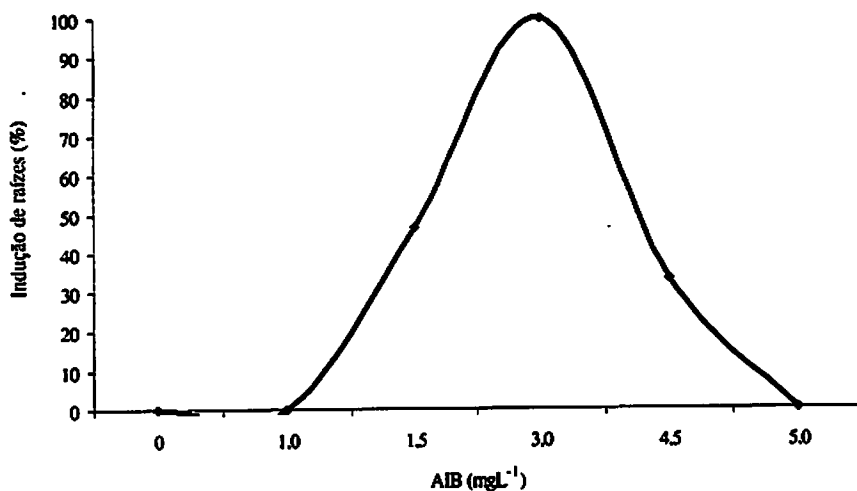
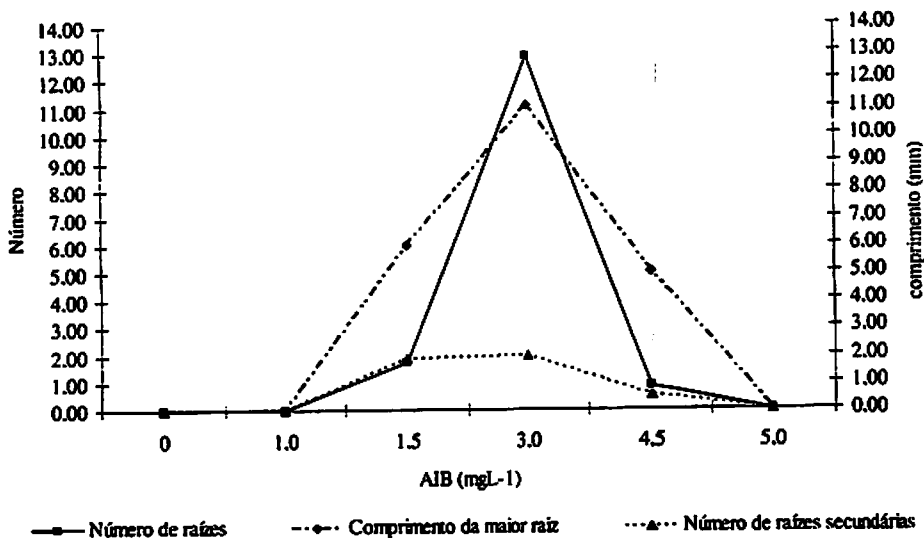


FIGURA 2 Porcentagem de indução de raiz em função das concentrações de AIB utilizadas. Lavras, UFLA, 2004.

Observou-se um comportamento semelhante ao encontrado para a porcentagem de indução de raízes nas brotações, ou seja, para os resultados das demais características avaliadas: número de raízes, comprimento da maior raiz e número de raízes secundárias. Um acréscimo nos valores destas características até a concentração de  $3\text{mg L}^{-1}$  com inibição em concentrações em condições acima desse valor (Figura 2). Estas observações estão de acordo com George (1996), o qual comenta que, com o aumento da concentração de auxina no meio de cultivo, aumenta-se também o enraizamento de brotações de várias espécies. No entanto, quando esta concentração se eleva, ocorrem diminuição do enraizamento e a presença de calos.



**FIGURA 3** Número de raízes, comprimento da maior raiz e número de raízes secundárias em função das concentrações de AIB utilizadas. Lavras, UFLA, 2004.

A utilização de 3mg L<sup>-1</sup> de AIB proporcionou a indução de raízes em 100% dos explantes, gerando um número médio de 12,87 por brotação. As concentrações de 1,5mg L<sup>-1</sup> e 4,5mg L<sup>-1</sup> induziram a formação de 1,73 e 0,87 raízes por brotação, respectivamente. Os resultados encontrados por Barbosa et al. (2004) para o enraizamento de figueira (cultivar Roxo de Valinhos) foram inferiores aos encontrados para o pequizeiro, sendo obtido com a utilização de 6mg L<sup>-1</sup> de AIB o enraizamento em 92% dos propágulos, com emissão de 7 raízes por explante.

