

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica

**Propagação *in vitro* e Caracterização Anatômica de Gemas
Adventícias e Embriões Somáticos de Murici (*Byrsonima basiloba*
Juss., Malpighiaceae)**

Zanderluce Gomes Luis

Brasília, DF
Abril de 2008



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Propagação *in vitro* e Caracterização Anatômica de Gemas
Adventícias e Embriões Somáticos de Murici (*Byrsonima basiloba*
Juss., Malpighiaceae)**

Zanderluce Gomes Luis

Orientador: Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Co-orientadora: Conceição Eneida dos Santos Silveira

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Botânica do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Botânica.**

Brasília, DF
Abril de 2008

Membros da banca examinadora:

Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Departamento de Botânica, UnB

(Orientador)

Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira

Departamento de Botânica, UnB

(Co-Orientadora)

Dr. João Batista Teixeira

CENARGEN/EMBRAPA

(Membro externo)

Dra. Sueli Maria Gomes

Departamento de Botânica, UnB

(Membro interno)

Dra. Lourdes Isabel do Velho Amaral

Departamento de Botânica, UnB

(Suplente)

*À meus pais e aos meus irmãos,
que colaboraram com compreensão,
amor e carinho nesta jornada !!!*

DEDICO

Só quem tenta o absurdo é capaz de alcançar o impossível.

Miguel de Unamuno

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo carinho de todos os dias, palavras de conforto e amizade. À meu pai, pela confiança e por acreditar sempre. Aos meus irmãos, pelo carinho e companheirismo.

À meus avós Orlando e Ironda, por todo incentivo e amparo.

Ao Maricélio, por toda atenção, dedicação, companheirismo, ajuda em todas as coletas e tudo que fosse necessário. À sua família, por me receber quando mais precisei, pelo carinho e atenção. Em especial à Marinalva por me acolher como filha e cuidar como se assim fosse.

Ao meu orientador, Professor Luiz Alfredo, pela compreensão, paciência e ajuda, sempre que necessário e principalmente por ter acreditado no meu potencial.

À co-orientadora, Professora Eneida, por toda paciência e auxílio durante todas as etapas deste trabalho e, principalmente, pela amizade e conselhos que foram de grande importância para minha formação pessoal e profissional.

Aos professores membros da banca: João Batista Teixeira por toda atenção e contribuição ao meu trabalho; Loudes Amaral, por toda atenção, carinho e incentivo, que foram essenciais quando achei que tudo estava perdido; Sueli Maria Gomes pela atenção.

Ao professor José Elias de Paula, por identificar a espécie no campo e toda a atenção prestada.

À minha querida amiga Giselle Pina, pela amizade sincera, companheirismo, incentivo e ajuda em todos os momentos. Obrigada Gi!!!

Ao amigo Davi!!! Sempre sincero e muito divertido! Obrigada por toda ajuda, amizade e confiança!!!

Às minhas amigas Luciene Barcelos e Letícia Zenóbia que, mesmo distante,

contribuíram com carinho e incentivo.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Botânica, Kadja, Aucilene, Juliene, Thais, Angélica, Gustavo, Mônica, Maria, Sabrina, Plauto, Gabriela, Cinara e Silvia, pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, Elias Luiz B. Cavalcante, por toda orientação e amizade; Eli Noronha, pela paciência e ensinamentos; Daiane e Guilherme pela amizade!

A todos os amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal e Fisiologia Vegetal por tornarem meus dias mais felizes!

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 ter meu profundo agradecimento.

À Capes pela bolsa de mestrado!

OBRIGADA A TODOS!!!

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Alguns aspectos sobre <i>Byrsonima</i> Rich. ex. H.B.K.	6
1.2 <i>Byrsonima basiloba</i>	7
1.3 Cultura de tecido vegetais	10
1.4 Micropropagação	11
1.5 Multibrotação	12
1.6 Regeneração <i>in vitro</i> de plantas	13
1.7 Contaminação <i>in vitro</i>	14
1.8 Meios de Cultura	16
1.9 Reguladores de crescimento	17
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO I	27
MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Byrsonima basiloba</i> Juss	27
RESUMO	28
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Coleta e preparo do material vegetal	32
2.2 Cultura de Tecidos	32
2.2.1 Desinfestação com hipoclorito de sódio e germinação	33
2.2.2 Desinfestação com fungicida Carbendazim e germinação	33
2.2.3 Multiplicação	34
2.2.3.1 Multiplicação e alongamento de brotos nos subcultivos	34
2.2.3.2 Efeito das concentrações de sais, hormônios e carvão ativado na multiplicação e alongamento	35
2.2.4. Alongamento	36
2.2.5 Enraizamento e aclimação	36
2.3. Análise estatística	37
3. RESULTADOS	38
3.1. Influência do tempo de imersão em hipoclorito de sódio sobre a desinfestação e	

germinação -----	38
3.2. Influência do tempo de imersão em fungicida Carbendazim na desinfestação e germinação de sementes -----	39
3.3 Germinação e desenvolvimento das plântulas -----	40
3.4 Multiplicação -----	42
3.4.1 Efeito do número de subcultivos -----	42
3.4.2 Efeito da concentração de sais do meio MS, hormônios e carvão ativado na multiplicação e alongamento de brotos -----	45
3.5 Alongamento -----	49
3.6 Enraizamento e aclimação -----	49
4. DISCUSSÃO -----	52
4.1 Desinfestação e germinação de <i>Byrsonima basiloba</i> -----	52
4.2 Desenvolvimento das plântulas -----	54
4.3 Multiplicação e alongamento -----	55
4.4 Enraizamento e aclimação -----	58
5. CONCLUSÕES -----	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	61
CAPITULO II -----	66
RESUMO -----	67
1. INTRODUÇÃO -----	69
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	71
2.1. Material vegetal -----	71
2.2. Meio de cultura para indução de formação de gemas adventícias e embriões somáticos -----	71
2.3. Concentrações de BAP e ANA na indução de embriogênese somática e organogênese -----	72
2.4 Testes para maximização dos processos de organogênese e embriogênese. -----	72
2.4.1 Efeito do TDZ, BAP e ANA -----	72
2.4.2 Efeito de um pré-tratamento, tratamento e meio de regeneração na indução de gemas adventícias e embriões somáticos -----	74
2.5 Análise morfo-anatômica -----	74
2.5.1 Obtenção do material e fixação -----	74
2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura -----	75

3. RESULTADOS	76
3.1 Reação dos explantes ao tratamento com BAP e ANA.	76
3.2 Testes para maximização dos processos de organogênese e embriogênese.	77
3.2.1 Efeito do TDZ, BAP e ANA	77
3.2.2 Efeito da variação das concentrações de BAP e ANA	78
3.3 Análise morfo-anatômica	82
4 DISCUSSÃO	86
5 CONCLUSÕES	91
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Aspectos gerais de <i>Byrsonima basiloba</i> -----	9
---	---

CAPÍTULO I

Figura 1. Germinação e desinfestação de sementes de <i>Byrsonima basiloba</i> em função do tempo de imersão em hipoclorito de sódio -----	38
Figura 2. Germinação e desinfestação de sementes de <i>Byrsonima basiloba</i> em função dos diferentes tempos de imersão em fungicida -----	39
Figura 3. Desenvolvimento das plântulas de <i>Byrsonima basiloba in vitro</i> em água e ágar --	41
Figura 4. Aspecto dos brotos de <i>Byrsonima basiloba</i> no primeiro e segundo subcultivos com 30 dias de cultivo.-----	44
Figura 5. Aspecto dos brotos de <i>Byrsonima basiloba</i> após 30 dias de cultivo-----	44
Figura 6. Aspecto dos brotos de <i>Byrsonima basiloba</i> após 30 dias de cultivo-----	48
Figura 7. Brotos de <i>Byrsonima basiloba</i> em meio de alongamento -----	49
Figura 8. Enraizamento e aclimação de brotos micropropagados de <i>Byrsonima basiloba</i> -	51

Tabelas

Tabela 1. Concentrações de sais do meio MS, de hormônios e presença ou não de carvão ativado nos tratamentos do segundo experimento de multiplicação de brotos de <i>Byrsonima basiloba</i> -----	35
Tabela 2. Média de brotos produzidos por clone nas cinco subculturas em meio MS suplementado com 1,0 mg.L ⁻¹ AIB + 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,2 mg.L ⁻¹ de CIN ---	42
Tabela 3. Efeito da subcultura sobre o número médio de brotos produzidos em meio ½ MS suplementado com 1,0 mg.L ⁻¹ de AIB, 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L ⁻¹ de CIN -	45
Tabela 4. Número médio de brotos de <i>Byrsonima basiloba</i> em função de diferentes concentrações hormonais, sais do meio MS e presença de carvão ativado -----	46

CAPÍTULO II

Figura 1. Explantes inoculados em meio suplementado com 0,45 mg.L ⁻¹ de BAP e 0,09 mg.L ⁻¹ ANA -----	77
Figura 2. Explantes inoculados inicialmente em meio BA suplementado com TDZ (0.66 mg.L ⁻¹) e ANA (0.01 mg.L ⁻¹) -----	78
Figura 3. Porcentagem de explantes oxidados, com calo friável e explantes necrosados em tratamentos contendo diferentes concentrações de BAP e ANA-----	80
Figura 4. Calos em explantes cotiledonares de <i>Byrsonima basiloba</i> -----	81
Figura 5. Aspecto das células nos calos, em divisão e sua organogênese -----	83
Figura 6. Embriões somáticos em explantes de <i>Byrsonima basiloba</i> -----	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB	Ácido indolbutírico
AIA	Ácido 3-indoliacético
ANA	Ácido naftaleno-acético
BAP	6-benzilaminopurina
CIN	6-furfurilaminopurina (cinetina)
MS	Meio de cultura formulado por (Murashige & Skoog, 1962)
½ MS	Concentrações de sais do meio MS diluídas pela metade
TDZ	Thidiazuron
2,4-D	Ácido 2,4- diclorofenoxiacético
PVC	Película de polivinilcloro

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é um tipo de vegetação própria do Brasil, com algumas extensões alcançando a Bolívia e o Paraguai, abrigando uma importante diversidade biológica, com um número significativo de espécies endêmicas (Ratter *et al.*, 1997). É considerado uma das 25 áreas mundiais prioritárias para conservação da biodiversidade, graças ao número de espécies endêmicas e o grau de ameaça em virtude das ações antrópicas.

O Cerrado abriga uma grande biodiversidade com cerca de 10 mil espécies de plantas dos quais 4400 seriam endêmicas, correspondendo 1,5 % da flora mundial (Myers *et al.*, 2000). Esse bioma possui inúmeras espécies de interesse econômico como plantas medicinais e frutíferas que geralmente são utilizadas pela população como fonte de alimento, no tratamento de muitas doenças infecciosas como malária, infecções bacterianas e fúngicas (Alves *et al.*, 2000).

É um bioma que se encontra bastante ameaçado, com espécies importantes comercial e ecologicamente e que estão desaparecendo em função da desordenada expansão urbana e agropecuária, bem como pela exploração irracional. O ritmo acelerado desta ação antrópica nas últimas décadas tem ocasionado a perda de material genético vegetal nativo e praticamente desconhecido cientificamente (Vieira & Martins, 2000). A preocupante taxa de extinção destas espécies vegetais torna urgente o estabelecimento de políticas e ações de conservação. Uma solução para a manutenção desse patrimônio genético é viabilizar o uso econômico e sustentável das espécies nativas do Cerrado que podem ser exploradas como recurso genético, alimento, medicamentos, fonte de energia, emprego em paisagismo e outras utilidades (Zaidan & Figueiredo-Ribeiro, 1995; Felfili *et al.*, 2002).

Dentre as várias espécies do Cerrado com potencial econômico destacam-se as espécies de *Byrsonima* (Malpighiaceae). Esse gênero tem cerca de 60 espécies nativas do

Brasil, as quais são conhecidas popularmente como murici (Mamede *et al.*, 1998). Seus frutos são ricos em vitamina C (Filgueiras & Silveira, 1990; Almeida *et al.*, 1998) e comumente utilizados na fabricação de doces, sucos, licores, sorvetes e consumo *in natura*. Sua comercialização se dá em grande parte em feiras livres e mercados públicos da região de ocorrência das espécies (Gusmão *et al.*, 2006).

Além de ser uma excelente fonte de alimento, a casca dos frutos pode ser utilizada como antidiarréico, na forma de chá ou como antifebrífuga, quando usada separadamente em decocção (Ferreira, 1973, Almeida *et al.*, 1998). As espécies arbóreas de *Byrsonima* podem ser utilizadas na construção civil, como ornamentais e também na recuperação de áreas degradadas (Silva & Tassara, 1996).

Apesar de sua grande utilidade, estudos visando o uso racional dessas espécies são raros. Além disso, muitas plantas do Cerrado, inclusive o gênero *Byrsonima* possuem baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas (Lorenzi, 2002), dificultando a propagação pela via sexuada. É importante que se trabalhe no sentido de se obter formas eficientes de propagação das espécies deste gênero, o que dará suporte para a multiplicação e conservação *in vitro* de genótipos, contribuindo dessa maneira para o seu manejo sustentável.

O uso de técnicas de cultura de tecidos consiste numa alternativa viável de propagação de plantas com dificuldades de reprodução semelhante às encontradas em espécies de *Byrsonima*. É uma ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, pois facilita a distribuição de material das plantas ameaçadas e permite a formação de banco de genes. Através da micropropagação o cultivo das espécies pode ser viabilizado em menos tempo, tanto para a recuperação do ambiente, como para o cultivo comercial das espécies com potencial econômico (Fay, 1992; Kane *et al.*, 2000; Pletsch, 2003).

Desta forma, este trabalho objetiva estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* e

caracterização micromorfológica de gemas adventícias e embriões somáticos de *Byrsonima basiloba* Juss.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Alguns aspectos sobre *Byrsonima* Rich. ex. H.B.K.

A família Malpighiaceae inclui cerca de 1.100 espécies, representadas por árvores, arbustos e lianas (Mabberley, 1993). Composta por cerca de 60 gêneros, essa família tem um amplo centro de distribuição na América Tropical, onde estão aproximadamente 85% de suas espécies (Davis *et al.*, 2002). Nos diferentes biomas do Brasil, a família apresenta 32 gêneros, com cerca de 300 espécies (Barroso, 1991). Dentre os gêneros pertencentes à Malpighiaceae, *Byrsonima* é composto por cerca de 150 espécies (Mamede, 1981), sendo um gênero essencialmente americano e encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Felício *et al.*, 1995).

No Brasil, são encontradas cerca de 60 espécies de *Byrsonima* distribuídas em vários estados, desde a Amazônia até o Paraná. O Cerrado brasileiro apresenta 38 espécies deste gênero, que medram em diferentes fisionomias, como cerradão, cerrado, cerrado sujo, cerrado ralo, campo rupestre e mata de galeria (Mendonça, 1998). No Distrito Federal há registro de 10 espécies (Giulietti, 1971). Popularmente são conhecidas como murici, morici, mureci ou moreci (Corrêa, 1984).

As espécies de *Byrsonima*, assim como todas as demais espécies de Malpighiaceae, possuem folhas simples, de filotaxia oposta, não apresentando estípulas (Joly, 1977). A floração das espécies deste gênero no Cerrado do Distrito Federal ocorre geralmente na primavera, muito embora algumas espécies floresçam quase o ano inteiro (Giulietti, 1971). As inflorescências são do tipo racemo terminal, com flores hermafroditas, pentâmeras, de simetria zigomorfa ou actinomorfa apresentando sépalas e pétalas, de formato e coloração, variáveis entre as espécies (Giulietti, 1971).

A frutificação das espécies *Byrsonima* pode ocorrer ao longo do ano todo (Ferreira, 1973). Os frutos são drupas de coloração amarela maturidade, com exocarpo fino, mesocarpo carnoso, endocarpo pétreo, contendo um único pirênio, com três lóculos e uma semente em cada lóculo (Giulietti, 1971; Ferreira, 1973; Barroso, 1991), sendo *B. gautherioides* Griseb. a única espécie cujo fruto é unilocular monospérmico (Giulietti, 1971).

Apesar da importância econômica do gênero, poucos trabalhos foram dedicados ao seu estudo, principalmente no que diz respeito à propagação de suas espécies para o uso racional e sustentável.

1.2 *Byrsonima basiloba*

Byrsonima basiloba possui vários nomes populares como murici-do-campo ou murici de folhas brancas (Ferreira, 1973), e de acordo com dados constantes no herbário da Universidade de Brasília (UB), também é conhecida como murici-de-ema. *B. basiloba* é uma planta arbustiva, bastante ramificada, com cerca de 2 metros de altura (Ferreira 1973). De acordo com Giuliette (1971), *Byrsonima basiloba* pode ser coletada em diferentes localidades do Distrito Federal, tais como, nas margens do Lago Paranoá, na Chapada da Contagem, no córrego Convança, além de outras áreas. Pereira (2002) também encontrou espécimes de *B. basiloba* no final da L2 Norte, próximo ao parque Olhos D'água e na via L3 próximo ao IBAMA.

Esta espécie floresce entre os meses de dezembro e maio podendo este período estender de setembro a maio. Sua frutificação ocorre de janeiro até outubro (Giulietti, 1971). Os frutos maduros apresentam cor amarela e diâmetro entre 1 e 2 cm. Estudos morfo-anatômicos do fruto e da semente desta espécie mostram que as sementes são frágeis, não apresentam dormência tegumentar e quando maduras não possuem endosperma (Pereira, 2002).

Os frutos das espécies de *Byrsonima* assemelham-se em diversas características como: forma, diâmetro e coloração e de acordo com Ferreira (1973). Dentre as espécies desse gênero no Distrito Federal, apenas três despertam interesse econômico em função do tamanho de seus frutos: *B. basiloba*, *B. crassa* Nied. e *B. verbascifolia* (L.) Rich, apresentando frutos com diâmetros entre 1 e 2 cm. Segundo Pereira (2002) os frutos de *B. basiloba* são maiores, que os das outras espécies de *Byrsonima*.



Figura 1. Aspectos gerais da espécie *Byrsonima basiloba*. **A)** Indivíduo no campo, com frutos verdes. **B)** Ramo com gema apical; folhas com filotaxia oposta cruzada. **C-D)** Frutos verdes e em estágio de maturação. Matriz fotografada no Centro Olímpico da Universidade de Brasília.

Os frutos são bastante apreciados e consumidos *in natura*, ou processados artesanalmente na forma de refresco, sorvetes, licores, pudins e geléias (Barbosa *et al.* 1979, Almeida *et al.*, 1998). O fruto é também utilizado para extrair um corante preto usado em tinturarias (Almeida, 1998). Em função dos ótimos preços no mercado e de uma exploração extrativista e indiscriminada dos frutos, existe um risco real à sobrevivência das espécies nativas (Santana, 2002; Castro, 2003).

No comércio, já é possível encontrar a polpa de murici (Silva & Borges, 1979), que é vendida como uma mistura de polpas de várias espécies do gênero. Isso ocorre em função da dificuldade de colher frutos de uma mesma espécie, uma vez que esses são extraídos em áreas de vegetação nativa, onde a densidade por espécie é baixa e irregular (Azanha, comunicação pessoal). Além disso, devido à constante redução das áreas de Cerrado, *B. basiloba* pode sofrer uma erosão genética, agravando bastante a situação dessa espécie na natureza. Estudo de propagação *in vitro* a partir de ramos e plântulas germinadas *in vitro* demonstra que é possível o uso de técnicas de cultura de tecidos para a propagação dessa espécie. Foi estabelecido um protocolo de propagação a partir sementes germinadas *in vitro*, contudo as fases de enraizamento e aclimação não foram completadas (Pereira, 2002).

1.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais consiste em inocular explantes, que podem ser pedaços de caule ou de folha, gemas, embriões, cotilédones e grãos de pólen, em condições assépticas em meio de cultura visando promover a regeneração e multiplicação somática desses explantes para obtenção de uma planta completa, com todas as características e funções orgânicas da planta original (Melo *et al.*, 1998). Em geral, os meios de cultura contêm sais minerais, podendo ter ou não um agente gelificante, suplementado com fitorreguladores, em ambiente asséptico e condições de luz e temperatura controladas (Feveiro *et al.*, 2001).

As técnicas de cultura de tecidos são eficazes na propagação de várias espécies, sendo, sobretudo importante para aquelas que se encontram em risco de extinção, em geral devido à antropização do seu ambiente natural (Cerqueira, 1999). No Brasil, poucos são os trabalhos relatando o emprego da cultura de tecidos visando a conservação de espécies ameaçadas, sendo que com espécies do Cerrado podem-se citar estudos realizados com mangabeira, *Hancornia speciosa* Gomez (Soares *et al.*, 2006), *Lychnophora pinaster* Mart. (Souza *et al.*, 2003), *Caryocar brasiliense* Camb. (Santos *et al.*, 2006), *Gomphrena macrocephala* St.-Hil

(Moreira *et al.*, 1999), barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)Coville (Pasqual & Barros, 1992; França *et al.*, 1995), e *Anemopaegma arvense* (vell) Stellf. ex de Souza (Pereira *et al.*, 2003). Os resultados obtidos de tais estudos são promissores o suficiente para se acreditar que a continuidade das pesquisas nesta área trará benefícios significativos para o plantio de espécies selecionadas (Melo *et al.*, 1998).

1.4 Micropropagação

A micropropagação é uma das principais aplicações da cultura de tecidos vegetais (Barbosa *et al.*, 1993) e tem como objetivo reproduzir plantas idênticas à planta-matriz de onde foram retirados os explantes. A técnica está baseada no totipotencial de uma única célula vegetal, ou seja, na sua capacidade de, por si só, originar uma nova planta, com as mesmas características genéticas da planta original (Pinto, 2001).

Através das técnicas de micropropagação pode-se induzir a proliferação de gemas apicais e axilares (multibrotação), formação de gemas adventícias por organogênese e de embriões por embriogênese somática, permitindo a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo (Grattapaglia & Machado, 1998; Torres *et al.*, 1998; Carvalho, 1999).

