



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS**

**VEGETAIS**

**PRISCILA TAVARES FONSECA**

**CULTURA DE EMBRIÃO ZIGÓTICO, CALOGÊNESE E  
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *ERYTHRINA VELUTINA* WILLD.  
(LEGUMINOSAE).**

FEIRA DE SANTANA – BA

2012

**PRISCILA TAVARES FONSECA**

**CULTURA DE EMBRIÃO ZIGÓTICO, CALOGÊNESE E  
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *ERYTHRINA VELUTINA*  
WILLD. (LEGUMINOSAE).**

FEIRA DE SANTANA – BA

2012

**PRISCILA TAVARES FONSECA**

**CULTURA DE EMBRIÃO ZIGÓTICO, CALOGÊNESE E  
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *ERYTHRINA VELUTINA*  
WILLD. (LEGUMINOSAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

FEIRA DE SANTANA – BA

2012

Catálogo-na-publicação: Biblioteca Central Julieta Carteadó – UEFS

Fonseca, Priscila Tavares

F746c Cultura de embrião zigótico, calogênise e conservação *in vitro* de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae). / Priscila Tavares Fonseca. – Feira de Santana - BA, 2012.

92 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2012.

1. *Erythrina velutina* Willd. 2. Cultura de embrião zigótico – *Erythrina velutina* Willd. 3. Calogênise – *Erythrina velutina* Willd. 4. Conservação *in vitro* – *Erythrina velutina* Willd. 5. Leguminosa. I. Santana, José Raniere Ferreira de. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Departamento de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 582.736

Aos meus pais Hermes e Cleuza pelo carinho,  
compreensão e por estarem sempre ao meu lado em  
todos os momentos da minha trajetória.

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar por está presente em todos os momentos, dando suporte para que pudesse vencer os obstáculos e conquistar meus objetivos.

À Deus pela oportunidade e o presente de conviver com pessoas que colaboraram para o alicerce do meu conhecimento compartilhando seus conhecimentos e experiências, contribuindo para a conclusão de mais uma etapa.

À todos os familiares, colegas de profissão e amigos que compartilharam comigo os momentos de alegria e de dificuldade durante o período de mestrado.

Obrigada mais umas vez!

“Diga-me eu esquecerei, ensina-me e eu poderei lembrar, envolva-me e eu aprenderei.”

(Benjamin Franklin)

"Os estudos aperfeiçoam a natureza e são aperfeiçoados pela experiência. "

(Francis Bacon)

A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer."

(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

*Erythrina velutina* é nativa do bioma Caatinga, apresentando relevada importância sócio-econômica e medicinal. Objetivou-se nesse trabalho o cultivo de embrião zigótico, bem como, calogênese e conservação *in vitro* de *E. velutina*. No primeiro experimento foi feito estudo comparativo da germinação entre sementes intactas e o cultivo de embrião avaliando o efeito dos reguladores vegetais BAP e ANA sobre a morfogênese *in vitro*. No segundo experimento verificou-se o efeito de BAP e CIN na regeneração de segmentos nodais. No terceiro experimento observou-se o efeito do 2,4-D na calogênese *in vitro* de diferentes explantes: embriões zigóticos inteiro e seccionado, folhas e epicótilo. Nos calos de embriões zigóticos analisou-se o crescimento cinético, quantificou-se os AR e AST e fez-se a anatomia vegetal. No último experimento avaliou-se o efeito do agente osmótico sacarose e do retardante de crescimento PBZ na conservação *in vitro*. Para germinação o cultivo de embriões zigóticos proporcionou plantas mais vigorosas. O explante plúmula e embriões zigóticos podem ser regenerados na concentração de 4,0 $\mu$ M de BAP, as regiões intermediária e radícula promoveram a formação de calos compactos na combinação de 10,63 $\mu$ M BAP e 2,0 $\mu$ M de ANA. Na regeneração *in vitro* a concentração de 20 $\mu$ M de BAP induziu maior número de brotos em segmentos nodais. Para calogênese a concentração de 11,75 $\mu$ M de 2,4-D induziu calos friáveis em embriões zigóticos inteiros sendo verificado a redução dos AR, AST e presença de células em divisão e amiloplastos durante o período de cultivo. A curva de crescimento mostrou que os calos devem ser transferidos para meio de subcultivo entre o 15<sup>o</sup> até o 21<sup>o</sup> dia. Na concentração testada de 11,75 $\mu$ M de 2,4-D obteve-se calos friáveis de segmentos foliares. Foi observado crescimento mais lento das culturas na temperatura de 18°C, a concentração de sacarose até 175,28mM não foram suficientes para reduzir o crescimento das plantas. Quando acrescido ao meio de cultura de 4 $\mu$ M de BPZ nota-se redução no crescimento das plantas.

**Palavras-chave:** Mulungu, regeneração *in vitro*, citocininas, auxinas, calogênese, crescimento mínimo.



## ABSTRACT

*Erythrina velutina* is a native Caatinga biome, with increasing socio-economic importance and medical. The objective of this work were to culture zygotic embryo, as well as *in vitro* *E. velutina* callus formation and conservation. The first experiment was a comparative study of seed germination between intact and embryo rescue evaluating the effect of plant growth regulators BAP and NAA on *in vitro* morphogenesis. The second experiment was verify the effect of BAP and CIN in the nodal segments regeneration. The third experiment observed the effect of 2,4-D on *in vitro* callus formation from different explants: zygotic embryos whole and sectioned, leaves and epicotyl. In callus cultures of zygotic embryos we analyzed the kinetics growth, quantified if the AR and AST did to plant anatomy. In the last experiment evaluated the effect of sucrose osmotic agent and the PBZ growth retardant the *in vitro* conservation. For germination of zygotic embryos cultivation provided more vigorous plants. The plumule explant and zygotic embryos can be regenerated at concentration of 4.0 $\mu$ M of BAP, the intermediate regions and the radicle promoted formation of compact callus on the combination of 10.63 $\mu$ M BAP and 2.0 $\mu$ M NAA. In regeneration *in vitro* concentration of 21.03 $\mu$ M BAP induced higher number of shoots in nodal segments. For callus formation concentration of 10.65 $\mu$ M 2,4-D induced friable callus on zygotic embryos whole and the reduction of AR, AST and the presence of dividing cells and amyloplasts during the growing period. The growth curve showed that callus should be transferred to subculture medium between the 15th to the 21st day. In the tested concentration of 11.75 $\mu$ M 2,4-D was obtained friable callus on leaf segments. We observed slower cultures growth at a temperature of 18°C, concentrations of up to 175.28mM sucrose was not sufficient to reduce plant growth. When using PBZ was observed a reduction of plant growth when added to the culture medium 4 $\mu$ M of BPZ.

**Keywords:** Mulungu, *in vitro* regeneration, cytokinin, auxin, callus formation, minimum growth.

## SUMÁRIO

(AGRADECIMENTOS)	
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
Referências	7
<b>CAPÍTULO 1- Germinação e morfogênese <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de <i>Erythrina velutina</i> Willd. (Leguminosae).</b>	10
Resumo	11
Abstract	12
Introdução	13
Material e métodos	15
Resultados e discussão	18
Conclusão	27
Referências	28
<b>CAPÍTULO 2- Regeneração <i>in vitro</i> <i>Erythrina velutina</i> Willd. (Leguminosae).</b>	31
Resumo	32
Abstract	33
Introdução	34
Material e métodos	36
Resultados e discussão	37
Conclusão	44
Referências	45
<b>CAPÍTULO 3- Calogênese: caracterização morfo-anatômica e bioquímica de calos induzidos a partir de embriões zigóticos de <i>Erythrina velutina</i> Willd. (Leguminosae).</b>	48
Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Material e métodos	54
Resultados e discussão	56
Conclusão	69
Referências	70
<b>CAPÍTULO 4- Conservação <i>in vitro</i> de <i>Erythrina velutina</i> Willd. (Leguminosae).</b>	75
Resumo	76
Abstract	77
Introdução	78
Material e métodos	80
Resultados e discussão	81
Conclusão	89
Referências	90
Considerações finais	93

## INTRODUÇÃO GERAL

A Caatinga representa a quarta maior área coberta de vegetação única do Brasil, respondendo por cerca de 60% do território da região Nordeste e abrangendo uma pequena parte da região sudeste de Minas Gerais (SAMPAIO et al., 2002), com representatividade de 596 espécies arbóreas e arbustivas, sendo que destas, 180 são endêmicas (COSTA et al., 2002).

A economia dessa região é fortemente sustentada pela exploração dos recursos naturais, que, em geral, vem sendo desenvolvida sem qualquer tipo de preocupação conservacionista (SAMPAIO, 2002), colocando em risco de extinção inúmeras espécies nativas, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasmas valiosos (GIULIETTI e QUEIROZ, 2006; FRANÇA et al., 2007). Aproximadamente 70% da região Nordeste do Brasil correspondente as terras de clima semiárido e subúmido estão susceptíveis a desertificação (VASCONCELOS, 2002), culminando com a diminuição da biodiversidade (SANTOS et al., 2009).

O bioma Caatinga possui vegetação de padrões diversificados, representado por espécies de várias famílias: Cactaceae, Euforbiaceae, Bromeliaceae e Leguminoseae. A família das leguminosas possui maior representatividade neste bioma, com cerca de 2.100 espécies e 188 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, estando presentes em todos os biomas brasileiros (ANDRADE et al., 2009).

Dentro da família da Leguminoseae, destaca-se a subfamília Faboideae (Papilionoideae) representadas por 482 gêneros e 12.000ssp., ao qual pertence o gênero *Erythrina* largamente conhecido, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Possui cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (VASCONCELOS et al., 2003) dentre elas a espécie em estudo *Erythrina velutina* Willd.

*E. velutina* é popularmente conhecida como suinã, mulungu, canivete, corticeira, mulungu-da-catinga, pau-de-coral, sanaduí e sananduva (LORENZI, 1992) e distribui-se na Caatinga e florestas secas no oeste da América do Sul, no Peru, Equador e no Caribe (Costa Norte da Venezuela e Cuba). É considerada nativa do bioma Caatinga ocorrendo desde a Paraíba, Piauí ao norte de Minas Gerais (QUEIROZ, 2009) (Figura 1).

