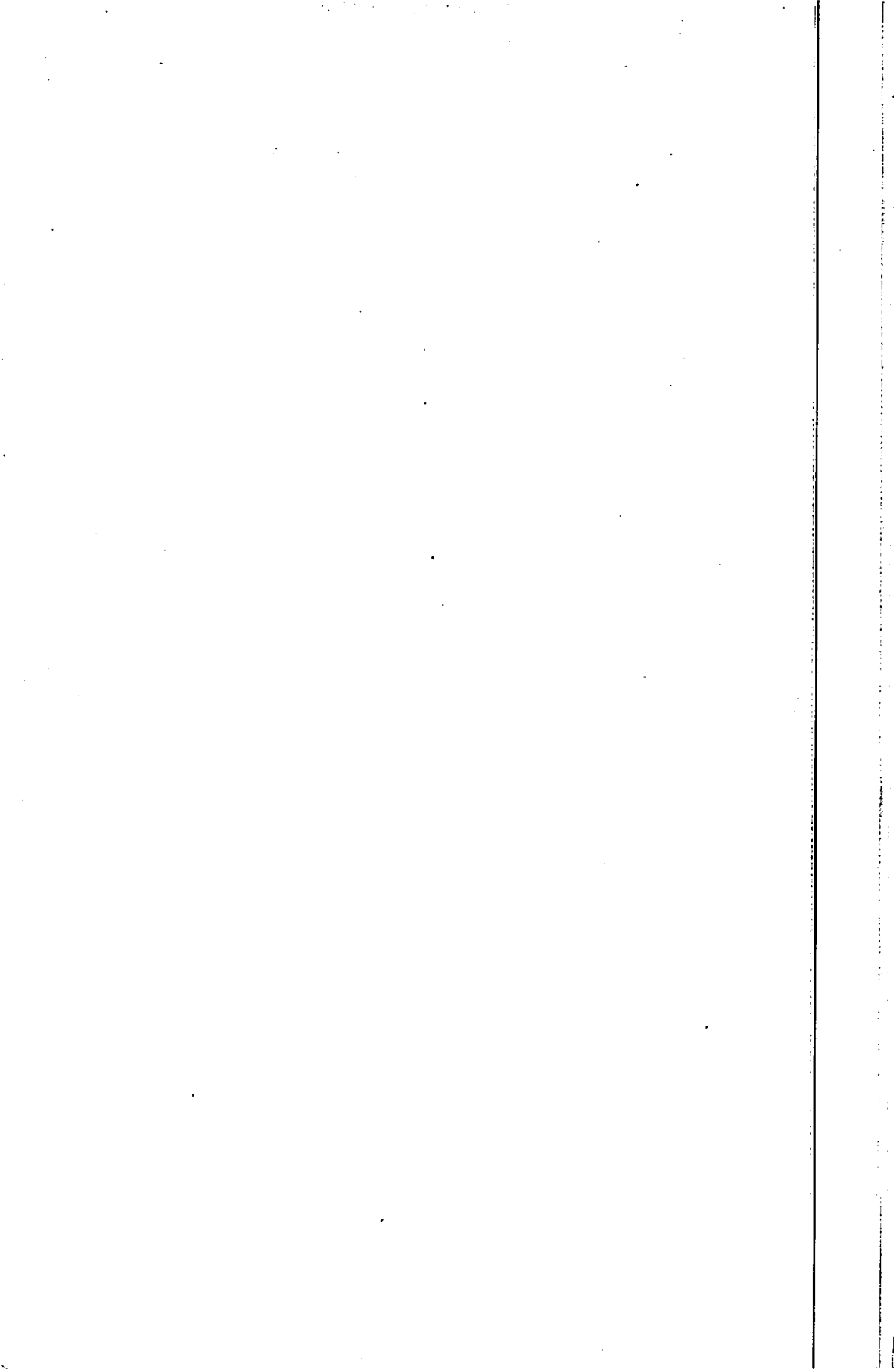


**Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-
estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd.
subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)**

VANESSA CRISTINA STEIN

2006



VANESSA CRISTINA STEIN

**Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-
estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd.
subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)**

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

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

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

Stein, Vanessa Cristina

Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de
ingazeiro (*Inga vera* Wild. subsp. *affinis* (DC) T.D. Penn.) / Vanessa Cristina
Stein. - Lavras : UFLA, 2006.

100 p. : il.

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

I. Frutíferas. 2. Cerrado. 3. Micropropagação. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-634.973322

VANESSA CRISTINA STEIN

Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)

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

APROVADA em 27 de julho de 2006

Prof. Dr. Eduardo Alves

UFLA

Prof. Dr. José Ranieri Ferreira Santana

UEFS

Prof. Dr. Antonio Paulino da Costa Neto

UEMG



Prof. Renato Paiva, PhD.

UFLA

(Orientador)

Lavras

MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua luz e seu amor e por me conceder esta oportunidade de vida e de evolução espiritual.

Aos meus pais, a minha irmã e a minha avó que souberam aceitar a distancia e sempre me dedicaram muito apoio amor e carinho.

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

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva e por toda a atenção, apoio, amizade e profissionalismo.

Aos membros da banca examinadora: Prof. José Ranieri Ferreira Santana, Prof. Antonio Paulino da Costa Neto, Prof. Eduardo Alves e Dr. Marcelo Murad Magalhães.

Aos professores da UFLA, por todos os conhecimentos transmitidos.

À professora e amiga, Vera Lucia Bobrowski, pelo incentivo, confiança e ensinamentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: Raírys, pela convivência, conselhos e valiosa ajuda; Cristiano, Patrícia, Rodrigo, Fernanda, Gabriela, Aline, Marcelo, Luciano e Letícia pela amizade, disposição e alegre companhia.

Aos funcionários técnico-administrativos: Ana Cristina, Marcelo, Joel, Lena, Evaristo, D'Artagnan, Izonel, Barrinha e Odorêncio, por todo o auxílio e pela simpatia sempre constante.

Aos grandes amigos da Fisiologia Vegetal, Franciane, Fernanda Carlota e Fernanda Soares, agradeço a convivência e amizade.

Ao amigo Lenaldo, pelo exemplo de profissional e pela contribuição a este trabalho.

A grande amiga Daiane Peixoto Vargas que, perto ou distante, esteve presente em todos os momentos; a Louise e a todos os amigos gaúchos Rafael, Letícia, Ilisandra e Juliano.

A minha família lavrense: Carminha, Tadeu e as manas emprestadas Josy e Juliana pela atenção e carinho.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
ARTIGO I.....	8
Germinação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de ingazeiro (<i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Penn.)	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAL E MÉTODOS	14
Material vegetal.....	14
Germinação <i>ex vitro</i>	14
Efeito de diferentes substratos.....	14
Germinação <i>in vitro</i>	15
Efeito de diferentes meios de cultura.....	15
Efeito do GA ₃	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
Germinação <i>ex vitro</i>	17
Germinação <i>in vitro</i>	19
Efeito de diferentes meios de cultura.....	19
Efeito do GA ₃	22
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ARTIGO II.....	28
Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (<i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Penn.)	28
RESUMO	29
ABSTRAC.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
Material vegetal.....	33
Indução de brotações	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34

CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ARTIGO III	44
Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro (<i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Penn.).....	44
RESUMO	45
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	47
Material vegetal.....	49
Curva de crescimento	49
Índice mitótico	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ARTIGO IV	56
Cultura de anteras e ovários de ingazeiro (<i>Inga vera</i> Willd. subsp. <i>affinis</i> (DC.) T.D. Penn.)	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	62
Material vegetal.....	62
Desinfestação e inoculação do material vegetal.....	63
Cultura de anteras.....	63
Tamanho do botão floral e concentrações de PVP na calogênese de anteras.....	63
Tamanho do botão floral e concentrações de 2,4 D na calogênese de anteras.....	64
Formulações de sais e fonte de carboidratos na calogênese de anteras.....	64
Cultura de ovários	64
Formulações de sais e concentrações de 2,4-D na calogênese de ovários.....	64
Meios de cultura.....	65
Cultura de anteras.....	66
Viabilidade do grão de pólen	66
Tamanho do botão floral e concentrações de PVP na calogênese de anteras.....	67

APRESENTAÇÃO

A falta de planejamento no processo de ocupação territorial do Brasil levou à destruição dos recursos naturais, particularmente das florestas. A cobertura nativa dos diversos biomas do país foi sendo fragmentada, cedendo espaço, principalmente, à monocultura e às cidades (Martins, 2001).

As regiões mais desenvolvidas, como o Sudeste e Sul, apresentam intenso processo de fragmentação florestal, que avança rapidamente para o Centro-Oeste e o Norte. A vegetação arbórea nativa fica representada somente por florestas secundárias em variado estado de degradação que leva à extinção de várias espécies da fauna e da flora e, conseqüentemente, um conjunto de problemas ambientais, como mudanças climáticas locais, erosão dos solos e o assoreamento dos cursos d'água.

Nesse contexto, o Cerrado é um dos biomas brasileiros mais seriamente degradados. Segundo Ratter et al. (1997), nos últimos 25 anos, 40% de sua extensão original foram convertidas ao uso da agricultura moderna, por intermédio das pastagens com espécies exóticas, ou arada para o cultivo de espécies anuais (soja, milho, etc.). As matas ciliares foram alvo de todo o tipo de degradação, pois sofreram pressão antrópica pela urbanização, pela construção de hidrelétricas, pela abertura de estradas, pela implantação de culturas agrícolas e pastagens, etc.

As matas ciliares são muito importantes para o ecossistema, pois elas funcionam como barreiras, retendo sedimentos, defensivos agrícolas e poluentes que seriam transportados para os cursos d'água. São

importantes também como corredores ecológicos, ligando fragmentos florestais e, portanto, facilitando o deslocamento da fauna e o fluxo gênico entre as populações de espécies animais e vegetais (Martins, 2001).

Dependendo da intensidade da degradação ambiental, fatores essenciais para a manutenção da resiliência, ou seja, recuperação da ambiental, como banco de plântulas e de sementes no solo, capacidade de rebrota das espécies, dentre outros, podem ser perdidos, dificultando o processo de regeneração natural ou tornando-o extremamente lento.

Assim, a escolha de espécies nativas regionais é importante no reflorestamento porque tais espécies já estão adaptadas às condições ecológicas locais. Além disso, no planejamento da recuperação deve-se considerar também a relação da vegetação com a fauna, que atuará como dispersora de sementes, contribuindo com a própria regeneração natural. Espécies regionais, com frutos comestíveis pela fauna, ajudarão a recuperar as funções ecológicas da floresta, inclusive na alimentação de peixes.

O *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn, pertencente à família Fabaceae, é uma espécie frutífera e medicinal nativa do cerrado, conhecida popularmente como ingazeiro pytã, ingazeiro colorado, ingazeiro, ingazeiro de quatro quinas. Apresenta frutos com 2 a 13 sementes por vagem, envoltas por uma polpa branca, levemente fibrosa, doce e comestível, rica em sais minerais (Lope, 2005). Em geral, ela é consumida ao natural e também é usada na medicina caseira, sendo útil no tratamento da bronquite e como cicatrizante (Geocities.com).

Essa espécie (Figura 1) também aparece em destaque na maioria dos estudos fitossociológicos em matas ciliares e a experimentação científica tem comprovado sua capacidade para recuperar estas áreas.

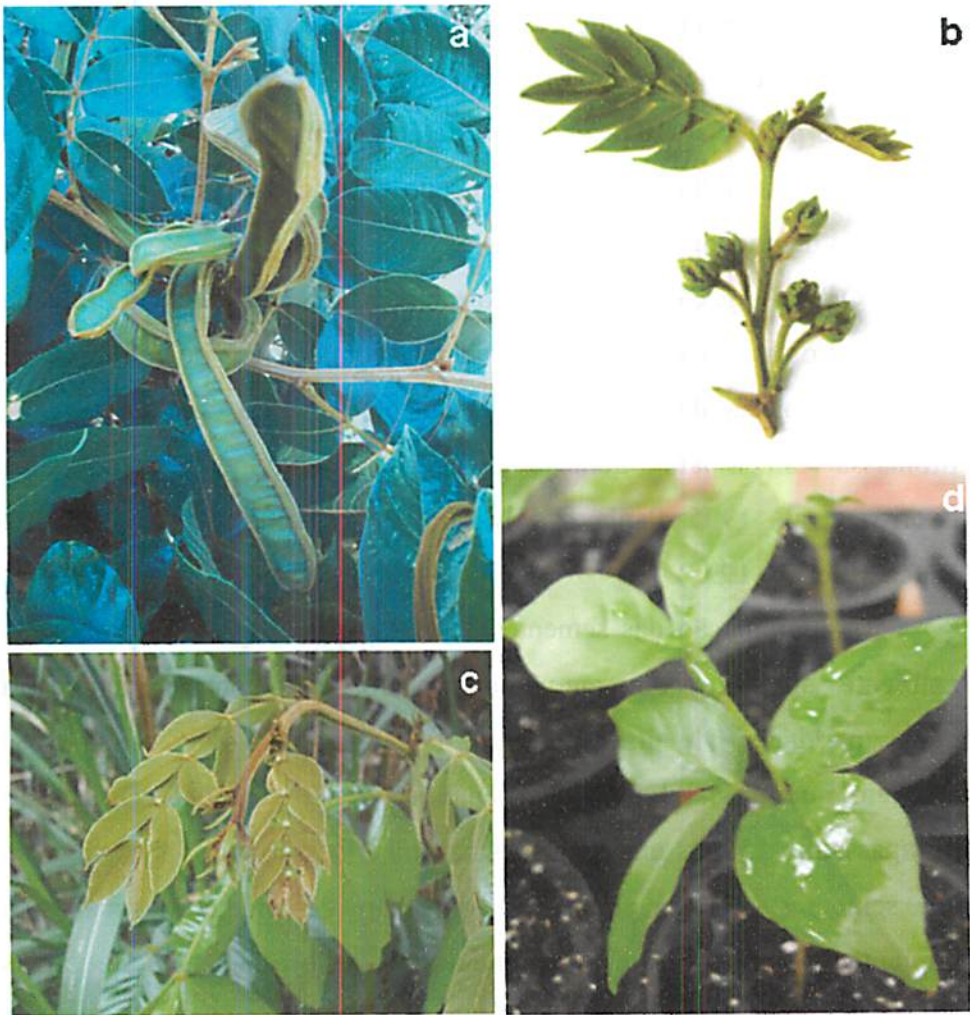


FIGURA 1. Fotografia de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. Frutos e folhas (a); Inflorescências (b); nectários extraflorais (c); plântula (d). UFLA, Lavras, 2006.

Segundo Oliveira-Filho et al. (1995), o salgueiro (*Salix* sp.) e ingazeiro-doce (*Inga vera* Willd.) apresentam raízes que possuem nódulos onde se alojam bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico (Figliolia, 1993; Lorenzi, 1992; Sanchotene, 1989), o que proporciona alta adaptabilidade a solos freqüentemente inundados como os que margeiam rios (Barbedo & Cicero, 1998). Estas características conferem à espécie um grande potencial de recuperação de áreas com risco de erosão (pela velocidade e amplitude de crescimento do sistema radicular) ou áreas de vegetação degradada.

Outras espécies deste gênero também são consideradas úteis em vários outros aspectos, como sombreamento em cultivos de café e cacau, lenha, composição de formações florestais heterogêneas com produção de fitomassa voltada para a geração de energia, fonte alimentar e fitoterapia (Correa et al., 1995; Paula & Silva Jr., 1994; Polhill & Raven, 1981; Pritchard et al., 1995).

A germinação das sementes desta espécie é favorecida tanto em ambiente controlado como em não-controlado, sendo comum o fenômeno da viviparidade (Oliveira & Beltrati, 1992). Barbedo & Cicero (1998) afirmam que a viabilidade das sementes é extremamente curta, não ultrapassando 15 dias em condições naturais. Desse modo, a propagação via sementes é inviável para a obtenção de mudas destinadas à implantação de pomares comerciais e reflorestamento de áreas degradadas.

A propagação e a conservação *in vitro* são indicadas, de modo especial, para plantas que não produzem sementes, que produzam em

pequenas quantidades ou aquelas em que as sementes sejam recalcitrantes (Barbieri, 2003), como é o caso do ingazeiro.

A cultura *in vitro* de plantas é uma técnica que não apenas apresenta importância prática na área florestal e agrícola, mas também na científica básica.

Em uma das aplicações, a embriogênese somática pode fornecer grandes quantidades de plântulas que podem servir de base para plantios no campo, tanto na área florestal quanto na agrônômica. No campo da aplicação básica, a cultura de tecidos dá suporte técnico também à bioquímica, à fisiologia vegetal, à fitopatologia e à citogenética; na bioquímica, para o estudo e o entendimento de rotas metabólicas; na fisiologia, para os estudos de crescimento e de desenvolvimento, na citogenética, para os estudos de cromossomos ou aberrações cromossômicas (Cid, 2002).

No entanto, Pescador et al. (2000) relatam que a possibilidade de manipular sistemas *in vitro* para a clonagem de genótipos vegetais superiores depende de vários fatores, desde as condições de indução da calogênese até parâmetros morfológicos, genéticos, bioquímicos e citológicos, como o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento celular, que é de fundamental importância para se obter respostas morfogenéticas nos sistemas de cultura *in vitro*.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a germinação *in vitro* e *ex vitro*; otimizar os protocolos de organogênese; avaliar a curva de crescimento e o índice de mitótico de calos; induzir a calogênese em anteras e ovários e observar características ultraestruturais embriogênicas em calos de anteras, ovários, segmentos nodais e folhas de ingazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 249-259, maio/ago. 1998.

BARBIERI, R. L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L. B. de; BERED, F. (Org.). *Genética & evolução vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

CID, L. P. B. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, D. F., v. 4, n. 25, p. 50-53, 2002.

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

FIGLIOLIA, M. B. **Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. associada à fenologia reprodutiva e à dispersão de sementes em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, município de Moji Guaçu - SP.** 1993. 150 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Geocities. Disponível em <www.geocities.com/atine50/frutas/inga.htm>. Acesso em: 5 nov. 2005.

LOPE, K. P.; BRUNO, R. DE L. A.; BRUNO, G. B. E MOURA, M. F. **Comportamento de sementes de *Inga* sp. durante o armazenamento.** Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/355.htm>. Acesso em: 5 nov. 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

MARTINS, S. V. **Recuperação de Matas Ciliares.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2001. 143 p.

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

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; VILELA, E. A.; CARVALHO, D. A.; GAVILANES, M. L. **Estudos florísticos e fitossociológicos em remanescentes de matas ciliares do Alto e Médio Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. p. 223-230.

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

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G. TAVARES, L. B. B. **Biotechnologia de *Piper hispidinervium*-Pimenta Longa**. **Biotechnologia, ciência e desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 19-23, jul./ago. 2000.

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

PRITCHARD, H. W.; HAYE, A. J.; WRIGHT, W. J.; STEADMAN, K. J. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 85-100, 1995.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. e BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 3, p. 223-230, Sept. 1997.