Uma das principais funções da técnica de cultura de tecidos é a produção de clones, que gera material homogêneo, livre de patógenos; híbridos, por hibridação somática, através da fusão de protoplastos, plantas haplóides, mutantes portadores de caracteres desejáveis obtidos por meio de agentes mutagênicos ou por variação somaclonal. Além disso, existem outras aplicações dessa tecnologia, como a construção de biorreatores vegetais, plantas geradoras de vacinas por engenharia genética, conservação de germoplasma por criopreservação, ou por manutenção do material vegetal durante períodos prolongados e sob condições limitantes de crescimento e desenvolvimento e, finalmente, biotransformação de

compostos pouco interessantes em compostos muito interessantes sob o aspecto econômico (Amaral & Silva, 2003).

Vários fatores influenciam na obtenção de um protocolo de sucesso para micropropagação. Dentre eles podemos destacar: estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz e do explante no momento da coleta, a época de coleta, o tipo de explante, o protocolo de desinfestação, o isolamento e o tamanho dos explantes, as condições de cultivo, a manipulação dos explantes nas subculturas, entre outros (Youmbi, 1991; Silveira, 1994; Grattaplaglia & Machado, 1998).

1.5 Multibrotação

A técnica de multibrotação consiste na multiplicação por meio de brotos contendo meristemas apicais e/ou axilares ou através de primórdios foliares. Pode ser realizada em meio de cultura com ou sem reguladores de crescimento, resultando em brotos semelhantes a plântulas, com forte dominância apical. Os meristemas podem estar quiescentes ou ativos, dependendo do estado fisiológico da planta (Melo, 1998).

Para se estabelecer uma cultura de ápices/gemas axilares é necessário que as partes da planta-mãe (explante), sejam retiradas livre de microorganismos, e colocadas em meio de cultura. Quanto menor o explante, maior a probabilidade de se obter uma planta livre de patógenos (Simão, 1998; Faveiro *et al.*, 2001), porém torna-se mais difícil sua sobrevivência. Apesar dos explantes maiores que 0,25 mm aumentarem o risco de contaminação virótica, eles têm uma taxa de sobrevivência mais elevada (Simão, 1998).

Em geral, o balanço de reguladores de crescimento (tipos/concentrações) é crucial no estabelecimento de cultura de ápices meristemáticos. Por exemplo, o modo de interação entre auxinas e citocininas é frequentemente afetado por fatores como espécie, órgãos e tecidos utilizados na cultura (Alves *et al.*, 2004).

Essa técnica tem sido usada com sucesso na multiplicação de diversas espécies (Fidelis, 1998), possibilitando obter mudas saudáveis, livres de vírus e outros patógenos, produzindo assim, material de alta qualidade genética e sanitária, sem a introdução de variabilidade genética (Grattapaglia & Machado, 1998).

1.6 Regeneração *in vitro* de plantas

A regeneração *in vitro* pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática a partir de uma otimização dos componentes do meio de cultura. A organogênese ocorre pela diferenciação de gemas adventícias diretamente no explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta) (Grattapaglia & Machado, 1998). Nesta via de regeneração, a gema é uma estrutura monopolar e há conexão vascular ao tecido de origem (Tisserat, 1991).

A regeneração indireta tem a vantagem de possibilitar a obtenção de uma grande quantidade de plantas a partir de um único explante, sendo um dos métodos mais eficientes na produção de plantas *in vitro*. Essa técnica apresenta o risco de provocar alterações genéticas tais como aneuploidias e poliploidias, que levam à perda da identidade genética do material propagado sendo, portanto evitada na propagação de culturas economicamente importantes, entretanto, é possível distinguir os regenerantes aberrantes na primeira etapa do processo, podendo-se assim eliminar as plantas indesejáveis (Pereira & Melo, 2004).

A embriogênese somática se caracteriza pela formação de embriões a partir de células somáticas, portanto sem fusão de gametas. Geralmente é induzida por tratamento com auxinas potentes e resulta na formação de estruturas não zigóticas, semelhantes a um embrião, tendo sua origem uni ou multicelular, de células pré-embriogênicas determinadas (embriogênese direta) ou de células embriogênicas determinadas induzidas (embriogênese indireta), esta via se caracteriza principalmente por apresentar estrutura bipolar e sistema vascular fechado (Thorpe, 1995). A indução de embriões somáticos apresenta grande potencial em várias

espécies de plantas, entretanto o seu sucesso em plantas lenhosas ainda é limitado (Guerra *et al.*, 1999).

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. De acordo com França (2001), a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual.

1.7 Contaminação *in vitro*

Na micropropagação todas as etapas são importantes, porém a desinfestação do explante é essencial, na qual podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida. A desinfestação deve permitir a eliminação dos microorganismos com o menor dano possível para os explantes. Na desinfestação, deve-se levar em conta o tipo de explante e a espécie vegetal para o uso das soluções desinfetantes (Mroginki & Roca, 1991).

Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio metabólitos tóxicos às plantas (Montarroyos, 2000). Na desinfestação, a maior dificuldade é obter a descontaminação sem provocar a morte do explante. Para isso várias substâncias com ação germicida têm sido utilizadas, sendo os mais comuns o etanol 70% e os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e o de cálcio (CaOCl_2) (Hartmann *et al.*, 1990; Grattapaglia & Machado, 1998). No entanto, existem também outras substâncias que podem ser utilizadas, como por exemplo a acetona, a qual foi utilizada com sucesso em ápices de *Arnica montana* L. (Conchou *et al.*, 1992). A concentração das soluções desinfetantes, assim como a combinação dos princípios ativos desinfetantes e o tempo de exposição podem variar muito (Montarroyos, 2000), sendo

necessário a adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (Mroginki & Roca, 1991).

A contaminação por microorganismos é conhecida como um dos problemas mais sérios na micropropagação. Na maioria das vezes, essa contaminação é proveniente de bactérias, sendo consideradas os contaminantes mais comuns em cultura de tecidos e os que ocasionam os maiores danos. Em seguida encontram-se os vírus, porque podem ser sistêmicos e sua detecção é mais difícil (Montarroyos, 2000). Para o controle das contaminações bacterianas, normalmente são utilizadas substâncias antibióticas que são incorporadas ao meio de cultura ou usadas diretamente sobre os explantes contaminados (Grattapaglia & Machado, 1998; Montarroyos, 2000).

As contaminações fúngicas podem ser facilmente visualizadas devido à intensa proliferação dos fungos (Pasqual *et al.*, 1997). O benomyl, primeiro fungicida sistêmico desenvolvido, possui atividades preventivas, curativas e sistêmicas contra numerosos grupos de fungos, sendo utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas, através de pulverizações na planta matriz em várias concentrações, 200 mg.L⁻¹ (Sato *et al.*, 2001), 1,0 g.L⁻¹ (Dantas *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003), 2,0 g.L⁻¹ (Mantovani *et al.*, 1999). A desinfestação de explantes, através da imersão completa do explante no fungicida tem sido relatada em diversos trabalhos como o realizado com embriões de pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke (Handa *et al.*, 2005) e em brotos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Flores *et al.*, 2006).

1.8 Meios de Cultura

Os meios utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

O meio de cultura é constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais são água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento. Outros componentes orgânicos, tais como aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas podem ser adicionados ao meio para otimizar determinada resposta no padrão de crescimento (Torres *et al.*, 2001).

Os macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, e enxofre são requeridos em todos os tipos de culturas, mas a concentração requerida pela planta de cada um pode variar de acordo com a espécie. Os micronutrientes são requeridos pela planta em quantidades menores, sendo os mais utilizados em cultura de tecidos o ferro, manganês, zinco, boro, cobre, cloro, molibdênio, e o níquel, no entanto o cobalto, iodo, e o sódio são incluídos em alguns meios de cultura, embora sua exigência e papel na fisiologia não estejam bem definidos (Rout *et al.*, 2000).

A exigência de carboidratos é suprida com a incorporação da sacarose 2-3%, ou glicose, sendo esta última com menos frequência. Outros carboidratos como a lactose, a maltose, a galactose são usados raramente. Além do seu papel como uma fonte de carbono, os carboidratos ajudam a manter o potencial osmótico no meio de cultura.

As plantas inteiras sintetizam todas as vitaminas requeridas para o seu crescimento e desenvolvimento normal, entretanto no meio de cultura são adicionadas vitaminas específicas, como a tiamina (B1), o ácido nicotínico (B3), a piridoxina (B6), e o mio-inositol, as quais são requeridas pelo explante em cultivo *in vitro*. Embora as células cultivadas sejam normalmente

capazes de sintetizar todos seus aminoácidos exigidos, a adição de glutamina, cisteína, prolina, e tirosina ou uma mistura do aminoácido como a caseína hidrolisada ao meio pode aumentar o crescimento celular.

O ágar é o agente solidificante mais usado para preparar meios de cultura sólidos ou semi-sólidos, porém outros agentes gelificantes como gelatina, amido e o gelrite também são utilizados (Rout *et al.*, 2000).

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e o B5 (Gamborg *et al.*, 1968) são os mais utilizados na cultura de tecidos da grande maioria das espécies, porém para espécies lenhosas o mais indicado é o WPM (Lloyd & Mccown, 1980; Caldas *et al.*, 1998). Entretanto, algumas espécies lenhosas são propagadas em meio MS, como a aroeira, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (Andrade *et al.*, 2000) e *Kielmeiera coriacea* Mart. (Arellano & Pinto, 1993). Além disso, modificações e diluições feitas no meio MS têm apresentado bons resultados para diversas espécies lenhosas. Em espinheira-santa, com a redução em 50% da concentração dos sais do meio MS, minimizou-se a oxidação fenólica (Flores *et al.*, 1998), enquanto que, para mogno, *Swietenia macrophylla* King, e espécies de *Prunus*, o meio MS diluído a $\frac{3}{4}$ foi eficiente no crescimento dos explantes, e na taxa de multiplicação (Rodrigues *et al.*, 2003; Rocha & Quorin, 2004). Na micropropagação de *Lychnophora pinaster* Mart, o meio MS diluído quatro vezes resultou em maior sobrevivência e multiplicação dos explantes (Souza, *et al.*, 2003). Já para aroeira, o meio MS com a metade dos seus sais foi eficiente na multiplicação da espécie (Andrade *et al.*, 2000).

1.9 Reguladores de crescimento

As concentrações de hormônios no meio de crescimento são determinantes para a maioria dos sistemas de cultivo *in vitro*. Simultaneamente, estimula certas respostas como crescimento, alongamento ou multiplicação da parte aérea. Estas respostas dependem do

estado fisiológico dos explantes, que está relacionado com a época do ano e estado geral da planta-matriz (Castro *et al.*, 2002).

As citocininas e as auxinas são as classes de reguladores mais usadas em cultura de tecidos e o balanço hormonal destes dois reguladores determina a formação de raízes, parte aérea e calo (Frank & Chumulling, 1999).

As citocininas desempenham papel importante na regulação da divisão celular, expansão foliar, quebra de dominância apical, formação de gemas adventícias, induzem o desenvolvimento prematuro de brotos axilares, que produzem grande número de brotações que podem ser cultivadas e utilizadas na produção de mudas, e interagem com as auxinas no controle de muitos aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas (Frank & Schmulling, 1999; Pozo *et al.*, 2005). Dentre as citocininas mais usadas em cultura de tecidos estão: BAP (6-benzilaminopurina), cinetina (CIN), zeatina, 2IP (isopenteniladenina) e TDZ (thidiazuron) (Torres, 2001).

O BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação nas culturas. Por outro lado, a CIN permite apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas (Hu & Wang, 1983 apud Torres, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). O TDZ é um herbicida, que tem sido utilizado como regulador de crescimento e apresenta efeitos semelhantes às citocininas, estimulando a produção de calos, tendo ação superior a estas, sendo muito eficiente na micropropagação em várias espécies, principalmente arbóreas ou florestais (Huetteman & Preece, 1993).

As auxinas estão envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos tais como dominância apical, formação e crescimento de raízes, abscisão foliar, indução de diferenciação vascular e desenvolvimento de gemas florais e do fruto (Taiz & Zeiger, 1998;

Pozo *et al.*, 2005). As auxinas mais usadas são AIA (ácido 3-indolacético), AIB (ácido 3-indolbutírico), ANA (ácido α -naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). O AIA é uma auxina instável que se degrada facilmente na presença de luz, pH baixo (Torres, 2001), fatores que a tornam muito fraca, quando comparada com o 2,4-D e o ANA, que são mais estáveis. O 2,4-D promove uma maior formação de calos e pode ser importante em sistemas de embriogênese somática, enquanto o AIA é ineficaz. Já o AIB é geralmente a melhor auxina na indução de raízes *in vitro* (Torres, 1998).

As giberelinas, na forma de ácido giberélico (GA3), têm como principal efeito o alongamento das brotações durante a multiplicação *in vitro*, sendo este fato observado em *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (Figueiredo *et al.*, 2001) e macela, *Egletes viscosa* (L) Less., (Diniz *et al.*, 2003). Em algumas culturas, as brotações obtidas na fase de multiplicação geralmente são pequenas e não se encontram em condições de serem individualizadas para o enraizamento. Neste caso, necessita-se de uma fase de alongamento e as giberelinas são os principais reguladores vegetais utilizados com esta finalidade (Grattaplagia & Machado, 1998).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. EMBRAPA- CPAC. Planaltina, DF. 85-88 p. 1998.
- Alves, T. M. De A.; Silva, A. F.; Brandão, M.; Grandi, T. S. M.; Smânia, E. De F.; Smânia Júnior, A.; Zani, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(3): 367-373 p. 2000.
- Alves, E. C. S. C., A. Xavier & W. C. Otoni. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. *Revista Árvore*. 28(5): 643-653p. 2004.
- Amaral, C.L.F.; Silva, A.B. da. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 30: 55-59p. 2003.
- Andrade, M.W. De; Luz, J.M.Q.; Lacerda, As.; Melo, P.R.A.de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciência e Agrotecnologia*, 24 (1):174-180p. 2000.
- Barbosa, M.H.P.; Pasqual, M.; Pinto, J.E.B.P.; Arello, E.F.; Barros, I. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. *Applebloesem*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. 28(1): 15-19p. 1993.
- Barroso, G.M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Universidade Federal de Viçosa, MG. 1991.
- Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 87-132p. 1998.
- Carvalho, J.M.F.C. *Técnicas de Micropropagação*. EMBRAPA- Centro Nacional de Pesquisas de Algodão. Campina Grande, PB. ISS 0101-0205, 38p. 1999.
- Castro, P.R.C.; Sena, J.O.A.; Kluge, R.A. *Introdução á fisiologia do desenvolvimento vegetal*. Maringá: Eduem. 55p. 2002.

- Corrêa, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Ministério da Agricultura Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 5: 264-269p. 1984.
- Dantas, A.C.De M.; Nesi, A.N.; Machado, L.B.; Haerter, J.; Fortes, G.R.de L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. *Revista Brasileira de Agrociência*, 8(1):19-23p. 2002.
- Davis, C.C.; Anderson, W.R.; Donoghue, M.J. Phylogeny of Malpighiaceae: Evidence from chloroplast *ndhF* and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal Botany*. 88: 1830–1846p. 2002.
- Diniz, J.D.N.; Almeida, J.L.; Teixeira, A.L.A.De.; Gomes, E.S.; Hernandez, F.F.F. Ácido giberélico (GA3) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de Macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.). *Ciência Agrotécnica*. 27(4): 934-938p. 2003.
- Felicio, J. D.; Gonçalves, E.; Lins, A. L.; Braggio, M. M.; David, J. M. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. *Arquivos do Instituto de Biologia*. São Paulo. 62: 91-92p. 1995.
- Ferreira, M.B. *Frutos Comestíveis Nativos do Distrito Federal-IV*. Fundação Zoobotânica do DF, Brasília- DF. 15-21 p. 1973.
- Fevereiro, Manuel P.; Caetano, Helena V.; Santos, Maria G. *Cadernos didáticos de Ciências*. Lisboa: Ministério da Educação, DES, EEC. 1. 2001.
- Fidelis, I. Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-cadela): uma espécie considerada medicinal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 102 p. 1998.
- Figueiredo, S.F.L.; Albarello, N.; Viana, V.R.C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (jacq.) Baill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology –Plant*. 37: 471-475p. 2001.
- Flores, R.; Stefanello, S.; Franco, E.T.H.; Mantovani, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Mayrtenus ilicifolia* Mart.). *Revista Brasileira de Agrociência*. 4 (3):201-205p. 1998.

- França, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: Simões, C. M. O. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª edição. Porto Alegre. 105-124p. 2001.
- Frank, M.; Schumulling, T. Cytokinin cycles cells. *Trends in Plant Sciences*. 4(7): 243-244p. 1999.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50:151-158p. 1968.
- Guerra, P.G.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, I.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. EMBRAPA: Brasília. 2:533-568p. 1999.
- Giulietti, A. M. *Byrsonima* do Distrito Federal. In: *III Simpósio sobre o cerrado*. Cood. Mário Guimarães Ferri. EDUSP & Editora Edgar Bluches Ltda. 133-149 p. 1971.
- Gusmão, E.; Vieira, F.A.; Fonseca Junior, E.M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). *Nota Técnica/Technical Note*: 12 (1): 84-91p. 2006.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. EMBRAPA. Produção de Informação/ Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. Brasília – DF. 2: 183-260p. 1998.
- Grigoletto, E. R.; Silveira, C. E.; Caldas, L.S. Micropropagation de mangaba (*Harconia speciosa* Gomez). *Anais do XLVII Nacional de Botânica*, Nova Friburgo, RJ. 441p. 1996.
- Grigoletto, E. R. Micropropagação de *Harconia speciosa* Gómez (mangabeira). *Tese de mestrado*. Universidade de Brasília. 68p. 1997.
- Hu, C.Y. & Wang, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. *Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding*, New York. 117-227p. 1983.

- Huettman, C.A.; Preece, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33(2): 105-119. 1993.
- Joly, A. B. *Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal*. Cia Editora Nacional. 4^a ed. São Paulo. 413 p. 1977.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa. 1: 386p. 2002.
- Lloyd, G.; Mccown, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, 15: 416p. 1980.
- Mamede, M.C.H. O gênero *Byrsonima* Rich. ex A.L. Juss. (Malpighiaceae). Na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. *Tese de Mestrado*. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1981.
- Mabberley, D. J. *The Plant-Book*. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press. 4^o ed. New York. 1993.
- Martins-Corderl & Borges Junior. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. *Ciência Florestal*. Santa Maria, 9(2): 1-7 p. 1999.
- Melo, J.T.; Silvia, J.A.; Torres, R.A.A.; Silveira, C.E.; Caldas, L.S. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado, p. 195-243. In: *Cerrado: Ambiente e Flora*. EMBRAPA. Planaltina- DF. 556 p. 1998.
- Mendonça, R.C.; Felfilli, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva, M. C.; Rezende, A.R.; Filgueiras, T.S.; Nogueira, P.E. Flora vascular do Cerrado. In: *Cerrado ambiente e flora*. Brasília: EMBRAPA. Planaltina- DF. 286-556 p. 1998.
- Montarroyos, A.V.V. Contaminação *in vitro*. *ABCTP Notícias*, 36 e 37:5-10p. 2000.
- Mroginsky, L.A; Roca, W.M. Estabelecimento de cultivos de tecidos vegetales *in vitro*. Roca, W.M.; Mroginsky, L. A. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. in: *Fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.20- 40p. 1991.
- Murashige, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166p. 1974.

- Murashige, T. & Skoog, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479. 1962.
- Myers, N.; Mittermeier, C.; Mittermeier, G.; Fonseca, G.A.B; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853-858.
- Pasqual, M.; Hoffmann, A.; Ramos, J.D. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações; introdução; fundamentos básicos*. UFLA/FAEPE. Lavras. 159p.1998.
- Pasqual, M. & Barros, I. Efeitos do ácido naftalenoacético e 6-benzioaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). *Pesquisa agropecuária Brasileira*. Brasília. 27(7): 1017-1019p. 1992.
- Pereira, K.B.D. Micropropagação e Estudo Morfo-Anatômico do Endocarpo, Semente e Plântula de *Byrsonima basiloba* Juss. *Tese de Mestrado*. Universidade de Brasília, UnB. Brasília, DF. 2002.
- Pereira, C. D.; Melo, B. Cultura de tecidos vegetais. Uberlândia- UFU/ICIAG. In: Floriano, E. P. 2004. *Produção de mudas florestais via assexuada*. Caderno Didático. n° 3. 1ª edição. 37p. 2004.
- Pinto, J. E. B. P. & Bertolucci, S. K. V. *Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais*. Lavras: FAEPE/UFLA. 169 p. 2001.
- Proença, C.; Oliveira, R. S. & Silva, A. P. *Flores e frutos do cerrado*. Ed. UnB, Brasília. 2000.
- Pozo, J.C.D.; Lopez-Matas, M.A.; Ramirez-Parra, E.; Gutierrez, C. Hormonal control of the plant cell cycle. *Biologia Plantarum*, 123:173-183p. 2005.
- Ratter, J.A.; Ribeiro, J.F.; Bridgewater, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*. 80: 223-230.
- Ribas, L.L.F.; Zanette, F.; Kulchetstki, L.; Guerra, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma pyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. *Revista árvore*. Viçosa- MG. 29(4): 517-524 p. 2005.