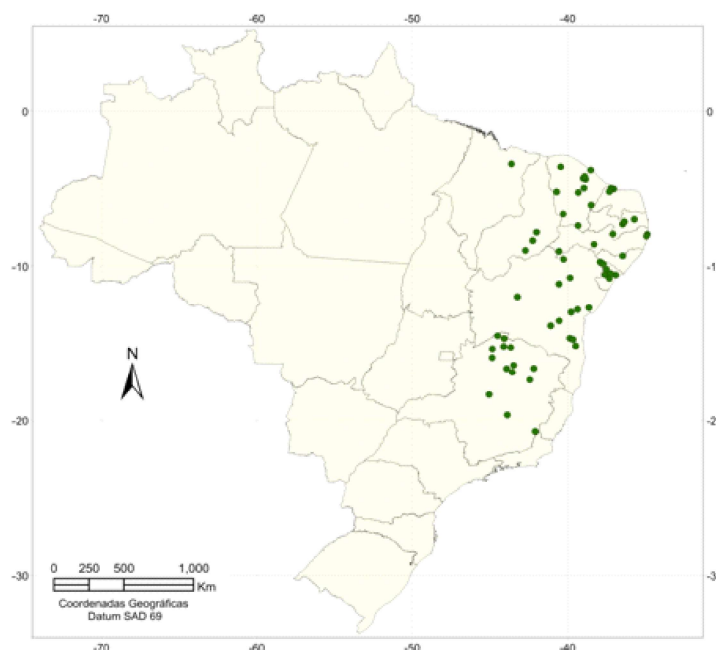


Figura 1– Distribuição geográfica de *Erythrina velutina* (●) no Brasil. (Fonte: Embrapa Florestas).

O nome genérico *Erythrina* vem do grego *erythros* que significa “vermelho”, em alusão à cor das flores e o epíteto específico *velutina* vem do latim, por suas folhas apresentarem indumento de delicados e macios pêlos (CARVALHO, 2008).

Caracteriza-se por ser uma árvore decídua, de copa aberta e arredondada, muito florífera e ornamental, espinhenta, atingindo de 6 a 12 m de altura (Figura 2A e B). Apresentam folhas compostas trifolioladas, alternas, de folíolos cartáceos, velutino-pubescentes, medido de 3 a 12 cm de comprimento. Suas flores são vermelho-coral, grandes, dispostas em panículas racemosas com raque pulverulenta, formadas com a árvore despida de sua folhagem (Figura 2C). Os frutos são do tipo legume (vagem) deiscente, com 5 a 8 cm de comprimento, contendo 1-3 sementes reniformes de cor vermelha e brilhantes (LORENZI e MATOS, 2008).



Figura 2– Aspectos visuais da planta (A); inflorescência (B) e das sementes (C) de *Erythrina velutina*. (Fonte: Autora).

A espécie em estudo possui grande relevância econômica sendo utilizada em diversificados setores: madeireiro, artesanal, tintóreais, bem como, para fins paisagísticos e principalmente na medicina popular.

Na medicina popular são atribuídos a casca e aos frutos dessa espécie propriedades sudorífica, calmante, emoliente, peitoral e ao seu fruto seco ação anestésica local, quando usado na forma de cigarro, como odontálgico (LORENZI e MATOS, 2008). Além dessas propriedades, a infusão da casca é empregada como sedativo, calmante de tosses e bronquites, bem como no combate a verminoses e no tratamento de hemorróidas; o cozimento (decocto) é indicado para acelerar a maturação dos abscessos nas gengivas (CARVALHO, 2008).

Estudos científicos identificaram a presença de compostos como flavonóides, isoflavanóides (CUNHA et al., 1996), alcalóides eryitrinano, erythodine N-óxido (OZAWA et al., 2008) e atividades biológicas contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (VIRTUOSO et al., 2005), bem como efeito anticolinesterásica (ESTEVAM et al., 2007), sedativo, bloqueador neuromuscular (DANTAS et al., 2004) e relaxante (SANTOS et al., 2007), demonstrando que a espécie possui um grande potencial farmacológico.

Por ser uma espécie de amplo potencial, encontra-se suscetível ao extrativismo indiscriminado. Aliados a esse fator, a espécie apresenta uma barreira natural de propagação, suas sementes possuem dormência tegumentar, impedindo sua germinação sobre condições naturais, levando a reduções drásticas das populações naturais, visto que o mecanismo de perpetuação da espécie ocorre por sementes.

Nesse contexto, faz-se necessário delinear estratégias de propagação que possam garantir a conservação, manutenção e utilização de forma sustentável da espécie. Alternativamente, a aplicação das técnicas de culturas de tecidos principalmente a micropropagação para produção vegetal, têm mostrado excelente desempenho *in vitro* em termos de número de mudas sadias em qualquer época do ano, em tempo e espaço físico reduzido e manutenção de genótipos elites (GAO et al., 2009). Além de resolver problemas associados com a oferta e a variabilidade na qualidade do produto (FRABETTI et al., 2009), com maior produtividade, uniformidade e desempenho no campo, contribuindo para reduzir a pressão extrativista em áreas nativas (GEORGE, 2008).

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como o cultivo de diferentes células somáticas, haplóides, tecidos ou órgãos das plantas denominados explantes, num meio de

cultura definido sob condições ambientais e assépticas controlados *in vitro* por meio da utilização de recipientes fechados.

Em geral, pode ser utilizado como fonte de explante qualquer fragmento da planta (SANTOS, 2009), seja uma célula, um órgão ou um tecido, tais como, segmento, disco foliar, hipocótilo (FARIA et al., 2007) bem como, embriões imaturos ou maduros excisados das sementes, que são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro* principalmente de plantas lenhosas por causa de sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo (HU e FERREIRA, 1998).

Ao isolar parte da planta *in vitro* é necessária a utilização de meio de cultura que propicie condições necessárias para o crescimento das plantas. Dessa forma, o meio deve fornecer um suporte semi-sólido, nutrientes, energia comumente a sacarose e algumas vitaminas suplementares. Muitas culturas, também, requerem a adição de reguladores de crescimento para regenerar ou propagar novas plantas (HARTMANN et al., 2002). Para espécies lenhosas geralmente utiliza-se o meio de cultura WPM (Woody Plant Medium), elaborado por LLOYD e MCCOWN (1981), para a cultura de *Kalmia latifolia* (Ericaceae) em razão da sua menor força iônica total em relação a outros meios empregados no cultivo *in vitro* (PASQUAL, 2001; JHA; GHOSH, 2006).

A partir de tecidos vegetais a formação de órgãos como partes aéreas e raízes *in vitro* é denominada organogênese que pode ser induzida por citodiferenciação, mediante duas vias organogênicas: direta e indireta.

A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (ARENHART e ZAFFARI, 2008) através da diferenciação celular, seguida de sucessivas mitoses, que dão origem a um arranjo de células que responderam a estímulos do balanço entre reguladores de crescimento (auxinas/ citocininas) e outros fatores do meio de cultura e ambiente (TERMIGNONI, 2005).

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas possuem papel fundamental por promover a divisão celular, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um dos mais utilizados nos processos de desdiferenciação celular e indução de calos, considerado também um potente sinalizador no processo de rediferenciação (GUERRA et al., 1999). Em determinadas condições, quando o balanço (citocinina/ auxina) for favorável a citocinina, centros meristemáticos do tecido calogênico podem diferenciar-se originando raízes, brotos ou embriões somáticos, podendo objetivar estudos em diversos campos, como a citologia, histologia e a bioquímica (NEUMANN et al., 2009).

Já na organogênese direta ocorre o surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vitro* (ARENHART e ZAFFARI, 2008). A regeneração de plantas via organogênese direta e indireta também está intimamente ligada ao uso de reguladores de crescimento no meio de cultura, em particular as citocininas. A adição de fitorreguladores nessa fase, principalmente citocininas, como 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e thidiazuron (TDZ) têm o objetivo de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz, estimulando respostas como o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (DONINI et al., 2008).

Nesse contexto, os processos morfogênicos podem ser melhores compreendidos com o auxílio do conhecimento anatômico e bioquímico, pois as identificações dos aspectos estruturais e das necessidades nutricionais são importantes para o sucesso da propagação, a qual depende da regeneração de tecidos vegetais (SILVA et al., 2005).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais também têm sido uma importante ferramenta para conservação de germoplasma *in vitro* de espécies ameaçadas de extinção pelo extrativismo e uso inapropriado e com grande potencial econômico.

A conservação de germoplasma *in vitro* pode se dá por meio do crescimento lento das culturas, podendo ser utilizado como fonte de explante meristemas ou ápices meristemáticos, sementes, embriões zigóticos e somáticos. Esse método consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento ou pela diminuição da concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS e WILLIAMS, 1998). Dessa forma, favorecendo a ampliação do tempo entre subcultivos e propiciando menor custo para manutenção do banco de germoplasma em laboratório (CANTO et al., 2004). de conservação *ex situ* se comparada aos métodos de conservação *in situ*, pois as culturas são livres de agentes patogênicos e intempéries, o que garante a manutenção da fidelidade genética, facilita a disponibilidade de material para o intercâmbio de germoplasma e redução dos custos de manejo e cultivo, além de permitir o desenvolvimento de estudos ampliando o conhecimento sob o germoplasma cultivado.

Trabalhos utilizando as técnicas de cultura de tecidos vegetais já foram realizados por COSTA et al. (2010), em que verificaram baixa taxa de multiplicação *in vitro* da espécie em estudo, o que torna necessário a realização de estudos mais específicos para a

micropropagação e o desenvolvimento de metodologias de conservação de forma a contribuir para exploração sustentável da espécie.

Diante disso, o trabalho objetivou o cultivo de embrião zigótico e a indução de calos como uma possível forma de propagação da espécie bem como, a obtenção de um protocolo de conservação *in vitro* de *E. velutina*.



## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. L. P.; MIOTTO, S. T. S.; SANTOS, E. P. A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v.36, n.4, p.737-768, 2009.
- ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, n.1, p. 16-22, 2008.
- CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.717-720, 2004.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, 2008.
- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p. 1090-1096, 2010.
- COSTA, J. A. S. et al. **Leguminosas forrageiras da Caatinga: espécies importantes para as comunidades rurais do sertão da Bahia**. Feira de Santana: Ed. Universidade Estadual de Feira de Santana, SASOP, 2002.
- CUNHA, E. V. L. et al. Eryvellutinone, na isofavanose from the stem bark of *Erythrina velutina*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1371-1373, 1996.
- DANTAS, M. C. et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 94, p. 129-133, 2004.
- DONINI, L. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1769-1772, 2008.
- ESTEVAM, C. S. et al. Atividade anticolinesterásica do extrato aquoso e da fração alcalóide total das folhas de *Erythrina velutina*. **In 30ª Reunião anual da sociedade brasileira de química**, 2007.
- FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, v. 66, n.4, p. 535-543. 2007.
- FRABETTI, M. et al. Micropropagation of *Teucrium fruticans* L., an ornamental and medicinal plant. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.45, p.129–134. 2009.
- FRANÇA, S. C. et al. [ORG]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 2007.