SANCHOTENE, M. C. C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: SAGRA, 1989. 306 p.

ARTIGO I

**Germinação *in vitro* e *ex vitro* de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp.
affinis (DC.) T.D. Penn.)**

RESUMO

Stein, Vanessa Cristina. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de ingazeiro (*Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). In: _____. **Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)** 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O *Inga vera* Will subsp *affinis* (DC). T.D. Penn. é uma espécie frutífera nativa do Cerrado, importante na recuperação de matas ciliares degradadas. Entretanto, apresenta sua propagação dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes, ou seja, não tolerarem a perda de água. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da germinação *ex vitro* e *in vitro* de ingazeiro. Para tanto, foram avaliados os efeitos de diferentes substratos: areia, Plantmax® e Areia+ Plantmax®; diferentes concentrações de sais: WPM, WPM/2, MS e MS/2, e diferentes concentrações de GA₃ (0, 5, 10, 17 e 20 µM) no meio de cultura. Observou-se que, na germinação *ex vitro*, o substrato Plantmax[®] proporcionou maior porcentagem de germinação (82%). Com relação à germinação *in vitro*, a maior porcentagem de germinação foi obtida utilizando-se meio de cultura WPM/2 (96%). A adição de GA₃ no meio de cultura não foi estatisticamente significativa, no entanto, a concentração de 20 µM de GA₃ proporcionou um aumento na germinabilidade de sementes de ingazeiro.

Palavras-chaves: frutíferas, cerrado, Plantmax®, areia, WPM, MS, GA₃.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

Stein, Vanessa Cristina. Germination *In vitro* and *ex vitro* of *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. In:_____. **Micropropagation, mitotic index and ultrastructural analysis of *Inga vera* Will subsp *affinis* (DC).** T.D. Penn. 2006. 100 p. Dissertation (Master of Science in Agronomy / Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The *Inga vera* Will subsp *affinis* (DC). T.D. Penn. is fruit specie native from the cerrado, important for recovering devastated areas. However, its propagation is complicated due to the fact that the seeds are recalcitrant and does not support water loss. The objective of this work was to study *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. *ex vitro* and *in vitro* germination aspects. For this purpose, different substrates: sand, Plantmax® and sand+ Plantmax®; different salt concentrations: WPM, WPM/2, MS and MS/2, and different GA₃ concentrations (0, 5, 10, 17 and 20 µM) were evaluated. The results showed that, in the *ex vitro* germination, the use of Plantmax® provided the highest germination percentage (82%). Regarding the *in vitro* germination, highest percentage was observed using WPM/2 (96%). Addition of GA₃ was not statistically significant although the concentration of 20 µM promoted the highest germination of *Inga vera* seeds.

Key words: fruit tree, cerrado, Plantmax, sand, WPM, MS, GA₃.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser); Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser)

INTRODUÇÃO

O *Inga vera* Will subsp *affinis* (DC). T.D. Penn. é uma espécie frutífera nativa do Cerrado, importante na recuperação de matas ciliares degradadas. No entanto, apresenta sua propagação dificultada pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes, ou seja, não tolerarem a perda de água.

Segundo Mûniz-Meléndez (1978), as sementes de ingazeiro são vivíparas, a radícula começa seu crescimento antes da abertura do fruto, quando esse ainda está ligado à planta-mãe e, ao cair sobre o solo, o fruto se decompõe e as sementes continuam seus processos germinativos. A viviparidade pode estar relacionada com o elevado teor de água após a maturação das sementes e ou com a baixa concentração de substâncias inibidoras presentes no fruto e ou na própria semente (Chin et al., 1989).

O ingazeiro floresce durante os meses de agosto e novembro e a maturação dos frutos se dá de dezembro a fevereiro (Lorenzi, 2000). Assim, a curta longevidade das sementes de ingazeiro restringe sua utilização, pois a semeadura deve ser realizada logo após a extração dos frutos (Stubsgaard, 1990). Conseqüentemente, inviabiliza-se a instalação de viveiros sob condições climáticas favoráveis à germinação e ao desenvolvimento das mudas, causando desuniformidade na produção e, além disso, limita a oferta de mudas em determinadas épocas do ano ou, ainda, torna-as disponíveis em épocas inadequadas ao plantio. A ocorrência de adversidades ambientais entre a formação e a colheita dos frutos, tais como geadas, estiagens e problemas fitossanitários, pode

provocar a diminuição na oferta de mudas, em virtude das dificuldades de manutenção de estoques de sementes (Fonseca & Freire, 2003).

Pela impossibilidade de formação de mudas em épocas distintas das que são produzidas as sementes em seu hábitat, também fica inviabilizada a sua inclusão nos programas voltados à recuperação de áreas nativas degradadas (Barbedo, 1997). Neste contexto, a multiplicação assexual é a melhor opção para superar os problemas com a propagação por meio de sementes (Hartmann & Kester, 1976).

A conservação *in vitro*, seja em condições de crescimento lento ou criopreservação de eixos embrionários isolados, ou de suas partes, é o método mais promissor para a conservação a médio e longo prazo, respectivamente (Faiad et al., 1998). Desse modo, Gomes (2003) afirma que condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser fornecidas em laboratórios por meio da multiplicação *in vitro*.

Assim, estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* de espécie recalcitrantes são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação como para obter plântulas uniformes com qualidade genética e fitossanitária adequada.

O suprimento adequado em água, composição de gases e temperatura convenientes, assim como a luz, são requisitos fundamentais para a germinação. Por outro lado, Mayer & Poljakoff-Mayber (1989) afirmam que fatores como composição química e balanço hormonal influenciam no processo germinativo. Melo et al. (1979) apontam que o tratamento de sementes com giberelinas pode promover a germinação.

O efeito de giberelinas como regulador de crescimento desencadeador do processo de germinação vem sendo comprovado em

diversas espécies. Sua atuação como indutor da transcrição de diversas hidrolases permite a mobilização de reservas a serem utilizadas pelo embrião (Taiz & Zeiger, 2004). Sendo assim, sementes que possuem uma concentração relativa de giberelina baixa, quando tratadas com ácido giberélico (GA₃) na concentração adequada, teriam uma germinação mais homogênea e em maior quantidade. Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente.

A presença de uma concentração maior ou menor de sais, ou outros compostos osmoticamente ativos, no meio de germinação, de acordo com a espécie e com o potencial osmótico de suas sementes, poderá ser o fator responsável pela adequada hidratação destas. Conseqüentemente, poderá viabilizar ou inviabilizar a ocorrência do processo germinativo, a partir de uma embebição adequada ou não (Dodd & Donovan, 1999).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Will subsp *Affinis* (DC). T.D. Penn.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Frutos maduros de ingazeiro foram coletados de populações naturais da localidade denominada cachoeira da Fumaça (21°29'15"S / 44°38'33" O), pertencente ao município de Carrancas, MG.

Germinação *ex vitro*

Efeito de diferentes substratos

Após a retirada manual do tegumento, as sementes foram acondicionadas em gerbox, contendo três diferentes tipos de substratos: areia, Plantmax[®] e areia + Plantmax[®] na proporção de 1:1 (v/v). Cada tratamento constou de cinco repetições, com dez sementes, mantidas em germinador tipo BOD (sigla em inglês para demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 25°C e fotoperíodo 16 horas. Em intervalos de dois dias, foram acrescentados 5 ml de água por gerbox.

A emergência foi avaliada aos sete e quatorze dias (BARBEDO & CÍCERO, 1998), após a semeadura, sendo considerada germinada quando houve a emergência do epicótilo. Aos quatorze dias, foram avaliados o número médio de folhas e a altura média da plântulas.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o Software Statistical Analysis System (SAS[®]). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Germinação *in vitro*

Efeito de diferentes meios de cultura

Os frutos foram lavados em água corrente por 20 minutos e transferidos para câmara de fluxo laminar, no qual foram imersos em álcool 70% (v/v) por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e autoclavada e abertos por corte longitudinal, isolando-se as sementes, que foram inoculadas em diferentes meios de cultura.

Foram testados os meios de cultura WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980), WPM/2, MS (Murashige & Skoog, 1962) e MS/2, suplementados com 3% de sacarose e solidificados com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada aos sete e quatorze dias de incubação (Barbedo & Cicero, 1998), sendo observada a percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protrundida.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 8 repetições por tratamento, cada uma composta por um frasco com 3 sementes. Os resultados foram submetidos à análise de variância (SAS[®]), sendo as médias comparadas pelos Modelos Lineares não Generalizados.

Efeito do GA₃

O processo de assepsia das sementes foi idêntico ao descrito anteriormente. Foram testados três níveis de GA₃ (0, 5, 10, 17 e 20 μM) no meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e solidificado com ágar 0,7%. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos sete e quatorze dias de incubação (Barbedo & Cícero, 1998), sendo observada a percentagem de sementes germinadas em cada tratamento. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protruída (Figura 1).

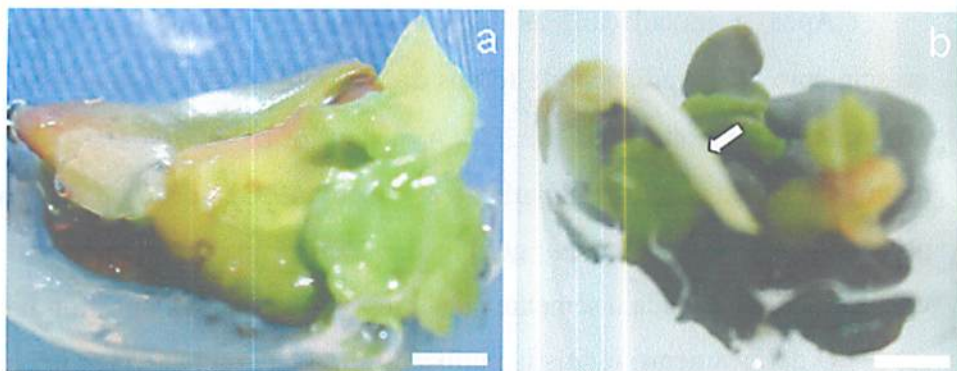


FIGURA. 1. Aspecto visual da germinação *in vitro* de ingazeiro. Não germinada (a); germinada com protusão da radícula (b). UFLA, Lavras, 2006. Br = 0,3cm

Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio e cada tubo contendo uma semente.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste de Tukey, com significância fixada em 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação *ex vitro*

Houve diferenças estatísticas (Anexo 1), entre as percentagens de sementes de ingazeiro germinadas nos substratos areia, areia + Plantmax[®] e Plantmax[®]. Os maiores percentuais de emergência aos sete e aos quatorze dias foram obtidos no substrato Plantmax[®] com 50% e 82% respectivamente, sendo esse bem superior ao substrato areia (26% e 58%) e ao substrato areia + Plantmax[®] (34% e 66%) (Figura 2). Segundo Smiderle (2001), o Plantmax[®], possui composição química bem balanceada, contendo, principalmente, os nutrientes N, P, K, Ca e Mg.

Os resultados encontrados para a germinação, corroboram com aqueles obtidos por Barbedo & Cicero (1998), que obtiveram 83% de germinação em substrato de papel, para a espécie *Inga uruguensis* Hook. & Arn., porém divergem de Varela et al. (2005), que obtiveram menor germinabilidade em sementes de *Acosmium nitens* (Vog.) Yakolev (Leguminosae) no substrato areia, comparado ao substrato vermiculita.

Portanto, quanto aos substratos, deve-se considerar que a capacidade de retenção de água de cada um deles, aliada às características

intrínsecas que regulam o fluxo de água para as sementes, pode influenciar os resultados (Castro, 2002).

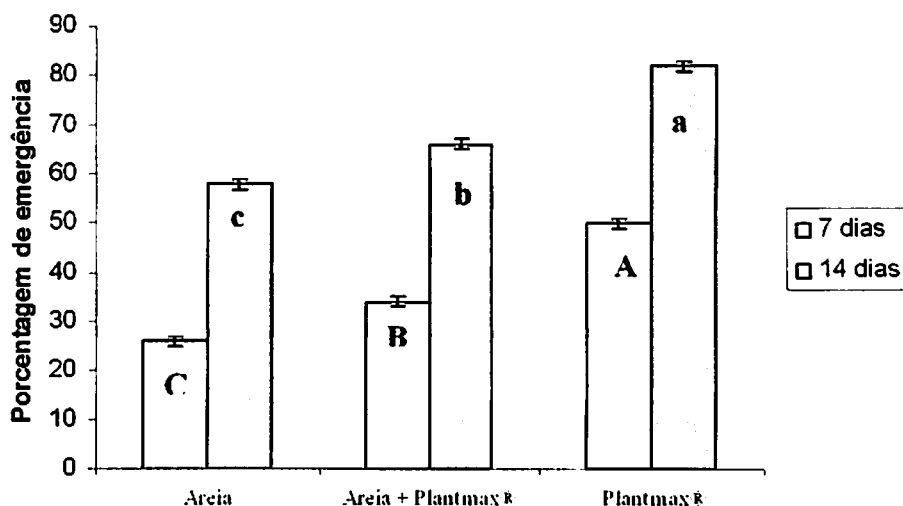


FIGURA 2. Emergência de sementes de ingazeiro em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para as variáveis, tamanho da parte aérea e número de folhas em plântulas germinadas nos diferentes substratos, as germinadas em areia apresentam valores superior, no entanto não diferem estatisticamente do Plantmax® (Tabela. 1).

TABELA 1. Tamanho da parte aérea e número de folhas de ingazeiro em diferentes substratos. UFLA, Lavras, 2006.

<i>Tratamento</i>	<i>Tamanho da parte aérea (cm)</i>	<i>Folhas</i>
Areia	1,76 a	0,8 a
Plantmax [®]	1,38 ab	0,24 ab
Areia + Plantmax [®]	0,72 b	0,12 b

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

O substrato propicia ancoragem às plantas, de modo que elas se sustentem e, ao mesmo tempo, regula o suprimento de água e ar para as raízes, possibilitando bom desenvolvimento das culturas (Minami & Puchala, 2000; Taveira, 1996).

O *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. é uma espécie extremamente abundante nas áreas sazonalmente inundadas, das margens dos rios, por apresentar algumas adaptações anatômicas e morfológicas que a fazem suportar submersão do sistema radicular (Soares, 2003).

Germinação *in vitro*

Efeito de diferentes meios de cultura

Pela análise de razão de chances (Tabela 2), verificou-se que o meio WPM/2 é o mais apropriado para a germinação de sementes de ingazeiro *in vitro*, tendo apresentado índice de 96%, sendo superior ao WPM (66%), MS/2 (75%) e MS (30%).

TABELA 2. Análise da “Deviance” para o efeito do meio nutritivo na agerminação de sementes de ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<i>Parâmetro</i>	<i>GL</i>	<i>Estimativa</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>p-valor</i>	<i>Razão de chances</i>
Intercepto	1	1,05	0,20	0,0001	
MS	1	-1,18	0,43	0,0059	0,875
MS/2	1	-0,24	0,31	0,4360	2,250
WPM	1	-0,36	0,32	0,2649	2,000
WPM/2	0	0,00	0,00		2,887

O meio nutritivo WPM apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS (Pasqual, 2001) e, segundo Premecz et al. (1978), elevadas pressões osmóticas reduzem o crescimento e afetam o metabolismo celular. Portanto, a diminuição do potencial osmótico promovido pela redução das concentrações de macro e micronutrientes do meio WPM/2 proporciona as maiores taxas de germinação.

No entanto, segundo Dodd & Donovan (1999), a presença de uma concentração maior ou menor de sais, ou outros compostos osmoticamente ativos, no meio de germinação, de acordo com a espécie e com o potencial osmótico de suas sementes, poderá ser o fator responsável pela adequada hidratação destas. Conseqüentemente, poderá viabilizar ou inviabilizar a ocorrência do processo germinativo, a partir de uma embebição adequada ou não.

Emershad & Ramming (1994) relataram altas percentagens de germinação de embriões de nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica* Schneid) e pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch), cultivados em meio básico WPM, os quais atingiram 98% e 100% de germinação. Assim como, Soares (2005), que obteve uma maior percentagem de germinação

de sementes de mangabeira em meio nutritivo MS/2 e para murici, os meios de cultura mais eficientes para a germinação de sementes e embriões são o MS e WPM/2, sem sacarose (Nogueira, 2004).

Foi verificado também que a taxa de germinação no meio WPM/2 (96%) foi bem superior ao substrato Plantmax[®] (82%). Estudos sobre germinação *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* (Viana et al., 1999) e de *Norantea brasiliensis* (Campos, 2003) também mostraram maior germinação quando comparadas às cultivadas *in vivo*.

No entanto, apesar da superioridade de germinação no meio WPM/2, foi observada uma alta taxa de contaminação das sementes após a germinação (Tabela 3), pois este meio de cultura apresenta menor concentração de sais, portanto maior disponibilidade de água, proporcionando uma maior proliferação de bactérias e fungos endógenos (Figura 3).

TABELA 3. Análise da “Deviance” para contaminação na germinação de sementes de ingazeiro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<i>Parâmetro</i>	<i>GL</i>	<i>Estimativa</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>p-valor</i>	<i>Razão de chances</i>
Intercepto	1	-0,98	0,57	2,88	
MS	1	1,38	0,64	4,61	0,08
MS/2	1	1,38	0,66	4,61	0,03
WPM	1	1,09	0,66	2,71	0,03
WPM/2	0	0,00	0,00		0,09

Franco (2002) relata a grande incidência de fungos saprófitas nas sementes de *Didymopanax morototoni* no meio MS. No entanto, o objetivo da germinação *in vitro* é a produção de explantes juvenis e

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBEDO, C. J. Armazenamento de sementes de *Ingá uruguensis* Hook. & Arn. 1997. 71 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 249-259, maio/ago. 1998.

CAMPOS, D. B. Métodos de propagação *in vivo* e *in vitro* de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). 2003. 90 f. (Monografia) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CASTRO, I. M.; CORDEIRO, C.; LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. da C.; RIOS, M. S. Germinação *in vitro* de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber) - Obtenção de plântulas assépticas para iniciar a micropropagação. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 5, jul./ago. 2002

CHIN, H. F.; HOR, Y. L.; LASSIM, M. B. Identification of recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 12, n. 2, p. 429-436, 1989.

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; 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. 1, p. 38-48, jan./fev. 2001.

DODD, G. L.; DONOVAN, L. A. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 86, n. 8, p. 1146-1153, Aug. 1999.

EMERSHAD, R. L.; RAMMING, D. W. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 55-59, Apr. 1994.

FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; FERREIRA, F. R. P.; GONDIM, M. T. P.; WETZEL, M. M. V. S.; MENDES, R. A.; GOES, M. de. *Manual de rocedimentos para conservação de germoplasma semente em longo prazo na Embrapa*, Brasília: Embrapa, 1998. 21 p.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Recalcitrant seeds: post-harvest problems. *Bragantia*, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

FRANCO, E. T. H.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 1-10, jun. 2002.