- Rodrigues, A.C.; Silveira, C.A.P.; Forets, G.R.L.De.; Fachinello, J.C.; Silva, J.B.da. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp., em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25 (1): 131-133p. 2003.
- Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P. *In vitro* manipulation and propagatino of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18: 91-120p. 2000.
- Santana, J. G. Caracterização de ambientes de cerrado com alta densidade de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.) na região sudeste do Estado de Goiás. *Tese de Mestrado*. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 100p. 2002.
- Santos, B.R.; Paiva, R.; Nogueira, R.C.; Lenaldo, M.O.; Silva, D.P.C.; Martinotto.; Soares, F.P.; Paiva, P.D.O. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura- Jaboticabal*. 28(2): 293-296. 2006.
- Sato, A.Y., Dias, H.C.T., Andrade, L.A. De; Souza, V.C. Micropropagação de *Celtis* sp: Controle da contaminação e oxidação. *CERNE*. 7 (2): 117-123p. 2001.
- Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Athayde, M.L. Saponinas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.De; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS. 597-622p. 2000.
- Silva, S. & Tassara, H. frutas no Brasil. Empresa das Artes. São Paulo. 204-206p. 1996.
- Silveira, C.E. Bouturage et microbouturage du *Fraxinus excelsior* L.: aspects morphogenetiques et cytophysiologiques. Tese de doutorado em morfo-anatomia e fisiologia vegetal na Universidade Pierre et Marie Curie, Curie. Paris VI. Paris. 301p. 1994.
- Silveira, C.E. & Cottignies, A. Period of harvest, sprouting ability of cutting, and *in vitro* plant regeneration in *Fraxinus excelsior*. *Canadian Journal of Botany*. 72: 261-267p. 1994.
- Simão, S. *Tratado de fruticultura*. Piracicaba: FESALQ. 760 p. 1998.
- Soares, F. P.; Paiva, R.; Alvarenga, A. A.; Nogueira, R. C.; Emrich, E. B.; Martinotto, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras. 31(4): 1048-1053p. 2007.

- Souza, A.V.; Pinto, J.E.B.P.; Bertolucci, S.K.V.; Corrêa, R.M.; Castro, E.M de. 2003. Germinação de embriões e multiplicação *In vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. *Ciênc. Agrotec.* Lavras. Edição Especial. 1532-1538p.
- Tisserat, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A.(ed.) *Plant Cell Culture*. Oxford. 79-106p. 1991.
- Torres, A.C.; Barbosa, N.V. Dos R.; Willadino, L.; Guerra, M.P.; Ferreira, C.F.; Paiva, S.A.V. de. *Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas*. Brasília. *Circular Técnica*. 24: 20p. 2001.
- Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. EMBRAPA Produção de Informação/ Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. Brasília. 2: 183-260 p. 1998.
- Thorpe, T.A. *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. 558p. 1995.
- Van Winkle, S., Johnson, S.; Pullman, G.S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*. New York. 21: 1175-1182p. 2003.
- Vieira, R. F.; Martins, V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 3(1): 13-36. 2000.
- Zaidan, L.B.P.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1995. Aproveitamento econômico de espécies nativas. In: Relatório do Workshop “Bases para a Conservação e Uso Sustentável das Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo”. Probio-SMA, São Paulo. 47p.

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO DE *Byrsonima basiloba* Juss.

RESUMO

O murici (*B. basiloba*) é um arbusto do Cerrado, cujos frutos são bastante apreciados, sendo consumidos *in natura* ou processados artesanalmente. Esta planta apresenta dificuldades de propagação sexuada. O objetivo do presente trabalho foi otimizar um protocolo de micropropagação para esta espécie, através de gemas apicais e adventícias obtidas de plântulas germinadas *in vitro*. Sementes de *B. basiloba* foram esterilizadas e germinadas em água e ágar. Gemas apicais e axilares adjacentes foram utilizadas na multiplicação em cinco subculturas. Para multiplicação foi utilizado meio MS e ½ MS, suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ou combinado com AIB (ácido indol-3-butírico) e cinetina, acrescido de 20 g.L⁻¹ de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de inositol e 7 g.L⁻¹ de ágar. Testou-se também a influência de carvão ativado. Não houve diferença entre o meio MS pleno e o diluído. A combinação BAP, AIB e CIN produziu maior quantidades de brotos, nas concentrações 0,5, 1,0 e 0,2 mg.L⁻¹ respectivamente. Para aumentar a eficiência na produção de brotos utilizando carvão ativado adicionado ao meio, é necessário aumentar as concentrações hormonais, caso contrário o meio promove apenas o alongamento dos brotos. O uso do carvão ativado foi essencial antes da etapa de enraizamento. Utilizou-se a mistura de talco neutro e AIB na base dos brotos, para o enraizamento *ex vitro*, que resultou em 47% dos brotos enraizados e aclimatados.

Palavras chaves:

Murici, Cerrado, micropropagação, multiplicação, enraizamento.

Abreviações:

BAP: 6-benzilaminopurina, AIB: ácido indol-3-butírico; CIN: cinetina; MS: Murashige & Skoog

ABSTRACT

The murici (*B. basiloba*) is a shrubby plant of the Cerrado biome, and its fruits are consumed fresh or as homemade sweeties. This species is difficult to be propagated by sexual reproduction. Therefore, the purpose of this work is to optimize a micropropagation protocol for this plant species using as explants the apical and adventitious buds taken from *in vitro* germinated seeds. Seeds of *B. basiloba* were sterilized and germinated in agar water medium. The apical and the adjacent buds were micropropagated in five subsequent multiplication subcultures. The multiplication medium was either MS or ½ MS, supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) alone or in combination with indole-3-butyric acid (IBA) or kinetin (KIN) plus 20 g.L⁻¹ of sucrose, 0.1 g.L⁻¹ myo-inositol, 7.0 g.L⁻¹ of agar. Furthermore, the influence of activated charcoal was tested during explant multiplication and elongation. There were no significant differences between the two media tested (MS and ½ MS) in the explant multiplication rate. The combination of 0.5 mg.L⁻¹ BAP, 1.0 mg.L⁻¹ IBA, and 0.2 mg.L⁻¹ KIN was the most effective in inducing sprouting. The activated charcoal was essential to elongate the explants before rooting. Nonetheless, to keep a high rate of multiplication after the addition of activated charcoal in the medium it was necessary to increase the concentration of the hormones. Rooting was induced *ex vitro* with a mixture of talcum powder and IBA at the basal region of the sprout, and 47% of the explants were rooted and acclimatized.

Key words:

Murici, Cerrado, micropropagation, multiplication, rooting.

Abbreviations:

BAP: 6-benzilaminopurine; IBA: indole-3-butyric acid; KIN: Kinetin; MS: Murashige & Skoog

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Byrsonima* é composto por cerca de 150 espécies (Mamede, 1981), sendo 60 nativas do Brasil. No Cerrado ocorrem 38 espécies e especificamente no Distrito Federal há registro de 10 espécies (Giulietti, 1971; Mendonça, 1998). Popularmente são conhecidas como murici, morici, mureci ou moreci, em suas regiões de ocorrência (Corrêa, 1984).

Os frutos das espécies de *Byrsonima* possuem diversas características semelhantes como forma, diâmetro e coloração. De acordo com Ferreira (1973), dentre as espécies desse gênero encontradas no Cerrado do Distrito Federal, apenas três despertam interesse econômico em função do tamanho de seus frutos: *B. basiloba* Juss, *B. crassa* Niedenzu e *B. verbascifolia* (L.) Rich. ex Juss., cujos frutos têm diâmetros entre 1 e 2 cm. Entretanto, segundo Pereira (2002) os frutos de *B. basiloba* são de dimensões maiores, o que aumenta o interesse por esta espécie.

Os frutos são bastante apreciados, sendo consumidos *in natura* ou processado artesanalmente na forma de refresco, sorvetes, licores, pudins e geléias (Barbosa *et al.* 1979; Almeida *et al.* 1998). No comércio, também já é possível encontrar a polpa de murici (Silva & Borges, 1979), que na verdade é uma mistura de polpas de várias espécies do gênero. Isso ocorre em função da dificuldade de colher frutos de uma mesma espécie, uma vez que esses são coletados em áreas de vegetação nativa, onde a densidade das espécies é baixa e irregular (Azanha, comunicação pessoal 2008).

Em função dos ótimos preços da polpa no mercado e da exploração extrativista e indiscriminada dos frutos, existe um risco real à sobrevivência das espécies nativas do Cerrado (Santana, 2002; Castro, 2003). Além disso, devido à constante redução das áreas com vegetação nativa, *B. basiloba* está sujeita a sofrer erosão genética, agravando bastante a situação dessa espécie na natureza. Observações em campo também mostram que a

germinabilidade desta espécie em condições naturais é baixa e isso se deve provavelmente à redução da fauna que se alimenta dos frutos que propicia a escarificação do endocarpo extremamente rígido, constituído de esclerênquima (Pereira, 2002). Estes fatos evidenciam a importância de estabelecer meios de propagação eficientes para esta espécie.

O presente trabalho objetiva estabelecer um protocolo de micropropagação para *Byrsonima basiloba* a partir de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo do material vegetal

Frutos maduros foram coletados de matrizes previamente selecionadas nos meses de setembro e outubro dos anos de 2006 e 2007, de acordo com o período de maturação e disponibilidade dos mesmos. As coletas foram realizadas em áreas de Cerrado localizadas no Centro Olímpico da Universidade de Brasília (UnB), Parque Olhos D'água e no final da via L3 Norte, todos situados na cidade de Brasília, Distrito Federal. Exemplares da espécie utilizada neste estudo foram depositados no Herbário na Universidade de Brasília (UB) com registro 76712.

Após a coleta, todos os frutos foram transportados para o Laboratório de Anatomia Vegetal, localizado no Departamento de Botânica da Universidade de Brasília, onde foram lavados em água corrente e detergente comercial, com auxílio de uma esponja. Posteriormente, foram retirados e descartados o exocarpo e mesocarpo carnosos. Os pirênios foram lavados em água corrente, com uma escova de cerdas duras e detergente líquido com ação fungicida. Subseqüentemente, os pirênios foram quebrados com auxílio de um torno de bancada e as sementes liberadas com auxílio de uma pinça de ponta fina.

A partir desta etapa, todas as manipulações foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, em condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal.

2.2 Cultura de Tecidos.

A metodologia utilizada seguiu as cinco fases para o estabelecimento de protocolo de micropropagação para espécies lenhosas de Melo *et al.* (1998).

Em todas as etapas as manipulações foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Todos os instrumentos utilizados (pinças, cabos de bisturis, placas de petri) foram previamente esterilizados em forno Pasteur a 150 °C, durante 24 horas.

2.2.1 Desinfestação com hipoclorito de sódio e germinação

Para a desinfestação, as sementes foram imersas em álcool etílico 70% durante 1 minuto e imersas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 15, 20, 30 e 40 minutos. Após aplicação dos tratamentos, as sementes foram lavadas três vezes por um minuto cada em água destilada e autoclavada e foram inoculadas em tubos de ensaio 150 x 25 mm contendo meio de germinação composto de água e ágar 7%.

Os tubos contendo o meio de germinação foram inoculados com sementes de cada um dos tratamentos de desinfestação e fechados com tampas plásticas, vedados com filme de PVC (película de polivinilcloro) e mantidos em sala de crescimento com lâmpadas fluorescentes (luz do dia) com irradiância de 41 $\mu\text{moles. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 80%, até o desenvolvimento das plântulas. Estas condições de cultivo foram utilizadas em todas as etapas. Para cada tratamento, foram realizadas três repetições, cada qual constituída por 10 sementes, totalizando 30 sementes por tratamento. A avaliação do número de sementes descontaminadas e germinadas foi realizada no 30º dia de cultivo.

2.2.2 Desinfestação com fungicida Carbendazim e germinação

Avaliou-se a eficiência do fungicida Carbendazim a 300 mL.L⁻¹ de água comercializado com nome Derosal®, através da imersão por 20, 40 e 240 minutos. Após imersão em fungicida, as sementes foram tratadas com álcool etílico 70% por um minuto, em seguida imersas por 20 minutos em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e lavadas três

vezes por um minuto cada em água destilada e autoclavada. As sementes foram inoculadas, cultivadas e avaliadas como descrito anteriormente.

2.2.3 Multiplicação

2.2.3.1 Multiplicação e alongamento de brotos nos subcultivos

Das plântulas com aproximadamente 30 mm de comprimento de parte aérea, obtidas na fase anterior foram utilizadas para a retirada dos explantes para multiplicação. Os explantes constituíram da parte aérea que compreendia o nó cotiledonar, gema apical, gemas axilares subjacentes e a parte basal das folhas cotiledonares. Para a multiplicação, testou-se meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), e MS com as concentrações de sais diluídas a metade ($\frac{1}{2}$ MS), como descrito para a espécie *Byrsonima basiloba*, por Pereira (2002). Acrescentou-se 20 g.L⁻¹ de sacarose ao meio, gelificado com ágar a 7 g.L⁻¹ e pH 5,7. O meio foi suplementado com reguladores de crescimento nas seguintes concentrações: 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 1,0 mg.L⁻¹ AIB (Ácido indol-3-butírico), e 0,2 mg.L⁻¹ de CIN (6-furfurilaminopurina).

A avaliação do material foi realizada 30 dias após cada repicagem, considerando em cada subcultura os seguintes parâmetros:

- a) Efeito sobre o número de brotos por explante e subcultivo;
- b) Efeito sobre o comprimento médio dos brotos;
- c) Morfologia das culturas obtidas conforme o número de subcultivos.

2.2.3.2 Efeito das concentrações de sais, hormônios e carvão ativado na multiplicação e alongamento

Para avaliar o efeito das concentrações de reguladores de crescimento, sais do meio MS e presença de carvão ativado realizou-se este experimento com brotos obtidos da segunda subcultura. Os brotos foram submetidos a quatro tratamentos para avaliar a multiplicação e o alongamento. Os tratamentos com diferentes concentrações hormonais, sais do meio MS e carvão ativado estão especificados na tabela 2. O tratamento inicial utilizado na multiplicação foi mantido para efeito de comparação com os novos e para verificar sua efetividade nas novas condições de cultivo.

A avaliação do material foi realizada no 30º dia após a inoculação nestes tratamentos. Foram considerados em todos os tratamentos os seguintes parâmetros: número de brotações por explante, comprimento e aspecto morfológico dos brotos.

Tabela 1. Concentrações de sais do meio MS, de hormônios e presença de carvão ativado nos tratamentos do segundo experimento de multiplicação de brotos de *Byrsonima basiloba* Juss.

Tratamentos	Concentração de sais	BAP mg.L ⁻¹	AIB mg.L ⁻¹	CIN mg.L ⁻¹	Carvão ativado mg.L ⁻¹
1	½ MS	1,0	0,5	0,2	0,0
2	½ MS	1,0	0,5	0,2	8,0
3	½ MS	0,0	10,0	0,0	8,0
4	½ MS	2,5	5,0	0,2	8,0
5	MS	2,5	5,0	0,2	8,0

2.2.4 Alongamento

O alongamento foi feito após o 5^o subcultivo. Os brotos foram transferidos para meio ½ MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e 0,2 mg.L⁻¹ de CIN e 8 mg.L⁻¹ carvão ativado.

Os brotos ficaram neste meio até que alcançassem aproximadamente 3,0 cm de altura para serem transferidos para a fase de enraizamento.

2.2.5 Enraizamento e aclimação

Para o enraizamento, os brotos foram colocados em copos plásticos de 300 mL perfurados, contendo vermiculita autoclavada e umedecida com água bidestilada e autoclavada. Antes do plantio, a base dos brotos com aproximadamente 2 mm foi tratada com uma mistura de AIB 1000 ppm e talco neutro com fungicida. Essa mistura foi preparada com 0,1 g de AIB, 0,1 g de Benlate® (Benomyl) e 100 g de talco neutro. Para homogeneizar a mistura, foi adicionado álcool comercial, de maneira a formar uma pasta. A pasta foi deixada à temperatura ambiente até total evaporação do álcool e da água, voltando ao estado de pó. O controle foi realizado tratando a outra metade dos brotos com a mesma mistura sem a adição de AIB.

Após o plantio, os copos plásticos foram cobertos com pequenos sacos plásticos transparentes individuais e fixados com uma liga de elástico, a fim de evitar a desidratação dos brotos.

A aclimação foi realizada no mesmo recipiente e substrato utilizado para o enraizamento, apenas retirando diariamente os sacos plásticos por períodos cada vez mais longos, até que as plantas estivessem totalmente aclimatizadas as condições ambientais (cerca de 20 dias). Posteriormente, as plantas foram transplantadas para recipientes plásticos de 1 L

contendo substrato composto de terra vegetal e vermiculita em partes iguais e umedecidos com água corrente de torneira.

A avaliação do material foi realizada no 30º dia, considerando número de plantas com raízes adventícias e aclimatizadas.

2.3. Análise estatística

Os dados obtidos através da porcentagem de desinfestação e taxa de germinação, por meio da contagem do número e comprimento (cm) de brotos por explante, foram submetidos a análises de variância e, quando significativos os dados paramétricos tiveram as médias comparadas pelo teste de Tukey e, quando não-paramétricos, pelo teste Kruskal-Wallis. O nível de significância de 5% foi adotado para todas as comparações. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi StatSoft STATISTICA 6.0.

3. RESULTADOS

3.1. Influência do tempo de imersão em hipoclorito de sódio sobre a desinfestação e germinação

Com relação à variável desinfestação, os tempos que proporcionaram maiores porcentagens de sementes desinfestadas (80% e 87%) foram respectivamente 30 e 40 minutos de imersão em hipoclorito de sódio (Figura 1). Os tempos que apresentaram maiores porcentagens de desinfestação, também resultaram em menor taxa de germinação. A análise estatística apontou diferença significativa apenas entre o tempo de 15 minutos de desinfestação em relação ao de 30 e 40 minutos com $p \leq 0,02$ e $p \leq 0,01$, respectivamente.

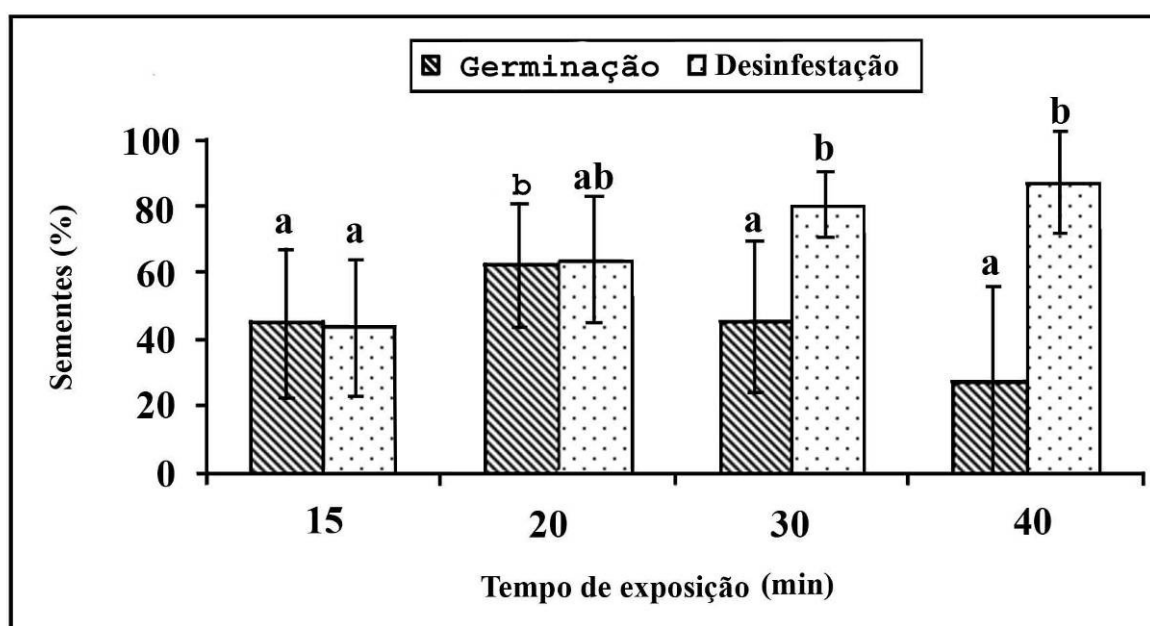


Figura 1. Germinação e desinfestação de sementes de *Byrsonima basiloba* em função do tempo de imersão em hipoclorito de sódio. As médias são expressas em porcentagens. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

No que se refere à variável germinação, verificou-se diferença significativa para o tempo de exposição em hipoclorito de sódio, 20 minutos, o que apresentou o melhor

resultado, com uma média de sementes germinadas superior a 60% (Figura 1). Tempos maiores que 20 minutos de imersão resultaram em decréscimo da taxa de germinação.

3.2. Influência do tempo de imersão em fungicida Carbendazim na desinfestação e germinação de sementes

Como a contaminação por fungo foi o principal problema no processo de desinfestação, testou-se a efetividade da adição de um fungicida. A presença de fungicida melhorou a eficiência da desinfestação/germinação. No tratamento de 20 minutos de imersão na solução desinfestante foi alcançado em torno de 80% de desinfestação e germinação (Figura 2). Nos tratamentos com tempos superiores a 20 minutos, foi alcançada maior eficiência na desinfestação, contudo a viabilidade das sementes foi sensivelmente comprometida (Figura 2).