- GAO, X. et al. In Vitro Micropropagation of *Freesia hybrida* and the Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Regenerated Plantlets. **Journal Plant Growth Regulation**, v.29 n.3 p.257-267, 2009.
- GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht : Springer, 2008. v.1, p.1-28.
- GIULIETTI, A. M; QUEIROZ, L. P. **Recursos genéticos do semiárido nordestino**. Instituto do Milênio do Semiárido, v.5. Recife-PE: IMSEAR, 2006.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2002. 847p.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.371-93.
- JHA, T. B.; GHOSH, B. **Plant Tissue Culture: Basic and Applied**. India: Universities Press (India) Private Limited. 2006. 206p.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v.15, p.415, 1980. (Abst. 321).
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p.577.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Nova Odesseia: Ed. Plantarum. 1992.
- NEUMANN, K.H; KUMAR, A; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture – a toll in biotechnology: basics and application**. Berlin: Springer Verlang, 2009. p.333.
- OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 234–236, 2009.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- QUEIROZ, Luciano Paganucci de. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana, Ba: UEFS, 2009. 467 p.
- SAMPAIO, E. V. S. B. 2002. **Uso das plantas da caatinga**. In: Sampaio, E. V. S. B.; Giulietti, A. M.; Virgínio, J. & Gamarra-Rojas, C. F. L. Vegetação e flora da caatinga.

Associação Plantas do Nordeste – APNE, Centro Nordestino de Informações sobre Plantas – CNIP, Recife. p. 49-90, 2002.

SANTOS, Daniela Soares. **Micropropagação da bromélia ornamental** *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.). 2009. (121. p). Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

SANTOS, M. F. A. V. et al. Diversidade e densidade de espécies vegetais da caatinga com diferentes graus de degradação no município de Floresta, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n.2, pg. 389-402, 2009.

SANTOS, M. R. V. et al. Relaxant effect of the aqueous of *Erythrina velutina* leaves on rat *van deferens*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 343-348, 2007.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Interrelações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasilica**, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

TERMIGNONI, Regina Ramos. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

VASCONCELOS, R. Estimativa de perdas econômicas provocadas pela desertificação na região do semiárido. In: Teuchler, H.& Moura, S. M. **Quanto vale a caatinga?**. Fundação Konrad Adenauer, Fortaleza. p. 45-67, 2002.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana de cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 137-142, 2005.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. (1998) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C. et al. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CBPH, 1998.

## Capítulo 1

---

**Cultivo, germinação e morfogênese *in vitro* de embriões zigóticos de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae).**

## RESUMO

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos representa uma técnica promissora para avançar no estudo do desenvolvimento embrionário e quebra da dormência de sementes. O trabalho objetivou o estudo comparativo da germinação de sementes e embriões zigóticos de *Erythrina velutina* bem como, avaliar o efeito dos reguladores vegetais BAP e ANA no potencial morfogenético *in vitro* dos embriões zigóticos. No primeiro experimento sementes intacas e embriões zigóticos foram inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. Após 30 dias foram avaliadas: porcentagem de germinação, número de gemas, número de folhas, comprimento da parte aérea, plantas normais e número de raízes. No segundo experimento, embriões zigóticos maduros foram utilizados inteiros, seccionado em: plúmula, região intermediária e radícula, sendo posteriormente inoculado em meio de cultura WPM suplementado com diferentes combinações de BAP (0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 $\mu$ M) e ANA (0,0; 1,0; 2,0 $\mu$ M) acrescido de 87,65mM de sacarose e solidificado 0,7% de ágar. Aos 30 dias da inoculação foram avaliados porcentagem de regeneração, número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e porcentagem de formação de calo para explantes região intermediária e radícula. Por meio dos resultados, infere-se que embriões zigóticos inteiros são excelentes fontes de explante para propagação *in vitro*. É possível a regeneração *in vitro* do explante plúmula e embriões zigóticos inteiros na concentração de 4,0 $\mu$ M de BAP. As regiões intermediária e radícula promoveram a formação de calos compactos (96,06%) na combinação de 10,63 $\mu$ M BAP e 2,0 $\mu$ M de ANA.

**Palavra-chave:** Mulungu, dormência, citocininas, morfogênese.

## ABSTRACT

The *in vitro* culture of zygotic embryos represents a promising technique to advance the study of embryonic development and break of dormancy in seeds. This study aimed the comparative study of seeds and zygotic embryos germination of *Erythrina velutina* as well as evaluate the effect of plant growth regulators BAP and NAA in the morphogenetic potential of *in vitro* zygotic embryos. On the first experiment, intact seed and whole zygotic embryos were inoculated in culture medium WPM supplemented with 87.64mM sucrose and solidified with 0.7% agar. After 30 days were evaluated: germination percentage, number buds, leaf number, stem length, normal plants and number of roots. In the second experiment, mature zygotic embryos were used integers, sectioned in plumule, radicle and intermediate region, and subsequently inoculated in WPM medium supplemented with different combinations of BAP (0.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 $\mu$ M) and NAA (0.0, 1.0, 2.0 $\mu$ M) plus with 87.65mM sucrose and solidified 0.7% agar. After 30 days from inoculation, were evaluated: regeneration percentage, buds number, number of leaves, stem length, number of roots and percentage of callus formation in intermediate region, explants and radicle. Through the results, that whole zygotic embryos are excellent sources of explants for *in vitro* propagation. It is possible to regenerate *in vitro* plumule explant and whole zygotic embryos at the concentration of 4.0 $\mu$ M BAP, intermediate and radicle regions promoted the formation of compact callus on the combination of (96.06%) 10.63 $\mu$ M BAP and 2.0 $\mu$ M NAA .

**Keyword:** Mulungu, dormancy, cytokinins, morphogenesis.

## INTRODUÇÃO

*Erythrina velutina* é uma árvore pertencente à família Leguminosae, conhecida popularmente como mulungu, suinã, corticeira e sanaduva, sendo nativa da região Semiárida do Brasil (LORENZI e MATOS, 2008). A espécie apresenta dificuldade de propagação sexual, uma vez que suas sementes possuem dormência tegumentar, o que impede sua germinação sobre condições naturais. Esse fator aliado ao intenso extrativismo de suas sementes para confecção de adornos e uso na medicina popular, impede a restauração das populações naturais.

Dentro desse contexto, a utilização da biotecnologia, a exemplo da cultura de tecidos vegetais, pode auxiliar na propagação de espécies vegetais que possuem problemas relacionados à germinação ou mesmo segregação de caracteres. Sendo que, técnicas de germinação *in vitro* utilizando embriões zigóticos podem superar a dormência tegumentar e de acordo com BENMAHIOUL et al. (2009) aumentar a taxa de produção de brotos, além de reduzir significativamente os riscos de contaminação *in vitro* e oxidação fenólica que são problemas freqüentemente observados em espécies lenhosas.

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos tem sido utilizado com sucesso na propagação de várias espécies vegetais (*Astrocaryum ule*; *Cocos nucifera* L.; *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*; *Pistacia vera* L.), permitindo dessa forma a superação de barreiras genéticas à germinação, produção de plantas assépticas e a elucidação de aspectos inerentes à nutrição do embrião no óvulo (HU e FERREIRA, 1998). A germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos e maduros pode ser utilizada para o cultivo desses em programas de conservação e melhoramento genético, na recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis e também como fonte de explante para a cultura de tecidos (ZHANG e LESPINASSE, 1991).

Nesse sentido, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos representa uma técnica promissora para avançar no conhecimento da biologia de determinadas espécies, uma vez que, se torna possível reproduzir e estudar o desenvolvimento embrionário, a quebra da dormência e a produção de plantas (COLLINS e GROSSER, 1984; HU e FERREIRA, 1998), sendo ainda que, os tecidos embrionários são excelentes explantes para a propagação clonal *in vitro* em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (PIERIK, 1990).

Entretanto, um importante aspecto do cultivo de embriões *in vitro*, é a definição do meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento (HU e

FERREIRA, 1998), pois as plantas cultivadas *in vitro* necessitam de uma fonte de energia exógena, visto que não dispõem de condições adequadas para a realização da fotossíntese. A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada na cultura de tecidos, sendo incorporada ao meio de cultivo para sustentar o crescimento das plantas (SANTANA et al., 2008). Dessa forma, os fatores que freqüentemente determinam o sucesso no cultivo *in vitro* são a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados.

Diante disso, tem-se buscado alternativas quanto à composição dos meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente do estágio em que se encontram (ANDREOLI, 1986). No entanto, conforme relatado por HU e FERREIRA (1998), embriões excisados no estágio maturo ou próximo a este são quase autotróficos e, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia, podendo germinar e crescer num meio inorgânico.

Para que os embriões zigóticos tenham desenvolvimento normal *in vitro*, é necessário que o meio de cultura possua uma composição mineral apropriada, sendo ainda necessário adaptar o meio cultura de acordo com as exigências nutricionais de cada espécie. Para a obtenção desses processos de desenvolvimento, podem ainda ser utilizados reguladores de crescimento vegetal como citocininas e auxinas, de forma que, para um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é necessário um adequado balanço entre estes (AMÉRICO et al., 2003). As citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares. As auxinas estão associadas ao enraizamento e alongamento celular, estando envolvidas também no controle da divisão celular (KERBAUY, 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo comparativo da germinação *in vitro* de sementes e embriões zigóticos, além de avaliar o efeito dos reguladores vegetais BAP e ANA no potencial morfogênético *in vitro* de embriões zigóticos de *E. velutina*.



## 1. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 Local de realização dos experimentos e desinfestação das sementes

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal (UNEHF) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), localizado no município de Feira de Santana, região do Semiárido da Bahia.

Foram utilizadas sementes de *E. velutina* coletadas na Fazenda Caiçara – Petrolina – PE (latitude 34°00'00"N e longitude 68°54'22,5" E) fornecidas pela EMBRAPA Semiárido, que estavam armazenadas no LCTV do Horto Florestal, sob temperatura ambiente.

Inicialmente as sementes foram submetidas à escarificação mecânica e ao processo de desinfestação segundo a metodologia de Costa et al. (2010) com modificações. Para escarificação mecânica foi utilizada mini retifica (Western® R-40) danificando o tegumento até o aparecimento do endosperma no lado oposto ao hilo.

Logo após, as sementes foram lavadas em água corrente por 10 minutos, em seguida desinfestadas em câmara de fluxo laminar, pela imersão em etanol a 70% por 2 minutos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 20 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas 4 vezes com água destilada estéril e, em seguida, colocadas para embeber em recipiente contendo água destilada estéril, vedado com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC), durante 20 horas.

### 2.2 Cultivo de embrião zigótico

Após o período de pré-embebição foi feita a incisão da semente, cortando-a transversalmente no centro, separando os cotilédones e utilizando uma pinça para a retirada do embrião zigótico (Figura 1).

### 2.3 Meio de cultura e condições experimentais

O meio de cultura foi o WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980) suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar (Himedia®). O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N antes da autoclavagem à temperatura de 121° C e pressão de 1 atm por 15 minutos.