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; SANTIAGO, É. J. A. de. Plant regeneration from callus culture of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Wallingford, v. 39, n. 3, p. 293-295, May 2003.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E., **Propagacion de plantas, principios e prácticas**. México: México Continental, 1976. 810 p.

KOCHABA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. *Annals of Botany*, New York, v. 38, n. 157, p. 795-802, 1974.

JELLER, H.; PEREZ, S. C. J. G. de A. Efeitos dos estresses hídrico e salino e da ação de giberelina em sementes de *Senna spectabili*. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 93-104, jun. 2001.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. v. 2.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Germination stimulators and inhibitors: Their effects and their possible regulatory role. In: MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4. ed. Toronto: Pergamon Press, 1989. p. 174-178.

MELO, J. T.; RIBEIRO, J. F.; LIMA, V. L. G. F. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 1, n. 1, p. 8-12, 1979.

MINAMI, K.; PUCHALA, B. Produção de mudas de hortaliças de alta qualidade. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 162-163, jun. 2000. Suplemento.

MUÑIZ-MELÉNDEZ, E. . **Demographic analysis of the life history of *Inga vera* subs. *vera***. 1978. 48 f. Thesis (Master Science) - University of Tennessee, Knoxville, TN.

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

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Firewood crops, shrub and tree species for energy production**. Washington, DC, 1980. 237 p.

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

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

PREMECZ, G.; RUZICKA, P.; OLAH, T.; FARKAS, G. L. Effect of 'osmotic stress' on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts. *Planta*, Berlin, v. 141, n. 2, p. 33-36, 1978.

SMIDERLE, O. J.; SALIBE, A. B.; HAYASHI, A. H.; MINAMI, K. Produção de mudas de alface, pepino e pimentão em substratos combinando areia, solo e plantmax®. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 3, p. 253-257, nov. 2001.

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

SOARES, F. P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)** 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STUBSGAARD, F. **Seed moisture**. Humlebaek: DFSC, 1990. 30 p.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720 p.

TAVEIRA, J. A. M. Produção de mudas: substratos. **Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**. Curitiba: SENAR, 1996. 88 p.

VARELA, V. P.; COSTA, S. de S.; RAMOS, M. B. P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de itaubarana [*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev] - Leguminosae, Caesalpinoideae. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 35-39, mar. 2005.

VIANA, V. R. C.; FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N. Germinação *in vitro* de plantas medicinais I. *Pothomorphe umbellata* L. L. Miq. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1/2, p. 22-24, 1999.

ARTIGO II

**Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (*Inga vera*
Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)**

RESUMO

Stein, Vanessa Cristina. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) In: _____. **Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

A maioria das frutíferas nativas, como o ingazeiro, multiplica-se por reprodução sexual. No entanto, problemas relacionados com o armazenamento e a dormência das sementes dificultam a germinação e a propagação desta espécie. Dessa forma, as técnicas de propagação vegetativa *in vitro*, como a micropropagação, têm possibilitado a reprodução de espécies lenhosas recalcitrantes, com inúmeras vantagens em relação às técnicas *ex vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de indução de brotações em *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.. Para tanto, segmentos caulinares contendo até dois centímetros foram inoculados em meio de cultura MS contendo 3% de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 2,5; 4,5; 8,5 e 13 μ M) combinados com ANA (0; 0,5 e 2,5 μ M). Quanto ao tamanho de brotações, as concentrações de 5 μ M de ANA e 2,5 μ M BAP proporcionaram maior crescimento das brotações, no entanto, o BAP reduziu o número de brotações e o número de folhas de explantes de ingazeiro.

Palavras-chave: frutíferas, micropropagação, BAP, ANA.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

Stein, Vanessa Cristina. Direct organogenesis in shoot explants of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. In: _____. **Micropropagation, mitotic index and ultrastructural analysis of *O Inga vera* Will subsp *affinis* (DC).** T.D. Penn. 2006. 100 p. Dissertation (Master of Science in Agronomy / Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Most native fruity trees, such *Inga vera*, present sexual propagation. However, problems related to storage and seed dormancy make difficult the germination and propagation of this species. In this context, techniques of *in vitro* vegetative propagation, like micropropagation, has provided the reproduction of many recalcitrant woody species with advantages in relation to the *ex vitro* technique. The objective of this work was to optimize the protocol for the *in vitro* shoot induction of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.. For this purpose, shoot segments of two centimeters long were inoculated in MS medium supplemented with 3% sucrose and different concentrations of BAP (0; 0.5; 2.5; 4.5; 8.5 and 13 μ M) in combination with NAA (0; 0.5 and 2.5 μ M). While the use of 5 μ M NAA and 2.5 μ M BAP originated higher shoot growth, the use of BAP reduced shoot and leaf number in the explants.

Key words: Fruity trees; micropropagation; BAP NAA.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser); Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser)

INTRODUÇÃO

O aumento populacional vem contribuindo para a crescente demanda dos recursos naturais, implicando na degradação ambiental, principalmente em áreas de maior densidade demográfica. O ingazeiro *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. é uma espécie pioneira, extremamente abundante nas áreas sazonalmente inundadas das margens dos rios, apresentando algumas adaptações anatômicas e morfológicas que a fazem suportar submersão do sistema radicular. Essas características a tornam uma ótima espécie para plantios mistos em recuperação de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios (Soares, 2003). Por outro lado, o ingazeiro também produz frutos comestíveis com elevados teores de sais minerais (Lope, 2005).

Geralmente, estas espécies nativas frutíferas multiplicam-se por reprodução sexual. No entanto, problemas relacionados com o armazenamento e a dormência das sementes dificultam a germinação. Além disso, este tipo de reprodução em espécies alógamas resulta em alto grau de variabilidade em muitas características de importância econômica (Campbell, 1996) e esta variabilidade, embora importante para programas de melhoramento, dificulta o cultivo econômico.

As técnicas de propagação vegetativa *in vitro*, como a micropropagação, têm possibilitado a reprodução de espécies lenhosas recalcitrantes, com inúmeras vantagens em relação às técnicas *ex vitro*. Um dos maiores benefícios da micropropagação, bem como das outras técnicas de propagação assexuada, está relacionado à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não-aditivos da variância

genética por meio da propagação clonal, tornando-se uma ferramenta poderosa associada aos programas de melhoramento florestal para a propagação massal de genótipos superiores (George & Sherrington, 1984).

A micropropagação também possibilita a manipulação e a propagação de plantas de forma contínua, independentemente da época do ano e de forma mais rápida que os métodos convencionais de propagação vegetativa e, ainda, a possibilidade de obtenção e de manutenção de estoques de plantas livres de doenças e o intercâmbio de germoplasma (Grattapaglia & Machado, 1990; Thorpe et al., 1991). Para tanto, são necessários ensaios que permitam conhecer e avaliar o potencial organogênico dos materiais de interesse (Costa, 2005)

A indução e a expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro* são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (Vasil, 1987), e também de fatores inerentes ao material vegetal, como fatores hereditários, estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (Thorpe et al., 1991). Dos fatores externos, podem-se destacar a utilização dos reguladores de crescimento como as citocininas, que são indispensáveis à divisão celular, à quebra da dominância apical, à indução e à proliferação de gemas axilares e à diferenciação de gemas adventícias (Preece, 1995) e as auxinas, outro grupo de reguladores de crescimento fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes, muitas vezes utilizadas nas fases de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas.

O objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de indução de brotações em *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn..

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Plantas matrizes de ingazeiro, com aproximadamente dois anos de idade, foram mantidas em sala de crescimento, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas. Essas plantas foram obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, MG ($21^\circ29'15''\text{S}$, $44^\circ38'33''\text{O}$).

Indução de brotações

Segmentos caulinares com, aproximadamente, 2 cm, foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 3% de sacarose e diferentes concentrações de benzilaminopurina – (BAP) (0; 0,5; 2,5; 4,5; 8,5 e $13 \mu\text{M}$) combinados com ácido naftaleno acético – (ANA) (0; 0,5, 2,5 e $5 \mu\text{M}$). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 45 dias, foram avaliados o número de brotações e de gemas por explante, o comprimento da maior brotação e a presença de calos na base dos explantes, aos 45 dias de cultivo.

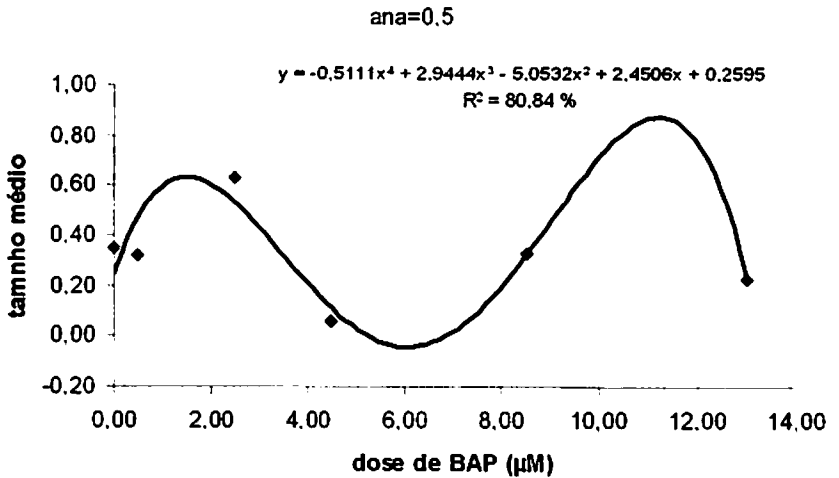


FIGURA 2. Efeito do regulador de crescimento BAP combinado com 0,5μM de ANA, quanto ao tamanho médio de brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

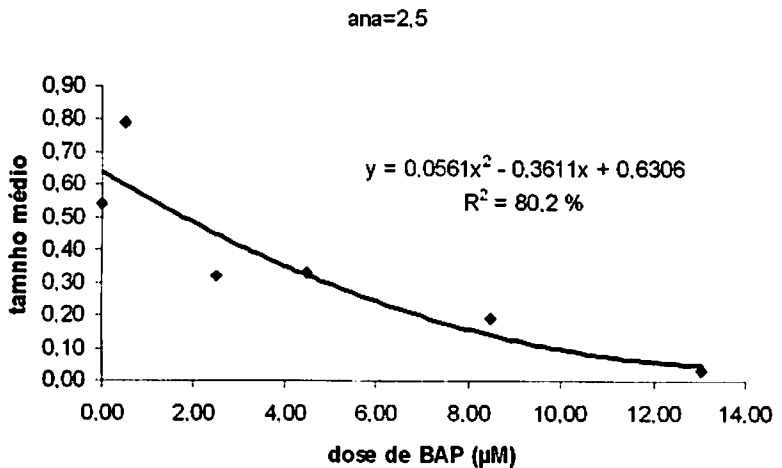


FIGURA 3. Efeito do regulador de crescimento BAP combinado com 2,5 μM de ANA, quanto ao tamanho médio de brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

O objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de indução de brotações em *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn..

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Plantas matrizes de ingazeiro, com aproximadamente dois anos de idade, foram mantidas em sala de crescimento, a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas. Essas plantas foram obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, MG ($21^{\circ}29'15''\text{S}$, $44^{\circ}38'33''\text{O}$).

Indução de brotações

Segmentos caulinares com, aproximadamente, 2 cm, foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 3% de sacarose e diferentes concentrações de benzilaminopurina – (BAP) (0; 0,5; 2,5; 4,5; 8,5 e $13 \mu\text{M}$) combinados com ácido naftaleno acético – (ANA) (0; 0,5, 2,5 e $5 \mu\text{M}$). O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 45 dias, foram avaliados o número de brotações e de gemas por explante, o comprimento da maior brotação e a presença de calos na base dos explantes, aos 45 dias de cultivo.

Utilizou-se o fatorial 6x3, com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio com um explante. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o Software Statistical Analysis System (SAS®) e as médias comparadas pelos modelos lineares generalizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável tamanho médio de brotações, observou-se interação significativa entre os reguladores de crescimento ANA e BAP (Tabela 1).

TABELA 1. Interação dos reguladores de crescimento ANA e BAP no tamanho de brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

FV	GL	SQ	QM	FC
BAP	5	28,09	5,61	0,0001*
ANA	3	15,10	5,03	0,0022*
BAP*ANA	14	30,04	2,14	0,0109*

Como houve interação entre os reguladores, ajustaram-se modelos de regressão de exponencial para modelar os seus efeitos. Os gráficos resultantes deste ajuste são mostrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

Foi observado um efeito inibitório quanto ao tamanho de brotação de ingazeiro, à medida que foi aumentada a concentração de BAP e em ausência de ANA (Figura 1).

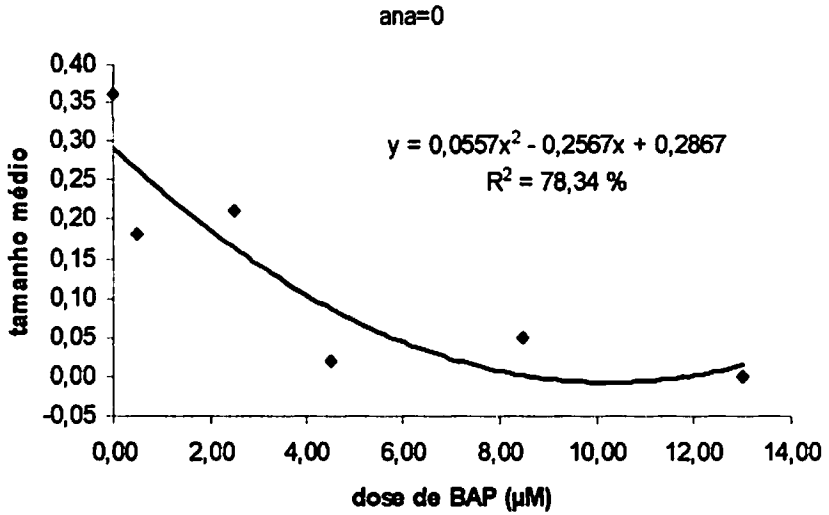


FIGURA 1. Efeito do regulador de crescimento BAP na ausência de ANA, quanto tamanho médio das brotações de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Entretanto, quando as diferentes concentrações de BAP foram combinadas com 0,5µM de ANA, houve uma tendência a aumento no número de brotações, até a concentração de 2,5µM BAP (Figura 2). No entanto, aumentando-se a concentração de ANA para 2,5µM, novamente ocorreu uma tendência à redução no tamanho médio de brotações, à medida que foi aumentada a concentração de BAP (Figura 3).

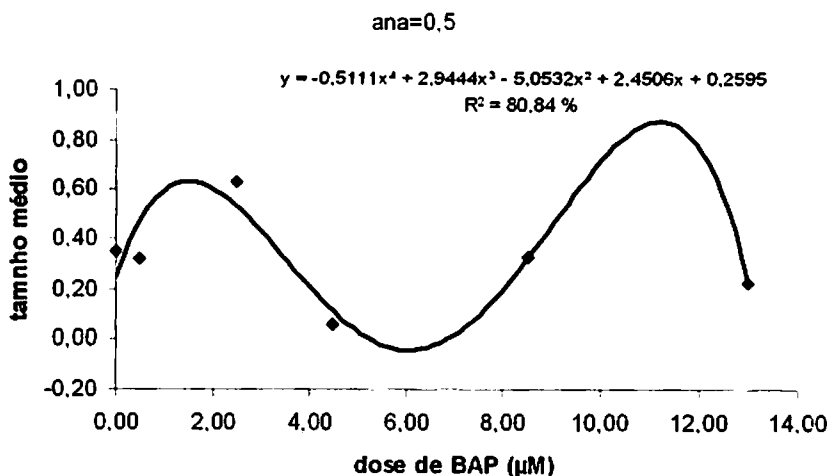


FIGURA 2. Efeito do regulador de crescimento BAP combinado com 0,5µM de ANA, quanto ao tamanho médio de brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

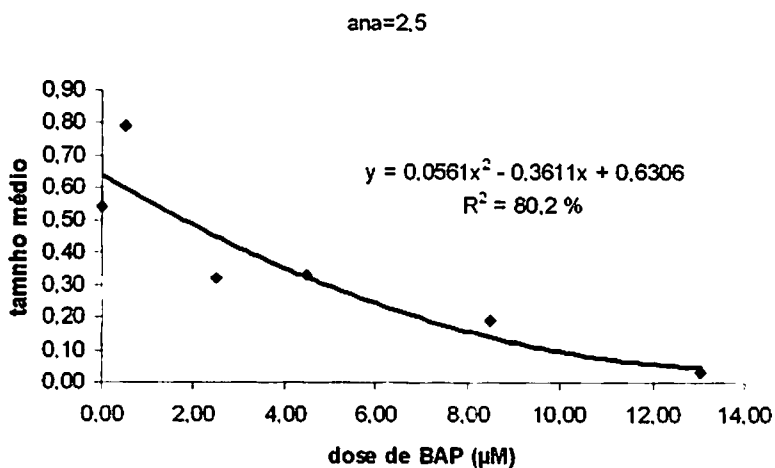


FIGURA 3. Efeito do regulador de crescimento BAP combinado com 2,5 µM de ANA, quanto ao tamanho médio de brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Contudo, a concentração de 5µM de ANA combinada com 2,5µM BAP, proporcionou maior crescimento das brotações (Figura 8), tendo as doses superiores a essa reduzido o tamanho das brotações (Figura 6).

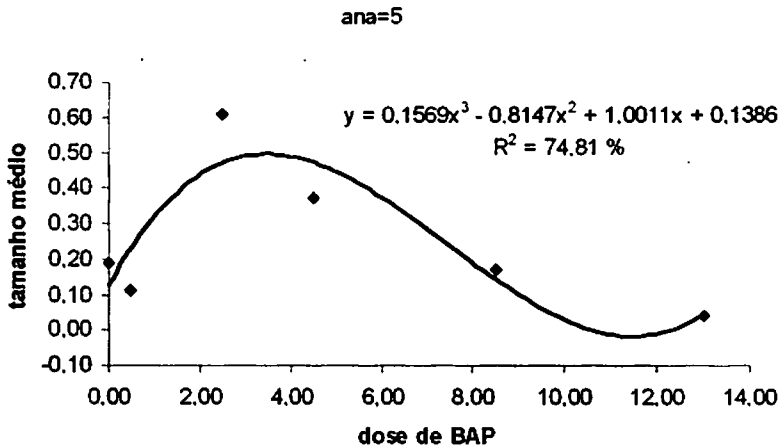


FIGURA 6. Efeito do regulador de crescimento BAP combinado com 5µM de ANA, quanto ao tamanho médio de brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Em *Eugenia dysenterica* DC., o maior número de brotações foi obtido nas concentrações de 8,5µM de BAP e 0,5 µM de ANA (Martinotto, 2004). Arello & Pinto (1993) obtiveram resultados satisfatórios na indução de brotações de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Martius) utilizando de 22µM de BAP associado com 0,5µM de ANA.