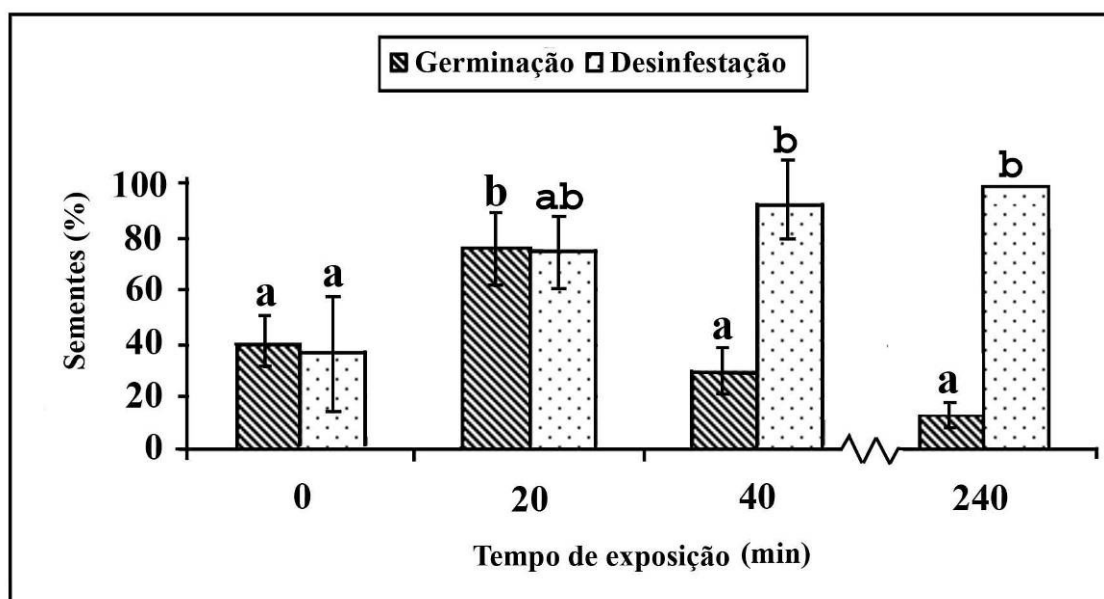


Figura 2. Germinação e desinfestação de sementes de *Byrsonima basiloba* em função dos diferentes tempos de imersão em fungicida. As médias são expressas em porcentagens. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3. Germinação e desenvolvimento das plântulas

A germinação das sementes de *Byrsonima basiloba* inicia após o 4º dia de inoculação, e no 20º dia o número de sementes germinadas é elevado. O desenvolvimento das plântulas (Figura 3 A-D) foi considerado lento, com as primeiras folhas (eofilos) surgindo cerca de 60 dias após a inoculação (Figura 3A). Em todas as sementes germinadas, somente depois dos cotilédones terem se expandido e se tornado verdes é que as primeiras raízes surgiram.

Algumas plântulas com os cotilédones totalmente desenvolvidos após 60º dia de cultivo produziram calos na face adaxial das folhas cotiledonares. Esses calos surgiram como manchas brancas na superfície adaxial (Figura 3 B) e se multiplicavam (Figura 3 C).

A maior quantidade de calos ocorreu em plântulas consideradas morfológicamente anormais. Nestas plântulas, foi possível observar diferentes padrões de desenvolvimento, tais como cotilédones que desenvolveram separadamente, cujos calos diferenciaram raízes a partir da face adaxial (Figura 3 D). Além disso, foi observado que algumas plântulas desenvolveram apenas parte aérea e na face adaxial dos cotilédones surgiram calos que posteriormente formaram raízes adventícias. Também foi visto que nas plântulas, com má-formação dos cotilédones, as raízes surgiam no epicótilo.

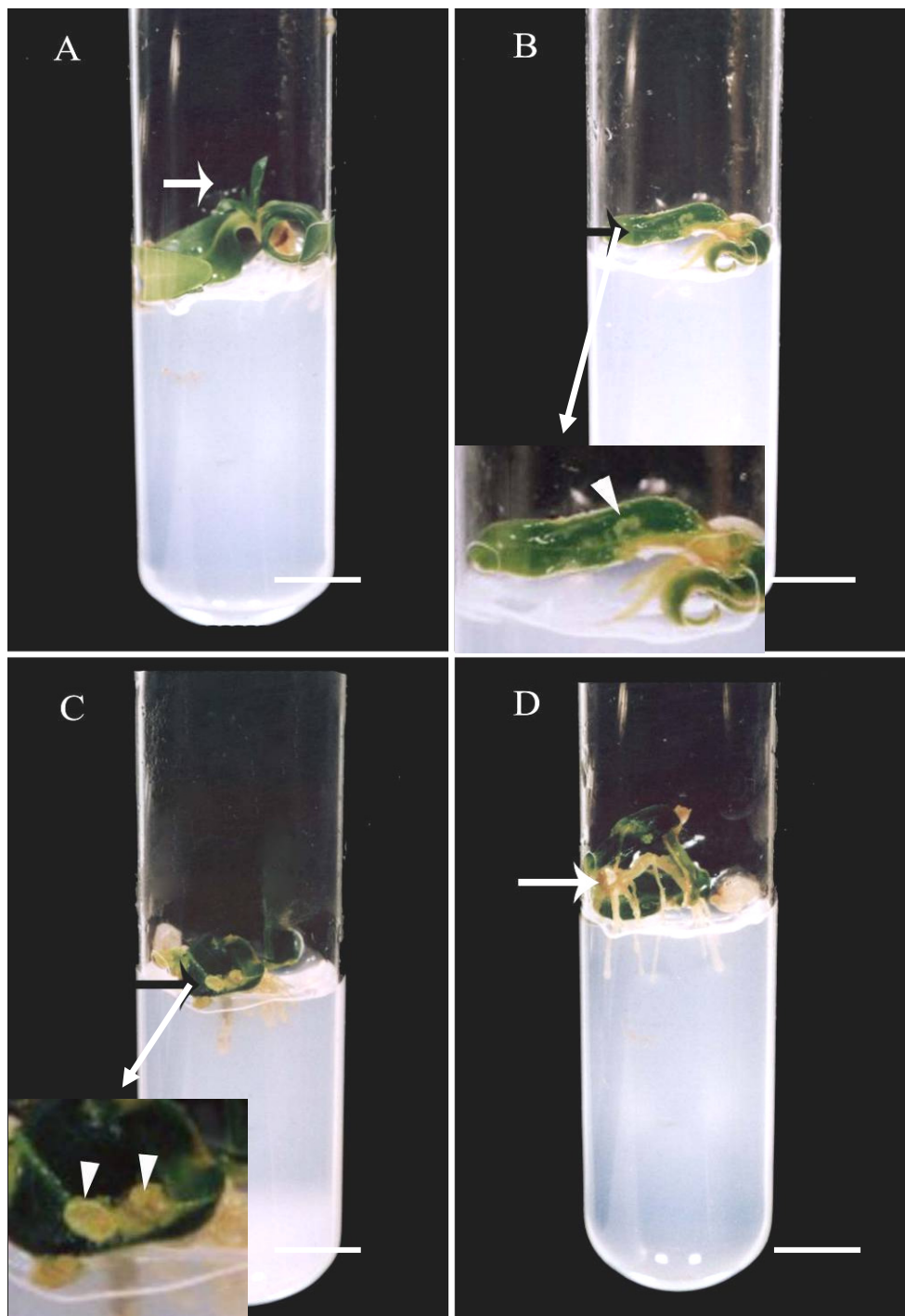


Figura 3. Desenvolvimento das plântulas de *Byrsonima basiloba* *in vitro* em água e ágar. **A)** Plântula normal com par de eofilos (seta). **B)** Plântula anormal com início de formação de calo no cotilédone (cabeça da seta). **C)** Plântula anormal com calos formados na folha cotiledonar (cabeças de seta). **D)** Plântula anormal, com folha cotiledonar separada e várias raízes adventícias (seta). Barras de escala = 1 cm.

3.4. Multiplicação

3.4.1 Efeito do número de subcultivos

A tabela 3 mostra o número de brotos produzidos pelos diferentes clones testados ao final das subculturas. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre o número de brotos dos clones na 1ª e 2ª subculturas, verificou-se uma tendência de diminuição dos brotos produzidos na 2ª subcultura na maioria dos clones testados com exceção dos clones 6 e 11. Esta diminuição ocorreu pela morte dos brotos dos clones 2, 4, 5 e 7 durante a segunda subcultura. Já na 3ª subcultura observou-se o aumento do número de brotos produzidos nos clones, exceto o clone 3. Na 5ª subcultura, do total de 11 clones iniciais, restaram apenas quatro produzindo brotos. Embora o número de brotos na 5ª subcultura tenha sido superior às demais, a análise estatística apontou diferenças significativas apenas desta em relação às duas primeiras subculturas realizadas neste experimento. Foi possível observar também que, com as sucessivas subculturas a média de brotos produzidos do clone 6 foi significativamente superior aos clones 2, 4, 5 e 7, pode-se notar uma diferença numérica expressiva.

Tabela 2. Número médio de brotos produzidos por clone em cinco subculturas realizadas sob efeito do tratamento $\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mg.L⁻¹ AIB + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,2 mg.L⁻¹ de CIN.

Clones	Subculturas					Número médio de brotos
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	
1	3	1	2	0	0	1,2 ^{bc}
2	1	0	0	0	0	0,2 ^c
3	5	5	2	0	0	2,4 ^{abc}
4	3	0	0	0	0	0,6 ^{bc}
5	1	0	0	0	0	0,2 ^c
6	12	23	62	169	470	147,2 ^a
7	9	0	0	0	0	1,8 ^{bc}
8	22	3	2	0	0	5,4 ^{abc}
9	43	27	37	22	36	33 ^{ab}
10	9	11	18	22	40	20 ^{abc}
11	15	26	36	56	79	42,4 ^{ab}
Média	11,2 ^a	8,7 ^a	14,5 ^{ab}	24,1 ^{ab}	56,7 ^b	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

A Figura 4 ilustra o aspecto morfológico dos brotos nas duas primeiras subculturas. Em parte dos brotos produzidos nas duas primeiras subculturas, as folhas adquiriram coloração amarelada e posteriormente os brotos necrosaram. Notou-se que alguns brotos que apresentavam folhas com coloração amarelada após serem transferidos para a terceira subcultura foram capazes de recuperar e adquirir aspecto saudável demonstrado pela coloração verde escuro das folhas (Figura 5A).

Durante a 3^a subcultura verificou-se que o espaço interno do tubo não era suficiente para os explantes que produziam maior quantidade de brotos. Desta forma, a partir da 3^a subcultura os explantes foram transferidos para frascos, o que possibilitou que os brotos desenvolvessem e produzissem mais brotações na 4^a e 5^a subculturas (Figura 5 B e C).

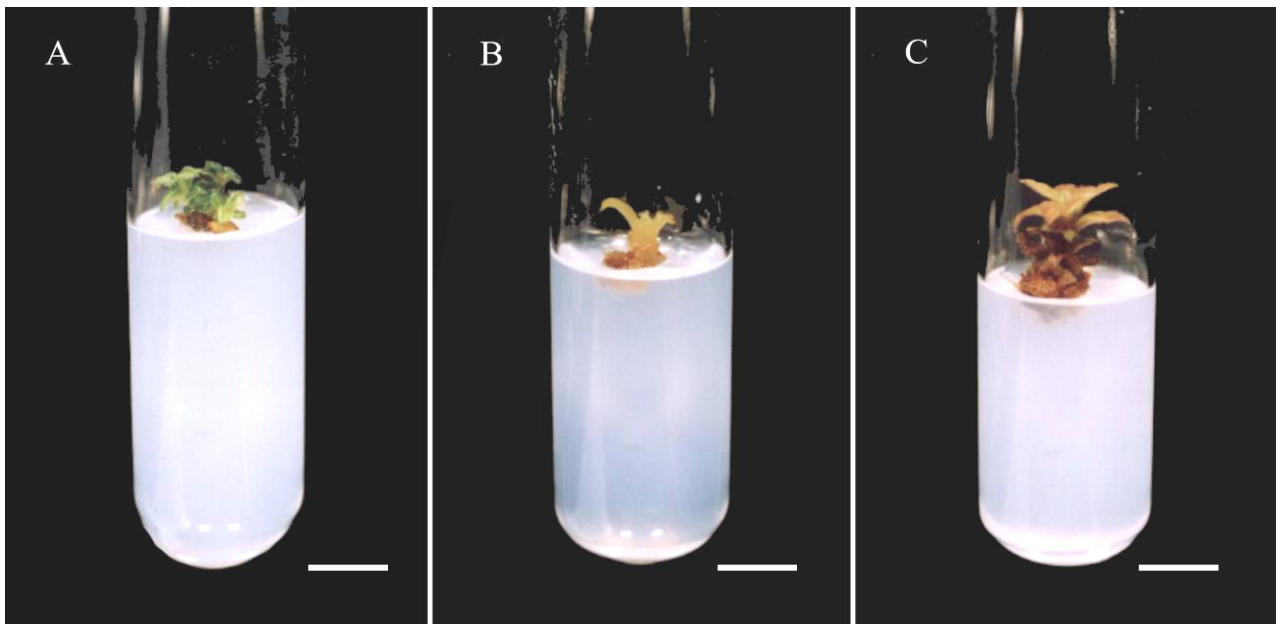


Figura 4. Aspecto dos brotos de *Byrsonima basiloba* no primeiro e segundo subcultivos com 30 dias de cultivo. **A)** Explante com brotações desenvolvendo normalmente. **B)** Explante sem desenvolvimento aparente e com folhas amarelas. **C)** Explante com folhas amarelas. Barras = 1,0 cm.

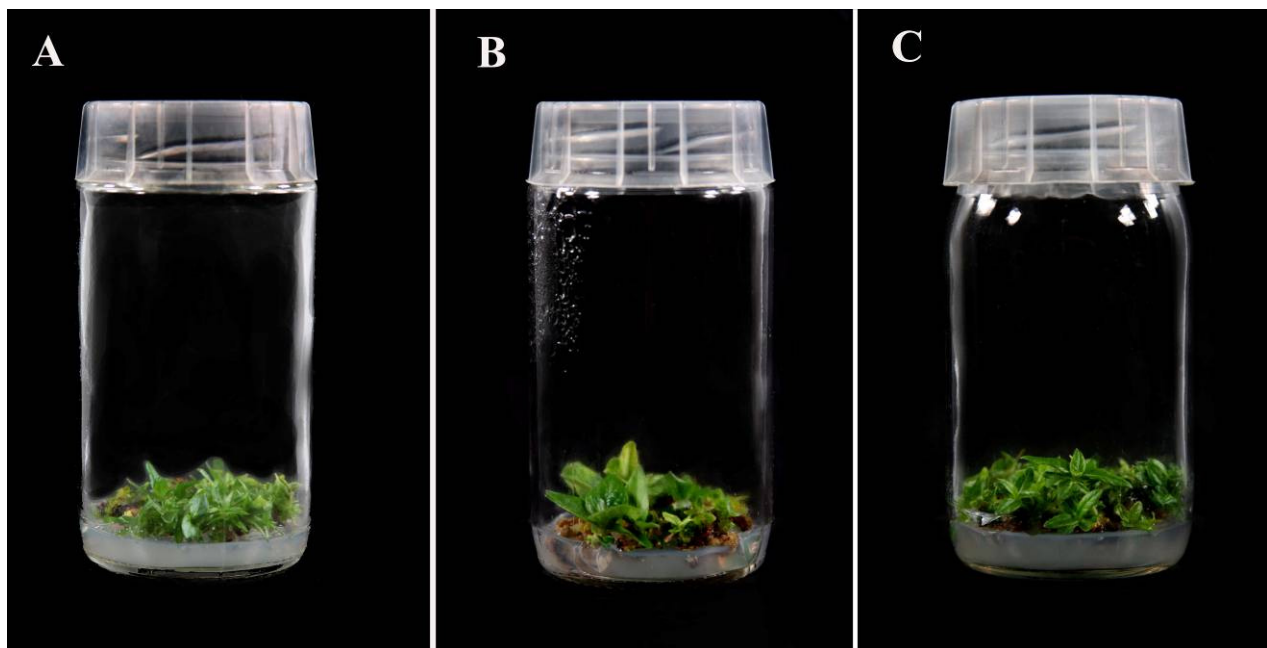


Figura 5. Aspecto dos brotos de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de cultivo. **A)** 3º subcultivo. **B)** 4º subcultivo. **C)** 5º subcultivo. Barras = 3,5 cm.

A tabela 3 agrupa os resultados observados no comprimento (altura) médio dos brotos nas cinco subculturas realizadas. Mesmo não existindo diferença significativa entre as cinco subculturas, observou-se que, o comprimento médio dos brotos na 2^a, 3^a e 4^a se manteve por volta de 0.32 a 0.39 cm. Já a 5^a subcultura foi a que apresentou melhores resultados, tanto em relação ao comprimento médio dos brotos, quanto ao número de brotos produzidos como já citado.

Tabela 3. Efeito do subcultivo sobre comprimento médio de brotos produzidos em meio ½MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB, 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L⁻¹ de CIN.

Subcultura	Número de brotos	Comprimento médio dos brotos
1 ^a	123	0,17 ^a
2 ^a	96	0,32 ^a
3 ^a	159	0,39 ^a
4 ^a	269	0,37 ^a
5 ^a	625	0,60 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.4.2 Efeito da concentração de sais do meio MS, hormônios e carvão ativado na multiplicação e alongamento de brotos.

Neste, verificou-se que, a presença de pelo menos uma auxina e uma citocinina no meio é essencial para o processo de formação de brotos (Tabela 4). Em meios contendo carvão ativado, foi necessário aumentar a concentração dos reguladores de crescimento para que se mantivesse a eficiência na formação de brotos. A média do número de brotos dos tratamentos mais eficientes ficou ao redor de nove brotos por clone.

A tabela 4 permite observar que, o maior número de brotos produzidos ocorreu no tratamento 1, o qual foi estatisticamente diferente dos outros tratamentos. Ressalta-se ainda que o tratamento 1 foi o mesmo utilizado no experimento anterior de multiplicação, o que confirma a eficiência do mesmo no desenvolvimento das gemas axilares. Já o tratamento 2 contendo menores concentrações de reguladores de crescimento, apesar de não apresentar diferença estatística em relação aos demais tratamentos, foi o que permitiu maior alongamento dos brotos. Embora o tratamento 3 tenha sido eficiente com relação ao alongamento dos brotos, este continha grande quantidade de BAP (10 mg.L^{-1}), aumentando o custo da produção de plantas em larga escala e ainda, mesmo que o carvão ativado esteja agindo como um quelante, a grande quantidade de BAP poderia interferir no processo de enraizamento.

Além disso, as combinações hormonais neste experimento resultaram numa visível melhora do aspecto morfológico dos brotos provenientes da segunda subcultura (Figura 6). A presença de carvão ativado nos tratamentos não resultou necessariamente em maior quantidade de brotos, porém, notou-se maior alongamento (Tabela 4) e vigor dos brotos demonstrado pela coloração das folhas (Figura 6 B-D).

Tabela 4. Número e comprimento médio de brotos de *Byrsonima basiloba*, em função de diferentes concentrações hormonais, sais do meio MS e presença de carvão ativado.

Tratamentos	Concentração de sais	Hormônios mg.L^{-1}			Carvão ativado mg.L^{-1}	Número médio de brotos	Comprimento médio dos brotos
		AIB	BAP	CIN			
1	½ MS	1,0	0,5	0,2	0,0	9,5 ^a	0,30 ^a
2	½ MS	1,0	0,5	0,2	8,0	4,2 ^b	0,48 ^a
3	½ MS	0,0	10,0	0,0	8,0	3,7 ^b	0,46 ^a
4	½ MS	2,5	5,0	0,2	8,0	8,7 ^{ab}	0,39 ^a
5	MS	2,5	5,0	0,2	8,0	8,6 ^{ab}	0,41 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey significância ($p \leq 0,05$).

As concentrações de sais do meio MS não tiveram efeito significativo sobre a produção de brotos como pode ser verificado nos tratamentos 4 e 5 (Tabela 4). Pode-se notar que a diferença entre os valores do número médio e comprimento dos brotos nestes dois foi mínima.

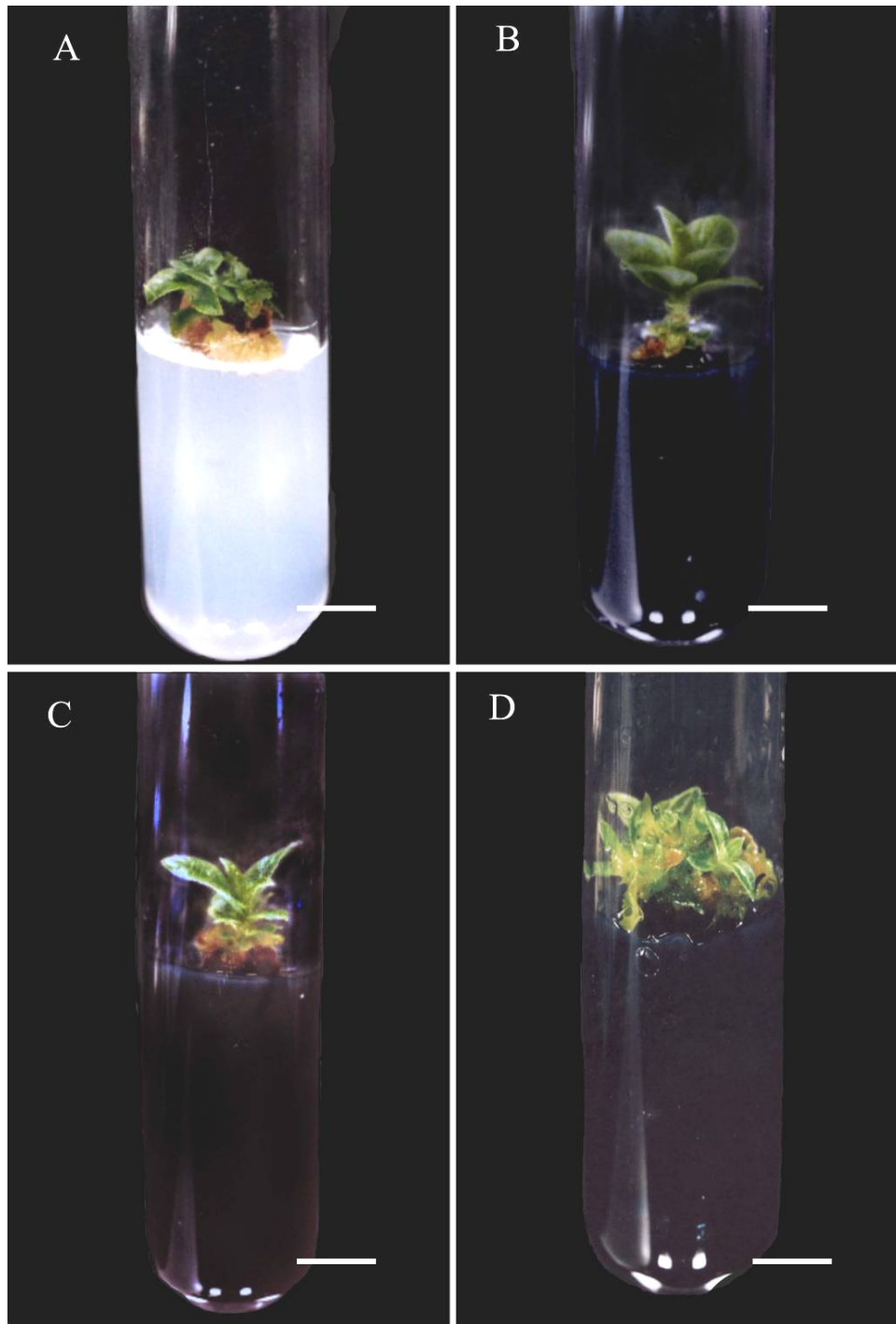


Figura 6. Aspecto dos brotos de *Byrsonima basiloba* após 30 dias de cultivo. **A)** Broto inoculado em $\frac{1}{2}$ MS, $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ CIN. **B)** Broto inoculado $\frac{1}{2}$ MS, $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ CIN e carvão ativado. **C)** Broto inoculado em $\frac{1}{2}$ MS, $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ CIN e carvão ativado. **D)** Broto inoculado em MS, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ CIN e carvão ativado. Barras = 1,0 cm.