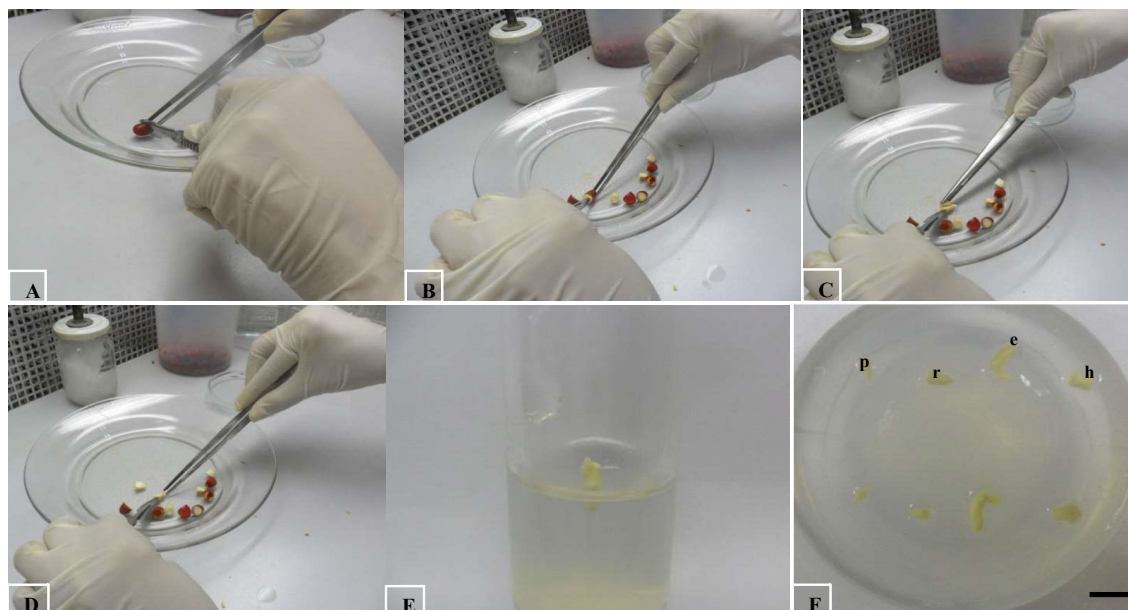


Figura 1– Corte transversal no centro da semente (A); Retirada do tegumento da semente (B); Cultivo do embrião (C) e (D); embrião zigótico intacto (E) e (F) embrião seccionado inoculado em meio WPM. Plúmula (p); Radícula (r); Embrião zigótico inteiro (e) e região intermediária (h) (Barra= 1cm). Feira de Santana, BA, 2012.

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica e os recipientes fechados com filme de PVC. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $60\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

#### 2.4 Estudo comparativo da germinação *in vitro* de sementes e embriões zigóticos de *E. velutina*

O embrião zigótico resgatado (item 2.2) e semente intacta foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 15 mL de meio de cultura WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado composto por 6 repetições, cada uma composta por 5 unidades experimentais. Após 30 dias foram avaliadas: porcentagem de germinação, número de gemas, número de folhas, comprimento da parte aérea, porcentagem de plantas normais e anormais (ausência ou crescimento atrofiado da parte aérea, ausência de expansão foliar) e número de raízes.

#### 2.5 Efeito dos reguladores crescimento vegetais BAP e ANA no potencial morfogênético de embriões zigóticos inteiros e seccionados de *E. velutina*.

O embrião zigótico resgatado (item 2.2) foi utilizado intacto e seccionado em: plúmula, região intermediária e radícula (Figura 1). Os explantes foram posteriormente inoculados em frascos (119 x 70mm), contendo 60 mL de meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 $\mu$ M) combinado com ácido naftalenoacético (ANA) (0,0; 1,0; 2,0  $\mu$ M), acrescido de 87,64 mM de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar (Himedia®).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4 x 5 x 3 (tipos de explantes x concentrações de BAP x concentrações de ANA) totalizando 60 tratamentos, composto por 5 repetições, cada uma constituída por 4 unidades experimentais. Aos 30 dias da inoculação foram avaliados: porcentagem de regeneração, número de brotos, número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e porcentagem de formação de calo para os explantes região intermediária e radícula.

#### *2.6 Análise estatística*

As médias obtidas foram submetidas à análise de variância pelo teste F, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey e regressão para fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Estudo comparativo da germinação *in vitro* de sementes e embriões zigóticos de *E. velutina*.

De acordo com análise de variância foi verificado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para porcentagem de plantas normais e efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) para número de gemas (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação (%G), número de gemas (NG), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), plantas normais (PN) e número de raízes (NR) em plantas de *Erythrina velutina* após 30 dias de inoculação em meio de cultura WPM. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrados médios					
		%G	NG	NF	CPA	PN	NR
Tipo de explante	1	133,33 <sup>NS</sup>	5,33 <sup>**</sup>	2,08 <sup>NS</sup>	1224,12 <sup>NS</sup>	21,33 <sup>*</sup>	1500,00 <sup>NS</sup>
Resíduo	10	53,33	0,497	1,20	581,76	256,66	47,00
CV		7,55	34,68	29,22	26,39	36,13	35,18

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A maior porcentagem de plantas normais (88,33%) foi obtida a partir da germinação dos embriões zigóticos quando comparados com plantas germinadas de sementes 61,67% (Figura 2A). Resultados semelhantes foram reportados na germinação *in vitro* de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.), em que LÉDO et al. (2008) verificaram 100 e 81,25% de conversão de embriões zigóticos em plântulas normais, entretanto, quando utilizado os reguladores BAP e ANA combinados.

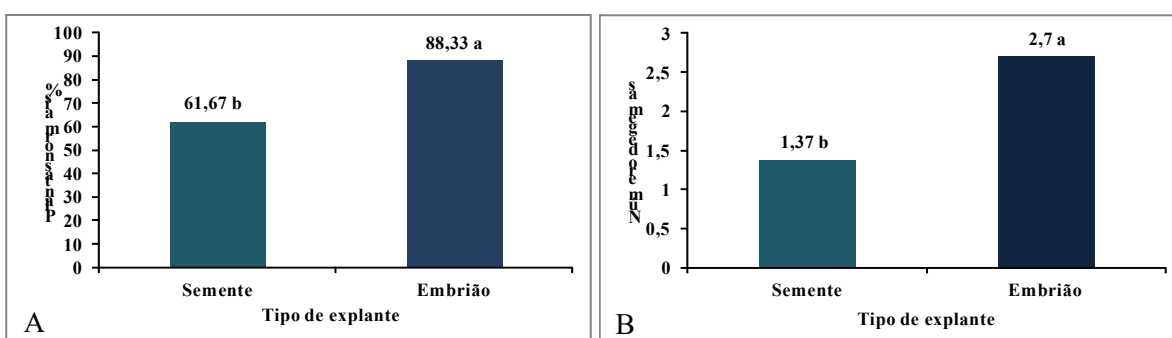


Figura 2– Porcentagem de plantas normais e número de gemas em plantas oriundas de sementes (A) e embriões zigóticos (B) de *Erythrina velutina* aos 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

Foi notado que para as plantas providas de semente houve o crescimento da região do hipocótilo, entretanto, a região plumular não se desenvolveu permanecendo inserida entre os cotilédones. Provavelmente o tegumento agiu como barreira para expansão foliar

nas plantas oriundas de sementes. Além disso, a liberação de exsudados durante o processo de embebição e inoculação das sementes em meio de cultura podem ter promovido a liberação de inibidores químicos.

Este processo possivelmente reduziu o crescimento do eixo embrionário, visto que, com a retirada do embrião zigótico e seu cultivo no meio de cultura, foi verificado a formação de plantas mais vigorosas (Figura 3). FIOR et al. (2012) observaram elevada formação de plântulas *in vitro* de *Butia capitata* (92%), quando retirou-se totalmente o pérculo da cavidade embrionária em comparação as sementes sem escarificação.

Segundo HU e FERREIRA (1998), o cultivo de embriões zigóticos contribui para verificar a viabilidade dos embriões de sementes dormentes, bem como, a superação da dormência e o conhecimento dos processos germinativos.

Ao utilizar o embrião zigótico foi registrada a maior média (2,7) de gemas por explante, enquanto que, para as plântulas oriundas da germinação de sementes obteve-se uma média de 1,37 gemas por explante (Figura 2B).

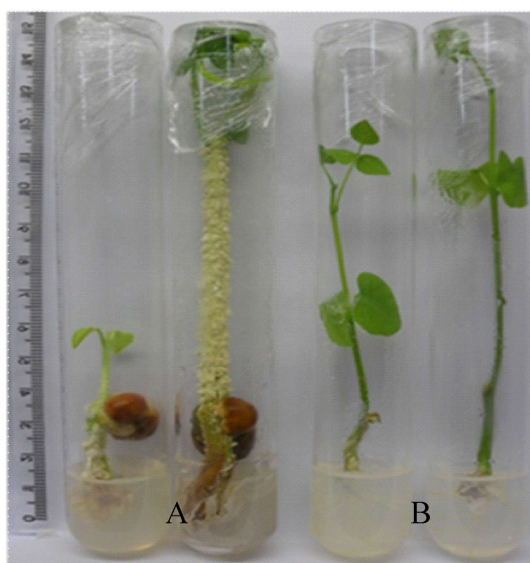


Figura 3– Plantas germinadas *in vitro* oriundas de sementes (A) e embriões zigóticos (B) de *Erythrina velutina* inoculados em meio WPM após 30 dias de cultivo. Feira de Santana, BA, 2012.

O menor número de gemas observadas nas plantas oriundas de sementes, provavelmente está relacionado com a falta de uniformidade, assim como, pelo alongamento dos entrenós, pois as plântulas obtidas da germinação dos embriões zigóticos possuem um menor alongamento dos entrenós e plantas uniformes, porém com incremento no número de gemas. Conferindo-lhe então, características importantes para o sistema de micropropagação do mulungu, principalmente para fase de estabelecimento e

multiplicação, pois o maior número de gemas proporciona maior produção de brotos.

### 3.2 Efeito dos reguladores vegetais BAP e ANA no potencial morfológico de embriões zigóticos inteiros e seccionados de *E. velutina*.

Observou-se efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da interação “BAP x Tipo de explante” para as variáveis porcentagem de regeneração, comprimento da parte aérea e número de raízes. Enquanto que, verificou-se efeito altamente significativo da interação “BAP x ANA” apenas para a variável porcentagem de calo. Foi observado efeito isolado das fontes de variação “BAP” e “Tipo de explante” para as variáveis: número de brotos e número de folhas (Tabela 2).

Ao analisar a variável porcentagem de regeneração em função do tipo de explante, verificou-se que na ausência de reguladores de crescimento vegetal, a porcentagem de regeneração foi maior (93,33%) quando se utilizou o explante embrião inteiro em relação ao explante plúmula (75%). Os explantes região intermediária e radícula não foram responsivos para a regeneração de brotos (Tabela 3).