Resultados semelhantes foram observados em *Sinningia speciosa* (Lood) Hiern, onde foi verificado um acréscimo no número de brotações até a concentração de 4µM de ANA (Londe, 2004). Em porta-enxerto de pereira cv. Pyrodwarf, a adição de 0,5 µM de ANA, combinada com

6,6 μ M de BAP, proporcionou o melhor resultado no comprimento das brotações (Junior, 2006).

Para *Ficus carica* L., a presença de ANA não melhora a resposta organogênica, exceto na concentração de 0,5 μ M, produzindo um aumento médio de 2,3 brotos por explante (Brum, 2002). Sugere-se que nessa concentração ANA estaria estabelecendo um balanço hormonal adequado com as citocininas endógenas dos explantes, o que estaria de acordo com que descreveram Skoog & Miller (1957).

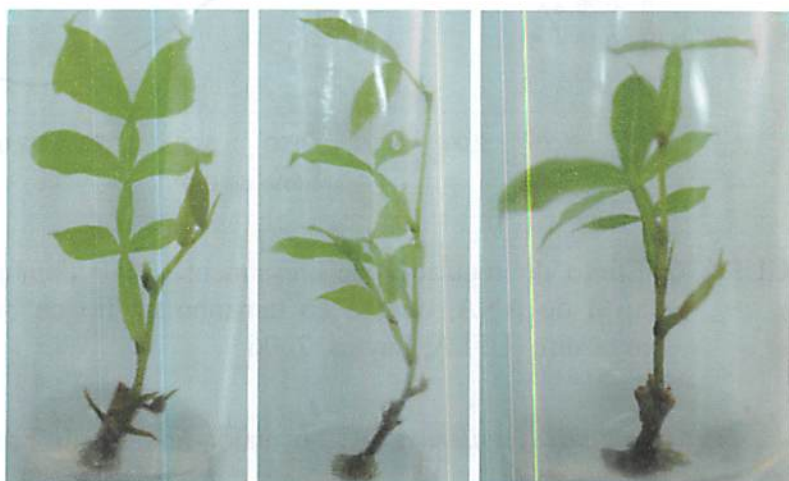


FIGURA 7. Aspecto visual das brotações de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Para avaliar a influência de BAP e ANA sobre as variáveis número de brotações e número de folhas, utilizou-se a metodologia dos modelos lineares generalizados, uma vez que estas variáveis apresentavam valores referentes a contagens, o que inviabiliza a aplicação da análise de variância usual, devido à ausência de normalidade dos resíduos. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 2.

TABELA 2. Avaliação das variáveis, número de brotações e número de folhas de ingazeiro pelos modelos lineares generalizados. UFLA, Lavras, 2006.

Parâmetros	Número de brotações	Número de folhas
	p-valor	p-valor
Intercepto	0,573	0,7847
BAP	0,0016*	0,0006*
ANA	0,4717	0,8418
BAP*ANA	0,9145	0,3531

Visto que apenas o fator BAP influenciou ambas as variáveis e por tratar-se de um fator quantitativo, ajustou-se um modelo de regressão de exponencial para modelar este efeito. Os gráficos resultantes deste ajuste são mostrados nas Figuras 8 e 9.

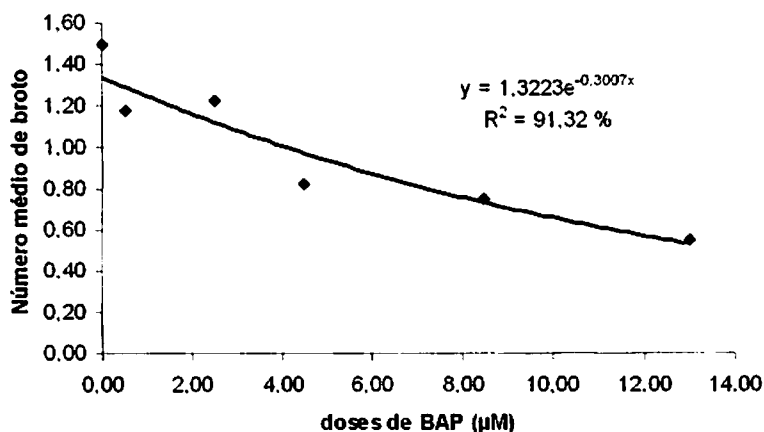


FIGURA 8. Efeitos do regulador de crescimento BAP no número de brotações de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

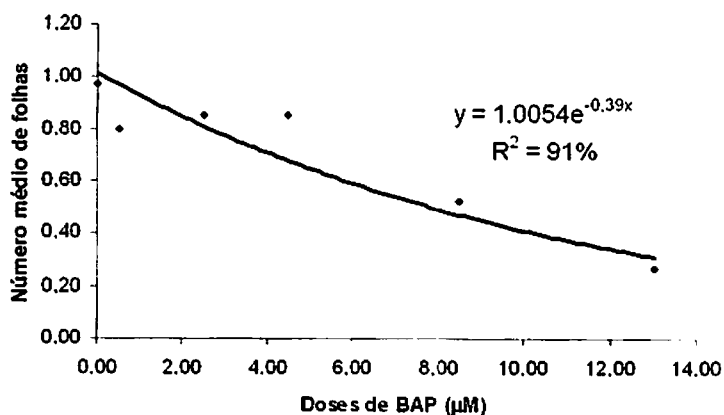


FIGURA 9. Efeitos do regulador de crescimento BAP no número de folhas em brotação de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Portanto, com relação ao BAP foi observada uma redução no número de brotações e no número de folhas, com o aumento da concentração desse hormônio (Figura 1 e 2). Na ausência de BAP, verificou-se uma média de 1,1 brotações por explante e que foi reduzida com o aumento de BAP, chegando à ausência de formação de brotos na concentração de 13µM.

Em *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke, outra Fabaceae, o tratamento com 13 µM BAP foi o que apresentou maior número de proliferação dos brotos. No entanto, Soares (2003), trabalhando com concentrações acima de 13 µM em brotação de ingazeiro, observou que a ausência de BAP apresentou proporcionou maior formação de brotações.

Coelho (1999) e Ponte (1999), relatam que o uso de baixas concentrações de BAP no meio de cultura tem sido indicado para espécies lenhosas, como *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus* Labill e sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.], pois, segundo Grattapaglia

& Machado (1998), as quantidades necessárias destas substâncias variam de acordo com o tecido utilizado e com seus níveis endógenos.

CONCLUSÃO

A concentração de 5µM de ANA, combinada com 2,5µM BAP, proporcionou maior crescimento das brotações e o BAP reduz o número de brotações e o número de folhas e explantes de ingazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. P. Propagação in vitro de *Kielmeyera coriacea*. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 25-31, jan. 1993.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação in vitro da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1403-1409. 2002. Edição Especial.,

CAMPBELL, R. J. South American fruits deserving further attention. In: JANICK, J. (Ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS, 1996. p. 431-439.

COELHO, M. C. F. Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COSTA M. A. P. de C.; CARMO, D. O. do; SOUZA, F. V. L D., MAGALHÃES, G. L. de; HANSEN, D. de S. Efeito de diferentes concentrações de GA₃ (ácido giberélico) no alongamento de brotações in vitro de jenipapo (*Genipa americana*). Disponível em: www.

ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/705.htm -
anais_xvii_cbf/fitotecnia/355.htm>. Acesso em: 5 nov. 2005.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação de goiabeira serrana. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 60-64, abr. 1999.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. *Plant propagation by tissue culture*. England: Eastern Press, 1984. 709 p.

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

JUNIOR, C. L. de A.; FAORO, I. D.; VIEIRA, R. L.; SPENGLER, M. M. Efeito da concentração de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de pereira cv. Pyrodwarf. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/026.htm> Acesso em: 2 maio 2006.

LONDE, L. N.; FIGUEIRA, E. R.; ARRUDA, A. da S.; BONNETI, A. M.; SANTANA, D. G. Cultivo *in vitro* de Glioxínia em meio MS com diferentes concentrações de fitorreguladores. *Journal Biociência*, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 69-74, Sept./Dec. 2004

LOPE, K. P.; BRUNO, R. DE L. A.; BRUNO, G. B.; MOURA, M. F. *Comportamento de sementes de Inga sp. durante o armazenamento*. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/58k>>. Acesso em: 09 abr. 2005.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo [*Cordia trichotom* (Vellozo) Arrabida ex Steudl]. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 11, n. 2, dez. 2001.

MARTINOTTO, C. *Cultivo in vitro e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira*. 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

PONTE, E. M. D. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. Globulus Labill.** 1999. 47 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pelotas.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 26-37, 1995.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957.

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

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 128, n. 3, p. 193-218, May 1987.

ARTIGO III

Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Inagazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)

RESUMO

Stein, Vanessa Cristina. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) In:_____. Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O conhecimento de mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais de espécies lenhosas, pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo *in vitro*. Portanto, para que os processos de organogênese indireta *in vitro* ocorram, as células devem passar pelos processos de desdiferenciação, aquisição da competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão. O objetivo deste trabalho foi descrever a curva de crescimento de calos originados de explante foliares de ingazeiro e observar o índice de divisão celular durante a curva. Para determinar a curva de crescimento, as folhas foram inoculadas em meio MS, com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e 9 μM de 2,4-D e, em intervalos de 10 dias, os calos foram pesados para a determinação da matéria fresca e, logo após, acondicionados em estufa para a determinação da matéria seca. Para a obtenção do índice mitótico, os calos foram coletados em intervalos de 20 dias, fixados em Carnoy e, posteriormente transferidos para 0,5 mL de solução tampão McIlvaine por 10 minutos, peneirados e centrifugados. O precipitado foi resuspenso em tampão McIlvaine e 20 μL desta suspensão celular foram transferidos para lâminas e corados com DAPI. A curva de crescimento apresentou crescimento com as fases: lag (entre 0 ao 40° dia de inoculação), exponencial (40° ao 50° dia), linear (50° ao 70° dia), desaceleração (70° ao 90° dia) e o índice de divisão celular acompanhou a curva, sendo um parâmetro importante para a compreensão da curva de crescimento de calos de ingazeiro.

Palavras-chave: calo, 2,4-D, matéria fresca, matéria seca, DAPI.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

Stein, Vanessa Cristina. Growth curve and cell division index of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. callus. In: _____ . Micropropagation, mitotic index and ultrastructural analysis of *O Inga vera* Will subsp *affinis* (DC). T.D. Penn. 2006. 100 p. Dissertation (Master of Science in Agronomy / Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The knowledge of biochemical and physiological changes that occur during *in vitro* growth of woody plant tissues can provide important information related to the establishment process and, consequently, optimize the conditions for the *in vitro* culture. Thus, for the occurrence of indirect *in vitro* organogenesis process, the cells should pass to the processes of dedifferentiation, acquisition of competence, induction, determination, differentiation and organ formation. The objective of this work was to describe the callus growth curve originated from leaf explants and to observe the cellular division index during its growth. To determinate the growth curve, leaf explants were inoculated in MS supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar and 9 μM 2,4-D , and in intervals of 10 days, callus were weighted for fresh matter determination and right after, transferred to a stove for dry matter determination. To obtain the mitosis index, callus were collected in intervals of 20 days, fixed in Carnoy and transferred to 0.5 mL of McIlvaine solution for 10 minutes, sifted and centrifuged. The hasty was suspended in McIlvaine solution and 20 μL of this cellular suspension were transferred to laminas colored with DAPI. The growth curve showed the following growing phases: lag (between 0 and 40 days after inoculation), exponential (40° to 50° day), linear (50° to 70° day) and deceleration (70° to 90° day). The index cell division accompanied the curve, showing to be an important parameter for the callus growth curve understanding.

Key words: callus, 2,4-D, fresh matter, dry matter, DAPI.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser); Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser)

INTRODUÇÃO

O ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) é uma árvore frutífera adaptada a terrenos úmidos, considerada uma espécie importante para a recomposição de áreas ciliares degradadas. No entanto, o potencial desta espécie para programas de preservação ambiental e sua utilização comercial são prejudicados pela impossibilidade de armazenamento de suas sementes. Assim, as técnicas alternativas de propagação assexuada, como a cultura de tecidos, são ferramentas que possibilitam a obtenção de um número expressivo de mudas de espécies ecológica e comercialmente importantes (Santos, 2005).

Devido à totipotência, protocolos para a obtenção de plantas com base em tecidos vegetais têm sido obtidos. Os processos pelos quais os tecidos produzem órgão vegetais adventícios *in vitro*, podem ocorrer direta (sem a formação de calos) e indiretamente, por meio da formação de calos (Moura, 2001).

O calo é uma massa compacta de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, ao tamanho, ao conteúdo celular e à espessura da parede (Narayanaswamy, 1977). Assim, para que os processos de organogênese indireta *in vitro* ocorram, as células devem passar pelos processos de dediferenciação, aquisição da competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão.

Os centros ativos de divisão celular do calo, em condições adequadas, respondem a determinados estímulos, sofrendo diferenciação celular e formando órgãos (George, 1996). No entanto, o que difere, no comportamento de células vegetais com a mesma composição genética, é

a competência das células-alvo (Torres et al., 2000), ou seja, a sua capacidade para responder a estímulos específicos (Taiz & Zeiger, 2004). Sendo assim, a competência é o primeiro passo para a diferenciação celular, seguida da determinação em células competentes, quando essas se submetem a um caminho particular de desenvolvimento geneticamente programado (George, 1996).

O conhecimento de mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais de espécies lenhosas, pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo *in vitro* (Mesquita, 2002).

No entanto, o índice de divisão celular dos calos pode elucidar as mudanças fisiológicas das células e auxiliar a otimização dos protocolos de regeneração e transformação genética. Segundo Fogliatto (2001), a eficiência da introdução de genes é aumentada durante a fase de divisão celular. Há indicações, na literatura, de que a eficiência de transformação tanto por métodos diretos (eletroporação, bombardeamento com microprojéteis) como por métodos indiretos (sistema agrobacterium), está relacionada a esta taxa de divisão celular.

O objetivo deste trabalho é determinar a curva de crescimento de calos originados de explante foliares de ingazeiro e observar o índice de divisão celular durante a curva.

MATERIAL E METODOS

Material vegetal

Plantas matrizes jovens de ingazeiro foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de fótons $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas. Essas plantas foram obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, MG ($21^\circ29'15''\text{S}$, $44^\circ38'33''\text{O}$)

Curva de crescimento

Para a desinfestação, as folhas foram lavadas em água corrente por 20 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70% por 60 segundos e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as folhas foram cortadas em diâmetros de 1cm^2 e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, e $9 \mu\text{M}$ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C , por 20 minutos. Os explantes foram mantidos no escuro à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para a determinação da curva de crescimento, em intervalos de 10 dias, os calos de ingazeiro foram pesados em balança de precisão para a determinação da matéria fresca e, logo após, acondicionados em estufa de circulação forçada a 70°C , por 72 horas, para a determinação da matéria

seca. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por ponto da curva, sendo cada repetição composta por um explante.

Índice mitótico

Para a determinação do índice mitótico, os calos de ingazeiro foram coletados em intervalos de 20 dias, até 90 dias e fixados em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético), por um período de 2 a 24 horas a temperatura ambiente e acondicionados em freezer para posterior análise.

Para a análise do índice mitótico (IM), 0,5g de calo foram transferidos para 0,5 mL de solução tampão McIlvaine (pH 7) por 10 minutos, posteriormente peneirados e centrifugados a 6.000 rpm por 1 segundo. O precipitado foi resuspenso em tampão McIlvaine (pH 7) e 20 μ L desta suspensão celular foram transferidos para lâminas, coradas com DAPI (4-6-diamino-2-fenilindole) e observadas em microscópio de fluorescência a um aumento de 400X.

Foram contadas, por meio da técnica de varredura, 1.200 células por ponto da curva. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células observado, multiplicando-se por 100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento dos calos foi observado pelos parâmetros: peso fresco, peso seco dos calos e índice de divisão celular. Observou-se crescimento sigmoidal, com tendência de ganho de matéria fresca, em função do aumento do tempo de cultivo (Figura 1).

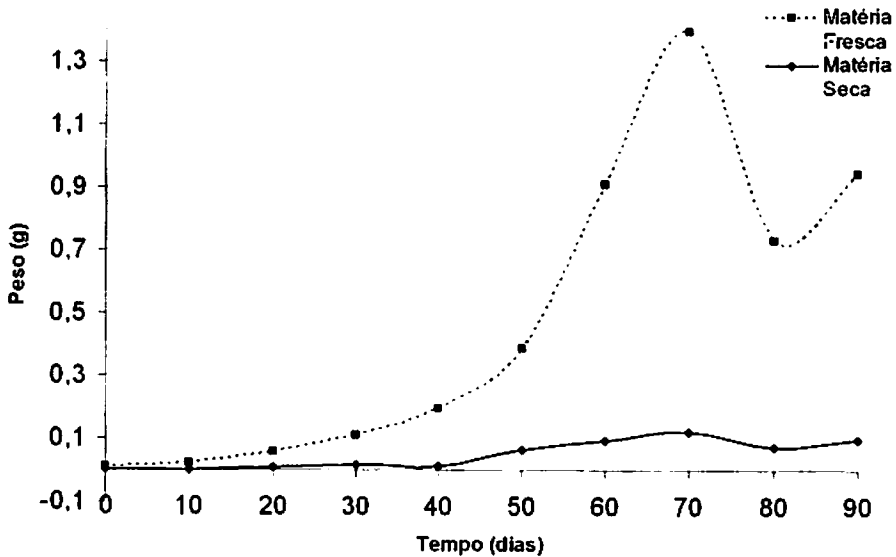


FIGURA 1. Curva de crescimento de calos de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Até o 40º dia, a fase lag, é caracterizada pelo pequeno acúmulo de matéria seca no calo. Nesta fase, tem-se número estacionário de células, início da mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e produção de energia, ou seja, preparação para a fase de divisão celular. Mezzetti et al. (1991), observaram a ocorrência dessa fase até o 30º dia após a inoculação de segmentos foliares de kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.)

C. F. Liang e A. R. Ferguson]. Serra et al. (2000) também observaram, em caios de *Bertholletia excelsa* H. B. K., que a fase lag ocorreu até o 30º dia de inoculação, e sugeriu que o longo período observado nessa fase pode estar relacionado com a utilização de explantes primários retirados de plantas com diferentes genótipos e estádios fisiológicos.

A fase log, ou de crescimento exponencial, período no qual ocorre a máxima divisão celular, foi observada entre o 40º e o 50º dia, com um maior acúmulo de matéria seca e um aumento do índice de divisão celular (Figura 2). Santos et al. (2003) observaram a fase exponencial entre o 42º e 77º dia de cultivo de calos de *Coffea arabica* L., cv Rubi e em calos de *Bertholletia excelsa* H. B. K. Esta fase ocorre entre o 30º e o 53º dia após a inoculação (Serra, 2000).