3.5 Alongamento

O alongamento foi realizado em meio contendo $\frac{1}{2}$ MS, $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ CIN e $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de carvão ativado. Observou-se que ao colocar vários brotos no mesmo frasco para alongar, geralmente um alongava mais, como pode ser notado na figura 7A. Quando se isolavam os brotos e os colocavam no meio de alongamento, formavam um calo cicatricial na inserção dos brotos adjacentes que foram retirados. Esse calo formado pode ter exercido influência na etapa de enraizamento.

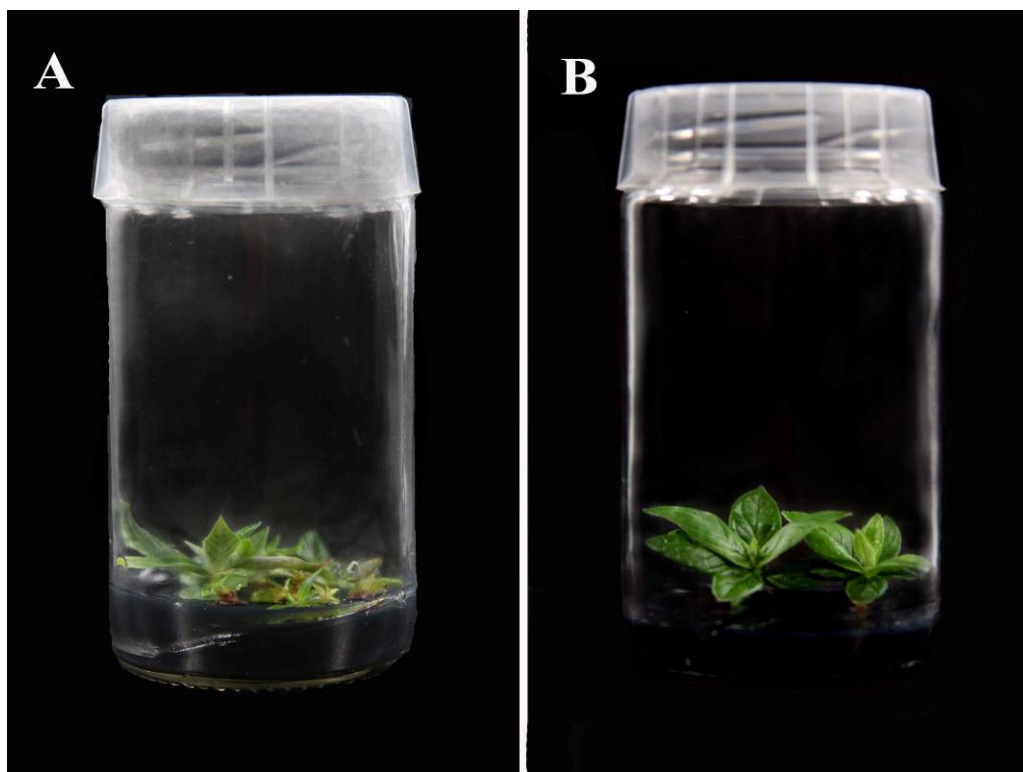


Figura 7. Brotos de *Byrsonima basiloba* em meio de alongamento. **A)** Brotos apresentando um mais desenvolvido. **B)** Brotos após 30 dias em meio de alongamento.

3.6 Enraizamento e aclimação

O enraizamento foi obtido 45 dias após a transferência para condição *ex vitro* e tratamento com talco e AIB. A Figura 8 A-D, ilustra desde a base do broto tratada com talco mais AIB até o broto com 2 raízes adventícias. Aos 20 dias nesta condição, observou-se que somente os brotos contendo calo na base, formado pela retirada dos brotos adjacentes conseguiram diferenciar raízes adventícias. Aqueles transferidos sem vestígio de calo não foram capazes de enraizar necrosando após 25 dias. A maior porcentagem de plantas que enraizaram e sobreviveram foram aquelas retiradas da condição *in vitro* com mais de 2 centímetros de altura. Estas sobreviveram, mesmo sem raízes, até 30 dias em condição *ex vitro*.

De um total de 50 brotos 27 foram enraizados, ou seja, 54% enraizamento. Os 50 brotos colocados no tratamento controle não foram capazes de enraizar, evidenciando a necessidade de se utilizar uma auxina para induzir a diferenciação de raízes adventícias nesta espécie.

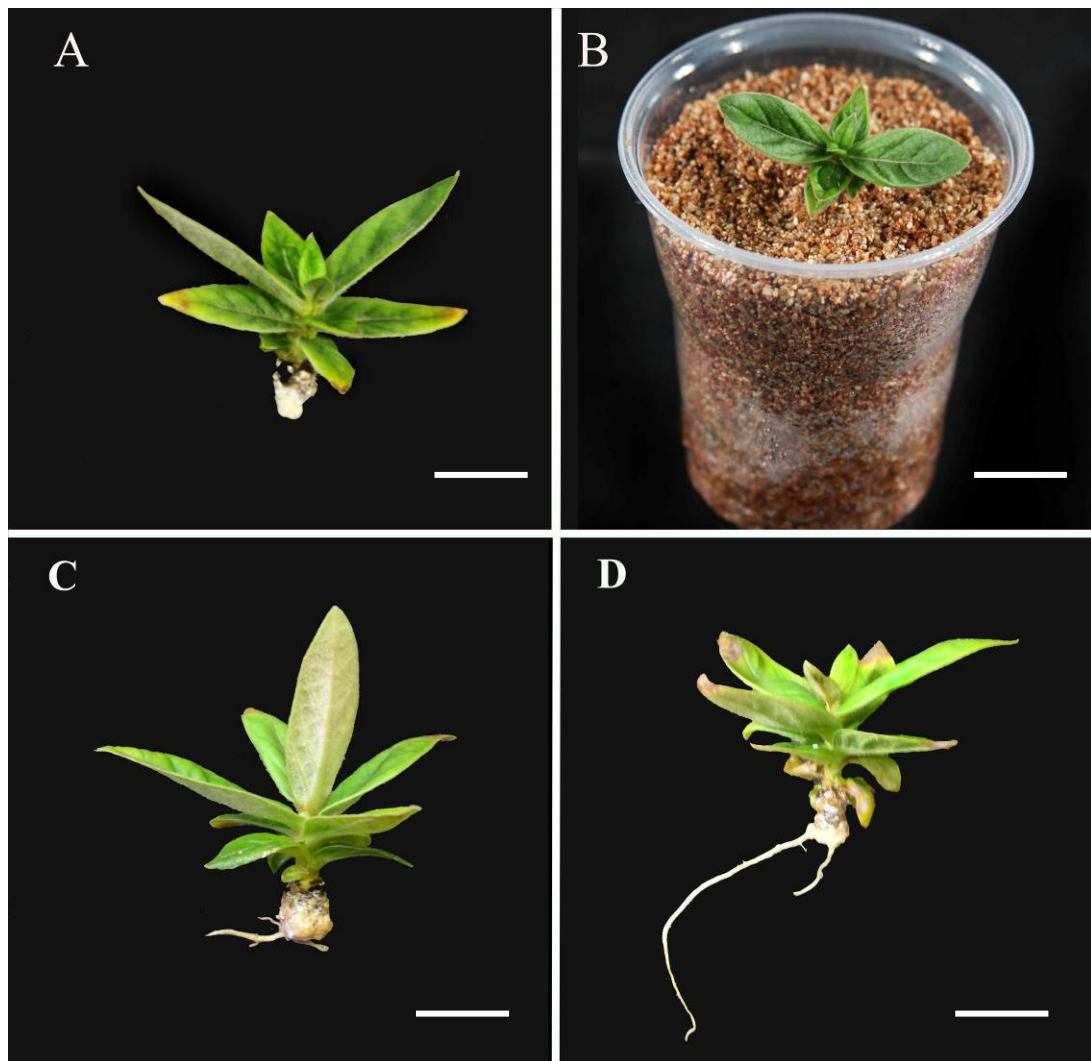


Figura 8. Enraizamento e aclimação de brotos micropropagados de *Byrsonima basiloba*. **A)** Base do broto tratado com uma mistura de AIB e talco. **B)** Broto em vermiculita umedecida **C)** Raiz adventícia formada no calo localizado na base do broto. **D)** Broto com duas raízes adventícias. Barras= 1,5 cm.

4. DISCUSSÃO

4.1 Desinfestação e germinação de *Byrsonima basiloba*.

A micropropagação é uma alternativa viável de propagação de muitas espécies do Cerrado que se encontram em risco de extinção (Santana 2002). É uma ferramenta promissora para a preservação, pois facilita a propagação das espécies ameaçadas (Pletsch, 2003; Kane *et al.*, 2000). Na micropropagação, é de extrema importância o estabelecimento de um protocolo de desinfestação eficiente, que reduza significativamente a porcentagem de contaminação das sementes *in vitro* para dar continuidade ao processo de propagação. Para isso, várias substâncias com ação germicida têm sido utilizadas, sendo as mais comuns, o etanol e os compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio (Grattapaglia & Machado, 1998; Hartmann *et al.*, 1990).

A combinação de etanol e hipoclorito de sódio ou cálcio normalmente permite o controle adequado das bactérias e dos fungos saprofitos que infestam a superfície dos órgãos vegetais (Bucher 2002). O tempo de tratamento e a concentração da substância desinfestante são fatores essenciais nesta etapa (Melo, 1998). Melo *et al.* (1998) citam que as sementes são geralmente explantes menos contaminados do que ramos coletados no campo, e ao mesmo tempo resistem melhor ao tratamento de desinfestação. No presente trabalho a combinação de etanol, hipoclorito de sódio e fungicida foram testadas em diferentes tempos de imersão para se obter sementes de *Byrsonima basiloba* desinfestadas. O melhor resultado foi obtido com a utilização de fungicida.

Em espécies como *Rapanea ferruginea* (Ruiz e Pav.) Mez. e *Plathymenia fóliosa* Benth., foram necessários tempo superiores a 30 minutos de imersão em hipoclorito de sódio, com o mínimo de 2% de cloro ativo, para se obter uma desinfestação eficiente para essas

espécies (Teixeira *et al.*, 1995). Para sementes de *B. basiloba* também foram testados tempos de desinfestação superiores a 30 minutos, todavia nessas condições ocorreu uma diminuição considerável da porcentagem de germinação, que ficou reduzida a 20%.

Os resultados permitem constatar que, utilizando hipoclorito de sódio, o melhor tratamento foi de 20 min, onde se conseguiu melhor equilíbrio entre germinação e desinfestação, em torno de 60% (Figura 1). Contudo, notou-se que ainda existia um índice relativamente alto de contaminação por bactérias e fungos após a germinação. Parte desta contaminação pode ter ocorrido durante a fase de preparo e manipulação dos materiais ou mesmo de fonte endógena, visto que era comum encontrar frutos de murici contaminados por fungos nas camadas mais externas do pericarpo. Desta forma, não se pode desconsiderar o fato de que as contaminações, após a germinação, sejam causadas por fonte endógena.

Resultados observados em espécies como mogno, *Swietenia macrophylla* King (Couto *et al.*, 2004) e *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet (Faiad *et al.*, 1997) mostram que sementes contaminadas por fungos não são capazes de germinar, pois, quando os fungos atingem as sementes, podem causar sua deterioração (Faiad *et al.*, 1997) e assim afetar negativamente a germinação. Desta forma, é provável que, o fato de as sementes de *B. basiloba* contaminadas não serem capazes de germinar, esteja diretamente associado com a presença de fungos. Por outro lado, Kalil Filho *et al.* (2000) utilizaram várias combinações de tempos para desinfestar sementes de mogno com hipoclorito de sódio e obtiveram 100% de germinação, mesmo quando as sementes apresentavam contaminação por fungos e bactérias.

O uso de fungicida no processo de desinfestação foi feito com o objetivo de obter um melhor aproveitamento das sementes, visto que estas não podem ser armazenadas por períodos longos. Assim, as sementes tratadas com carbendazim por 20 min tiveram a melhor taxa de germinação (> 80%), porém, a taxa de desinfestação foi abaixo de 80%. Os tempos de

tratamento com fungicida superior a 20 min resultou em altas taxas de desinfestação chegando a alcançar 100% de sementes desinfestadas, contudo a germinação das sementes foi seriamente comprometida. Desta forma, tempos elevados de exposição ao fungicida inibem o crescimento de fungos, porém são tóxicos para as sementes de *B. basiloba*. Resultado semelhante foi observado utilizando-se o fungicida Benomyl em explantes de pau d'álho, *Gallesia gorazema* Moq., espécie da Mata Atlântica (Sato, 2004).

4.2 Desenvolvimento das plântulas

O desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *B. basiloba* pode ser considerado lento, com os eofilos surgindo cerca de 60 dias após a inoculação. Em geral, plantas do cerrado apresentam desenvolvimento inicial lento quer seja *in vitro*, em condições de casa de vegetação, ou em condições naturais. Isso foi observado em várias espécies como *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Schizocentron elegans* Meissn. (Carreira & Zaidan, 2003), *Qualea grandiflora* Mart. (Rizzini, 1971), Jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Souza *et al.*, 2001), Embiruçu, *Pseudobomax tomentosum* (Mart. & Zucc.) Robyns (Lorenzi, 1992), e marmelo, *Alibertia edulis* A.Rich (Silva *et al.*, no prelo).

Além do desenvolvimento lento das plântulas de *B. basiloba*, foi verificada a ocorrência de plântulas anormais e formação de calos nas folhas cotiledonares, o quê sugere que esta espécie pode ser propagada via organogênese/embriogênese indireta. Trabalhos relatando a ocorrência de plantas anormais *in vitro* são escassos. Plântulas anormais podem ocorrer principalmente em virtude da ação de agentes patogênicos (Martins-Corder & Borges Junior, 1999) ou de injúrias mecânicas nas sementes (Pereira, 2002) e ainda, devido ao grande aumento da concentração de ágar no meio de cultivo como visto em urucum (Lima *et al.*, 2007). Entretanto, as sementes inoculadas de *B. basiloba* estavam desinfestadas e

aparentemente não apresentavam danos superficiais, mas, como as sementes são frágeis, danos mecânicos podem ter sido a causa da anormalidade.

4.3 Multiplicação e alongamento

A multiplicação *in vitro* objetiva produzir o maior número de brotos no menor espaço de tempo possível, com aspecto morfológico normal (Melo *et al.*, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). A multiplicação nas duas primeiras subculturas foi considerada baixa, com número médio de 10 e 8,7 brotos respectivamente (Tabela 3). Os brotos nestas subculturas eram de tamanho inferior às demais subculturas e apresentaram folhas com coloração amarela ou mesmo necrosadas. Nestas duas primeiras subculturas o ágar não solidificou indicando que poderia se tratar de um produto de baixa qualidade. Deberg (1983) comparando diversas marcas de ágar concluiu que, além da concentração, a própria marca de ágar pode interferir nas propriedades físicas e químicas do meio que, por sua vez, influencia o desenvolvimento das culturas. Apenas com a mudança de ágar, observou-se grande diferença no aspecto morfológico dos brotos, estes desenvolveram e multiplicaram com aspecto saudável evidenciado por folhas de coloração verde.

A película de polivinilcloro (PVC), geralmente é utilizada para evitar a entrada de insetos, e esporos de fungos fontes indesejáveis de contaminação no meio, entretanto, pode provocar um acúmulo de diferentes gases (dióxido de carbono, etileno e outros) em função da permeabilidade diferencial da película a cada um destes gases (Grattapaglia & Machado, 1990). Desta forma, a película de PVC pode ser considerada também um fator que contribuiu para a pouca brotação, necrose dos brotos e folhas amarelas na 1^a e 2^a subculturas, pois nestas subculturas as tampas foram envolvidas com duas voltas de película de PVC. A partir da 3^a subcultura os frascos não foram envolvidos com esta película e observou-se nítida alteração no aspecto dos brotos (Figura 5).

A produção de brotos aumentou significativamente com as sucessivas subculturas, podendo observar a superioridade de multiplicação do clone 6. Essa variabilidade clonal no comportamento *in vitro* manifesta-se em todas as fases da micropropagação. Se por um lado ocorrem genótipos que se adaptam à condição *in vitro*, respondendo bem a uma gama de meios, por outro, é freqüente a necessidade de se otimizar meios de cultura para cada clone ou grupos de clones. Outro fator, é que as sucessivas subculturas parece rejuvenescer os tecidos, tornando a cultura mais reativa, existindo também uma variabilidade na capacidade e velocidade de rejuvenescimento de acordo com o clone (Grattapaglia & Machado, 1998).

Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS, concentrações de reguladores de crescimento e presença de carvão ativado, considerado a possibilidade de otimizar a multiplicação e alongamento. Assim, cinco tratamentos foram utilizados na multiplicação, sendo mantido o tratamento inicial utilizado nas subculturas para efeitos de comparação com os novos e verificar sua efetividade nas novas condições de cultivo.

O efeito das concentrações de auxina/citocinina sobre a brotação dos explantes de *B. basiloba* foi limitado. Contudo, percebe-se que a presença de pelo menos uma citocinina e uma auxina é necessária, como também uma concentração mínima para que essa combinação seja efetiva. Os melhores tratamentos (1, 4 e 5) com diferentes combinações de hormônios e sais não apresentaram diferenças significativas entre eles.

Embora os tratamentos 1 e 2 (Tabela 4) tivessem a mesma quantidade e tipos de reguladores de crescimento, a diferença significativa observada no número de brotos produzidos se deve a presença do carvão ativado no tratamento 2. O carvão ativado tem a propriedade de adsorver componentes do meio, e, desta forma, no tratamento 2 esse componente pode ter reduzido a quantidade efetiva de hormônios disponíveis para os explantes resultando em menor número de brotos. Este fato também foi observado por Costa

(2006) em que BAP associado com carvão ativado na propagação *in vitro* de bananeira provocou diminuição dos brotos. Desta forma, para se determinar o real efeito dos reguladores de crescimento em meios de cultura suplementados com carvão ativado é necessário que se eleve o nível dessas substâncias (Pullman *et al.*, 2005). Embora a presença de carvão ativado não tenha induzido o aumento do número de brotações, notou-se que os explantes tendem a se alongar na sua presença.

O balanço das concentrações de auxina e citocinina é importante na dominância apical e no número de eventos morfogênicos (Li & Bangerth, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005). O sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro* e concentrações mais elevadas de citocininas em relação às auxinas induzem, predominantemente, a formação de gemas (Santana, 2003). Em espécies como *Spathiphyllum floribundum* L. (Ramirez-Malagon *et al.*, 2001) e *Lippia juneliana* Cham. (Juliani Júnior *et al.*, 1999) o aumento do número de brotações foi obtido com a combinação de BAP e ANA. Para indução de brotações em *B. basiloba* a presença de auxinas e citocininas no meio de cultura também foi crítica. Adicionalmente, os resultados indicam que um suprimento exógeno dessas classes de reguladores de crescimento é ainda mais importante que as diferentes combinações testadas.

É possível inferir que, para a multiplicação de *B. basiloba*, não há necessidade de concentrações muito elevadas de citocininas. O tratamento 1, que numericamente foi melhor que os outros tinha apenas 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L⁻¹ de CIN. Tentou-se aumentar a concentração de BAP (5 mg.L⁻¹ + carvão ativado), contudo, isto não resultou em maior eficiência de multiplicação. O uso de baixas concentrações de BAP vem sendo usado com sucesso na propagação de várias espécies, como por exemplo: *Tagetes* sp. e *Vitis thunbergii* (Siebold & Zucc.) utilizando 0,5 mg.L⁻¹ realizados por Turchetto *et al.* (2005) e Lu (2005)

respectivamente; Em arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), com 0,62 mg.L⁻¹ de BAP (Souza *et al.*, 2003), e *Eucalyptus globulus* Labill. (Ponte, 1999). Por outro lado, concentrações relativamente altas de citocininas também têm sido usadas com sucesso em algumas espécies. Em paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), 3 mg.L⁻¹ de BAP proporcionou maior proliferação de brotos (Cordeiro, 2004), e em pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Mart. ex Saddi), 5,0 mg.L⁻¹ de BAP mais 0,1 mg.L⁻¹ de ANA foram usados com sucesso (Arelló & Pinto, 1993).

O efeito residual das citocininas utilizadas na etapa de multiplicação pode comprometer a fase de enraizamento. Para resolver este problema, faz-se necessária uma fase intermediária de alongamento para desintoxicar as culturas. O carvão ativado é um componente essencial para esta fase, por promover a adsorção de hormônios (auxinas, citocininas), além de produtos do metabolismo de plantas (exudatos) e metabólicos tóxicos, como os compostos fenólicos (Pan & Van Standen, 1998). A fase de alongamento foi extremamente importante, pois brotos pequenos não foram capazes de enraizar e aclimatar. Todavia, a fase de alongamento é considerada inviável por demandar mão de obra adicional e não resultar em multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998).