No entanto, ao suplementar o meio de cultura com o regulador de crescimento vegetal BAP foi verificado aumento na taxa de regeneração para explante plúmula (98,35%) na concentração de  $4\mu\text{M}$  de BAP, sendo mantida com o aumento das concentrações. O centro produtor de citocinina ocorre nos meristemas radiculares, no entanto, pode haver a síntese destas nos meristemas presentes no ápice caulinar (TAIZ e ZEIGER, 2009). Possivelmente, a síntese no ápice caulinar de citocinina do explante plumular não é suficiente para promover um balanço auxina/citocinina favorável ao crescimento da gema caulinar, o qual foi suprido com a adição de BAP no meio de cultura. Ao suplementar o meio de cultura com BAP, o explante plúmula apresentou diferença significativa para a variável porcentagem de regeneração, obtendo um acréscimo de 23,75% quando comparado ao meio isento de regulador de crescimento vegetal (Tabela 3).

Tabela 2- Resumo da análise de variância para porcentagem de regeneração (%R), número de brotos (NB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior parte aérea (CPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e formação de calos de plantas de *Erythrina velutina* submetidas a diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) combinado e isolado com ácido naftaleno acético (ANA) em meio de cultura WPM. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrado médio						
		%R	NB	NF	NR	CPA	MSPA	F.CALO
BAP	4	545,50**	0,46**	37,80**	19,53**	2492,41**	381,90**	21395,00**
ANA	2	187,06 <sup>ns</sup>	0,076 <sup>ns</sup>	2,20 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	177,89 <sup>ns</sup>	326,66**	4330**
Explante	1	168233,09**	2,88**	692,16**	11,29**	14100,67**	3465,37**	563,33 <sup>ns</sup>
BAP x ANA	8	234,90 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	2,62 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	41,68 <sup>ns</sup>	158,29*	630,00**
BAP x Explante	4	316,92**	0,05 <sup>ns</sup>	3,05 <sup>ns</sup>	7,92**	2433,22**	883,37**	255,00 <sup>ns</sup>
ANA x Explante	2	75,75 <sup>ns</sup>	0,076 <sup>ns</sup>	4,37 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	78,75 <sup>ns</sup>	646,28**	3,33 <sup>ns</sup>
BAP x ANA x Explante	8	112,34 <sup>ns</sup>	0,073 <sup>ns</sup>	0,94 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	30,04 <sup>ns</sup>	101,71 <sup>ns</sup>	195,00 <sup>ns</sup>
Resíduo	90	92,06	0,064	2,37	0,36	53,92	61,98	134,44
CV (%)		20,93	23,55	33,92	32,42	32,67	51,47	14,77

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

O efeito positivo de reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* em embriões zigóticos e explante plumular também foi reportado por COSTA e ALOUFA (2007) que registraram taxa de 66,6% de conversão de embriões zigóticos em plântulas de *Phoenix dactylifera* L. em meio de cultura MS isento dos reguladores de crescimento BAP e AIA. No cultivo de ápices plumular de *Vigna unguiculata* L, a adição de reguladores de crescimento vegetal foi significativa quando embriões zigóticos foram tratados com pulso de 44,4 $\mu$ M de BAP por 5 dias, sendo inoculados posteriormente em meio para regeneração acrescido de BAP (1,11 a 5,55 $\mu$ M) e ANA (0,54 $\mu$ M) promovendo 100% de regeneração de ápices plumular (AASIM et al., 2009).

Tabela 3–Porcentagem de regeneração (%R) de *E. velutina* em função de BAP aos 30 dias de inoculados em meio de cultura WPM. Feira de Santana, BA, 2012.

Explante	BAP ( $\mu$ M)				
	0	4	8	12	16
Embrião	93,33 AB a	98,33 A a	86,67 B a	93,33 AB a	96,67 AB a
Plúmula	75,0 C b	98,35 A a	83,37 BC a	93,33 AB a	98,33 A a
R. Intermediária	0,0 A c	0,0 A b	0,0 A b	0,0 A b	0,0 A b
Radícula	0,0 A c	0,0 A b	0,0 A b	0,0 A b	0,0 A b

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Figura 4– Embrião zigótico inteiro e segmentado (A); Brotos oriundos de embriões zigóticos (B); Brotos oriundos de ápice plumular (C); Calo compacto formado em explantes da região intermediária (D), inoculados em meio WPM acrescido de reguladores de crescimento vegetal após 30 dias de cultivo. (Barra= 1cm). Feira de Santana, BA, 2012.

Ao analisar a variável número de brotos em função do tipo de explante (Figura 4B e C), registrou-se a maior média (1,23) para embrião zigótico inteiro, sendo que para o explante plúmula essa média foi de 0,92 (Figura 5A). Pressupõe-se que a citocinina



interagiu com os fito-hormônios endógenos de forma que, obteve uma maior capacidade de resposta utilizando o embrião zigótico quando comparado com o explante plúmula.

Contudo, a porcentagem de brotos oriundos de embriões zigóticos é considerada baixa, semelhantes aos verificados por DANTAS et al.(2002) na superação de dormência do porta enxerto de macieira M9 (*Mallus pumilla*), pois ao cultivar *in vitro* embriões zigóticos, constataram baixa taxa de formação de brotos (2,3 brotos por explante) quando foi utilizado 4  $\mu\text{M}$  de BAP.

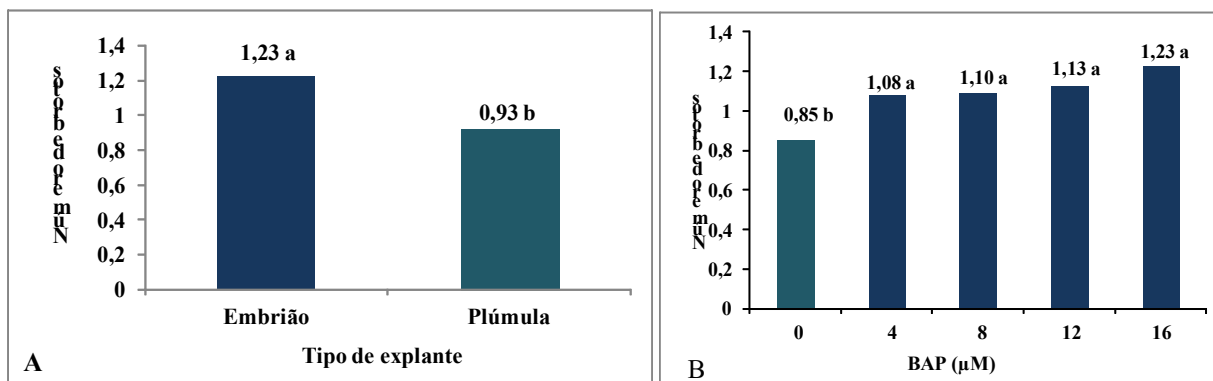


Figura 5–Número de brotos em função do tipo de explante (A) e das concentrações de BAP (B) em explantes de *E. velutina* aos 30 dias de inoculados em meio de cultura WPM (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

Para número de brotos em resposta às concentrações de BAP, foi verificado que o maior valor médio (1,23) foi constatado na presença de 16,0 $\mu\text{M}$  de BAP, que não diferiu das demais concentrações independente do explante utilizado (Figura 5B). Como não houve remoção dos ápices caulinares nos explantes embriões zigóticos e plúmula, o acréscimo de citocinina no meio de cultura provavelmente acumulou-se nos ápices produtores de auxina do explante, promovendo assim um balanço auxina/citocinina favorável ao crescimento vegetal, mantendo a dominância apical e impedindo o desenvolvimento das gemas laterais e adventícias em explantes de *E. velutina*.

Segundo GEORGE et al. (2008) a obtenção de múltiplos brotos pode ser iniciada a partir de semente, principalmente em espécies lenhosas como é o caso da espécie *E. velutina*, ocorrendo nódulos axilares ou brotações adventícias em meio basal acrescido de citocinina.

Provavelmente seriam necessários subcultivos em meio suplementado com concentrações mais baixas de citocininas para obtenção de brotações múltiplas, como reportado por HORBACH et al. (2012) em ápices caulinares de erva-mate obtidas a partir

de embriões zigóticos, pois foram necessários três subcultivos em meio suplementado com 0,044 $\mu$ M de BAP para a obtenção de brotações múltiplas.

Ao analisar o número de folhas, registrou-se a maior média (7,15) quando foi utilizado o embrião inteiro como explante, valor este que se mostrou significativamente superior aos obtidos para o explante plúmula (2,35) (Figura 6A).

No entanto, ao analisar o número de folhas em função das concentrações de BAP, constatou-se um comportamento linear decrescente à medida que se aumentou a concentração de BAP, sendo que a maior média observada (5,42) foi obtida na presença de 4,0 $\mu$ M de BAP (Figura 6B). Esse decréscimo no número de folhas pode ser um indicativo de fitotoxicidade do regulador de crescimento BAP (GRATTAPLAGIA e MACHADO, 1988).

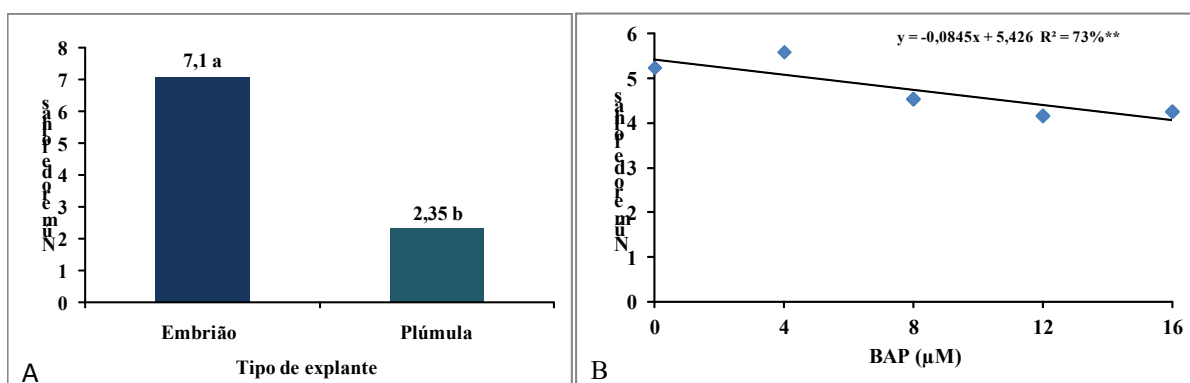


Figura 6- Número de folhas em função do tipo de explante (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey) (A) e das concentrações de BAP (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F) (B) em explantes de *E. velutina* aos 30 dias de inoculados em meio de cultura WPM. Feira de Santana, BA, 2012.