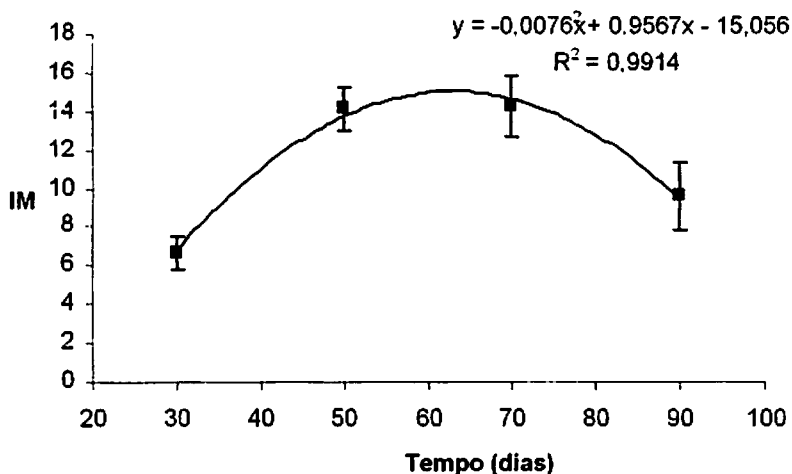


FIGURA 2. Índice mitótico de calos de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

A fase linear ficou caracterizada entre o 50° ao 70° dia, quando observou-se a estabilização da divisão celular e expansão celular e o aumento de matéria fresca. Assim, caracterizam essa fase o crescimento e o desenvolvimento celular.

Finalmente, a fase de desaceleração do crescimento ocorreu entre o 70° e o 80° dia após a inoculação dos explantes foliares com uma visível redução do IM (Figura 2). Soares (2003), também observou que a fase estacionária da curva de crescimento de ingazeiro, na qual ocorre o menor crescimento celular, iniciou em explantes foliares a partir do 70° dia após a inoculação. Foi observada a manutenção do peso alcançado na fase anterior e em explantes de segmentos internodais a partir do 90° dia, alcançando 1% de crescimento.

Segundo Smith (1992), é nessa fase que os calos devem ser repicados, principalmente por causa da redução de nutrientes, secagem do ágar ou mesmo acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura.

CONCLUSÕES

A curva de crescimento apresenta um elevado acúmulo de matéria fresca com crescimento tipo sigmóide. A matéria seca e a fresca apresentam as fases: lag (entre 0 ao 40° dia de inoculação), exponencial (40° ao 50° dia), linear (50° ao 70° dia) e desaceleração (70° ao 80° dia).

O índice de divisão celular é um parâmetro importante e pode ser utilizado para a compreensão da curva de crescimento de calos de ingazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MOURA, T. L. de A.; MENDES, W. A. B. de; JANUZZI, B. M. *et al.* Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de bap e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, ago. 2001.
- FOGLIATTO L. F.; DROSTE, A.; ZANETTINI, M. H. B. Frequência de divisões celulares em tecido embriogênico de Soja x eficiência de transformação via biolística. Disponível em: http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/02/02pdf/02-004.PDF. Acesso em: 05 maio 2006.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. England: Excegetics Limited, 1996. 2v.
- MESQUITA, A. C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A. de; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, L. V.; GOMES, A. C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lichieira (*Litchi chinensi* Sonn.). **Magistra**, Cruz das Almas - BA, v. 14, n. 1, jan./jun. 2002.
- MEZZETTI, B.; CONTE, L. S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 153-160, Sept. 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-92, 1962.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Spring-Verlag, 1977. Cap. 10. p. 179-206.
- SANTOS, B., R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R., C.; PAIVA, P., D., DE O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510-514, maio/jun. 2005
- SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de Segmentos foliares de *Coffea arabica* L.,

cultivar rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, maio/jun. 2003

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

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SA, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

ARTIGO IV

**Cultura de anteras e ovários de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp.
affinis (DC.) T.D. Penn.)**

RESUMO

Stein, Vanessa Cristina. Cultura de anteras e ovários de Ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). In: _____. **Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)** 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia /Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O ingazeiro é uma espécie pioneira, presente em matas ciliares com grande potencial para programas de reflorestamento, pois apresenta algumas adaptações anatômicas e morfológicas que o fazem suportar a submersão do sistema radicular. Nesse contexto, o melhoramento genético tem contribuído com a produção de indivíduos superiores e novas variedades, principalmente para áreas com baixo potencial para reflorestamento. Uma das técnicas utilizadas para isso é a cultura de anteras e ou micrósporos, que tem sido extensivamente empregada na produção de linhagens homocigóticas. Essa técnica envolve o cultivo de anteras, ovários e micrósporos para estimular o desenvolvimento de células gametofíticas haplóides, permitindo a formação de calos ou embriões regeneráveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos para a calogênese de anteras e ovários de ingazeiro. Para a calogênese de anteras, foram avaliados a viabilidade do grão de pólen, pela coloração com carmim acético e os efeitos do tamanho do botão floral, das concentrações de PVP (0; 0,9; 1,8; 3,6; 7,2mM) e 2,4-D (0; 4,5; 9; 22; 44µM) e dos meios de cultura MS e WMP combinados com manitol, sorbitol e sacarose, como fontes de carboidratos. Para a cultura de ovários, foram testados dois meios de cultura, MS e WPM e diferentes concentrações de 2,4-D (0; 4,5; 9; 22; 44µM). Na cultura de anteras, a escala de 0,7 a 1,0 mm, combinada com as concentrações de 0,9mM de PVP e 44 µM de 2,4 D, são mais indicadas. Quanto à formulação de sais e fonte de carboidratos, os melhores resultados foram obtidos no meio WMP suplementado com manitol. Para a calogênese de ovários, o meio mais indicado é o MS complementado com 4,5µM de 2,4-D.

Palavras-chave: anteras, ovários, calogênese, PVP, 2,4-D.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

Stein, Vanessa Cristina. *In vitro* culture of anthers and ovaries of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. In:_____. **Micropropagation, mitotic index and ultrastructural analysis of *O Inga vera* Will subsp *affinis* (DC).** T.D. Penn. 2006. 100 p. Dissertation (Master of Science in Agronomy / Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. is a pioneer species that occurs naturally on ciliary's forest and presents high potential for reforestation programs, due to some anatomical and morphological adaptations that make its root system resistant to flooding. In this context, plant breeding studies have contributed to produce superior plants and new varieties to be used in areas with reduced potential for reforestation. One of the techniques used is anther or microspores culture which has been extensive used for production of homozygote lines. This technique consist into cultivate anthers, ovaries and microspores in order to stimulate the development of haploid gametophyte cells for the formation of callus or regenerative embryos. The objective of this work was to establish protocols for callogenesis in anthers and ovaries of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. Viability pollen through coloration with acetic carmine, the effects of flower button size, the effects of different concentrations of PVP (0; 0.9; 1.8; 3.6 and 7.2M) and 2,4-D (0; 4.5; 9; 22 and 44 μ M) and the MS and WPM culture mediums combined with different sources of carbohydrates (manitol, sorbitol and sucrose) were evaluated for anther calogenesis. The effect of MS and WPM culture media and different concentrations of 2,4-D (0; 4.5; 9; 22 and 44 μ M) were evaluated for ovary culture. Results of anther culture, showed that pollen with size of 0.7 to 1.0 mm, cultivated in the presence of 0,9M PVP and 44 μ M 2,4 D were the most indicated for *in vitro* anther callogenesis. Higher callus formation was observed in WPM supplemented with manitol. For callus formation from ovaries, the use of MS supplemented with 4.5 μ M 2,4-D is recommended.

Key words: anthers, ovary, callus, PVP, 2,4-D.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser); Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser)

INTRODUÇÃO

O *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. é uma espécie pioneira, presente em matas ciliares sazonalmente inundadas, apresentando assim, algumas adaptações anatômicas e morfológicas que a fazem suportar a submersão do sistema radicular. Essas características a tornam uma ótima espécie para plantios mistos em recuperação de áreas ciliares degradadas e em áreas de depleção de reservatórios (Soares, 2003). No entanto, as sementes de ingazeiro são recalcitrantes e, pela impossibilidade de formação de mudas em épocas distintas das que são produzidas as sementes em seu hábitat, fica inviabilizada a sua inclusão nos programas voltados à recuperação de áreas nativas degradadas (Barbedo, 1997).

O melhoramento genético tem contribuído com a produção de indivíduos superiores e novas variedades, por meio da recombinação de caracteres selecionados, principalmente para áreas com baixo potencial para reflorestamento (Menck et al., 1999). Assim, a obtenção de haplóides pode ser utilizada como suplemento dos programas clássicos de melhoramento (Kantha & Roca, 1993), pois a indução da haploidia proporciona a manifestação de caracteres genéticos. Esse sistema também facilita a análise genética do material, amplia a eficiência de seleção de características agrônômicas desejáveis, diminui a complexidade do heterozigoto e representa redução do tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas puras. Além disso, é importante em trabalhos envolvendo obtenção de mutantes, fusão somática, mapeamento gênico

em duplo-haplóides e, ainda, como alvo para a transferência de genes (Moraes-Fernandes, 1990).

Neste contexto, a cultura de anteras e ou micrósporos tem sido extensivamente empregada na produção de linhagens homozigóticas. Essa técnica envolve o cultivo de anteras, ovários e micrósporos, para estimular o desenvolvimento de células gametofíticas haplóides, permitindo a formação de calos ou embriões regeneráveis.

A androgênese ou embriogênese do pólen é o fenômeno de formação de uma planta haplóide a partir de um grão de pólen. Ou seja, na androgênese, os micrósporos sofrem divisões mitóticas contínuas, originando uma estrutura multicelular, que é a réplica de um embrião zigótico (Santos, 2003).

Na androgênese direta, o micrósporo comporta-se como um zigoto e passa por vários estádios de embriogênese, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Na androgênese indireta, que ocorre com maior frequência, os micrósporos, em vez de passarem pela embriogênese, dividem-se algumas vezes, formando calos, os quais emergem através da parede da antera (Peters et al., 1998).

Uma planta androgênica, formada a partir do cultivo *in vitro* de anteras, tem somente metade do número de cromossomos da espécie. Entretanto, a duplicação de seus cromossomos pode ocorrer de maneira espontânea ou induzida, recuperando, assim, sua condição diplóide totalmente homozigota (Bajaj, 1984).

No entanto, uma série de fatores químicos, físicos e genéticos interage de forma complexa, influenciando tanto na indução do embrião haplóide como sua diferenciação em plântula (Santos, 2003). Dentre os

fatores críticos para a indução da androgênese, têm-se o genótipo e as condições fisiológicas da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, o tipo de pré-tratamento aplicado nos botões florais e a composição do meio de cultura (Peters et al., 1998).

A maior dificuldade da aplicação da cultura de anteras consiste na adequação do meio de cultura apropriado, para que ocorra a divisão celular, o processo de ativação e desativação dos genes, no momento e no local apropriados, visando à diferenciação celular e, conseqüentemente, a obtenção de uma planta (Salomon, 2003). O meio de cultura mais utilizado na cultura de anteras é o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com reguladores de crescimentos, especialmente auxinas e citocininas que estimulam a androgênese. No entanto, os teores de nitrogênio e as fontes de carboidratos são fatores importantes na obtenção de plantas haplóides (Nitsch, 1981).

Outro fator limitante para o estabelecimento de anteras *in vitro* é a alta taxa de oxidação dos explantes. De acordo com Custódio et al. (2005) a oxidação das anteras pode inibir totalmente a indução de calos podendo este efeito ser minimizado com a utilização de antioxidantes, como a polivinilpirrolidona (PVP), que tem ação de prevenir a oxidação por compostos fenólicos (George & Sherrington, 1984).

A cultura de ovários também é uma técnica realizada com êxito em muitas espécies para a obtenção de embriões somáticos a partir do cultivo de óvulos (Moore, 1985; Gmitter Junior & Moore, 1986). Entretanto, a origem dos óvulos, o estado fisiológico desses e as condições em que eles são expostos são responsáveis por diferenças na resposta embriogênica. Além disso, o alongamento *in vitro* dos embriões

e a subsequente aclimatização são processos longos e difíceis (Button & Kochba, 1977), existindo, ainda, expressão de características de juvenildade nas plantas originadas *in vitro*, constituindo importante limitação na propagação (Ollitrault, 1992).

O objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo de calogênese em anteras e ovários de *Inga vera* Will subsp *Affinis* (DC). T.D. Penn..

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Botões florais de ingazeiro foram coletados de populações naturais, localizadas na Universidade Federal de Lavras, no período de agosto a novembro de 2005 e armazenados à temperatura de 10°C por dois dias. Após o armazenamento, os botões florais foram classificados em faixas de diferentes tamanhos: 0,7–1,0; 1,0-1,5; 1,5-2,0 cm (Figura 1)

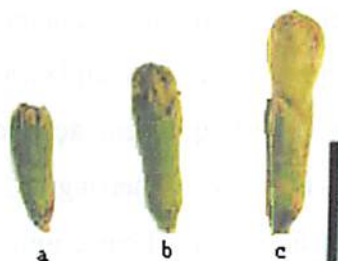


FIGURA 1. Classificação dos botões florais de ingazeiro, 0,7–1,0 cm (a); 1,0-1,5 cm (b) ; 1,5-2,0 cm (c). Barra: 0,5cm.

Viabilidade do grão de pólen

Botões florais foram fixados em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético), por um período de 2 a 24 horas, à temperatura ambiente e, depois, foram acondicionados em freezer. Para o preparo das lâminas, a fim de avaliar a viabilidade do grão de pólen, as anteras foram isoladas do botão floral em microscópio estereoscópio, esmagadas e coradas com carmim acético 2%. Realizou-se a contagem de 2.000 células/tratamento em microscópio de luz com um aumento de 40x. Foram considerados viáveis os pólenes corados.

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o Software Statistical Analysis System (SAS[®]). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Desinfestação e inoculação do material vegetal

Os botões florais foram lavados em água corrente por 20 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70%, por 60 segundos e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a triplice lavagem em água destilada e autoclavada e os botões foram abertos para o isolamento das anteras ou ovários.

Cultura de anteras

Tamanho do botão floral e concentrações de PVP na calogênese de anteras

Após a desinfestação, as anteras provenientes de botões florais com diferentes tamanhos (0,7–1,0; 1,0–1,5; 1,5–2,0 cm) foram inoculadas

em tubos de ensaio contendo meio MS. com 3% de sacarose, 4,5 μ M de 2,4-D, 0,25% de carvão ativado e diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP) (0; 0,9; 1,8; 3,6; 7,2mM)

Tamanho do botão floral e concentrações de 2,4 D na calogênese de anteras

As anteras provenientes de botões florais classificados por tamanho foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS, com 3% de sacarose, 0,9mM de PVP, 0,25% de carvão ativado e suplementado com 0; 4,5; 9; 22 e 44 μ M de 2,4-D.

Formulações de sais e fonte de carboidratos na calogênese de anteras.

As anteras provenientes de botões florais (1,0-2,0 cm) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo duas formulações de sais: MS e WPM e com diferentes fontes de carboidratos: 3% de manitol, sorbitol ou sacarose.

Foram adicionados aos meios de cultura 3% de sacarose, 4,5 μ M de 2,4-D, 0,9mM de PVP e 0,25% de carvão ativado.

Cultura de ovários

Formulações de sais e concentrações de 2,4-D na calogênese de ovários

Após a desinfestação, os ovários provenientes de botões florais com 1,0-2,0 cm foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS ou WPM, com 3% de sacarose, 0,9mM de PVP e 0,25% de carvão ativado e suplementado com 0; 4,5; 9; 22 e 44 μ M de 2,4-D.

Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados foram solidificados com ágar 0,7% e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos no escuro à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada em intervalos de 10 dias até os 45 dias, sendo observado a presença e ausência de calos, utilizando microscópio esterioscópico com aumento de 20X.

Análise estatística

Para análise estatística, os calos foram classificados nas seguintes categorias: 0 = ausência de calos, 1 = explantes intumescido, 2 = início da calogênese, 3 = 50% do explante coberto por calos e 4 = explante totalmente coberto por calo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 10 repetições. Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SAS[®], pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e obtendo-se o score médio de formação de calos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultura de anteras

Viabilidade do grão de pólen

Todas as classes de botão floral (0,7–1,0; 1,0-1,5; 1,5-2,0 cm) apresentaram pólenes formados e a viabilidade do grão de pólen não diferiu estatisticamente (Tabela 1)

TABELA 1. Viabilidade do grão de pólen em anteras de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Classes	0,7–1,0cm	1,0-1,5cm	1,5-2,0cm
Viabilidade (%)	95,7a	95,3a	95,2a

Letras iguais não diferem entre si, a 5% de significância.

Há evidências de não existir uniformidade de desenvolvimento dos grãos de pólen entre diferentes anteras de um botão floral ou entre diferentes grãos de pólen de uma mesma antera (Milani & Carvalho, 2005). Segundo Peters et al. (1998), os micrósporos respondem apenas em uma determinada etapa do desenvolvimento, sendo o estágio uninucleado o mais adequado para a maioria das espécies. Entretanto, isso não foi observado neste estudo.

Assim, para anteras de café, o estágio ótimo para o desenvolvimento do pólen está entre o uninucleado médio e o binucleado tardio (Chen, et al, 1991). No entanto, segundo Dao & Shamina (1978), observa-se a formação de calos em todos os estádios da microsporogênese de anteras de tomate, embora micrósporos mononucleados e pólenes maduros tenham sido os mais favoráveis para a indução da embriogênese.

Tamanho do botão floral e concentrações de PVP na calogênese de anteras

As concentrações de PVP e os tamanhos de botão floral diferiram estatisticamente na indução de calos em anteras de ingazeiro.

Quanto ao tamanho do botão floral, a escala de 0,7 a 1,0 mm proporcionou os maiores escores de calogênese em todas as concentrações de PVP. No entanto, a concentração de 0,9mM foi a mais eficiente na formação dos calos (Figura 2).

Para a escala de 1,0 a 1,5 cm, o PVP não interferiu na formação de calos, pois, na ausência deste antioxidante, os escores da calogênese foram muito próximos à concentração mais alta de 7,2mM. No entanto, para a escala de 1,5 a 2,0 foi observado um aumento na formação de calos nas concentrações de 0,9 e 1,8mM e uma tendência à redução da calogênese nas concentrações superiores (3,6 e 7,2mM).