4.4 Enraizamento e aclimação.

A fase de enraizamento é geralmente realizada na presença de uma auxina e é geralmente a última etapa *in vitro*, podendo também ser realizada *ex vitro*. Esta fase é caracterizada pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas (Melo *et al.*, 1998). O enraizamento de brotos de *B. basiloba* foi realizado *ex vitro* utilizando talco neutro misturado com auxina AIB. Segundo Pasqual *et al.* (2000), dentre os reguladores de crescimento, o AIB tem sido o mais utilizado para induzir o enraizamento de brotos. O processo de enraizamento *ex vitro* tem sido considerado vantajoso, pois muitas lenhosas apresentam as raízes formadas

in vitro com células do córtex hipertrofiadas e sistema vascular pouco desenvolvido em comparação com aquelas produzidas *ex vitro* (Bonga & Von Aderkas, 1992). Cheng & Shi (1995) concluíram que o estágio de enraizamento *in vitro* poderia ser eliminado para reduzir o tempo e o custo da propagação comercial *in vitro*.

Em *B. basiloba*, foram obtidos 54 % de brotos enraizados. O enraizamento ocorreu com mais facilidade em brotos com mais de 2,5 cm de comprimento e somente naqueles que apresentavam calos na base do broto. Segundo Fachinello *et al.* (1994), no momento em que a auxina é aplicada, há aumento da concentração na base da estaca e, caso os demais requerimentos fisiológicos sejam satisfeitos, há formação do calo, resultante da ativação de células do câmbio em regiões com crescimento secundário.

Na aclimação, os brotos são transferidos das condições *in vitro* para *ex vitro*, onde são gradativamente submetidos às condições naturais de luminosidade, umidade relativa e temperatura (Torres, 2000; Melo *et al.*, 1998). A fase de aclimação de brotos de *Byrsonima basiloba* foi realizada simultaneamente à fase de enraizamento. Os resultados permitem considerar que a aclimação de brotos de *B. basiloba* foi satisfatória, com 48 % dos brotos aclimatados. Além disso, os brotos maiores e com folhas mais desenvolvidas toleraram melhor o estresse da aclimação do que os menores. Conde *et al.* (2008) obteve 88,6% de brotos de *Ulmus minor* Mill. aclimatados diretamente como realizado neste trabalho.

Nossos resultados conduzem à conclusão de que o enraizamento *in vitro* antes da aclimação não é necessário e que a aclimação direta é fácil e economicamente viável, permitindo o estabelecimento eficiente e rápido das plantas.

5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais adotadas, os resultados permitem as seguintes conclusões:

- Desinfestação com 20 minutos de exposição ao fungicida e hipoclorito de sódio foi o melhor tratamento de desinfestação das sementes de *Byrsonima basiloba*. Tempos superiores a este diminuí drasticamente a germinação *in vitro* de *B. basiloba*.
- Em geral, a presença de pelo menos uma auxina e uma citocinina no meio favorece a proliferação dos brotos. Em meios contendo carvão ativado as concentrações de hormônios devem ser aumentadas.
- A mistura de talco e AIB produziram raízes em 54% dos brotos com 45 dias de cultivo em vermiculita umedecida. A aclimação pode ser realizada concomitantemente ao enraizamento em *B. basiloba* cultivada *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. EMBRAPA- CPAC. Planaltina, DF. 85-88 p. 1998.
- Arellano, E.F. & Pinto, J.E.B.P. Propagação *in vitro* de *Kilmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. 28(1):25-31p. 1993.
- Barbosa, M. H. P.; Pasqual, M.; Pinto, J. E. B. P.; Arellano, E. F.; Barros, I. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. *Applebloesem*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. 28(1): 15-19p. 1993
- Bonga JM, Von Aderkas P. Clonal propagation. In: Bonga JM, Von Aderkas P (eds) *In vitro culture of trees*. Kluwer Academic Publishers, Boston. 72–125p. 1992.
- Carreira, R. C.; Zaidan, L. B. P. Estabelecimento e crescimento inicial de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Schizocentron elegans* Meissn., sob fotoperíodos controlados. Resumo. Instituto de Botânica de São Paulo. 33. 2003
- Castro, A. H. F. *Aspectos da propagação, ecofisiologia e fitoquímica de Byrsonima verbascifolia Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG. 130p. 2003.
- Cheng Z-M, Shi N-Q. Micropropagation of mature Siberian elm in two steps. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 41:197–199. 1995.
- Coelho, M. C. F. *Germinação de sementes e propagação "in vitro" de Sucupira Branca [Pterodon pubescens (Benth.) Benth.]*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras. 119p. 1999.
- Conde P.; Sousa A.; Costa A.; Santos C. A protocol for *Ulmus minor* Mill. Micropropagation and acclimatization. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 92:113–119p. 2008

- Cordeiro, I.M.C.C.; Lameira, O.A.; Ohashi, S.T.; Rosal, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). *Nota Técnica/ Technical Note. Cerne. Lavras. 10(1): 118-124p. 2004.*
- Costa, F.H.S.; Pereira, J.E.S.; Pereira, M.A.A.; Oliveira, J.P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶- benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, CV. Grande Naine (AAA). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal. 28(2): 280-283p. 2006*
- Corrêa, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Ministério da Agricultura Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 5: 264-269p. 1984.
- Couto, J. M. F.; Otoni, W. C.; Pinheiro, A. L.; Pádua, E.F, de. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* king). *R. Árvore. 28(5):.633-642p. 2004.*
- Faid, G. M.G.R.; Salomão, A. N.; Cunha, R. da.; Padilha, L.S. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora Leptophloeos* (Mart.) J.B. *Revista Brasileira De Sementes. 19(1): 14-17p. 1997.*
- Deberg, P. C.; Maene, L. J. Pathological and Physiological problems related to *in vivo* culture of plant, *Parasitica, Gembloux. 40:(1) 69-75. 1984.*
- Ferreira, M.B. *Frutos Comestíveis Nativos do Distrito Federal-IV*. Fundação Zoobotânica do DF, Brasília- DF. 15-21 p. 1973.
- Giulietti, A. M. *Byrsonima* do Distrito Federal. In: *III Simpósio sobre o cerrado*. Cood. Mário Guimarães Ferri. EDUSP. 133-149 p. 1971.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. EMBRAPA. Produção de Informação/ Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. Brasília-DF. 2: 183-260 p. 1998.
- Juliani Junior, H.R.; Koroch, A.R.; Juliani, H.R.; Trippi, V.S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell, Tissue and OrganCulture. 59: 175-179p. 1999.*

- Kalil Filho, A. N. Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. In: Simpósio internacional sobre ecossistemas florestais . *Anais*. Porto Seguro. 2000.
- Kane, M.E., Gillis, M.R., Philman, N. & Campbell, S. Seasonal differences in *ex vitro* growth and corm formation between two micropropagated *Sagittaria latifolia* ecotypes. *Acta Hort*. 520: 229-238p. 2000.
- Li, C.; Bangerth, F. Stimulatory effect of cytokininins and interaction with IAA on the release of lateral buds of peã plants from apical dominance. *J. Plant Physiol*. 160: 1059-1063p. 2003.
- Lima, R.V.; Lopes, J.C.; Schmildt, E.R.; Maia, A.R. Germinação *in vitro* de urucum. *Revista Brasileira de Sementes*. 29(1): 171-177p. 2007.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa. 1: 386 p. 2002.
- Mamede, M.C.H. *O gênero Byrsonima Rich. ex A.L. Juss. (Malpighiaceae). Na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1981.
- Martins-Corderl & Borges Junior. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. *Ciência Florestal*. Santa Maria. 9(2): 1-7 p. 1999.
- Melo, J.T.; Silvia, J.A.; Torres, R.A.A.; Silveira, C.E.; Caldas, L.S. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado, p. 195-243. In: *Cerrado: Ambiente e Flora*. EMBRAPA. Planaltina- DF. 556 p. 1998.
- Mendonça, R.C.; Felfilli, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva, M. C.; Rezende, A.R.; Filgueiras, T.S.; Nogueira, P.E. Flora vascular do Cerrado. In: *Cerrado ambiente e flora*. Brasília: EMBRAPA. Planaltina- DF. 286-556 p. 1998.
- Murashige, T. & Skoog, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479. 1962.

- Nakagawa, H.; Jiang, C.J.; Sakakibara, H.; Kojima, M.; Honda, I.; Ajisaka, H.; Nishijima, T.; Koshioka, M.; Homma, T.; Mander, L.N.; Takatsuji, H. Overexpression of a petúnia zinc-finger gene alters cytokinin metabolism and plant forms. *J. Plant.* 41: 512- 523p. 2005.
- Pan, J.J.; Van Staden, J. The use of charcoal in in vitro culture. *Plant Growth Regulators*, The Hague. 26:155-163p. 1998.
- Pasqual, M.; Silva, A. B.; Maciel, A. L. R.; Pereira, A. B.; Alves, J. M. C. Enraizamento *in vitro* de um porta-enxerto de macieira em diversos substratos. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 57, n. 4. 781-784p. 2000.
- Pletsch, M. Compostos naturais biologicamente ativos – A Aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2003.
- Pereira, K.B.D. *Micropropagação e estudo morfo-anatomico do endocarpo, semente e plântula de Byrsonima basiloba Juss.* Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília -UnB. Brasília-DF. 151p. 2002.
- Pullman, G.S.; Gupta, P.K.; Timmis, R.; Carpenter, C.; Kreitinger, M.; Welty, E. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. *Plant Cell Report.* 24: 271- 279p. 2005.
- Ramirez-Malagon, R.; Borodanenko, A.; Barreraguerra, J. L.; Ochoa-Alejo, N. Shoot number and shoot size as affected by growth regulators *in vitro* cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. *Scientia Horticulturae.* 89(3): 227-236p. 2001.
- Rizzini, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: Ferri, M. G. “III Simpósio sobre o cerrado”, São Paulo. 61-64p. 1971.
- Santana, J. G. *Caracterização de ambientes de cerrado com alta densidade de pequizeiros (Caryocar brasiliense Camb.) na região sudeste do Estado de Goiás.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 100p. 2002.

- Sato, A.Y.; Dias, H.C.T.; Andrade, L.A. De. Souza, V.C. de. Dornelas, G.V. Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau d'álho (*Gallesia gorazema* moq.). *Agropecuária Técnica*. 25(2): 65-70p. 2004.
- Silva, F.A.B.; Pereira, L.A.R.; Silveira, C.E.S. *In vitro* micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. (Quince). No prelo.
- Souza, A.V.; Pinto, J.E.B.P.; Bertolucci, S.K.V.; Corrêa, R.M.; Castro, E.M de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. *Ciênc. Agrotec.* Lavras. Edição Especial. 1532-1538p. 2003.
- Souza, P.A. de.; Venturin, N.; Macedo, R.L.G. de.; Alvarenga, M.I.N.; Silva, V.F. da. Estabelecimento de espécies arbóreas em recuperação de área degradada pela extração de areia. *Cerne*. 7(2): 43-52p. 2001.
- Teixeira, J.B.; Lemos, J.I.; Coelho, M.C.F. Micropropagação de espécies lenhosas da Mata Atlântica. V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 132p. 1995.

CAPITULO II

**REGENERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE CALOS,
GEMAS ADVENTÍCIAS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DE MURICI
(*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae)**

RESUMO

O murici (*Byrsonima basiloba* Juss.) é uma planta nativa do Cerrado que apresenta dificuldades de propagação sexuada. O objetivo do presente trabalho foi regenerar e caracterizar gemas adventícias e embriões somáticos obtidos a partir de folhas cotiledonares, raízes e folhas jovens inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Calos foram observados em todos os três tipos de explantes utilizados em todos os tratamentos. Após a formação dos calos, estes foram repicados periodicamente e a cada subcultivo avaliou-se a formação de calos embriogênicos e gemas adventícias. O único tratamento que apresentou regeneração de embriões somáticos e gemas adventícias foi contendo BAP (0.45 mg.L^{-1}) e ANA (0.09 mg.L^{-1}). Embriões e gemas regeneraram em explantes cotiledonares que produziram calos de aspecto friável e coloração inicial avermelhada, que posteriormente adquiriram coloração amarelo-esverdeada. Análises anatômicas e através da microscopia eletrônica de varredura mostraram que esses calos apresentaram células com núcleo volumoso e citoplasma denso, caracterizando células meristemáticas com grande quantidade de reserva. Secções de gemas adventícias com dois e quatro primórdios foliares e embriões somáticos em diferentes estágios foram registrados em estudo anatômico. Tentou-se várias combinações de BAP e ANA para aumentar a produção de gemas e/ou embriões, todavia, durante o período observado, esses tratamentos não resultaram na formação de calos. Conseqüentemente, serão necessários mais estudos para se elucidar as condições ideais para induzir os processos de organogênese e embriogênese somática em *B. basiloba*.

Palavras chaves:

Murici, cerrado, gemas adventícias, embriões somáticos, anatomia.

Abreviações:

BAP: 6-benzilaminopurina ANA: ácido naftaleno-acético; MS: Murashige & Skoog

ABSTRACT

The murici (*Byrsonima basiloba* Juss.), a Cerrado plant that is not easily propagated by traditional means such as seeds and cuttings. The purpose of this work is to obtain a protocol to regenerate this species by inducing the formation of adventitious buds and somatic embryogenesis from cotyledonary segments, roots, and young leaves. Explants from these plant parts were inoculated in MS medium supplemented with several combinations of auxin and cytokinin. Callus formation was seen in all three types of explants, which were periodically sub-cultivated. The induction of somatic embryos and adventitious buds was evaluated in all treatments. The treatment with BAP (0.45 mg.L^{-1}) and NAA (0.09 mg.L^{-1}) induced the formation of yellow-greenish friable calluses from cotyledonary explants in which was observed the differentiation of somatic embryos and adventitious buds. These friable calluses generally presented in the outer cell layers, groups of meristematic cells with large nuclei, dense cytoplasm, and large amounts of reserve. As these groups of cells started the organogenesis and/or embryogenesis processes, the reserve content of these cells diminished. Furthermore, these embryogenic and organogenic calluses initiated a necrosis process and died preventing the maturation of the buds and embryos. The induction of embryo and adventitious buds was not highly efficient, and therefore, several combinations of BAP and NAA were tried, however, this did not result in bud and embryo differentiation. Therefore, it will be necessary to investigate more efficient hormone combinations to maximize both somatic embryogenesis and organogenesis processes in *B. basiloba*.

Key Words:

Murici, Cerrado, adventitious buds, somatic embryogenesis, organogenesis.

Abbreviations:

BAP: 6- benzylaminopurine; NAA: naftaleno-acético acid; MS: Murashige & Skoog

1. INTRODUÇÃO

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer através de dois processos distintos denominados de organogênese e embriogênese somática (Tang; Harris *et al.*, 2004). Na organogênese, ocorre a diferenciação de gemas e raízes. As gemas podem ser formadas *in vitro* por organogênese direta ou organogênese indireta, na qual ocorre uma fase inicial de calo (Ibrahim e Debergh 2001; Singh *et al.*, 2003), onde geralmente os meios de cultura contêm um determinado balanço de auxinas e citocininas que é específico para cada planta.

A embriogênese somática é o processo pelo qual, uma única célula somática ou conjuntos de células embriologicamente competentes desenvolvem embriões completos (Toonen *et al.*, 1996). É geralmente utilizada na regeneração de plantas *in vitro*, podendo ocorrer também as vias direta ou indireta, esta última ocorre através da formação de calos e tem sido amplamente utilizada para a propagação em massa de diversas espécies (Pierik, 1987; Landa *et al.*, 2000; Tsuru *et al.*, 2000).

Para a regeneração de plantas *in vitro* pode-se utilizar diversos tipos de explantes, como embriões, folhas e cotilédones, sendo que este último tem recebido atenção considerável (Chaturvedi & Bhatnagar, 2001). Isto ocorre por várias razões, como a fácil acessibilidade, a resposta rápida e a capacidade elevada que estes explantes possuem para a organogênese e embriogênese somática e cultura de protoplasto (Tabei, 1997).

Estas técnicas são indicadas para muitas espécies do Cerrado (Melo *et al.*, 1998), especialmente para as de difícil propagação pelos métodos convencionais (Barbosa *et al.*, 1993) como *Byrsonima basiloba* Juss., que apresenta baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas (Lonrezi, 2002), e na propagação de espécies medicinais (Rout *et al.*, 2000), possibilitando a produção comercial de fármacos (Cerqueira, 1999).

B. basiloba tem sofrido redução considerável do número de indivíduos na natureza em consequência da extração predatória de seus frutos e pelo avanço das fronteiras agrícolas. A cultura de tecidos pode facilitar a produção em grande escala e a regeneração de clones através da embriogênese somática e organogênese. O objetivo deste trabalho é estabelecer um protocolo para a organogênese e embriogênese somática de *B. basiloba*, a partir de cotilédones e folhas jovens de plantas adultas no campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O material utilizado para indução de organogênese e embriogênese somática foi obtido a partir de folhas cotiledonares e raízes de plântulas de *B. basiloba* germinadas *in vitro* (cf. capítulo I § 2.1) e de folhas adultas oriundas de plantas adultas crescidas no campo.

Dos folhas cotiledonares foi utilizada apenas a região central e apical. A base foliar permaneceu junto da parte aérea, a qual foi utilizada no experimento de micropropagação, descrito no capítulo anterior. Todas as raízes disponíveis nas plântulas foram utilizadas.

As folhas adultas foram primeiramente desinfestadas, conforme método já descrito para semente (cf. capítulo 1 § 2.2.1), em 1 min em álcool 70%, 20 min em hipoclorito de sódio e três lavagens sucessivas em água autoclavada.

Todos explantes (0,5 cm aproximadamente) foram retirados com o auxílio de uma pinça e excisados com bisturi. Os explantes foram distribuídos em placas de petri, com a face abaxial voltada para o meio. Calculou-se a porcentagem de explantes com oxidação, calo friável e necrose através do quociente do número de explantes com a variável pelo total de explantes de cada tratamento.

2.2. Meio de cultura para indução de formação de gemas adventícias e embriões somáticos

O meio de cultura utilizado nos experimento de indução foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,7 antes da adição do agente gelificante e autoclavagem. O meio foi autoclavado durante 17 min, a 121°C e 105 KPa. O TDZ (Tidiazuron) foi esterilizado por filtração (Millipore, 0,22 µm) e adicionado

após autoclavagem. Os demais hormônios foram adicionados antes da autoclavagem, nas concentrações especificadas em cada experimento.

2.3. Concentrações de BAP e ANA na indução de embriogênese somática e organogênese

O meio utilizado para indução de organogênese e embriogênese somática foi o MS suplementado com $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA. Os explantes de raízes e cotilédones permaneceram nestas condições por cerca de 30 dias em fotoperíodo de 16 h, até que se observasse a formação de gema. O meio de cultura foi renovado a cada 15 dias. Para este experimento foram realizadas duas repetições, porém, cada repetição com material proveniente de matrizes diferentes. Neste experimento, para cada repetição foram utilizadas seis placas contendo cada uma 10 explantes (cotilédone ou raiz).

2.4 Testes para maximização dos processos de organogênese e embriogênese.

2.4.1 Efeito do TDZ, BAP e ANA

Os explantes foram inoculados em meio MS acrescido de $0,66 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Os explantes permaneceram nestas condições por 15 dias (5 dias no escuro e 10 dias em fotoperíodo de 16 horas). Na condição de luz, o meio de cultura foi renovado a cada 5 dias e após este tempo, foram transferidos para o meio de regeneração suplementado com $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Os explantes permaneceram no meio de regeneração por cerca de 30 dias em fotoperíodo de 16 horas, até que se observasse a formação de gema. O meio de cultura foi renovado a cada 15 dias.

Neste experimento, para cada repetição foram utilizadas seis placas contendo cada uma 10 explantes (cotilédone ou raiz).

2.4.2 Efeito de um pré-tratamento, tratamento e meio de regeneração na indução de gemas adventícias e embriões somáticos

Pré-tratamento

Os explantes foram colocados em meio inicial, pré-tratamento, o qual foi suplementado com $0,11 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Os explantes permaneceram no pré-tratamento por 5 dias na ausência de luz.

Tratamento

Posteriormente, os explantes foram transferidos para o tratamento composto de meio MS acrescido de $0,66 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Os explantes permaneceram nestas condições por 15 dias (5 dias no escuro e 10 em fotoperíodo de 16 horas). Na condição de luz, o meio de cultura foi renovado a cada 5 dias e após este tempo, foram transferidos para o meio de regeneração, que está descrito abaixo.

Meio de Regeneração

O meio de regeneração foi suplementado com $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA. Os explantes permaneceram nestas condições por cerca de 30 dias em fotoperíodo de 16 horas, até que se observasse a formação de gema. O meio de cultura foi renovado a cada 15 dias.

Neste experimento, para cada repetição foram utilizadas seis placas contendo cada uma 10 explantes (cotilédone ou raiz).

2.4.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na indução de gemas adventícias e embriões somáticos em folhas adultas

Este experimento foi realizado com folhas adultas provenientes de matrizes no campo. As folhas foram desinfestadas como já citado, e inoculadas em meio básico suplementado com 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg.L⁻¹ de BAP combinados com 0,09 mg.L⁻¹ de ANA.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, totalizando 72 explantes foliares. Os experimentos foram avaliados diariamente.

2.5 Análise morfo-anatômica

2.5.1 Obtenção do material e fixação

Estudos anatômicos foram realizados em amostras de calos contendo estruturas que se assemelhavam morfológicamente a gemas ou embriões, provenientes de explantes de folhas cotiledonares e raízes cultivado em meio MS com 0,45 mg.L⁻¹ de BAP e 0,09 mg.L⁻¹ de ANA foram fixados e processados como descrito a seguir.