O comprimento da maior raiz e o número de raízes secundárias também aumentaram de acordo com o aumento da concentração de AIB até a concentração de 3mg L<sup>-1</sup>, apresentando os valores de 11,07 e 2,0mm, respectivamente.

Resposta antagônica a estes resultados foi obtida por Lopes et al. (2001), os quais relataram que o AIB não proporcionou bons resultados no enraizamento

de mogno (*Swietenia macrophylla* King.). Leite et al. (1994), não observaram efeito positivo da utilização de AIB na indução de raízes de pereira.

## 5.2 Efeito do carvão ativado na indução de raízes *in vitro*

A análise estatística para a influência do carvão ativado na indução de raízes em brotações de pequiheiro, conforme a Tabela 2, refere-se à probabilidade do teste Kruskal-Wallis para as características número de raízes, comprimento de raiz e número de raízes secundárias. Para a porcentagem de indução de raízes, todos os tratamentos apresentaram 100 % de indução.

TABELA 2 Probabilidades do teste Kruskal-Wallis (KW) para enraizamento com carvão ativado e sem carvão ativado. Lavras, UFLA , 2004.

Variável	Probabilidade do teste KW
Número de raízes	0,000
Comprimento de raiz	0,000
Número de raízes secundárias	0,000

Considerando o nível de significância fixado em 5%, verificou-se que os resultados diferem entre si para as três variáveis analisadas.

Os resultados demonstram que houve a formação de raízes nas brotações inoculadas em meio de cultura contendo carvão ativado e nos meios sem carvão ativado. Entretanto, todas as brotações desenvolvidas na ausência de carvão ativado apresentaram formação de calos em sua base, o que pode interromper a ligação entre as raízes e a brotação, dificultando uma futura aclimatização. Resultados semelhantes foram encontrados por Santos (2001), ao observar que brotações de salix (*Salix humboldtiana* Willd.) desenvolvem calos na base da brotação quando estas são inoculadas em meio sem carvão ativado.

As médias originais obtidas em função dos tratamentos com e sem carvão ativado, estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3 Média dos resultados obtidos em função do efeito da presença e ausência de carvão ativado no enraizamento de brotações de pequizeiro. Lavras, UFLA, 2004.

Tratamento	Porcentagem de indução de raízes	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (mm)	Número de raízes secundárias
Com carvão ativado	100	7,95	33,16	19,53
Sem carvão ativado	100	18	11,8	4,35

Maior número de raízes foi obtido na ausência de carvão ativado (média de 18 raízes desenvolvidas por brotação). Na presença de carvão ativado, foi obtida uma média de 7,95 raízes por explante. Entretanto, as raízes desenvolvidas no meio de cultivo contendo carvão ativado se apresentaram maiores (33,16 mm em média) e com um número maior de raízes secundárias (19,53).

Uma menor quantidade de raízes secundárias pode afetar o processo de aclimatização, segundo Deberg & Maene (1984), isto ocorre devido à falta de raízes adventícias e pêlos absorventes. Esta afirmação corrobora os resultados deste trabalho, no qual a utilização do carvão ativado resultou na indução de raízes secundárias.

Gomes (1999) relata que o carvão ativado é um dos compostos mais utilizados para auxiliar a rizogênese *in vitro*, por possuir a capacidade de fixar auxinas e reter fenóis, sendo, de forma geral, benéfico por promover o alongamento das raízes.

O aspecto visual das brotações e raízes desenvolvidas em meio de cultivo acrescido com carvão ativado pode ser observado na Figura 3.