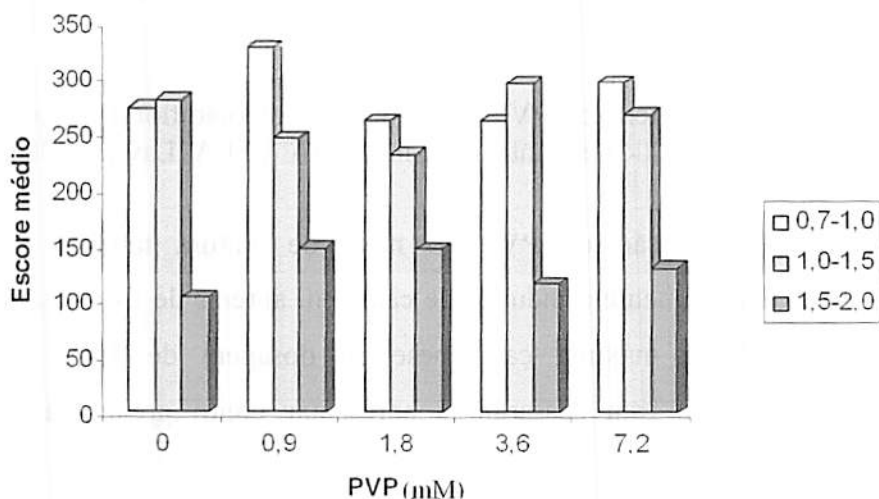


FIGURA 2. Efeito do PVP e do tamanho do botão floral na indução de calos em anteras de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e a polimerização. Portanto, os tratamentos mais eficientes na calogênese de anteras foram os que apresentaram menores escores para coloração marrom, o que caracteriza a oxidação (Figura 3).

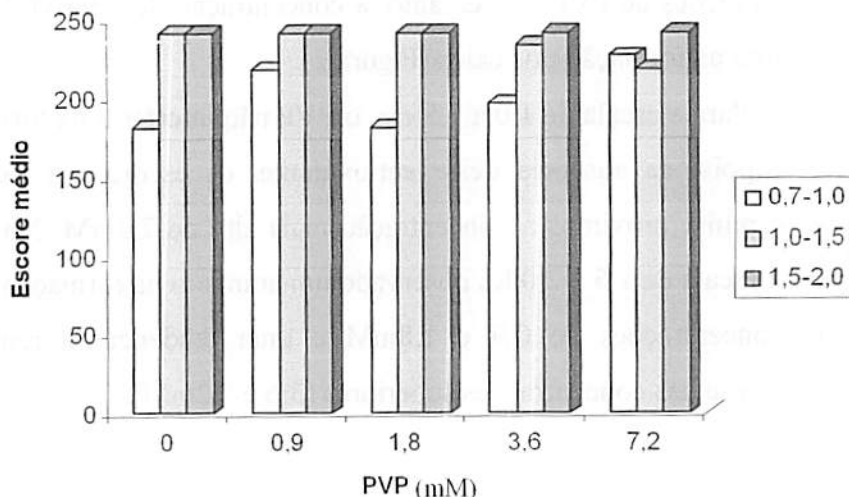


FIGURA 3. Efeito do PVP e do tamanho do botão floral na coloração de calos em anteras de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

A adição de PVP ao meio de cultura também aumentou significativamente a indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., atingindo a máxima calogênese na dosagem de 1,8M. Dosagens superiores a esta passaram a apresentar efeito prejudicial (Pascoal, 2002).

Tamanho do botão floral e concentrações de 2,4-D na calogênese de anteras

As concentrações de 2,4-D e os tamanhos de botão floral diferiram estatisticamente na indução de calos em anteras de ingazeiro. Na calogênese de anteras, a concentração de 44 μ M de 2,4 D e o botão floral na escala de 0,7 a 1,0 cm proporcionaram os maiores escores (319), diferindo do controle com escore de 164 (Figura 4).

Para as anteras oriundas de botões com tamanho entre 1,0 e 1,5 a ausência de 2,4-D proporcionou uma maior formação de calos. No entanto, esse escore diferem pouco das outras concentrações de 2,4 D. Já na faixa de 1,5 a 2,0 cm, foi observado um aumento na formação de calos na concentração de 4,5 μ M de 2,4-D e as concentração superiores a essa apresentaram uma tendência à redução de formação de calos (Figura 4).

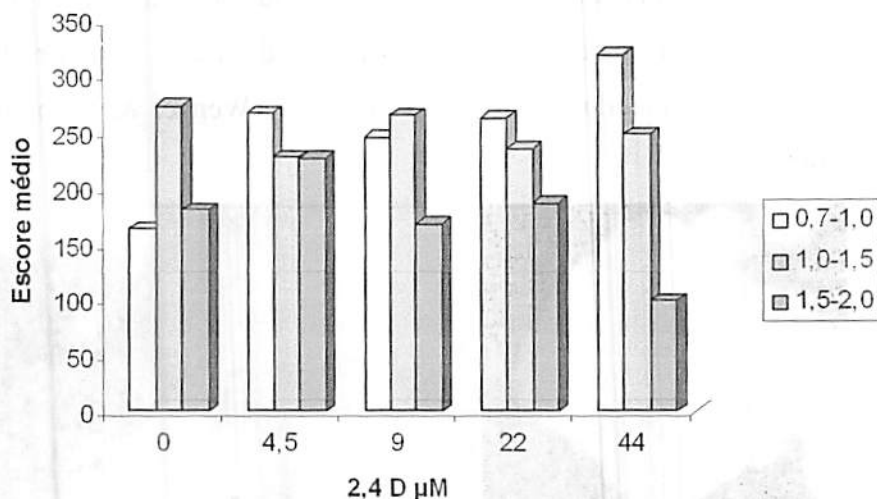


FIGURA 4. Efeito do 2,4-D e do tamanho do botão floral na indução de calos em anteras de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Palú et al. (2004) relatam que, para *Coffea arabica* L. cultivar Acaiá, o aumento da produção de calos em anteras ocorreu até a concentração de $9\mu\text{M}$ de 2,4-D, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibir a produção de calos. Vargas (2006) obteve calos em anteras de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizando $9\mu\text{M}$ de 2,4-D. Experimentos de calogênese em anteras de *Triticum aestivum* utilizando AIA e 2,4D demonstram que esse é mais efetivo na indução de calos em anteras (Ball et al., 1993) e anteras de *Cucumis sativus* L. cultivar Calypso, inoculadas em meio B5, completado, principalmente, com $2,5\mu\text{M}$ de 2,4-D, desenvolveram calos e embriões globulares em 4 semanas (Ashok et al., 2003).

Foi observada também a formação de calos na região final do filete e no conectivo das anteras (Figura 5). Em algumas espécies, a inclusão de uma determinada concentração de auxina pode desviar o desenvolvimento do micrósporo para induzir a formação de calos a partir do tecido conectivo (Sunderland, 1971) ou do filete (Wenzel & Foroughi-Wehr, 1984).

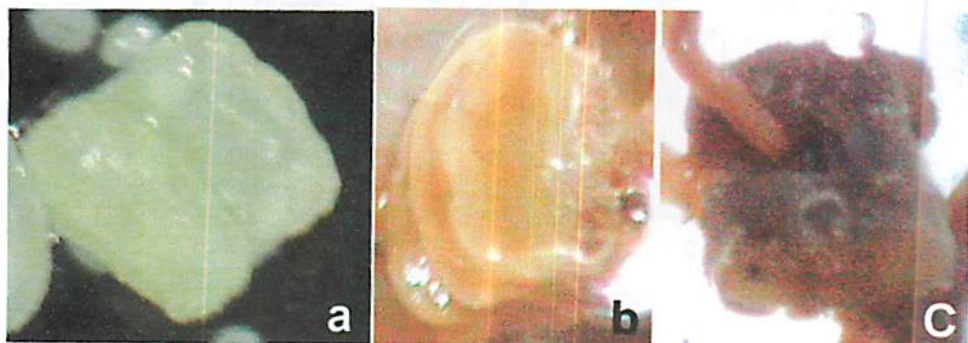


FIGURA 5. Esteriomicrografia de calos em anteras de ingazeiro. Antera sem calo (a), antera intumescida (B), calo na região final do filete (C). UFLA, Lavras, 2006.

Formulações de sais e fonte de carboidratos na calogênese de anteras.

○ crescimento e a diferenciação dos calos em anteras são determinados pelas concentrações de sais inorgânicos, principalmente de amônio. Por isso, a relação entre a concentração de amônio e de nitrato é um dos principais fatores na composição do meio de cultura (Lentini, 1997). Além disso, os carboidratos no meio de cultura satisfazem o requerimento de moléculas de carbono como fonte de energia e, em geral, altos índices de sacarose satisfazem à indução de calos em anteras (Chen et al. 1991)

Portanto, verificou-se que as formulações de sais MS e WPM e as fontes de carboidratos diferiram estatisticamente na calogênese de anteras de ingazeiro. Os maiores escores (410) para a formação de calos foram obtidos no meio WPM suplementado com manitol (Figura 6), sendo esse superior à sacarose (300) e ao sorbitol com score de 190. Já para o meio de cultura MS, a sacarose apresentou os melhores escores (360), seguida do sorbitol e manitol, que não diferiram estatisticamente, apresentando escore de 280.

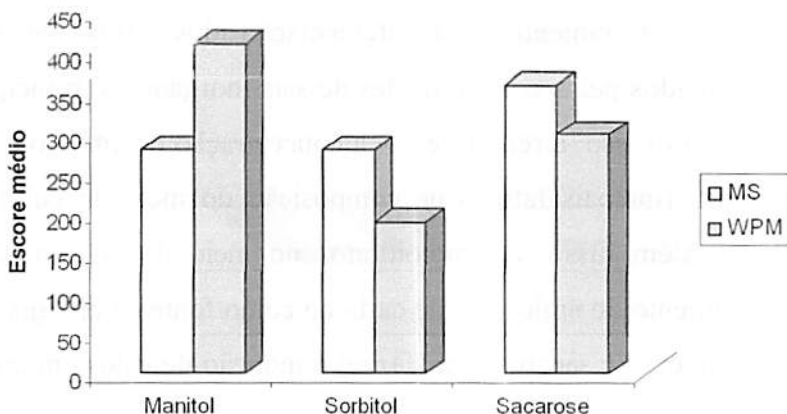


FIGURA 6. Efeito do meio de cultura e da fonte de carboidratos na indução de calos em anteras de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.

Com relação à fonte de carbono, resultados semelhantes foram observados em micrósoros de arroz e outros cereais (Lentini, 1997). Segundo Ricci et al. (2002), galactose e lactose induziram um maior número de calos e embriões somáticos de citrus. Já para anteras de café, a substituição de 5% de sacarose por 5% de maltose proporcionou um incremento significativo na indução de calos (Lentini et al, 1995).

Por outro lado, as altas concentrações de amônio presentes no meio MS combinadas com o manitol, inibiram a formação de calos, mas, quando foi utilizado sorbitol e sacarose, a calogênese no MS apresentou maiores escores do que WPM (Figura 6).

Segundo Galletta (1983), um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos. Supõe-se que tal

equilíbrio possa ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o excesso ou a deficiência de qualquer desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen.

Cultura de ovários

Formulações de sais e concentrações de 2,4-D na calogênese de ovários

Para a calogênese de ovários de ingazeiro, a concentração de 4,5 μM de 2,4-D no meio de cultivo MS foi a mais eficiente, sendo bem superior ao controle. A calogênese foi, inicialmente, observada na região basal e, posteriormente, estendeu-se para toda a região do explante com aspecto amarelo (Figura 7).

Quanto ao meio MS, foi observado que, com o aumento da concentração de 2,4-D para 9 μM , ocorreu uma diminuição na calogênese. No entanto, as concentrações superiores apresentam uma tendência a um aumento na formação de calos (Figura 8).

Por outro lado, para o meio de cultura WPM foi verificado um acréscimo na calogênese à medida que se aumentou a concentração de 2,4-D.

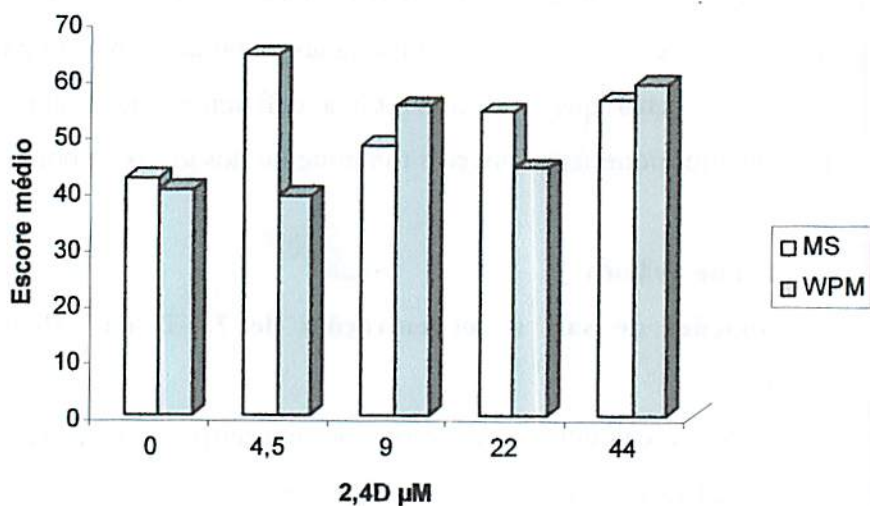


FIGURA 8. Efeito do meio de cultura e das concentrações de 2,4-D na indução de calos em ovários de ingazeiro. UFLA, Lavras, 2006.



FIGURA 7. Aspecto visual e calo em ovário de ingazeiro. Calo no ovário (a). UFLA, Lavras, 2006.

Pétalas, ovários e estames cultivados de *Feijoa sellowiana* Berg. em meio basal suplementado com diferentes reguladores de crescimento, dentre eles 2,4-D, mostraram uma intensa indução de calos na região oasal do explante, aspecto compacto e coloração amarela translúcida (Stefanello et al., 2005).

Para algumas variedades de citrus, em geral, a indução de calos ocorre entre a sexta e oitava semanas de cultivo em meio MT (Murashige & Tucker, 1969) (Kayim & Koc, 2006). Para *Lilium* híbrido, a combinação de 0,005 μ M de ácido α -naftaleno acético (ANA) e 5 μ M 6-benziulaminopurina (BAP) induziram a máxima formação de calos em ovários (NOVÁK, 1981)

CONCLUSÃO

Para os botões florais, a escala de 0,7 a 1,0 mm, combinada com as concentrações de 0,9mM de PVP e 44 μ M de 2,4 D, é a mais indicada para a formação dos calos em anteras de ingazeiro.

Quanto à formulação de sais e fonte de carboidratos, os melhores resultados foram obtidos no meio WPM suplementado com manitol.

Para a calogênese de ovários, o meio mais indicado é o MS complementado com 4,5 μ M de 2,4-D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHOK KUMARA, H. G.; MURTHYA, H. N.; PAEK, K. Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Paek Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 213-222, May 2003.

BAJAJ, Y. P. S. *In vitro* production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan. 1984. v. 1, p. 229.

BALL, S. T.; ZHOU H.; KONZAK C. F. Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Science*, Clare, v. 90, n. 2, p. 195-200, 1993.

BARBEDO, C. J. Armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. & Arn. Piracicaba. 1997. 71 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BUTTON, J.; KOCHBA, J. Tissue culture in the *Citrus* industry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 70-92.

CHEN, C. C.; TSAY, H. S.; HUANG, C. R. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: Bajaj, Y. P. S. **Biotecology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1991. V. 14, p. 193-215.

CUSTODIO, L.; CARNEIRO, M. F.; ROMANO, A., Microsporogenesis and anther culture in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 65-77, Mar. 2005.

DAO, N. T.; SHAMINA, Z. B. Cultivation of isolated tomato anthers. *Soviet Plant Physiology*, Moscow, v. 25, n. 1, p. 120-126, 1978.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p. 23-47

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories.** Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GMITTER JUNIOR, F. G.; MOORE, G. A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination, and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 139-147, 1986

KARTHA, K. K.; ROCA, W. M. Role of plant biotechnology in crop improvement. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings...Calli: Centro internacional de agricultura tropical**, 1993. p. 466-476. (Working Document, 123)

KAYIM, M.; KOC, N. K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Scientia Horticulturae**, Amserdam, v. 109, n. 1, p. 29-34, June 2006.

LENTINI, Z.; MARTINEZ, C. P. Applications of anther culture in rice breeding (cartelera). In: CUEVAS-PEREZ, F. (Ed.). **Rice in latin america: improvement, management, and marketing.** Cali, Colombia: CIAT, 1995.

LENTINI, Z.; MARTINEZ, C. P.; ROCA, W. **Cultivo de anteras de arroz em el desarrollo del gemoplasma.** Cali, Colômbia: Centro internacional de agricultura tropical. 1997. 57 p.

MENCK, A. L. M.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALKI, M. E. Influencia de sistema de colheita de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, Piracicaba, n. 43/44, p. 20-23, 1999.

MILANI, M.; CARVALHO, J. M. F. C. C. **Utilização de cultura de anteras no melhoramento de plantas.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 26 p.

MOORE, G. A. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 1, p. 66-70, Jan. 1985.

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.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-92, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. Proceedings... Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1161.

NITSCH, J. P. Experimental androgenesis in nicotiana. *Phytomorphology*, New Delhi, v. 19, n. 4, p. 389-404, 1969.

NOVÁK F. J.; PETRU, E. A. Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. *Scientia Horticulturae*. Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 191-199, 1981

OLLITRAULT, P. Somatic embryo grafting: a promising technique for *Citrus* breeding and propagation. *Fruits*, Montpellier, v. 47, p. 213-218, 1992. Numero special Agrumes.

PALU, E. G.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 28, n. 4, p. 736-742, jul./ago. 2004.

PASCOAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; CAMPOS; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R. J. C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea Arabica* L.) Cultivadas *In Vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 1, p. 71-76, jan./fev. 2002.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. [S. l. : s. n.], 1998. v. 2, p. 569-612.

RICCIL, A. P.; FILHO, F. de A. A. M.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE, S. M. de S. Somatic Embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 41-46, jan./mar. 2002.

SALOMON, M. V. Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras. 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência Celular e Cultura de Tecidos Vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.). **Genética & evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

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

STEFANELLO, S.; VESCA, L. L. D.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O. e GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 117-126, May 2005.

SUNDERLAND, N. Anther culture: a progress report. *Science Progress*, Oxford, v. 59, n. 236, p. 527-549, 1971.

VARGAS, D. P. Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

WENZEL, G.; FOROUGH-WEHR, B. Anther culture of cereals and grasses. In: VASIL, I. K. (Ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. London: Academic Press, 1984. v. 1, p. 311-327.