As amostras foram selecionadas e imediatamente imersas em solução fixadora composta de glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) e tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,1) por 24 h sob vácuo e lavadas três vezes por 1 h cada lavagem no mesmo tampão. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em uma série alcoólica crescente, infiltradas e incluídas em historresina (Techovit, Kulzer).

Cortes seriados longitudinais e transversais (7 e 10 µm) foram obtidos em micrótomo rotatório Leica modelo RM 2145, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa histológica a 45 °C. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina e montados com Entellan. Os resultados foram registrados em fotomicroscópio Zeiss modelo Axioskop acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% e em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,1 por 3 horas. Em seguida, elas foram lavadas e desidratadas em série crescente de acetona, secadas ao ponto crítico com CO₂ e metalizadas com 120 nm de ouro-paládio. Os espécimes foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura Jeol.

3. RESULTADOS

Vários experimentos com diferentes combinações de hormônios, condições de cultivo e explantes não resultaram na formação de gemas adventícias e embriões somáticos. Embora alguns destes experimentos até tenham formado calos friáveis, não desenvolveram essas estruturas. Os resultados descritos a seguir se referem àqueles tratamentos, nos quais se obteve sucesso ou mostraram potencial para que se continue a pesquisar as melhores condições para a regeneração de *B. basiloba* através de organogênese e embriogênese somática.

3.1 Reação dos explantes ao tratamento com BAP e ANA.

Na primeira semana de cultivo foi observada a formação de calos de aspecto friável apresentando coloração clara nos explantes de folhas cotiledonares e raízes (Figura 1). Foi observado também a formação de calo friável porém, de coloração avermelhada nos explantes cotiledonares (Figura 1 B). Após 30 dias, os calos avermelhados nos explantes cotiledonares adquiriram coloração amarelo-esverdeada e os das raízes não apresentaram nenhum desenvolvimento, iniciando processo de necrose. Com a contínua exposição ao meio, os calos friáveis e esverdeados dos explantes cotiledonares diferenciaram em gemas adventícias. Esses calos também apresentavam regiões de coloração esbranquiçada, o que poderia indicar potencialidade embriogênica. Posteriormente, a análise anatômica confirmou que as estruturas visualizadas realmente eram embriões somáticos em fase inicial de desenvolvimento (Figura 6).

A manutenção dos explantes nesse meio por período prolongado resultou no escurecimento dos calos e conseqüente necrose de todo o explante, impedindo que os embriões somáticos e as gemas continuassem a se desenvolver. Foi realizado um

experimento, porém utilizando material proveniente de matrizes diferentes. Na segunda repetição, não foi verificada a formação de gemas adventícias ou embriões somáticos. Os calos seguiram o mesmo padrão de formação citado anteriormente, alguns apresentaram aspecto embriogênico, entretanto, a análise anatômica não mostrou a formação de gemas e embriões somáticos ou mesmo células meristemáticas.

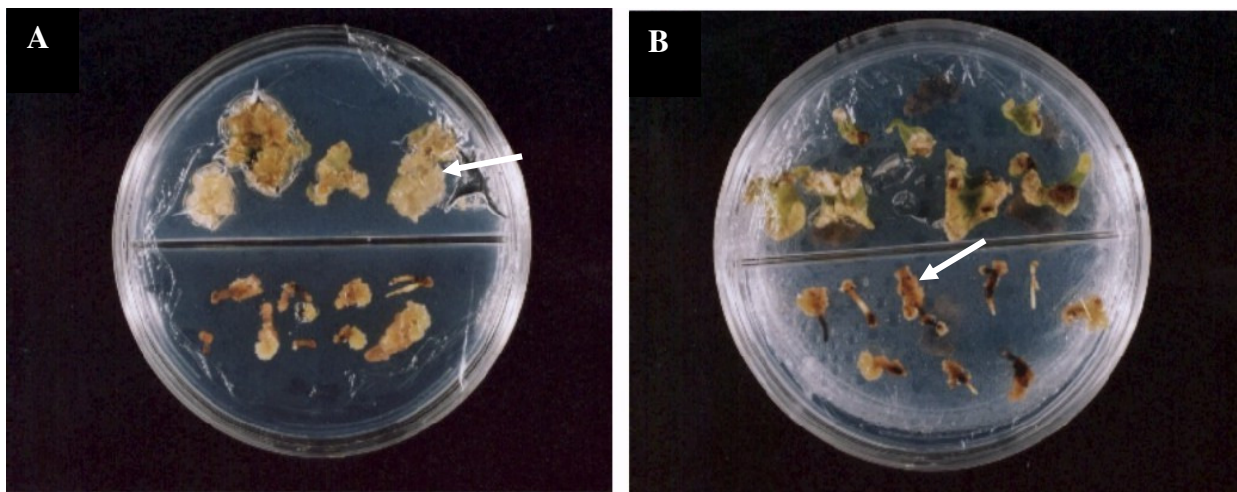


Figura 1. Aspecto dos explantes oriundos de folhas cotiledonares e raízes em meio suplementado com $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA. **A)** Calos friáveis formados em folhas cotiledonares (seta). **B)** Explantes de raízes formando calos (seta).

3.2 Testes para maximização dos processos de organogênese e embriogênese.

3.2.1 Efeito do TDZ, BAP e ANA

Neste experimento, nos explantes na ausência de luz em meio suplementado com TDZ ($0,66 \text{ mg.L}^{-1}$) e ANA ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) foram notadas imensas áreas oxidadas e posteriormente foram verificadas grandes formações de calos avermelhados sob as áreas oxidadas (Figura 2 A). Entretanto, 40 dias após serem transferidos para meio de regeneração (BAP e ANA) estes

explantes iniciaram processo de necrose, caracterizado por manchas na superfície dos explantes (Figura 2 B seta), resultando em cerca de 91% de necrose em folhas cotiledonares e raízes, após 40 dias de inoculação.

Os explantes cotiledonares que sobreviveram neste experimento formaram grandes massas de calos com aparência friável de cor clara. Já nas raízes foram observados apenas calos com aparência vitrificada.

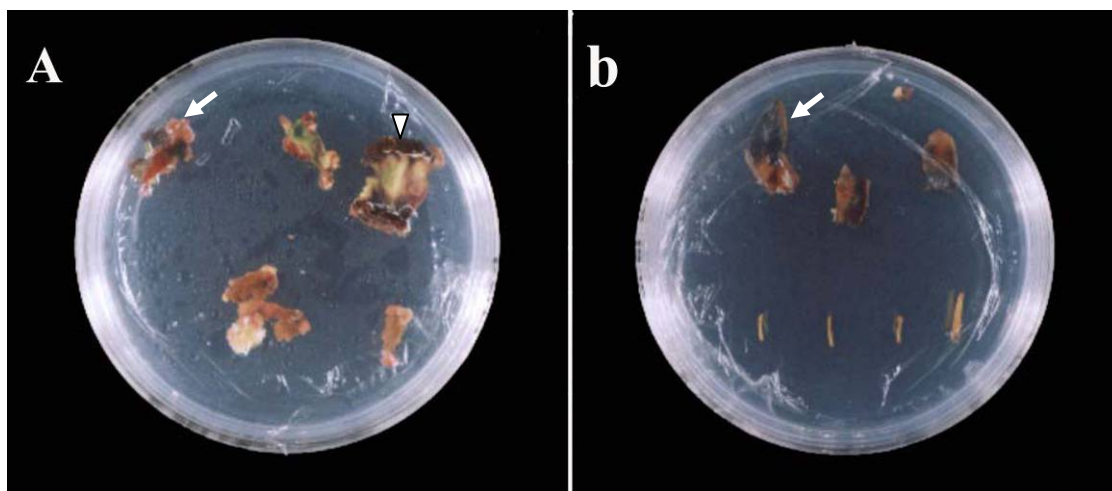


Figura 2. Aspectos dos explantes inoculados inicialmente em meio suplementado com TDZ. **A)** Explantes com calos vermelhos (seta) e áreas oxidadas (cabeça da seta). **B)** Explantes necrosados após transferência para meio suplementado com $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA, áreas necrosadas (seta).

3.2.2 Efeito da variação das concentrações de BAP e ANA

Em todas as combinações de BAP e ANA testadas foi possível visualizar a formação abundante de calos, exceto o tratamento contendo BAP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e ANA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), que produziu poucos calos e alta taxa de necrose (Figura 3). A Figura 4 mostra o aspecto dos calos formados em explantes de cotilédone. Na maior parte dos explantes, a formação dos calos iniciou com a oxidação e em seguida surgiram calos provenientes das regiões que foram

seccionadas (Figura 4A). Morfologicamente dois tipos de calos com aspecto friável foram observados nos explantes: calos friáveis com coloração avermelhada (Figura C) e calos friáveis de cores claras (Figura B).

Os calos avermelhados apresentaram desenvolvimento lento, e iniciaram sua formação apresentando grande quantidade de antocianina nas células (Figura 4 C seta preta) e posteriormente adquiriram coloração amarelo-esverdeada (Figura 4 C seta branca). Já o calo friável de coloração clara, apresentou desenvolvimento rápido e a mesma coloração desde o início da formação.

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a diferença dos calos friáveis. Calos de cor avermelhada foram caracterizados por células menores de formato arredondado (Figura 4 E) enquanto calos de cor clara apresentou células de formato alongado com dimensões maiores.

Ambos os tipos de calos formaram estruturas que se assemelhavam aos estágios iniciais de formação de embriões somáticos. Nos calos com aparência friável avermelhada, foi possível observar estruturas morfológicamente similares a uma gema adventícia (Figura 4 D). A combinação de reguladores de crescimento mais eficientes na formação de calos friáveis avermelhado foi $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Apesar de induzir a formação de estruturas similares a embriões, essas não resultaram em embriões somáticos.

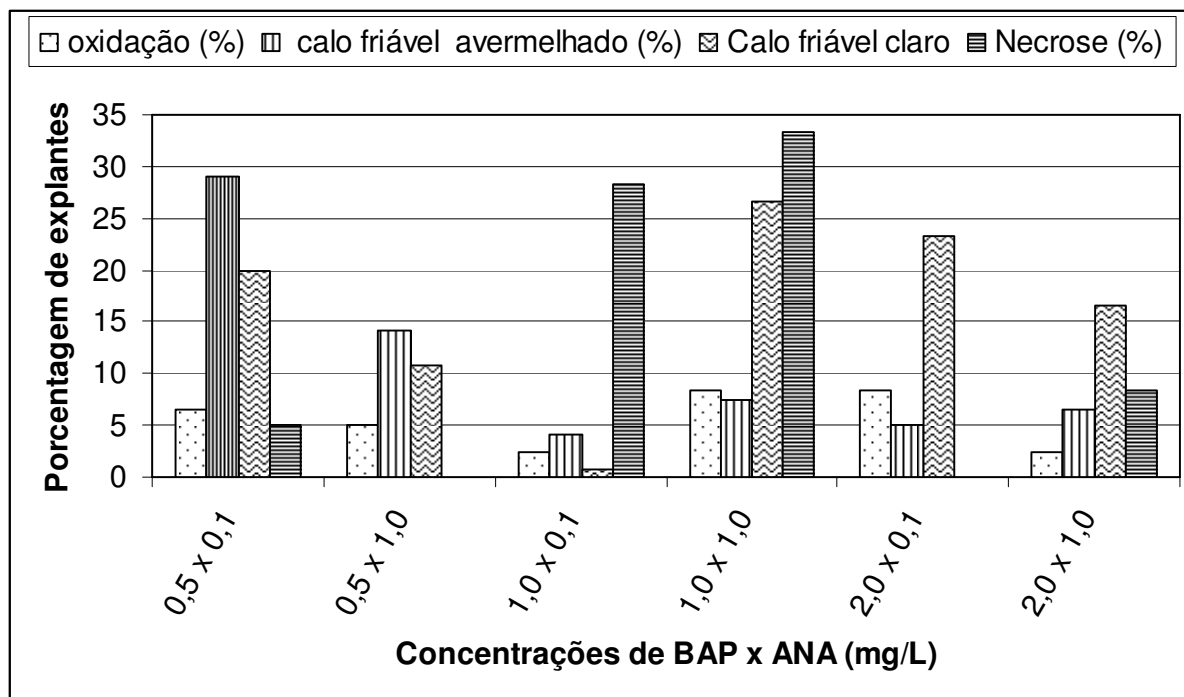


Figura 3. Porcentagem de explantes oxidados, com calo friável avermelhado, calo friável claro e explantes necrosados em tratamentos contendo diferentes concentrações de BAP e ANA.

No que se refere aos calos de aspecto friável claro, o meio que proporcionou maior porcentagem de produção desses calos foi aquele contendo BAP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e ANA ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Com a contínua exposição ao meio, estes calos também formaram estruturas isoladas com cor esbranquiçada, similares à fase inicial da formação de embriões somáticos. Porém, após 60 dias também não se verificou o amadurecimento de embriões e/ou gemas.

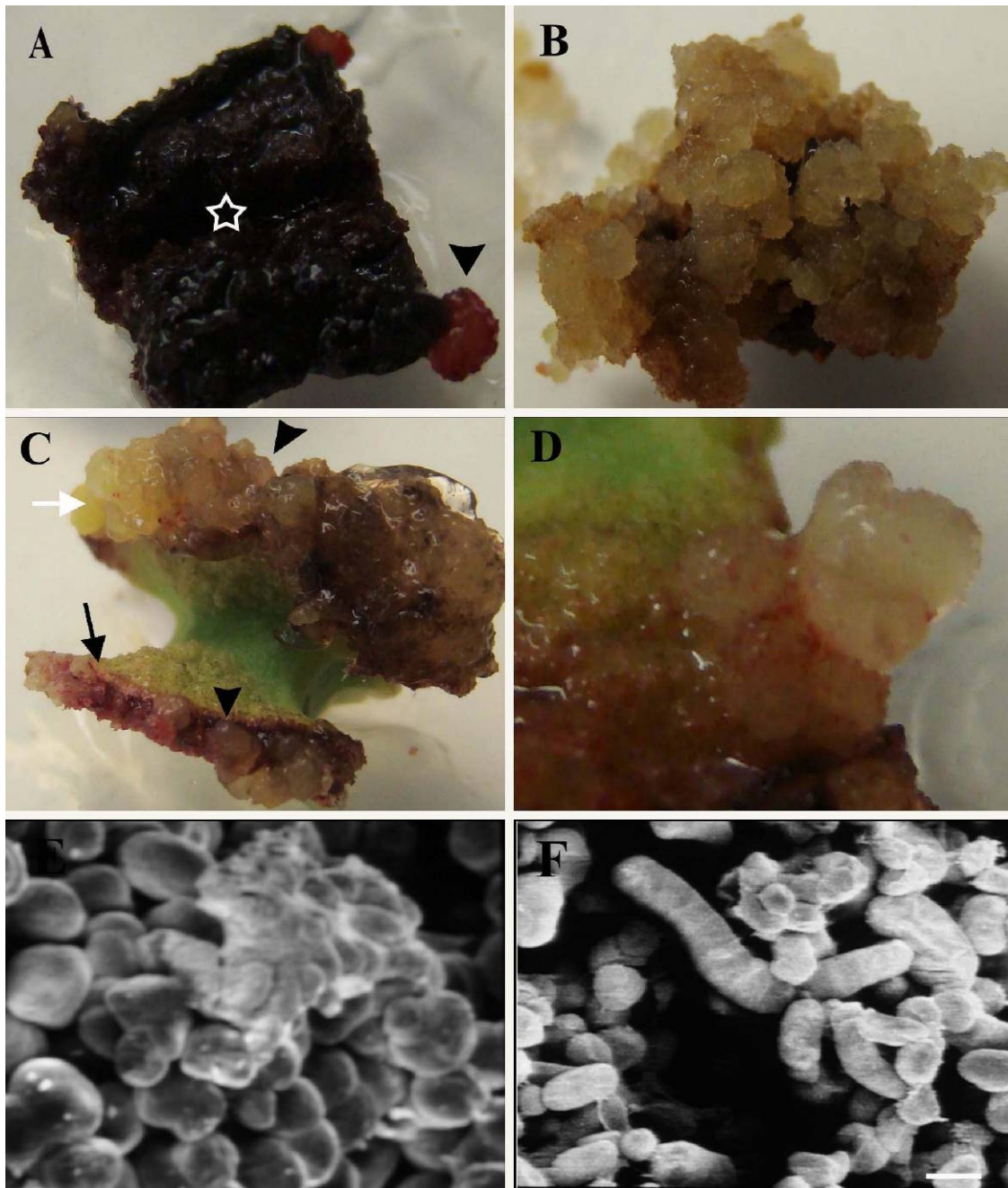


Figura 4. Calos em explantes cotiledonares de *Byrsonima basiloba*. **A)** Calo formado (seta) após oxidação do explante (estrela). **B)** Calo com aspecto friável claro. **C)** Início da formação de calo friável avermelhado (seta preta) e posteriormente com células de coloração esverdeada (seta branca). Pode ser observado também, estruturas morfológicamente similares a meristemóides (setas). **D)** Detalhe de uma estrutura semelhante a uma gema adventícia em calo avermelhado. **E)** Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as células ovaladas do calo friável avermelhado. **F)** Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as células alongadas do calo friável claro.

3.3 Análise morfo-anatômica

A figura 5 mostra a análise anatômica dos calos com aparência friável de coloração clara e avermelhada. Calos de coloração clara de explantes de raízes e folhas cotiledonares em meio contendo $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA apresentou células espaçadas, alongadas e sem substância de reserva (Figura 5 B). Já os calos com aspecto friável de cor avermelhada, induzidos de explantes cotiledonares nesse mesmo meio, possuíam na sua superfície, células caracterizadas por núcleo volumoso, paredes finas, e abundância de inclusões citoplasmáticas (Figura 5 C e D), que posteriormente foram identificadas como amido. É importante dizer que nos demais tratamentos, também ocorreu formação de calos friáveis (dados não mostrados). Contudo, nestes calos não ocorreram diferenciação de embriões e gemas, apresentando pouca substância de reserva. A morfologia celular também diferiu entre esses dois tipos de calos friáveis. Nos calos organogênicos/embriogênicos, as células das regiões periféricas apresentavam-se freqüentemente ovais e com citoplasma denso (Figura 5 D). Nos demais, não se verificou a presença deste tipo celular, ao contrário, as células eram altamente vacuoladas.

Nos explantes contendo calos avermelhados foi observado a regeneração de gemas e embriões somáticos. Notou-se que as gemas tiveram maior desenvolvimento que os embriões, sendo possível encontrar gemas adventícias em fase inicial de desenvolvimento (Figura 5 E), com os primeiros primórdios foliares e, também gemas em estágio mais avançado com um segundo par de primórdios em diferenciação (Figura 5 F).

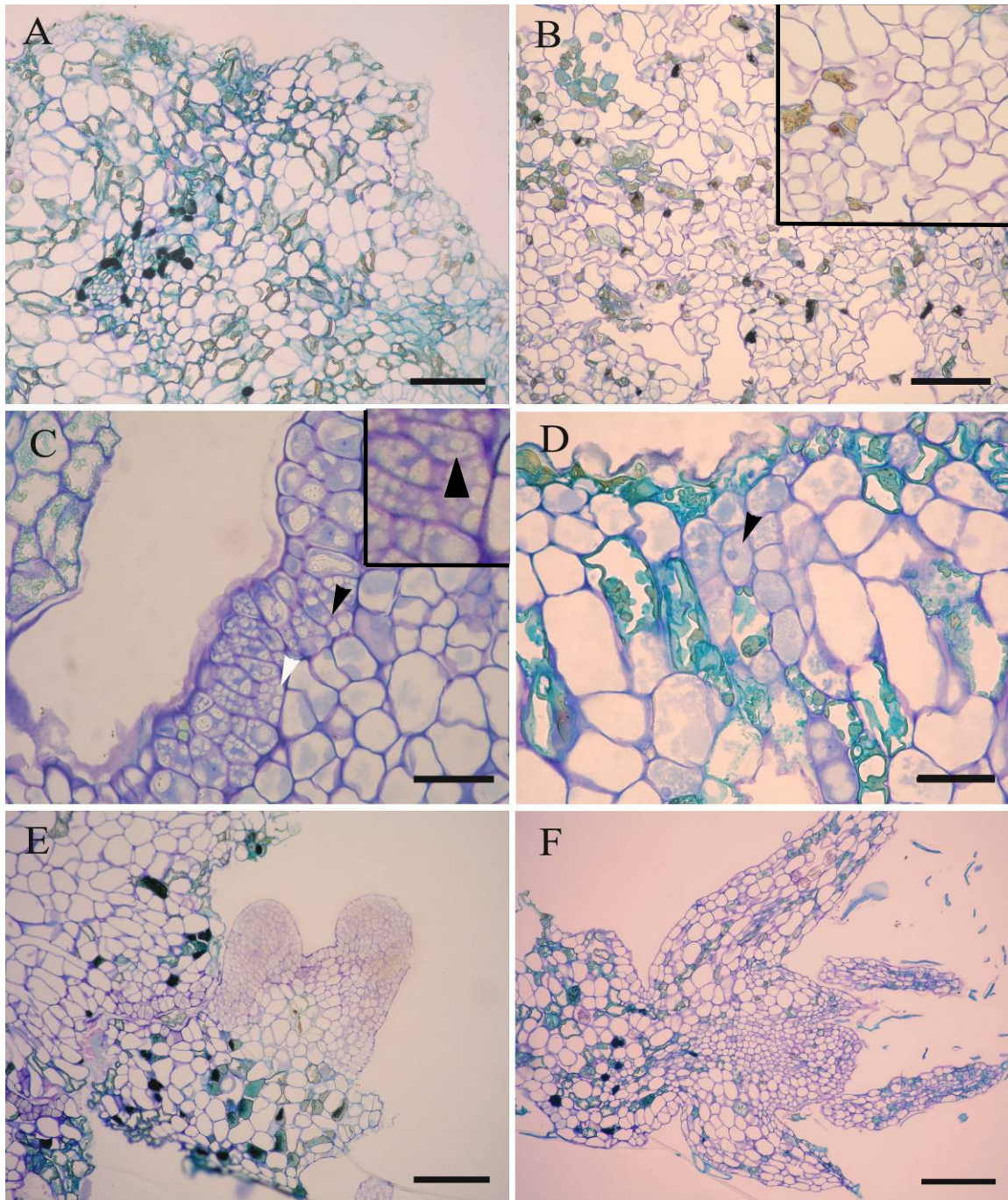


Figura 5. Aspecto das células nos calos e em organogênese. **A)** Calo friável avermelhado com células compactas. **B)** Calo friável de cor clara com amplos espaços intercelulares e sem substâncias de reserva (detalhe). **C)** Divisão celular em calo friável avermelhado que diferenciou gemas, com células que contêm substâncias de reserva (cabeça de seta). **D)** Células meristemáticas (cabeça de seta), com núcleo volumoso. **E)** Gema com o primeiro par de primórdios foliares. **F)** Gema com o segundo par de primórdios foliares em formação. (Escala A, B, C, D = 50 μm ; E = 200 μm ; F = 500 μm).