Para a variável comprimento da parte aérea, o modelo matemático mais representativo foi o quadrático descendente, no qual constatou-se uma redução no comprimento da mesma à medida que se aumentaram as concentrações de BAP, com utilização do explante embrião inteiro, sendo que a maior média (67,93mm) para essa variável, foi obtida na ausência de BAP (Figura 7A). O melhor crescimento das plantas em meio isento de regulador de crescimento vegetal está de acordo com BENMAHIOUL et al. (2009) que relataram melhor crescimento da parte aérea (26 e 25mm) de embriões isolados *Pistacia vera* L. promovidos em meios sólidos rico em nutrientes (DKW e MS) com ágar na concentração de 0,4%.

De acordo com COSTA e ALOUFA et al. (2007), muitas vezes o acréscimo de hormônios exógenos pode não ser benéfico devido aos teores indeterminados de hormônios endógenos do embrião.

Em relação ao explante plúmula não houve um modelo matemático representativo, entretanto, foi verificado que o comprimento das plantas não apresentou grande variação, cujo comprimento médio foi de 12,0mm, independente da concentração de regulador de crescimento vegetal utilizado (Figura 7A). Esses dados discordam dos verificados por AASIM et al. (2009) os quais constataram que a adição de reguladores de crescimento vegetal foi benéfico para promoção do crescimento em ápices plumular *Vigna unguiculata* L, verificando maior comprimento dos brotos (31,80mm) quando embriões zigóticos foram tratados com pulso de 44,4  $\mu\text{M}$  de BAP por 5 dias e inoculados posteriormente em meio de cultura acrescido de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA.

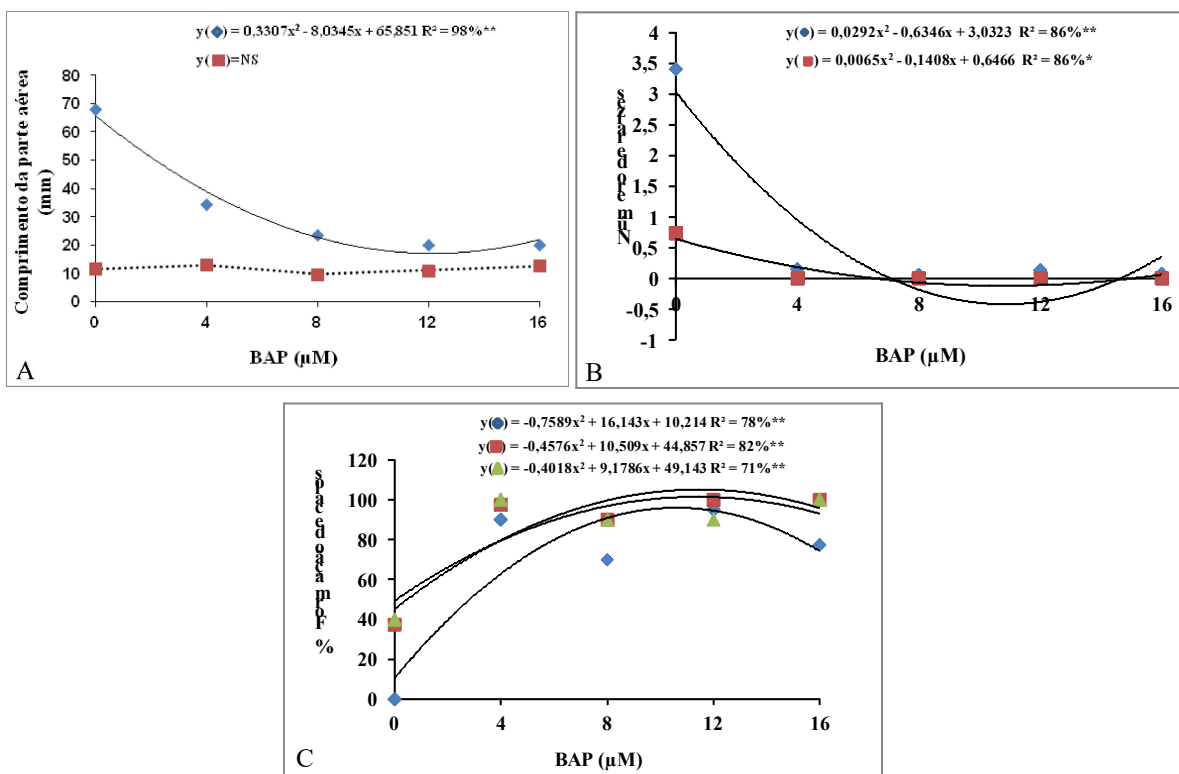


Figura 7– Comprimento da parte aérea (A) e números de raízes (B) obtidos de explante de embriões zigóticos inteiro (♦) e plúmula (■) em função dos níveis de BAP e (C) formação de calos em função de BAP e ANA (♦) 0,0; (■) 1,0; (▲) 2,0 ANA após 30 dias de inoculação em meio WPM (\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup> Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

Ao avaliar o número de raízes observou-se comportamento quadrático descendente em relação às concentrações de BAP quando se utilizou o explante embrião inteiro, sendo

perceptível decréscimo no número de raízes proporcional com o aumento das concentrações de BAP (Figura 7B).

Foi verificada a formação de calo na base dos explantes na presença de BAP, mesmo em concentrações baixas, o que provavelmente inibiu a formação de raízes (dados não mostrados). Comportamento semelhante foi reportado por COSTA e ALOUFA (2007) no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), no qual observaram que apenas as plântulas oriundas do meio de cultura isento de regulador de crescimento apresentaram raízes primárias normais. NOGUEIRA et al. (2004) observaram que embriões zigóticos de murici-pequeno cultivados em meio de cultura isento de BAP as plantas se desenvolviam normalmente e a adição deste no meio de cultura promoveu a formação de plantas com calos na base.

De acordo com GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), a formação de calo na base dos explantes em espécies lenhosas pode está associado a quantidades excessivas de auxinas e sacarose, comprometendo dessa forma o processo de rizogênese.

Nos explantes região intermediária e radícula foram observados a formação de calos, apresentando comportamento quadrático ascendente das concentrações de ANA em relação às de BAP. A curva de resposta indicou que na concentração 2,0 $\mu$ M de ANA e 10,63 $\mu$ M de BAP atinge-se o valor máximo estimado (96,06%) para formação de calo (Figura 7C). Os calos em todos os tratamentos apresentaram textura compacta (Figura 4D) e coloração branca (dados não mostrado), o que pode ser um indicativo de alta atividade auxínica (TERMIGNONI, 2005).

A formação de calo nos explantes região intermediária e radícula podem está associada ao balanço auxina/citocinina favorecendo a formação de calos, bem como, a sensibilidade do tecido explantado, pois tecidos embrionários tem maior facilidade em expressar a totipotência por serem tecidos jovens e ativos.

O efeito sinérgico da combinação de reguladores de crescimento vegetal potencializando a resposta do explante têm sido relatado em outras espécies, COUTO et al. (2006) verificou alta formação de calo (91%) no cultivo *in vitro* de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) utilizando 1,34 $\mu$ M de ANA combinado com 4,44 $\mu$ M de BAP e 5,37 $\mu$ M de ANA combinado com 8,88 $\mu$ M de BAP. A interação BAP e ANA também mostrou ser significativa na indução de calos utilizando segmentos foliares de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.), no qual se obteve 83,33 e 91,33% de formação de calos em explantes mantidos na combinação de 10,70 $\mu$ M ANA com 2,22 $\mu$ M e 4,44 $\mu$ M BAP respectivamente (LANDA et al., 2000).

### 3. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos para obtenção de plantas é vantajoso para sistema de micropropagação, uma vez que produz duas vezes mais gemas laterais e brotos uniformes do que sementes.

A melhor concentração para regeneração do explante plúmula (98,35%) foi na concentração de 4 $\mu$ M de BAP.

A maior média (1,23) para número de brotos registrou-se para o explante embrião zigótico inteiro.

A maior média para número de folhas foi observada (5,42) na presença de 4,0 $\mu$ M de BAP.

Na ausência de regulador de crescimento foi verificado a maior média (67,93mm) para comprimento da parte aérea.

A adição de regulador de crescimento favoreceu a formação de calos na base dos explantes, inibindo a formação de raízes.

As regiões intermediária e radícula possuem potencial morfogênico para formação de calos compactos quando utilizado a concentração de 10,63 $\mu$ M de BAP e 2,0 $\mu$ M de ANA, que podem ser fonte de estudo para obtenção de brotos via organogênese indireta.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AASIM, M.; KHAWAR, K.M.; OZCAN, S. In vitro micropropagation from plumular apices of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Akkiz. **Scientia Horticulturae**, v.122, p.468-471, 2009.
- AMÉRICO, W. J.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação in vitro do Porta-enxerto de almeixeira Julior. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.
- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: Simpósio de cultura de tecidos vegetais, 1., 1985, Brasília, DF. **Anais**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p. 25-28.
- BENMAHIOUL, B. et al. In vitro embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). **Scientia Horticulturae**, v.122, p.479-483, 2009.
- BEVILACQUA, C. B. et al. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula Superficial. **Ciência Rural**, v.41, n.5, p.761-766, 2012.
- COLLINS, G. B.; GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, v.1, p.241-57, 1984.
- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação in vitro de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, 2010, v.40, n.5, p. 1090-1096, junho, 2010.
- COSTA, N. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agrônômica**, v.38, n.3, p.276-279, 2007.
- COUTO, B.J.M.F. et al. Calogênese in vitro em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.
- DANTAS, A. C. M, et. al. Superação in vitro da dormência de embriões do porta-enxerto de macieira M9 (*Malus pumilla* Mill.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 010-014, 2002.
- FERREIRA, A.G.; HU, C.I. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH. 1998, 371-393.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FIOR, S. L. et. al. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1150-1153, 2012.

- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1. p.371-93.
- GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1998. p.183-260.
- HORBACH, M. A. et al. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p. 113-119, 2012.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008.p116-223.
- LANDA, F. S. L. et al. Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.
- LÉDO, A.S. et al. Germinação in vitro de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (Azadirachta indica A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.3, p.1-5, 2008.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of Rhododendron spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, p.415, 1980.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p.577
- NOGUEIRA, R. C. et al. Germinação in vitro de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. 3. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.
- SANTANA. J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento in vitro de Annona glabra L. I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32. n. 1. p.80-86, 2008.
- TAIZ, L & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p.849.
- TERMIGNONI, Regina Ramos. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

ZHANG, Y.X. & LESPINASSE, Y. Removal of embryonic dormancy in apple (*Malus domestica* Borkh) by 6-benzylaminopurine. **Scientia Horticulturae**, v.46, p.215-223, 1991.