ARTIGO V

**Análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd.
subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)**

RESUMO

Stein, Vanessa Cristina. Análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. In: _____ . **Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)** 2006. 100 p.. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A compreensão da organogênese e da embriogênese de plantas, nos estágios iniciais de desenvolvimento das células, requer a observação das mudanças subcelulares. No entanto, a caracterização citológica durante o desenvolvimento destes não tem sido realizada com frequência na cultura de tecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho é caracterizar as diferenças ultraestruturais relacionadas à calogênese de anteras, ovários, folha e segmentos nodais de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. Para tanto, botões florais, segmentos nodais e folhas foram desinfestados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, com 3% de sacarose e 4,5µM de 2,4-D, exceto para calogênese de folhas em que foram utilizados 9µM desta auxina e na calogênese de anteras e ovários cujo meio de cultura foi acrescido de 0,25% de carvão ativado e 90µM de PVP. Após 45 dias em meio de cultura, os calos de anteras, ovários, folhas e segmentos nodais foram fixados em Karnovisky e preparados para a visualização em microscopia de transmissão eletrônica de varredura. Sendo assim, foram observadas diferenças ultraestruturais entre as células dos calos provenientes de anteras, ovários, segmentos e folhas. Os calos de anteras, folhas e segmentos nodais não apresentaram evidências de formação de embriões somáticos, apesar de suas células apresentarem algumas características embriogênicas. No entanto, os calos de ovários parecem ser a fonte de explante mais responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões.

Palavras-chave: anteras, ovários, segmentos foliares, folhas, calogênese.

* Comitê Orientador: Renato Paiva – UFLA (Orientador)

ABSTRACT

Stein, Vanessa Cristina. Ultra structural analysis of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. callus. In:____. **Micropropagation, mitotic index and ultrastructural analysis of *Inga vera* Will subsp *affinis* (DC).** T.D. Penn. 2006. 100 p.. Dissertation (Master of Science in Agronomy / Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The understanding of plant organogenesis and embryogenesis during the initial stages of cells development requires an observation of the sub cellular changes. In this context, cytological characterizations during cell development have not been frequently performed on tissue culture. The objective of this work was to characterize ultra structural changes related to callus formation from anthers, ovaries, leaves and nodal segments of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. Flower buttons, nodal segments and leaves were disinfested and inoculated in MS medium, supplemented with 3% sucrose and 4.5 μ M 2,4-D, except for leaf calogenesis where 9 μ M 2,4-D was used and on anthers and ovaries calogenesis where the medium was supplemented with 0.25% activated charcoal and 90 μ M PVP. After 45 days in culture, callus formed from anthers, ovaries, leaves and nodal segments were fixed in Karnovsky and prepared for visualization in scanning electronic transition microscope. Ultra structural differences of callus formed from anthers, ovaries segments and leaves were observed. Callus from anthers, leaves and nodal segments showed no evidences of somatic embryo's formation although, some of its cells showed some embryogenic characteristics. Callus formed from ovaries seem to be the best source of embryogenic responsive explants.

Key words: anthers, ovary, nodal segments, leaves, callus formation.

* Guidance Committee: Renato Paiva – UFLA (Adviser); Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser)

INTRODUÇÃO

Inga vera Willd., pertencente à família Fabaceae, é uma espécie frutífera e medicinal nativa do cerrado. Seus frutos apresentam polpa branca, levemente fibrosa e rica em sais minerais (Lope, 2006). No entanto, alguns autores afirmam que a viabilidade das suas sementes é extremamente curta, não ultrapassando 15 dias, em condições naturais (Barbedo, 1998).

Assim, a embriogênese somática torna-se uma estratégia viável para o estudo do desenvolvimento fisiológico do embrião e produção de sementes sintéticas em larga escala. Esta técnica é uma das melhores opções para a propagação massal de plantas elite (Gupta et al., 1993), proporcionando alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção, manutenção de embriões em meios de cultura, plantio direto da muda sem necessidade de enxertia, além de possibilitar a transferência de genes, tanto pela fusão de protoplastos como pela transformação genética (Barros, 1999).

Segundo Ammirato (1983), na embriogênese somática, uma única célula ou um grupo de células somáticas são precursores de embriões somáticos, sendo esse processo similar ao da embriogênese zigótica. Os embriões somáticos *in vitro* podem ser formados a partir de dois padrões básicos de embriogênese, direto ou indireto.

A embriogênese somática direta ocorre a partir do explante, que possui células programadas para a diferenciação e a formação de embriões somáticos. Para a embriogênese somática indireta, a desdiferenciação dos explantes resulta na formação de calos, com células

ou grupo de células competentes, ou seja, com capacidade de responder aos efeitos estimulatórios do meio de cultura. A transferência destas células, agora competentes, para os meios indutores de gemas torna-as determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento (Kerbaui, 1998).

Segundo Vikrant (2001), a embriogênese somática direta ocorre mais frequentemente em explantes de micrósporos, óvulos e embriões imaturos. Em contraste, embriogênese somática indireta ocorre nas células indeterminadas e não diferenciadas, formadas, primeiramente, nos calos.

Embora o sucesso da embriogênese somática em plantas lenhosas seja muito baixo, foi possível estabelecer protocolos de indução de embriogênese somática para várias espécies florestais, incluindo vários membros da família Lauraceae, como para *Laurus nobilis* (Canhoto et al., 1999), *Persea americana* Mill. (Witjaksono et al., 1999) e *Ocotea catharinensis* (Viana & Mantell, 1999).

Pescador et al. (2000) reportam que a possibilidade de manipular sistemas *in vitro* para a clonagem de genótipos vegetais superiores depende de vários fatores, como parâmetros morfológicos, genéticos, bioquímicos, citológicos e o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento celular, que é de fundamental importância para se obter respostas morfogenéticas nos sistemas de cultura *in vitro*.

Embora não se conheça, ainda, de forma satisfatória, por que certos eventos regenerativos, *in vitro*, são mais facilmente induzidos em alguns tecidos do que em outros, admite-se que as diferentes expressões

moriogénicas reflitam na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos.

Portanto, a compreensão da organogênese de plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento das células meristemáticas requer a observação das mudanças subcelulares e as suas correlações com as alterações bioquímicas (Pihakashi-Maunsbach et al. 1993). A grande aplicação desta metodologia é fornecer informações associadas aos parâmetros morfológicos e bioquímicos das células competentes (Santiago, 2003).

As células embriogénicas, de maneira geral, apresentam características comuns ao comportamento de células embriogénicas ativas, incluindo rápida divisão mitótica, pequeno tamanho, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolo proeminente, vacúolo pequeno e abundância de grãos de amido. Essas características sugerem uma intensa síntese de RNA e ampla atividade metabólica.

Assim, alguns autores tentam relacionar as características ultraestruturais ao potencial embriogénico (Radojevic et al., 1975). No entanto, a caracterização citológica de calos durante o desenvolvimento não tem sido realizada com frequência na cultura de tecidos. O estudo das alterações ultraestruturais durante a organogênese *in vitro* para caracterizar as células meristemóides e a formação dos brotos é escasso (Pihakashi-Maunsbach et al., 1993, Arai et al., 1997).

Dessa forma, a falta de conhecimento dos fatores que regulam a embriogênese somática e a assíncronia no desenvolvimento de embriões somáticos. São os principais responsáveis por sua reduzida aplicação comercial (Pihakashi-Maunsbach, 1993). Uma das estratégias que podem

aumentar a eficiência do processo embriogênico seria uma análise ultra-estrutural ainda no estádios de calos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar as diferenças ultra-estruturais relacionadas à calogênese de anteras, ovários, folha e segmentos nodais de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para a calogênese de anteras e ovários, botões florais de ingazeiro foram coletados de populações naturais, localizadas na Universidade Federal de Lavras, no período de agosto a novembro de 2005 e armazenados à temperatura de 10°C por dois dias.

Na indução de calos em folhas e segmentos nodais, foram utilizadas plantas matrizes jovens de ingazeiro mantidas em sala de crescimento à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, densidade de fluxo de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Essas plantas foram obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (CEMIG), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, MG ($21^\circ 29' 15''\text{S} / 44^\circ 38' 33''\text{O}$).

Desinfestação e inoculação do material vegetal

Botões florais, segmentos nodais e folhas foram lavados em água corrente por 20 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70%, por 60 segundos e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a triplice lavagem em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, os botões florais

seccionados longitudinalmente com bisturi para o isolamento das anteras ou ovários.

Calogênese

Os diferentes explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 3% de sacarose e $4,5\mu\text{M}$ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), exceto para calogênese de folhas, em que foram utilizados $9\mu\text{M}$ desta auxina e na calogênese de anteras e ovários, cujo meio de cultura foi acrescido de 0,25% de carvão ativado e 0,9mM de polivinilpirrolidona (PVP).

Todos os meios de cultura utilizados foram solidificados com ágar 0,7% e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C , por 20 minutos. Os explantes foram mantidos no escuro à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 45 dias.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após 45 dias em meio de cultura, os calos de anteras, ovários, folhas e segmentos nodais foram fixados em Karnovsky [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,0] por um período de 2 a 24 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 0,05M, por 4 horas.

Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (30, 50, 70 e 90 por 10 minutos). Posteriormente, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina Spurr 30%, por 8 horas, a 70%

por 12 horas e duas vezes a 100%, em intervalos de 24 horas. Os tecidos emblocados em resina pura e colocados em estufa a 70°C, por 48 horas, para a polimerização.

Em seguida, foram realizados os cortes em seções semifinas (1µm) e ultrafinas (<100nm), utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-Jung. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina (1g azul de toluidina, 1g borato de sódio e 100 mL de água purificados por meio de filtro Millipore 0,2µm) e montados permanentemente em meio Permoult.

Os cortes ultrafinos foram coletados em uma gota de água com grades Slots e colocados em raques, cobertos com uma película de formvar (Rowley & Moran, 1975). As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo, por 3 minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 109 a 80Kv.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após 45 dias em meio de cultura, os calos de anteras, ovários, frutos, folhas e caules foram fixados em Karnovsky [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato, pH 7,0, por, no mínimo, uma hora, em temperatura ambiente.

Posteriormente, os calos foram cortados com bisturi em nitrogênio líquido e os fragmentos lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05M e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 0,05 M por 1-2 horas. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (30%, 50%, 70% e 90%) por 10 minutos.

Após a desidratação, foi realizada secagem ao ponto crítico, por meio de CO₂ líquido e as amostras metalizados com ouro. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico (LEO Evo 40), operando entre 10 e 20 kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças ultra-estruturais entre as células dos calos provenientes de anteras, ovários, segmentos e folhas. Na MEV foi verificada a proliferação de células, com formato isodiamétrico (Figura 1c e 1d) em toda a superfície da antera, inclusive na região do conectivo (Figura 1b) e no grão de pólen (Figura 1f).

As células dos calos de anteras, quando observadas em MET, apresentaram núcleos centrais com contorno irregular e formas diversas (Figura 2a). Essa conformação de núcleo também foi observada por Gloria & Machado (2004), em células organogênicas de *Glycine max* (L.) Merr.

Quanto ao citoplasma das células, esse é denso e abundante em retículo endoplasmático (Figura 2b) e mitocôndrias (Figura 2d). Segundo Tomes (1985), os calos embriogênicos, nas células, são compostos por células com características meristemáticas, apresentando dimensões relativamente pequenas e citoplasma denso. Além disso, nas células organogênicas de *Glycine max* (L.) Merr., as mitocôndrias são abundantes, com matriz eletrodensa e cristas bem desenvolvidas. Esse fator tem sido associado também a sistemas embriogênicos, estando relacionado a alta atividade metabólica, pelas altas taxas respiratórias (Canhoto *et al.* 1996).

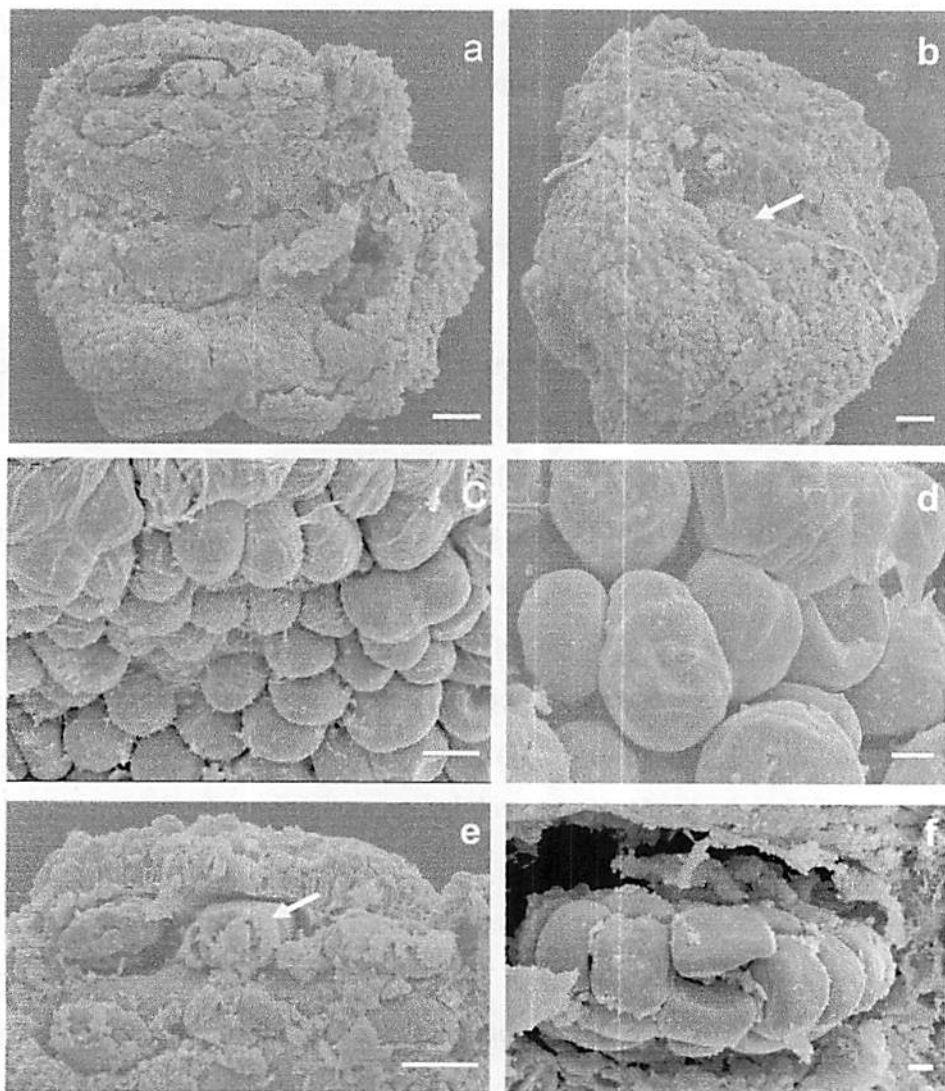


FIGURA 1. Eletromicrografias de varredura de calos de anteras de ingazeiro (a-d). Visão geral dos calos(a); visão geral dos calos na região do conectivo (b); células isodiamétricas dos calos (c,d); calos nos pólen (e,f). Br = 100 μ m (a, b, e); 20 μ m (c) ; 10 μ m (d, f). UFLA, Lavras, MG, 2006.

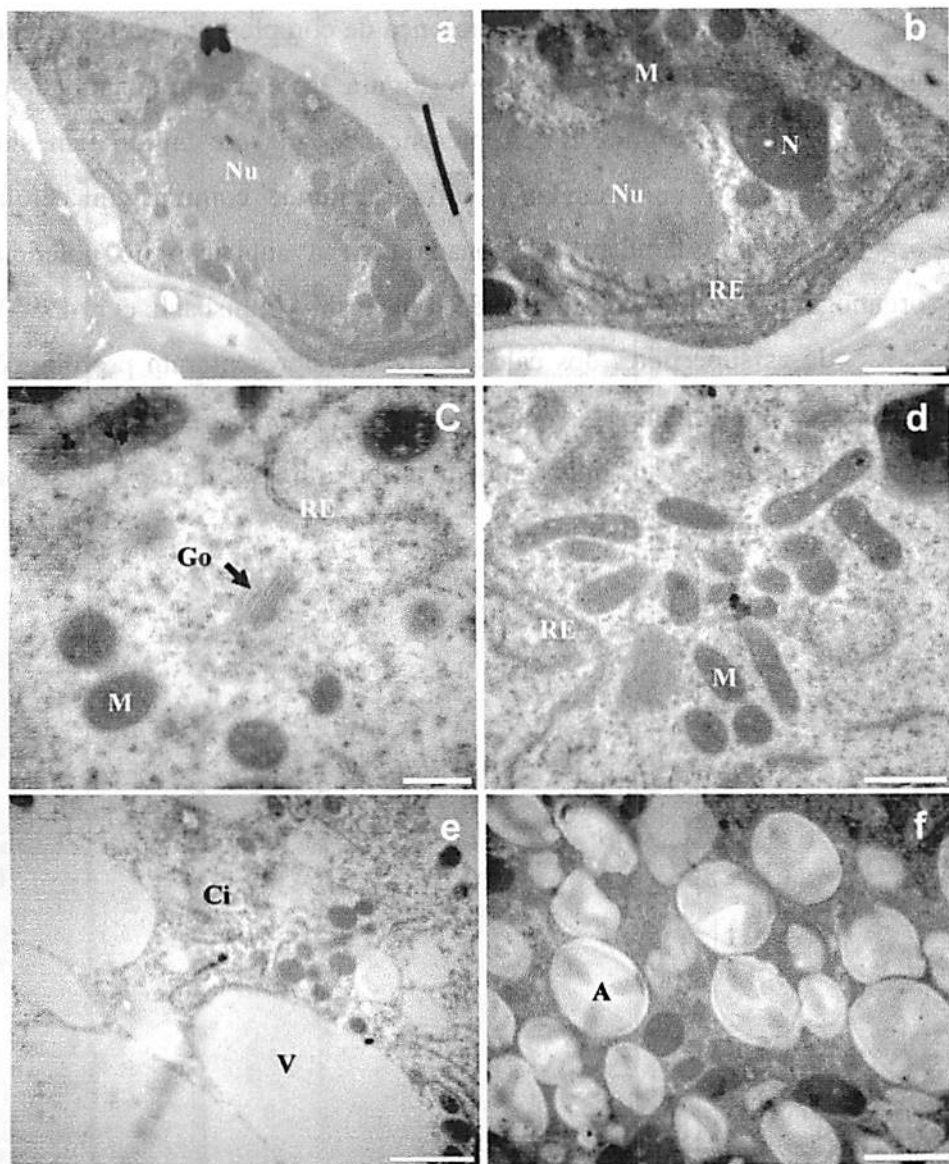


FIGURA 2. Eletromicrografias de transmissão de células dos calos em anteras. Célula do calo de anteras (a); retículo endoplasmático (b); complexo de golgi (c); mitocôndrias (d); vacúolos (e) e grãos de Amido (f). Br= 2 μ m (a, d, e, f); 1 μ m (b); 500nm (c). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Foi observada também a presença de complexo de Golgi (Figura 2c), vacúolos com citoplasma denso (Figura 2e) e grande quantidade de grãos de amido (Figura 2f). A presença de grão de amido tem sido reportada como uma mudança ultra-estrutural, comum em células organogênicas e também relacionada com a aquisição do potencial organogênico (Villalobos et al. 1985, Pihakashi-Maunsbach, et al 1993).

Já as superfícies dos calos de ovários apresentaram proliferações celulares bem organizadas, que indicam a formação de pró-embriões somáticos (Figura 3c), pois também observaram-se indícios de sistema vascular organizado (Figura 3d).