Em algumas áreas localizadas na parte mais externa do calo, notam-se grupos isolados de células meristemáticas em intensa divisão celular, caracterizando um embrião somático em estágio semelhante ao globular (Figura 6 A seta e 6 B). Em outras áreas, notou-se a presença de estruturas celulares com uma protoderme bem definida e procâmbio diferenciado indicando a existência de embriões em estágios de desenvolvimento mais avançados (Figura 6 C e D). Na figura 6 C, observam-se embriões de diferentes formas, o que se deve aos diferentes planos em que estes foram seccionadas. Como os embriões surgiram na região dos calos, pode se concluir que estes formaram-se através de embriogênese indireta.

Após 10 semanas de cultivo, mesmo repicando para meio novo, intensas áreas escuras apareceram nos explantes que acabaram necrosando impedindo a formação de gemas e embriões maduros. Devido a isso, não foi possível esclarecer se os embriões formados eram normais.

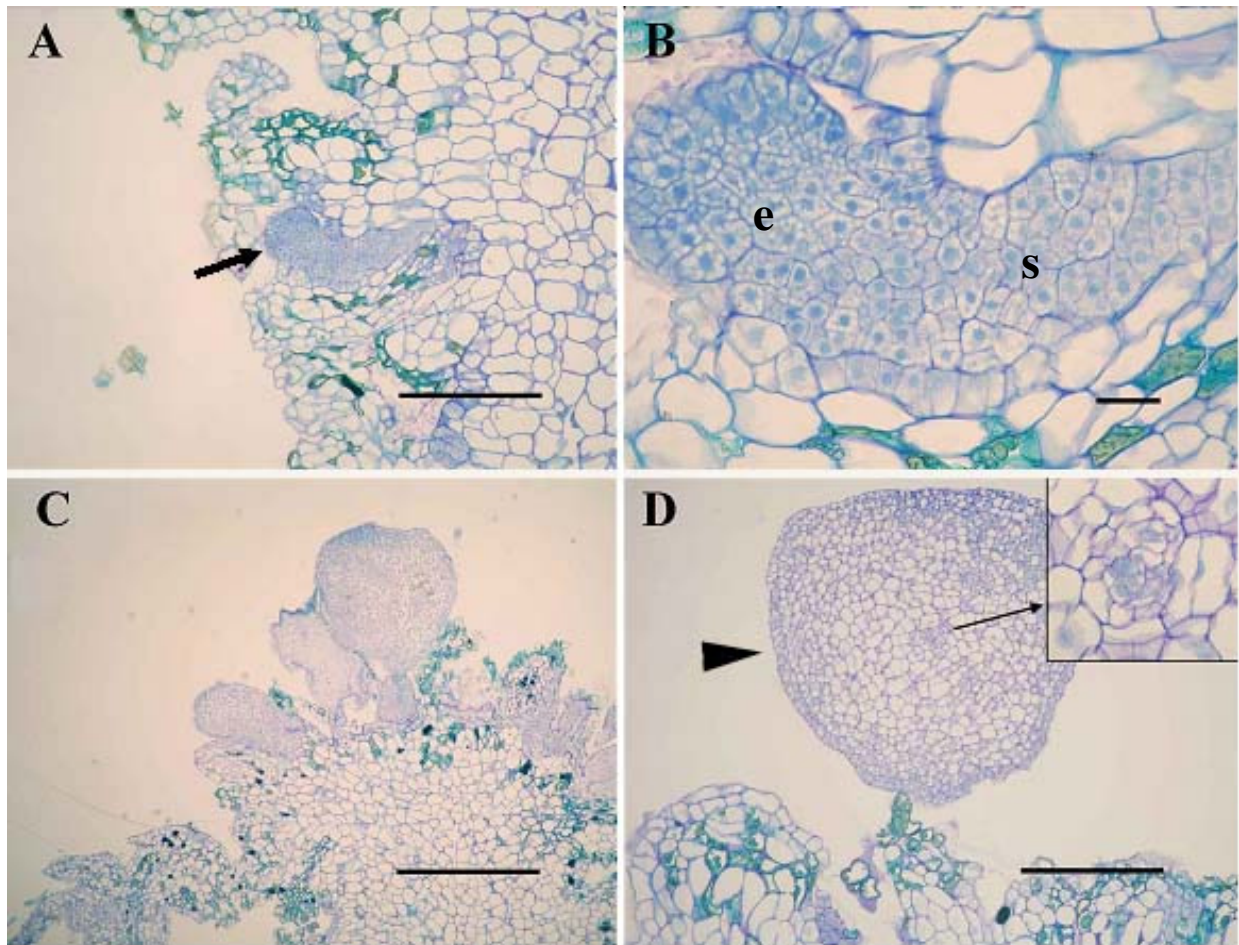


Figura 6. Embriões somáticos em explantes de *Byrsonima basiloba*. **A)** Região de um calo friável de explante cotiledonar onde ocorre a presença de um embrião somático em estagio globular. **B)** Detalhe de A: embrião (e) com suspensor (s). **C)** Vários embriões formados em diferentes planos de secção. **D)** Embrião em corte transversal com protoderme bem definida (cabeça da seta) e início da diferenciação do procâmbio (detalhe). (Barras: A, C, D = 200 μ m; B = 50 μ m).

4. DISCUSSÃO

Estudos relatando a regeneração *in vitro* de espécies nativas do Cerrado são raros. Entretanto, pode-se perceber que trabalhos utilizando a regeneração como forma de propagação reconhecem a importância desta técnica para a conservação dos recursos do Cerrado. Nesse processo de regeneração o balanço hormonal é crucial na determinação das respostas morfogênicas bem como as condições de cultivo e o tipo de explante. As interações entre as auxinas e as citocininas durante todo o desenvolvimento da planta são complexas, controlando a formação das raízes, dominância apical, a formação de calos, gemas adventícias e embriões somáticos (Landi & Mezzetti, 2005).

As combinações de citocinina e auxina testadas neste estudo induziram a formação de calos de diferentes aspectos, onde o tipo de explante também influenciou sobre a morfologia dos calos. É importante observar que todos os tratamentos induziram formação de calos, mesmo após severa oxidação de alguns explantes. Em geral foram observados dois tipos de calos: calos com aspecto friável apresentado coloração avermelhada e com tonalidades mais claras. A cor e a morfologia dos calos têm sido utilizadas para distinguir calos embriogênicos dos não embriogênicos (Arnold *et al.*, 2002). Calos avermelhados estão geralmente associados à presença de antocianinas que, de acordo com Hervé *et al.* (2001), em estudos com *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh e *E. gunnii*, observaram uma correlação entre a formação de calos vermelhos e a regeneração de gemas adventícias.

A maior porcentagem de calo avermelhado ocorreu, quando se adicionou ao meio de cultura 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ ANA. O efeito positivo na combinação destes dois reguladores também foi observado na indução de calos em explantes foliares de *Salix humboldtiana* Willd. (Santos *et al.*, 2005) e de *Caryocar brasiliense* Camb. (Landa *et al.*, 2000).

Explantos inoculados em meio contendo TDZ associado à auxina ANA produziram grandes massas de calos. Entretanto, quando estes explantes foram submetidos ao meio de regeneração (BAP e ANA), 91% dos explantes necrosaram. Aumentos no nível de auxina endógena, citocinina e etileno foram verificados em resposta ao tratamento com TDZ por Murthy *et al.* (1995). Estas atividades que estão relacionadas à aplicação do TDZ podem explicar a necrose dos explantes após exposição a este regulador. No entanto, vários trabalhos citam o sucesso na utilização do regulador de crescimento (TDZ) na regeneração, como o realizado por Hutchinson *et al.* (1996), que observaram que tecidos tratados com TDZ tiveram um aumento no número de centros meristemáticos que refletiu no número de embriões somáticos.

Em *B. basiloba*, explantes cotiledonares inoculados em meio com 0.45 mg.L⁻¹ de BAP e 0.09 mg.L⁻¹ de ANA regeneraram gemas adventícias e embriões somáticos no mesmo explante. Essa combinação de reguladores de crescimento na presença de luz foi capaz de induzir a formação de calos viáveis a partir de segmentos cotiledonares de *B. basiloba*. Observou-se também que, as gemas formadas tiveram maior desenvolvimento que os embriões somáticos. Resultados semelhantes foram observados em estudos com *Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl., onde as gemas adventícias formaram antes que os embriões somáticos, portanto estavam mais desenvolvidas (Liu *et al.*, 2006).

Neste estudo, após as sucessivas subculturas observou-se forte oxidação, evidenciada pelo escurecimento dos explantes e posterior necrose. Em consequência disso, as gemas e embriões não continuaram o processo de diferenciação e desenvolvimento. Em estudos com murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* Juss.), para promover o desenvolvimento de embriões somáticos, houve forte oxidação dos explantes em todos os tratamentos, apesar da presença de

carvão ativado no meio de cultura, e com isso não houve evolução dos embriões globulares para os demais estádios de desenvolvimento embrionário (Nogueira *et al.*, 2006).

A oxidação também foi observada em explantes retirados de híbrido *Eucalyptus grandis* W.Hill ex. Maiden x *E. urophylla* S.T. Blake, cultivados por mais de oito semanas no meio de regeneração com meio contendo BA e ANA, que foi relacionada com a ativação na biossíntese de compostos fenólicos pela luz (Barrueto *et al.*, 1999). Já em trabalhos com café, escurecimento dos explantes foi relacionado ao envelhecimento dos calos. Além disso, a qualidade e quantidade dos componentes do meio de cultura e/ou acúmulo de substâncias inibidoras do crescimento produzidas pelo explante original também foram considerados como fatores que influenciaram nesse processo (Teixeira *et al.*, 2004). Além do tipo de explante, a oxidação pode ser influenciada pelo genótipo e condições de cultivo *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

Análise anatômica evidenciou diferenças entre calos avermelhados e claros. Calos avermelhados apresentaram células mais próximas, e na sua superfície foi frequentemente observado a presença de células meristemáticas. Já os calos claros possuíam células alongadas, com maiores espaços intercelulares entre elas. Esta diferença na morfologia das células é importante no processo de diferenciação de embriões e gemas. De acordo com Dhed'a *et al.* (1991), células alongadas altamente vacuoladas dão origem a tecidos não-meristemáticos, enquanto células ovais, com citoplasma denso e contendo grãos de amido originaram tecidos meristemáticos.

Outra diferença observada entre os dois tipos de calos formados, consistiu na presença de amido nas células dos calos competentes para organogênese/embriogênese. A ocorrência abundante de grãos de amido tem sido relacionada à aquisição de potencial embriogênico (Profumo *et al.*, 1987; McCleary and Matheson, 1976). Adicionalmente, o amido em células

embriogênicas de calos de *Gentiana punctata* L. foi relacionada com fonte de energia para a intensa divisão celular e posterior desenvolvimento dos embriões (Mikula *et al.*, 2004). De acordo com Silveira *et al.* (2004), o nível desta molécula pode mudar dependendo da fase de crescimento do embrião, uma vez que a divisão e diferenciação celular demandam grande quantidade de carbono e ATP.

Neste trabalho, também foi possível visualizar alterações nas células das regiões mais externas do calo com maior intensidade mitótica formando protuberâncias, caracterizando a presença de meristemóides. Certamente, foram essas regiões que deram origem aos calos e conseqüentemente aos embriões e gemas, que se localizavam abaixo das camadas epidérmicas da folha cotiledonar. Resultado semelhante foi visto em folhas cotiledonares de *Abies amabilis* cultivados durante sete dias em meio de cultura na presença de BAP onde se observou o desenvolvimento de meristemóides na região sub-epidérmica dos explantes sugerindo que estas células deram origem aos calos, gemas e embriões (Kulchetski *et al.*, 1995).

Diferentes formas de embriões foram observadas. Contudo, a necrose das gemas e dos embriões impediu o desenvolvimento completo e conseqüentemente observações da morfologia final destas estruturas. O plano de corte dos explantes certamente contribuiu para que embriões de diferentes formas e tamanhos fossem vistos. Em muitos trabalhos sobre embriogênese somática, no meio de indução observa-se uma mistura de embriões em estágios diferentes de desenvolvimento, necessitando assim, serem subcultivados em um meio diferente para germinarem (Parra & Amo-Marco, 1998).

O conhecimento dos aspectos morfológicos dos embriões somáticos é importante para se determinar se estes embriões são normais ou possuem algum tipo de anormalidade. A formação de embriões somáticos anormais e a falta de sincronização no desenvolvimento,

não-conversão desses embriões em plantas e não-repetibilidade dos resultados são grandes entraves que têm limitado a obtenção de um protocolo eficiente de embriogênese somática, como foi observado em *Eucalyptus grandis* (Titon *et al.*, 2007).

Explantos provenientes de matrizes diferentes das utilizados na primeira repetição no meio contendo 0.45 mg.L^{-1} de BAP e 0.09 mg.L^{-1} de ANA não regeneram gemas adventícias e/ou embriões somáticos. Além disso, foi tentada a maximização da produção de gemas/embriões através da mudança das concentrações de ANA e BAP em explantes cotiledonares. Embora morfológicamente os tratamentos desse experimento apresentassem estruturas que lembravam estágios iniciais da formação de gemas e embriões, não foi possível a confirmação da diferenciação dessas estruturas devido à necrose dos explantes. É importante considerar que, para o desenvolvimento de órgãos *in vitro* ou embriões somáticos, fatores como genótipo e o tipo de explante são relevantes para o sucesso dessa via de regeneração (Rines & McCoy, 1981; Bered *et al.*, 1998). A influência do genótipo e do tipo de explante também foi verificada em aveia na indução da diferenciação da parte aérea e regeneração de plântulas (Lamb *et al.*, 2002).

A necrose dos explantes com a contínua exposição ao meio impediu o desenvolvimento de gemas e embriões somáticos. Contudo, ficou provada a capacidade regenerativa dos explantes de *Byrsonima basiloba*. Assim, para esta espécie, novos estudos devem ser realizados, testando outros tipos de reguladores de crescimento em diferentes concentrações e também a ausência de luz até que se verifique a total regeneração de embriões ou gemas, pois neste trabalho foi testada a influência da luz apenas na indução dos embriões e gemas. Segundo Souza & Junghans (2006), a luz é o fator que mais influencia no processo de morfogênese.

5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais realizadas, os resultados permitem as seguintes conclusões:

- Todos os tratamentos foram capazes de induzir a formação de calos friáveis;
- Foi possível observar dois tipos de calos friáveis: calos avermelhados e calos claros;
- Calos avermelhados possuíam células com núcleo volumoso, paredes finas, abundância de inclusões citoplasmáticas e substância de reserva, e calos claros não apresentavam estas características e as células eram altamente vacuoladas;
- A microscopia eletrônica de varredura mostrou que calos de cor avermelhada possuíam células menores de formato arredondado enquanto calos de cor clara apresentaram células de formato alongado com dimensões maiores;
- Tratamento contendo 0.45 mg.L^{-1} de BAP e 0.09 mg.L^{-1} de ANA, foi capaz de induzir a diferenciação de gemas adventícias e embriões somáticos em explantes contendo calos friáveis avermelhados;
- Após 10 semanas de cultivo, todos os explantes necrosaram impedindo o desenvolvimento das gemas adventícias e embriões somáticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, S.V.; Sabala, I.; Bozhkov, P.; Dyachok, J.; Filonova, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233-249p. 2002.
- Barrueto Cid, L.P.; Machado, A.C.M.; Carvalheira, S.R.C.; Brasileiro, A.C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56:17-23p. 1999.
- Barbosa, M. H. P.; Pasqual, M.; Pinto, J. E. B. P.; Arello, E. F.; Barros, I. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. *Applebloesem*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. 28(1): 15-19p. 1993.
- Bered, F.; Sereno, M.J.C.De M.; Carvalho, F.I.F. De; Federizzi, L.C.; Dornelles, A.L.C.; Lange, C.E.; Handel, C. L. Avaliação de embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). *Ciência Rural*. Santa Maria. 26(3):371- 375p. 1996.
- Bered, F.; Sereno, M. J. C. De M.; Carvalho, F. I. F. De; Lange, C. E.; Handel, C. L.; Dornelles, A.L. C. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. 33(11):1827-1833p. 1998.
- Cerqueira, E. S. *Propagação e calogênese in vitro em erva-de-touro (Tridax procumbens L.), uma planta medicinal*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras. 81p. 1999.
- Chaturvedi, R., Bhatnagar, S.P., High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar baby. In: *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 37: 255–258p. 2001.
- Dhed'a, D.; Dumortier, F.; Panis, B.; Vuylsteke, D.; Langhe, E. de Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana cv. Bluggoe. *Fruits*. 46:125-135p. 1991.
- Flores, R; Nicoloso, F.T; Vasconcellos, N.J.S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu*. 8(3): 89-95p. 2006.

- Hervé, P.; Jauneau, A.; Pâques, M.; Marien, J.N.; Boudet, A.M.; Teulières, C. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Science: 161*: 645-653p. 2001.
- Hutchinson, M.J.; Krishnaraj, S.; Saxena, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x Hortorum* Bailey) hypocotyls cultures. *Internacional journal of plant sciences. 157(4)*: 440-446. 1996.
- Ibrahim R. & Debergh, P.C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida*). *Scientia Hort . 88*: 41–57p. 2001.
- Johansen, D.A.. *Plant microtechnique*. New York: 523p. 1940
- Lamb, C.R.C.; Milach, S.C.K.; Pasquali, G.; Barro, R.S.; Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. *Pesq. agropec. bras., Brasília. 37(2)*.; 123-130p. 2002.
- Landa, F.S.L.; Paiva, R.; Paiva, P.D.O.; Filho, J.S.S.B. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciencia Agrotécnica. Lavras. 24*: 56-63p. 2000.
- Landi L, Mezzetti B. TDZ, anxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep. 25*:281–288p. 2005.
- Liu, C.; Xia, X.; Yin, W.; Huang, L.; Zhou, J. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl.). *Plant Cell Rep. 25*: 621-628p. 2006.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa. 386p. 2002.
- Mccleary, B. V., Matheson, N. K. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry. 15*: 43-47p. 1976.

- Melo, J.T.; Silvia, J.A.; Torres, R.A.A.; Silveira, C.E.; Caldas, L.S. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado, p. 195-243. 1998. In: *Cerrado: Ambiente e Flora*. EMBRAPA. Planaltina- DF. 556p.
- Mikula, A. Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. *Acta Biológica Cracoviensia*. 46: 109-120p. 2004.
- Murthy, B.N.S.; Murch, S.J.; Saxena, P.K. Thidiazuron- induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiologia Plantarum*. 94: 268-276p. 1995.
- Nogueira, R.C.; Paiva R.; Castro A.H.; Vieira C.V.; Abbade L.C.; Alvarenga A.A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciênc. Agrotec*. 28(5): 1053-1059p. 2004.
- Nogueira, R.C. Caracterização de calos embriogênicos de murici- pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Dissertação: UFLA- Lavras. 37p. 2006.
- Parra, R.; Amo-Marco, J.B. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). *Plant Cell Reports*. 18: 325–330p. 1998.
- Pereira, K.B.D. Micropropagação e estudo morfo-anatômico do endocarpo, semente e plântula de *Byrsonima basiloba* Juss. Dissertação de mestrado- UnB. Brasília. 151p. 2002.
- Profumo, P., Gastaldo, P. & Rascio, N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Protoplasma*. 138(2-3):. 89-97p. 1987.
- Rines, H. W.; Mccoy, T. J. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. *Crop Science*. Madison, 21:837-842. 1981.
- Santos, B.R.; Paiva, R.; Martinotto, C.; Nogueira, R.C.; Paiva, P.D.O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix (Salix humboldtiana willd.)* Ciência Rural, Santa Maria. 35(3): 510-514p. 2005.

- Silveira, V.; Floh, E. I. S., Handro, W.; Guerra M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76(1): 53-60p. 2004.
- Singh, N.D.; Sahoo, L.; Sarin, N.B.; Jaiwal, P.K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Plant Scienc*. 164: 341–347p. 2003.
- Titon, M.; Xavier, W. C.O.; Motoike, S.Y.; Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*.31(3): 417-426p. 2007.
- Tabei, Y., Kitade, S., Nisihizawa, Y., Kikuchi, N., Kayano, T., Hibi, T., Akutsu, K., Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Rep*. 17, 159–164p. 1998.
- Teixeira, J.B.; Junqueira, C.S.; Pereira, A.J.P da Costa. Mello, R.I.S.; Silva, A.P.D.; Mundim, D.A. Multiplicação clonal de café (*Coffea arábica* L.) via embriogênese somática. *Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 0102-0110. Brasília-DF. 121p. 2004.
- Toonen, M.A.J.; Schmidt, E.D.L.; De Vries, S.C. Cell tracking as a tool to study initial processes in somatic embryo development. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 2: 3–10. 1996.