## Capítulo 2

---

**Regeneração *in vitro* de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae).**

## RESUMO

*Erythrina velutina* é nativa do bioma caatinga região fortemente impactada pela exploração dos recursos naturais. Técnicas de propagação vegetativa *in vitro* têm possibilitado a produção de mudas em larga escala de espécies lenhosas com inúmeras vantagens em relação às técnicas de propagação tradicionais. O objetivo deste trabalho foi induzir brotos a partir de segmentos nodais de plantas germinadas de embriões zigóticos utilizando diferentes citocininas. Os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com as citocininas isoladas nas 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (CIN) nas concentrações (0,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu$ M), acrescido de 87,65mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Aos 30 dias da inoculação, foram analisadas as variáveis porcentagem de explantes responsivos, número de brotos, número de gemas, número de folhas, comprimento da parte aérea, porcentagem de formação de calo. Para número de brotos, verificou-se a maior média (2,35 por explante) quando foi utilizado 21,03 $\mu$ M de BAP. O BAP mostrou ser a melhor citocinina para indução de brotos em segmentos nodais de plantas oriundas de embriões zigóticos.

**Palavras-chave:** Mulungu, regeneração *in vitro*, reguladores de crescimento vegetal, organogênese direta.

## ABSTRACT

*Erythrina velutina* is native from caatinga biome region heavily impacted by exploitation of natural resources. Vegetative propagation *in vitro* techniques have enabled the production of large-scale plants of woody species with numerous advantages over traditional propagation techniques. The aim of this study was to induce buds on nodal segments of plants germinated through zygotic embryos using different cytokinins. The nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with cytokinins alone 6-benzylaminopurine (BAP) or kinetin (CIN) at concentrations (0,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu$ M) suplementend with 87.65mM sucrose and solidified with 0.7% agar. The statistical design was completely randomized. Cultures were maintained at a growth chamber at temperature of  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . After 30 days from inoculation, the variables analyzed were: responsive explants percentage, buds number, number of buds, number of leaves, aerial part length, percentage of callus formation at the base of the explant. For number of buds, the highest average (2.35 per explant) was when used 20 $\mu$ M BAP. The BAP proved to be the best cytokinin for induction of sprouts in nodal segments of plants from zygotic embryos.

**Keywords:** Mulungu, *in vitro* regeneration, plant growth regulators, direct organogenesis.

## 1. INTRODUÇÃO

*Erythrina velutina* é uma espécie nativa do bioma Caatinga conhecida popularmente como mulungu (LORENZI, 1992). A propagação desta espécie no ambiente natural tem sofrido reduções drásticas devido ao extrativismo não sustentável da madeira, das folhas e suas sementes, o qual é o principal meio de propagação desta espécie.

Alternativamente, a propagação *in vitro* de espécies lenhosas tem sido bem demonstrada em termos de excelente desempenho *in vitro*, manutenção de genótipos elites (GAO et al., 2009), além de resolver problemas associados com a oferta e a variabilidade na qualidade do produto (FRABETTI et al., 2009).

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos pode ser uma alternativa para aumentar a taxa de produção de brotos, reduzir significativamente os riscos de contaminação *in vitro* e oxidação fenólica frequentemente observada quando micropropagadas espécies lenhosas (BENMAHIOUL et al., 2009) como *Erythrina velutina*.

O sistema de micropropagação é um método de reprodução assexuada importante, que pode ser usado para a produção de plantas clonais, mas também forma a base para a introdução de variação genética por transformação genética ou mutagenese. Em ambos os casos, é necessário ser capaz de regenerar brotos viáveis, que possam ser propagados por organogênese ou embriogênese somática (PÉREZ-TORNERO et al., 2009).

A regeneração de brotos no cultivo *in vitro* é promovida pela utilização de reguladores de crescimento, no qual o balanço citocininas/auxinas deve ser favorável para as citocininas na indução de brotos. Estas são essenciais para indução e formação de órgãos e citocinese e também são responsáveis por promoverem alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos e aumento da longevidade de tecidos e órgãos (HOWELL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

O sucesso de uma cultura pode ser afetado pelo tipo e concentração de citocininas aplicadas, pois a sua absorção, transporte e metabolismo diferem entre as espécies, além de interagirem com citocininas endógenas do explante (STRNAD et al., 1997; WERBROUCK et al., 1996; VAN STADEN et al., 2008).

Dentre as citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilminopurina (BAP) é a citocinina sintética de menor custo em relação às demais fontes desta classe de reguladores de crescimento, sendo a mais ativa e mais utilizada na multiplicação de diversas espécies

(CID, 2000) com aproximadamente 60% dos meios de cultivo, seguida da cinetina (CIN), com cerca de 23% (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Entretanto, estas apresentam diferenças quanto ao potencial de indução dos brotos nos explantes (HU & WANG, 1983; KIELSE et al., 2009), geralmente o BAP induz à formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, enquanto que CIN têm permitido apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS et al., 1998).

Alem disso, o acréscimo de citocinina exógena ao meio nutritivo pode levar à formação de desordens fisiológicas como a vitrificação dos explantes e a redução no crescimento das brotações. A menor exigência de citocinina para determinados genótipos pode estar associada aos altos teores endógenos que, aliados à adição deste regulador de crescimento ao meio nutritivo, podem contribuir para um efeito decrescente na taxa de multiplicação (RADMAN et al., 2009).

Outros fatores que podem intervir na taxa de multiplicação são o genótipo, o tipo e orientação dos explantes que interfere na resposta morfogenética de forma a aumentar ou reduzir a absorção dos reguladores de crescimento e nutrientes (PAPAFOTION et al., 2009). O tipo de explante deve ser escolhido de acordo com a sua capacidade para se adequar às condições *in vitro*, sendo recomendados os que contenham maior proporção de tecido meristemático por apresentarem uma maior capacidade de expressar a totipotência (KIELSE et al., 2009).

A utilização de segmento nodal como explante é um método direto de regeneração de plantas, baseado na indução do crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas. Os segmentos nodais contendo as gemas são isolados e inoculados *in vitro*, sendo estas estimuladas ao crescimento, dando origem a brotos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Trabalhos de propagação *in vitro* já foram realizados com a espécie em estudo por COSTA et al. (2010), no entanto, foi verificado uma baixa taxa de multiplicação (2,68 por explante) quando utilizado 17,76 $\mu$ M de BAP, sendo necessário novos estudos para otimização do protocolo.

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de altas concentrações das citocininas BAP e CIN em segmentos nodais de plantas germinadas a partir de embriões zigótico.

## 2. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 Local de realização dos experimentos e desinfestação das sementes

Idem capítulo 1, item 2.1, pág. 15.

### 2.2 Multiplicação *in vitro*

Neste experimento foram utilizadas plantas provindas do cultivo do embrião zigótico maturo (Item 2.2) com 30 dias de idade. Segmento nodal (Figura 1) com 1cm de comprimento, foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio(25x150 mm) contendo 10ml de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN) nas concentrações (0,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40 $\mu$ M) solidificado com 0,7% de ágar (Himedia®).

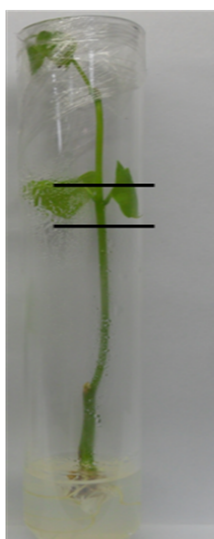


Figura 1– Esquema do seccionamento realizado para obtenção do explante segmento nodal utilizado na etapa de multiplicação *in vitro* oriundo de plantas germinadas de embriões zigóticos de *Erytrina velutina* inoculados em meio WPM após 30 dias de cultivo. Feira de Santana, BA, 2012.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 5 (tipos x concentrações de citocininas) totalizando 10 tratamentos, constituído de 5 repetições cada, sendo que cada repetição foi composta de 5 unidades experimentais. Aos 30 dias da inoculação os explantes foram avaliados, sendo observadas as seguintes variáveis: porcentagem de explante responsivos, número de brotos, número de gemas, número de folhas, comprimento da parte aérea, porcentagem de formação de calo.

### 2.3 Meio de cultura e Condições experimentais

Idem capítulo 1, Item 2.3, pág.15

### 2.4 Análise estatística

Idem capítulo 1, Item 2.6, pág.15

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da interação “tipo de citocininas x concentrações” para as variáveis porcentagem de explantes responsivos, número de brotos, número de gemas, número de folhas e porcentagem de formação de calo. Os fatores isolados tipo de citocinina e concentração foram altamente significativos ( $p < 0,01$ ) para variável comprimento da parte aérea (Tabela 1).

Tabela 1– Resumo da análise de variância para porcentagem de explante responsivos (%ER), número de brotos (NB), número de gemas (NG), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), porcentagem de calo (%C) em brotos de *Erythrina velutina* obtidas em diferentes concentrações de BAP e CIN em meio de cultura WPM. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados médios					
		%ER	NB	NG	NF	CPA	% CALO
Tipo de citocinina (T)	1	512,0**	3,49**	0,33 <sup>NS</sup>	2,43 <sup>NS</sup>	1272,60**	4,500 <sup>NS</sup>
Concentração (C)	4	4252,0**	1,48**	1,82**	52,81**	7947,90**	11727,50**
T x C	4	1852,0**	1,03**	1,16**	8,13 <sup>NS</sup>	90,00 <sup>NS</sup>	609,50**
Resíduo	40	140,0	0,14	0,19	4,04	86,37	141,50
CV		17,20	26,24	20,94	31,91	34,11	23,10

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A porcentagem de explante responsivos foi inversamente proporcional ao aumento das concentrações de BAP, representada pela equação linear decrescente. Na ausência de BAP foi observada a maior taxa de explantes responsivos (100%). Houve uma redução de 24% para porcentagem de explantes responsivos em relação a suplementação com regulador de crescimento vegetal, verificando-se que na concentração de 10 $\mu$ M de BAP, a porcentagem de explantes responsivos atingiu cerca de 76% (Figura 2A). Conjetura-se que o aumento da concentração de BAP promoveu um efeito fitotóxico diminuindo a capacidade de resposta do explante.

Em relação às concentrações CIN, para a variável porcentagem de explantes responsivos, a equação que melhor se ajustou ao modelo matemático foi a quadrática descendente (Figura 2A). Na ausência de CIN foi observada a maior taxa de explantes responsivos (100%), entretanto, na concentração de 40 $\mu$ M de CIN foi registrado aumento (80%) para porcentagem de explantes responsivos.