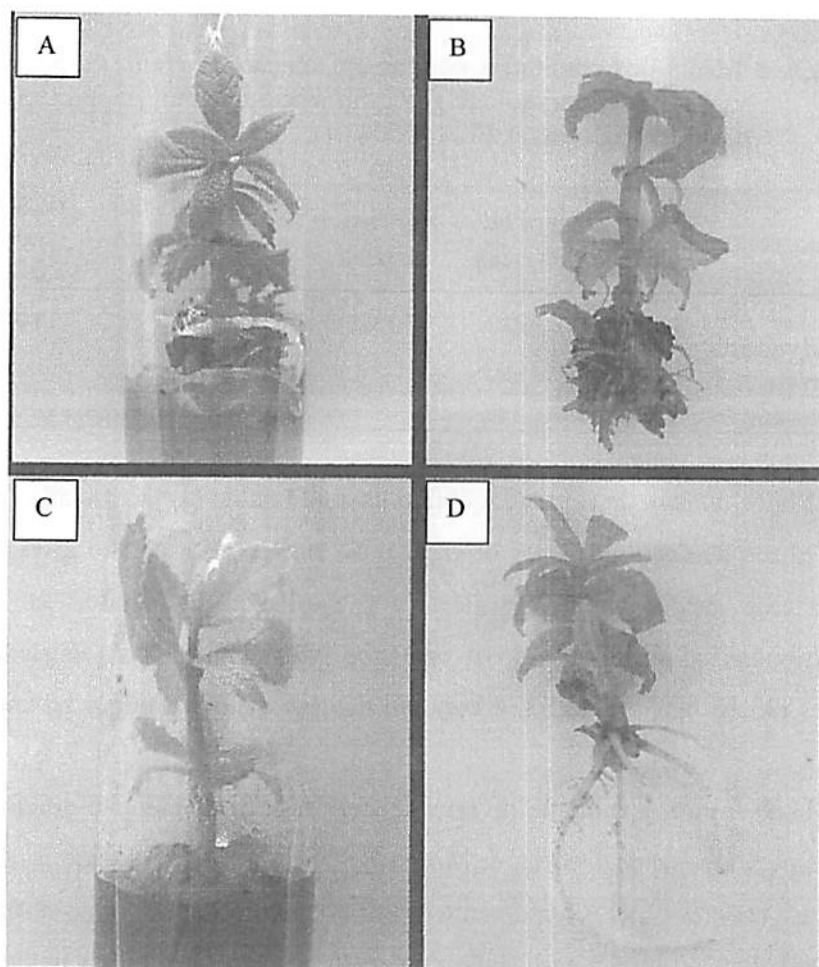


FIGURA 4 Brotações enraizadas em meio de cultivo sem carvão ativado (A e B) e brotações enraizadas em meio de cultivo acrescido de carvão ativado (C e D). Lavras, UFLA, 2004.

### 5.3 Aclimatização de Plântulas

Os resultados apresentados por meio da Tabela 4 evidenciam que houve diferença estatística ao nível de 5% de significância, demonstrando que as plântulas provenientes do cultivo *in vitro* em meio WPM acrescido com 4 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (Cca) apresentou proporções maiores de plantas vivas em relação as plântulas provenientes do meio de cultivo com ausência de carvão ativado (Sca).

Tabela 4 Porcentagem de plantas aclimatizadas vivas.

Tratamento	Plantas Vivas (%)
Sca	26,6 a
Cca	60,0 b



Figura 5 Plântula de pequizeiro aclimatizada aos 30 dias após o transplântio.  
Lavras, UFLA – 2004

A maior porcentagem de aclimatização (60%) foi obtida por este trabalho ao se utilizar plântulas provenientes do cultivo *in vitro* com  $4\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado, este resultado pode estar ligado a uma melhor formação de raízes como foi observado no experimento anterior. Este resultado corrobora Santos (2001), quando obteve 90% de sobrevivência durante a aclimatização, trabalhando com plântulas de *Salix humboldtiana* provindas da fase de enraizamento utilizando meio WPM acrescidos de  $4\text{g L}^{-1}$  de carvão ativado. Bons resultados também foram obtidos por Santana (2003), utilizando carvão ativado à  $2,0\text{g L}^{-1}$  no meio de enraizamento na propagação *in vitro* de *Annona glabra*, obtendo 100 % de sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização.

## 6 CONCLUSÕES

Foi observada a formação de raízes apenas nas brotações que foram inoculadas na presença de AIB.

Na ausência de carvão ativado, as brotações apresentaram formação de calos em sua base.

O uso de AIB na concentração de  $3,0\text{mg L}^{-1}$  e carvão ativado favorecem a indução de raízes em brotações de pequizeiro.

Foi possível aclimatizar plântulas de pequizeiro proveniente do cultivo *in vitro* aos 30 dias após o transplântio.

As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* com carvão ativado apresentaram uma maior taxa de sobrevivência na aclimatização.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, W.; AMARAL, L.; VEIGA, R. F. A.; POMMER, C. V. Concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de acessos de figueira e comportamento das mudas micropropagadas. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/centros/centro%20de%20fruticultura/trabalhos%20publicados/resumos/resumos%20figo.htm>. Acesso em: 20 jun. 2004.

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

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portlant: Discorides, 1988. p. 117-131.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 2**, In Praticce. 2. ed. Englend: Exegetics, 1996.

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

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

LEITE, D. L.; PETERS, J. A.; FORTES, G. R. L.; NAKASU, B. H. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* das cvs. De pereira “Bartlett”, “Hosui” e “Okusankichi” e do clone “OH x F97”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p. 236-241, 1994.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980. Abstracts 321.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; MACIEL, A. L. R.; PEREIRA, A. B.; ALVES, J. M. C. Enraizamento *in vitro* de um porta – enxerto de macieira em diversos substratos. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 781-784, out./dez. 2000.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; MENDONÇA, V.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros *Tangerina sunki* x *Trifoliata english* 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 66-70, jan./fev. 2002.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

**TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 87-132.**

**TRIOLA, M. F. Introdução a Estatística. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1999, 410 p.**