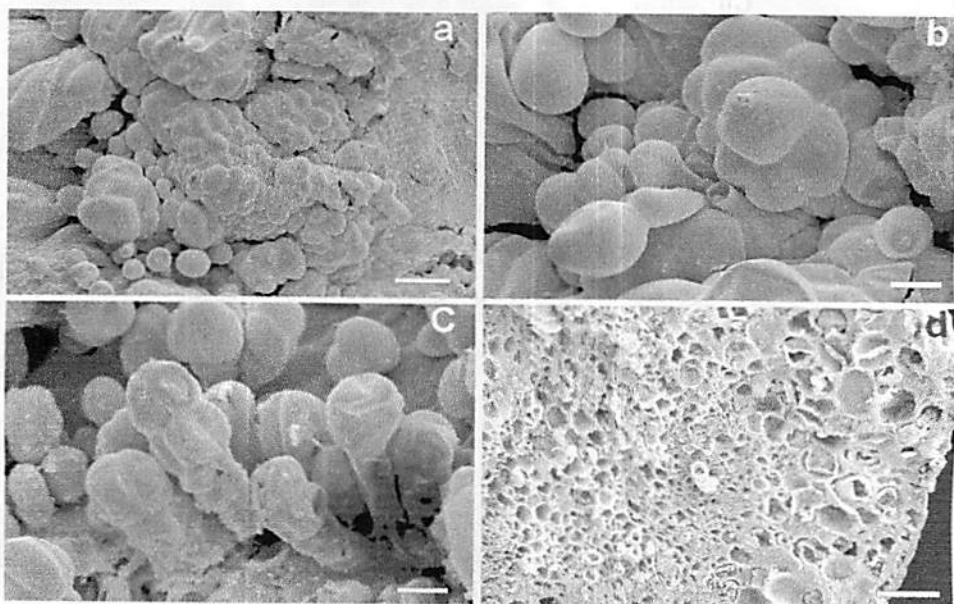


Figura 3. Eletromicrografias de varredura de calos em ovários. Proliferação de células (a); aspectos da superfície do calo (b); início da formação de embriões (c), organização vascular do calo (d). Br=10 μ m (a); 30 μ m (b); 20 μ m (c,d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Além disso, observaram-se núcleos e organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático em posição periférica (Figura 4a e b), pois a célula é praticamente toda ocupada por grandes vacúolos (Figura 4c). Como observado por Canhoto et al. (1996), usualmente, as células dos pró-embriões apresentam algumas características observadas em células meristemáticas. No entanto, podem ser tão vacuoladas que mostram apenas um fino citoplasma entre o tonoplasto e a membrana plasmática (Figura 4d).

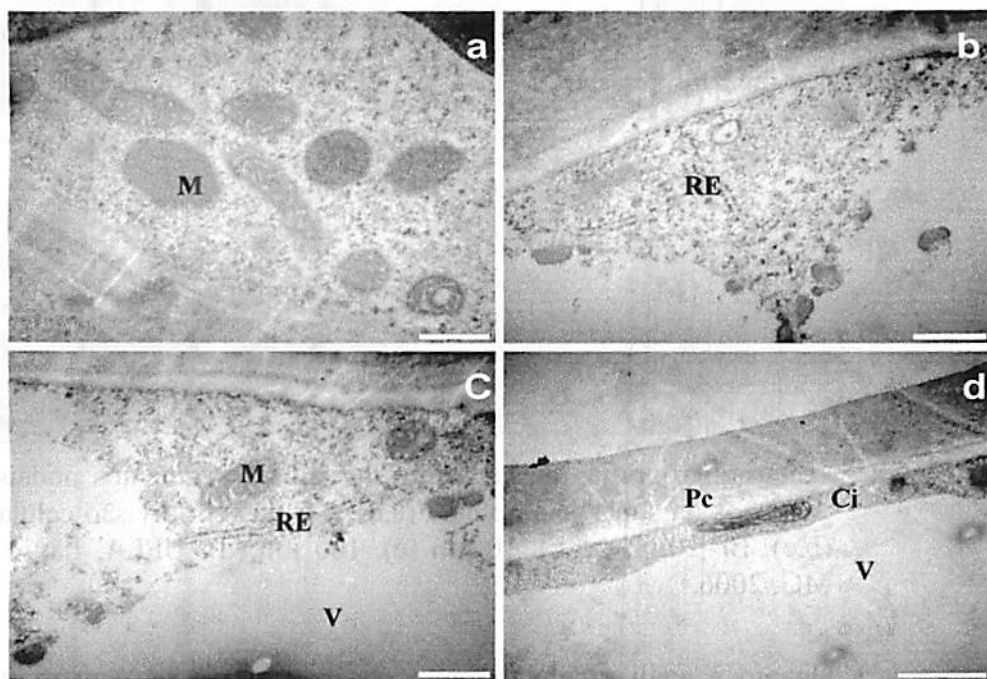


Figura 4. Eletromicrografias de transmissão de células dos calos de ovários. Mitocôndrias (a); retículo endoplasmático (b); mitocôndrias e retículo endoplasmático (c); citoplasma na periferia com mitocôndria. Br=500 μ m (a,b,c); 1 μ m (d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

No entanto, as superfícies dos calos de segmentos nodais e folhas não apresentam indícios de formação de embriões. As células na sua maioria apresentam formato arredondado. No entanto pode-se observar algumas formas alongadas (Figura 5).

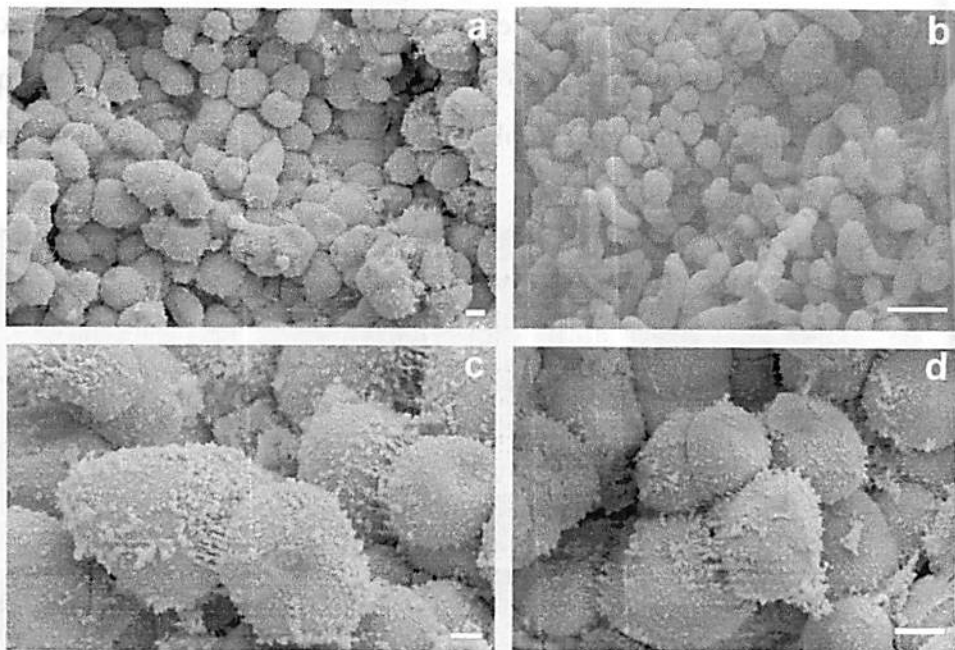


Figura 5. Eletromicrografias de varredura de calos e segmentos nodais. Aspectos da superfície do calo (a,d); Células em divisão celular (b,c). Br=20 μ m (a, b), 10 μ m (c), 100 μ m (d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quanto à análise celular foram observadas células com muitos vacúolos (Figura 6d), núcleos com formatos variados (Figura 6a e b) e grande quantidade de mitocôndrias (Figura 6c), em sua maioria com formato alongado. Segundo Canhoto (1996), as células não embriogênicas apresentam mitocôndrias com formato comprido, enquanto que, em células embriogênicas, as mitocôndrias são arredondadas (Figura

6c). No entanto, Skoog e Miller (1957) afirmam que as células não embriogênicas possuem potencial, para desenvolver células meristemáticas e quando em condições satisfatórias, podem dar origem a uma nova planta.

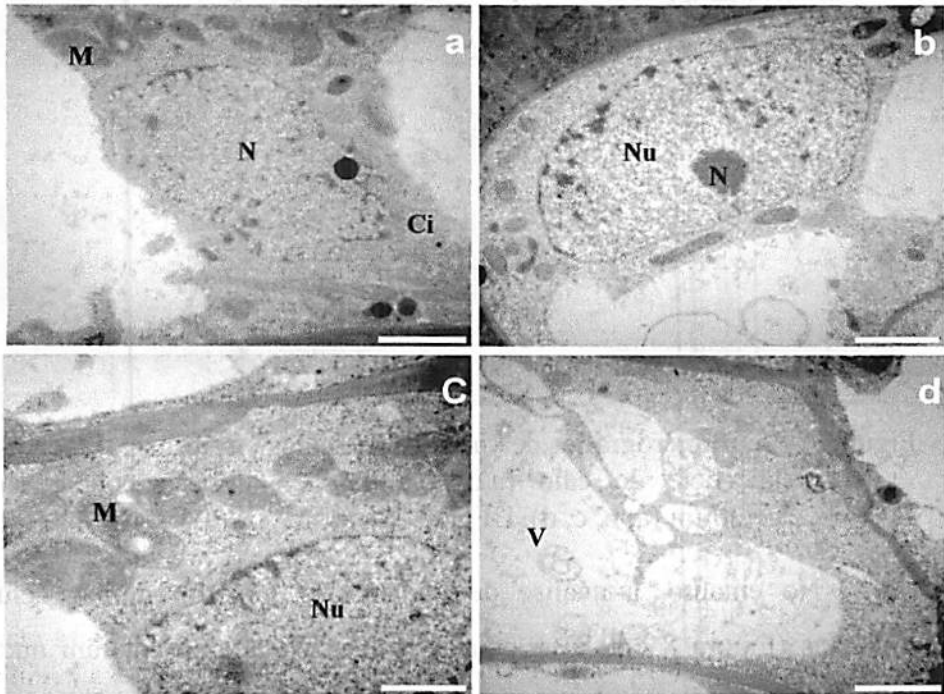


Figura 6. Eletromicrografias de transmissão de células dos calos de segmentos nodais. Núcleo (a, b); mitocôndrias (c); vacúolo (d). Br= 2 μ m (a, b, c, d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

As células dos calos provenientes de folhas apresentam morfologia semelhante às das células dos segmentos nodais, ou seja, bem arredondadas (Figura 7).

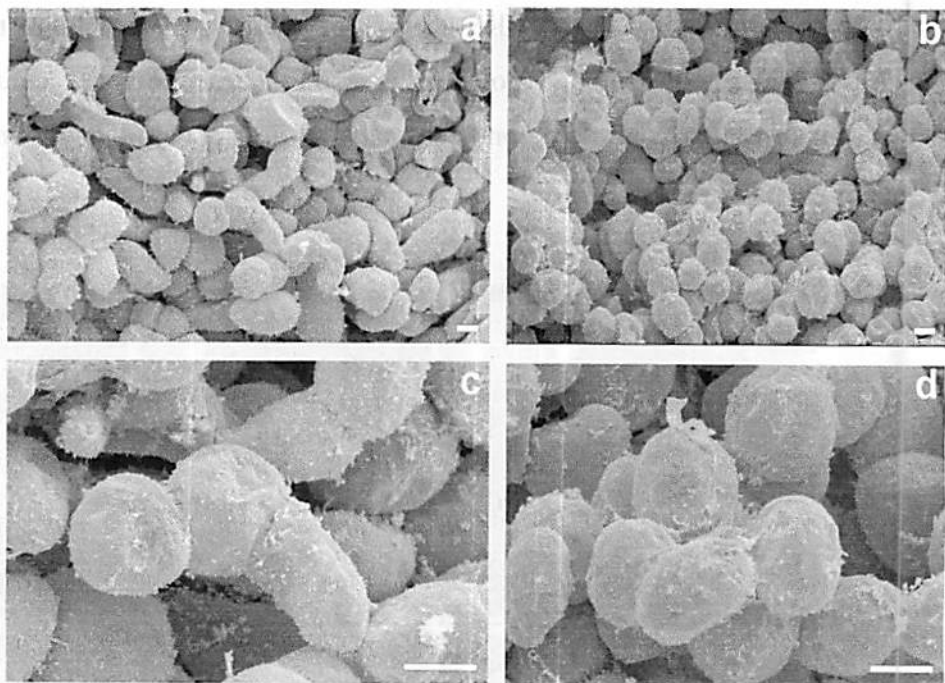


Figura 7. Eletromicrografias de varredura de calos em folhas. Aspectos da superfície do calo (a,d); células em divisão celular (b,c). Br=20 μ m (a, b, c, d). UFLA, Lavras, MG, 2006.

No entanto, a análise de transmissão mostrou muitas células inviáveis (Figura 8 c,d) e as poucas células vivas apresentaram núcleo irregular, poucas organelas e presença de amiloplastos (Figura 8b).

Como já mencionado durante a cultura de embriões somáticos, as células acumulam grande quantidade de grãos de amido, sugerindo que os grãos de amido podem ser utilizados como marcadores iniciais do potencial embriogênico (Radojevic, 1979; Ho & Vasil, 1983). Portanto, são necessárias sucessivas repicagens para a seleção das células vivas e com potencial embriogênico neste tipo de explante.

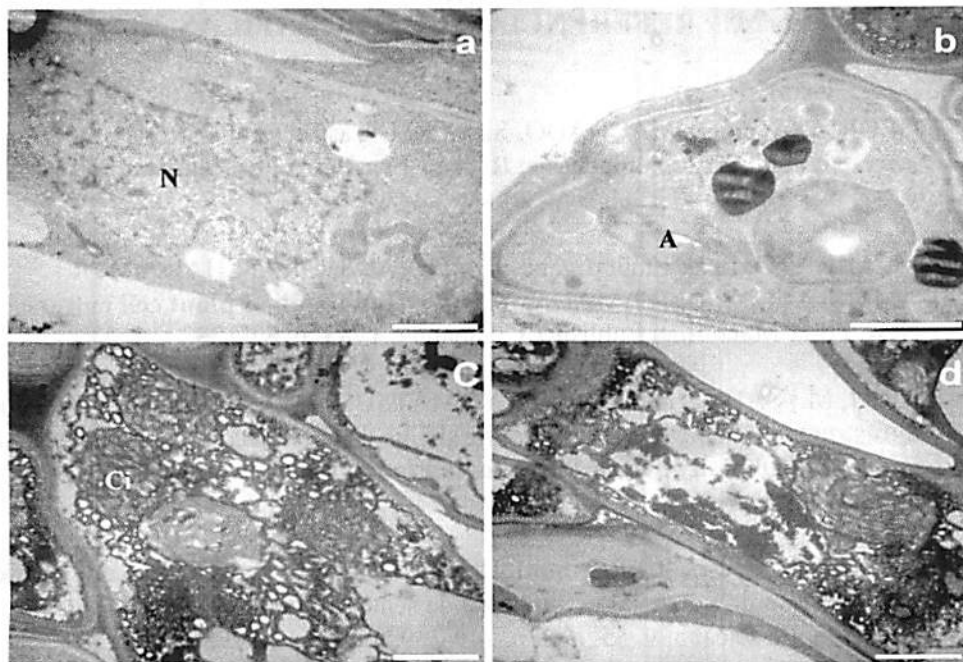


Figura 8. Eletromicrografias de transmissão de calos em folhas. Aspectos da superfície do calo (a,d); células em divisão celular (b,c). UFLA, Lavras, MG, 2006. Br=2 μ m (a,b,c,d)

CONCLUSÕES

Há diferenças ultra-estruturais entre as células dos calos provenientes de anteras, ovários, segmentos e folhas.

Os calos de anteras, folhas e segmentos nodais não apresentaram evidências de formação de embriões somáticos, apesar de suas células apresentarem algumas características embriogênicas. Os calos de ovários apresentam-se como a fonte de explante mais responsiva à embriogênese, mostrando indícios de formação de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GLORIA, A. da B.; MACHADO, Silvia R. Ultrastructural analysis of in vitro direct and indirect organogenesis. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 429-437, jul./sept. 2004.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan Publisher Company, 1983. p. 82-123.
- ARAI, M.; SAITO, T.; KANEKO, Y.; MATSUSHIMA, H. Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (*Nicotiana tabacum*) internodes cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 99, n. 4, p. 523-528, Apr. 1997.
- BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingazeiro. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 249-259, maio/ago. 1998.
- BARROS, L. de M. Embriogênese somática. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Uberlandia, v. 2, n. 7, p. 36-43, jan./fev. 1999.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis in Bay Laurel (*Laurus nobilis*). In: JANI, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed.). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 4, p. 341-367.
- CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, London, v. 78, n. 4, p. 513-521, Oct. 1996.
- GUPTA, P. K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W. C.; GROB, J.; WELTY, E. Forestry in the 21st Century. *Bio/Technology*, New York, v. 11, n. 4, p. 454-459, Apr. 1993.
- HO, W.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, New York, v. 118, p. 169-180. 1983.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. [S. l. : s. n.], v. 2, 1998. p. 569-612.

LOPE, K. P.; BRUNO, R. DE L. A.; BRUNO, G. B.; MOURA, M. F. **Comportamento de sementes de Inga sp. durante o armazenamento**. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/355.htm>. Acesso em: 5 fev. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-92, 1962.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G. TAVARES, L. B. B. **Biocologia de Piper hispidinervium-pimenta longa**. **Biocologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 19-23, jul./ago. 2000

PIHAKASHI-MAUNSBACH, K.; NYGAARD, K. B.; JENSEN, K. H.; RASMUSSEN, O. Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analysed by light and electron microscopy. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, n. 2, p. 167-176, Feb. 1993.

RADOJEVIC, L. Somatic embryos and plantlets from callus cultures of *Paulownia tomentosa* teud. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 91, n. 1, p. 57-62, 1979.

RADOJEVIC, L.; VUJICIC, R.; NESKOVIC, M. Embryogenesis in tissue culture of *Coryllus avellana* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 77, p. 33-41, 1975.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wring wrinkle – free sections on formvar – coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 151-155, 1975.

SANTIAGO, E. J. A de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, DeCandolle)**. 2003. 184 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia Society Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131,

TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston: Nijhoff/Junk, 1985. p. 175-203.

VIANA, A. M.; MANTELL, S. H. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the mata atlântica (South Brazil). In: JAIN, S. M.; GUPTA P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 3-30.

VIKRANT, A. R. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, n. 1, p 33-38, 2001

VILLALOBOS, V. M.; YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. . Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 12, p. 2172-2176, Dec. 1985.

WITJAKSONO, R. E.; LITZ, R. E.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.). In: JAIN, S. M.; GUPTA P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 197-214.