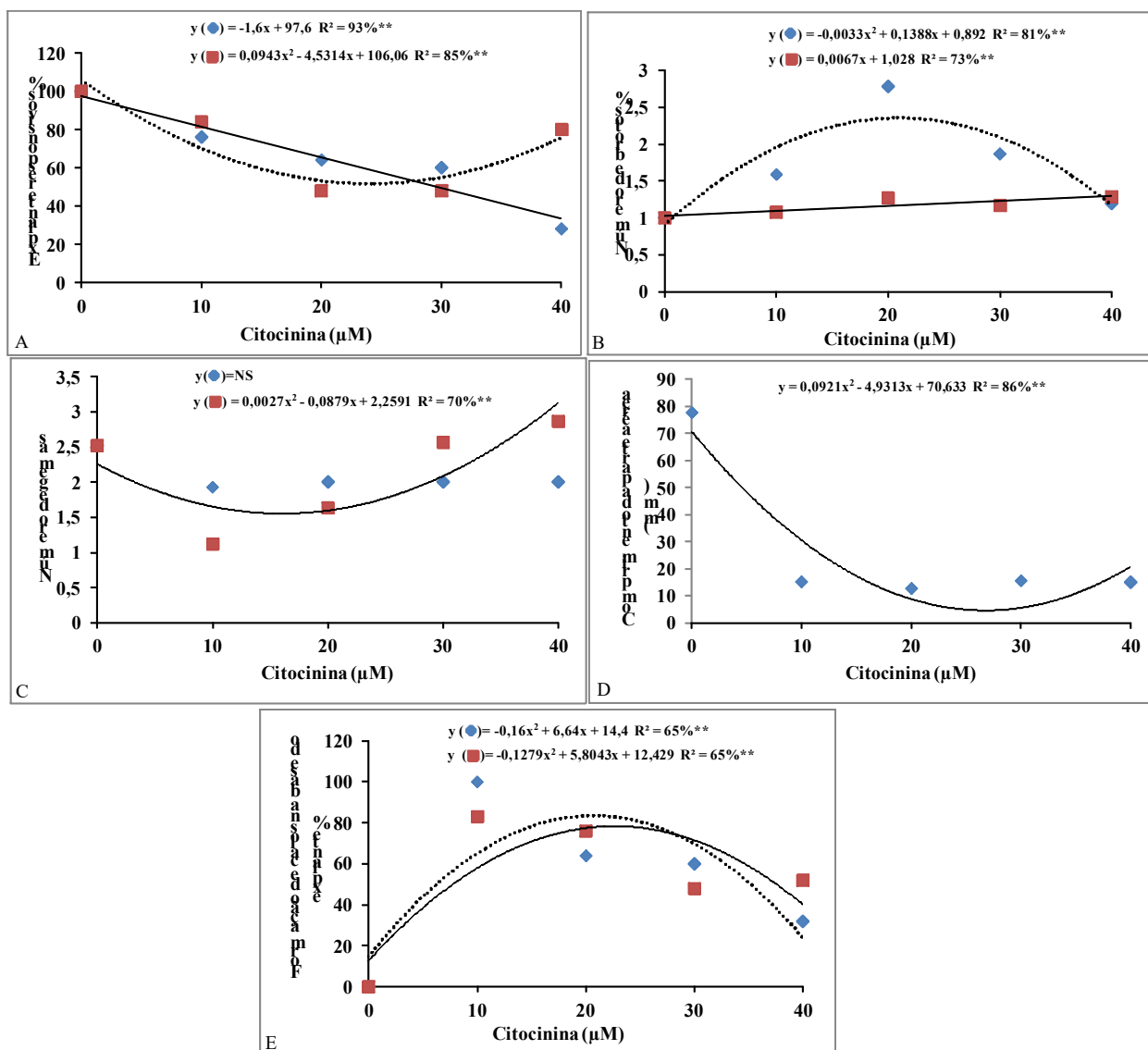


Figura 2—Porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos (A), número de brotos (B), número de gemas (C) em função das concentrações de BAP ( $\blacklozenge$ ) e CIN ( $\blacksquare$ ); Comprimento da parte aérea em função das concentrações de citocininas (D); Formação de calo na base do explante em função das concentrações de BAP ( $\blacklozenge$ ) e CIN ( $\blacksquare$ ) (E) em segmentos nodais de *E. velutina* após 30 dias de inoculação em meio WPM (\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

Pressupõe-se que os tipos de citocininas bem como, as concentrações utilizadas interagiram com o explante de forma que, obteve-se maior capacidade de resposta utilizando o regulador de crescimento vegetal CIN quando comparado com o regulador de crescimento vegetal BAP. A interação entre o tipo de explante e citocininas foi reportada por GUTIÉRREZ et al. (2012) em que o segmento nodal e internodal de *Bauhinia cheilantha* obtiveram 97,33% de explantes responsivos independente do tipo de citocinina utilizada na concentração  $8,88\mu\text{M}$  de BAP,  $9,08\mu\text{M}$  de CIN e  $9,30\mu\text{M}$  de TDZ.



A análise de regressão mostrou tendência quadrática ascendente das concentrações de BAP para variável número de brotos. O maior número de brotos (2,35) por explante foi estimado na concentração 21,03 $\mu$ M de BAP (Figura 2B).

Contudo, verifica-se que à medida que se aumenta a concentração de BAP há decréscimo para número de brotos. A adição de BAP ao meio de cultura foi favorável a indução de brotos até a concentração já supracitada, suficiente para promover o balanço citocinina/auxina necessário para a produção de brotos, visto que acima desses valores houve inibição para formação de brotos.

A média para número de brotos obtida neste experimento foi semelhante à reportada por COSTA et al. (2010) em segmentos nodais de plantas germinadas a partir de sementes da espécie em estudo *E. velutina*, no qual registrou-se um maior número de brotos (2,68) quando acrescido em meio WPM 17,76 $\mu$ M de BAP.

A utilização de altas concentrações de citocininas em *E. velutina* mostrou não ser favorável para o incremento da taxa de multiplicação, o que permite sugerir novos estudos abordando a modificação do meio de cultura para a otimização da taxa de multiplicação (Figura 3).

No cultivo de segmentos nodais de *Citrus limon* a otimização da taxa de multiplicação foi dependente das concentrações BAP e GA<sub>3</sub> e os melhores resultados (9 brotos) foram obtidos com 8,88 $\mu$ M de BAP e 0,58 $\mu$ M de GA<sub>3</sub> (PÉREZ-TORNERO et al., 2009). MHATRE et al. (2000) reportaram na propagação *in vitro* de cultivares de *Vitis vinifera* múltiplos brotos em meio de cultura MS acrescido de sulfato de adenina, fosfato de sódio monobásico, BAP e ANA. BALARAJU et al. (2008) induziram múltiplos brotos em segmentos nodais e apicais de *Vitex agnus-castus* quando combinado 8,88 $\mu$ M de BAP e 0,47 $\mu$ M de CIN.

No entanto, ao analisar o número de brotos em função das concentrações de CIN, constatou-se comportamento linear crescente à medida que se aumentou as concentrações de CIN, sendo que a maior média (1,29) foi obtida na presença de 40,0 $\mu$ M de CIN (Figura 2B). Pode-se inferir que a capacidade metabólica do tecido explantado para formação de brotos obteve melhor resposta quando aplicadas o regulador de crescimento vegetal BAP ao tecido vegetal. Isto provavelmente, ocorreu em consequência dessa citocinina ser mais ativa que a CIN (HU & WANG, 1983).

O aumento da taxa de multiplicação em segmentos nodais de *Chlorophytum borivilianum*, utilizando os reguladores de crescimento vegetal BAP e KIN foi promovido quando estes foram submetidos anteriormente a 2 ciclos com 5 $\mu$ M de BAP obtendo nas

concentrações de 12,5 de BAP e 5 $\mu$ M de CIN as maiores taxas (8,7 e 6,2) de multiplicação (KUMAR et al., 2010).

A definição do tipo e da concentração ótima de citocinina para a multiplicação constitui um passo importante, pois a taxa de multiplicação é controlada em grande parte pela interação entre genótipo e a citocinina (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

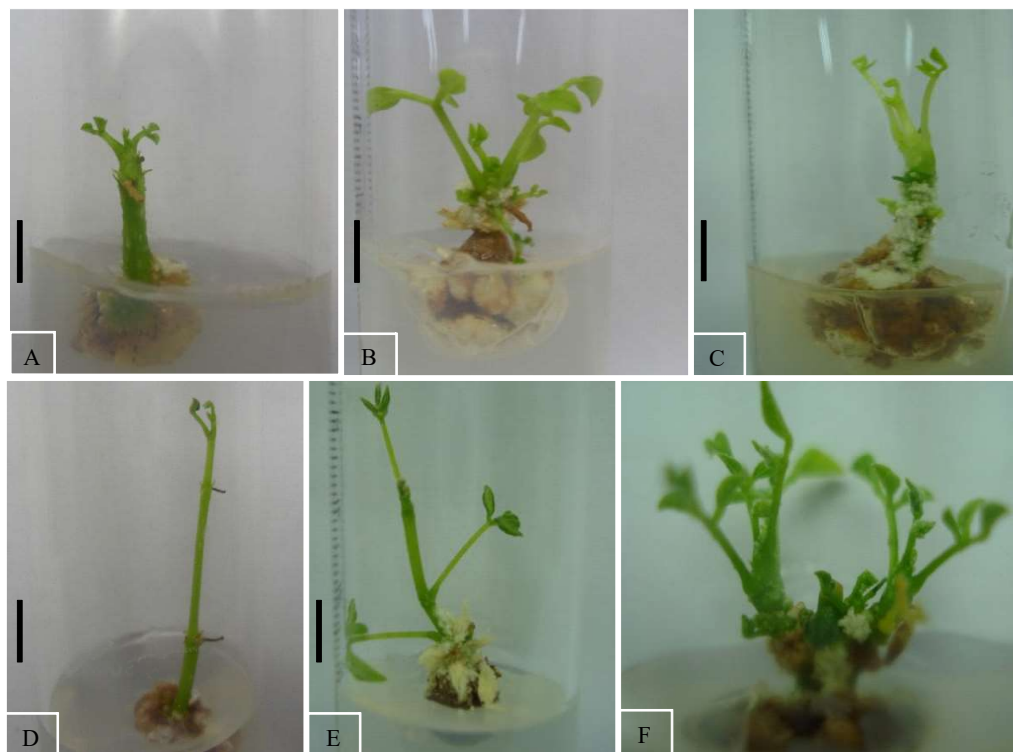


Figura 3— Brotos oriundos de segmento nodais de plantas germinadas a partir de embriões zigóticos cultivados em meio WPM acrescido com regulador de crescimento vegetal BAP nas concentrações de 10,0 (A), 20,0 (B) e 40,0 $\mu$ M (C); e regulador de crescimento vegetal CIN nas concentrações de 10,0 (D), 20,0 (E) e 40, 0 $\mu$ M (F); após 30 dias de cultivo. (Barra= 1 cm). Feira de Santana, BA, 2012.

Para variável número de gemas, não houve um modelo matemático representativo. Entretanto, o maior número de gemas foi observado na ausência de BAP (Figura 2C). Esse resultado é inferior ao observado em segmento nodal de *Bauhinia cheilantha* onde o maior número de gemas (4,85) foi favorecido em meio de cultura WPM quando o meio foi acrescido de 2,22 $\mu$ M de BAP (GUTIÉRREZ, 2010).

Para número de gemas em relação às concentrações de CIN, notou-se tendência quadrática descendente. Foi registrado um aumento para número de gemas por explante (2,87) na concentração de 40,0 $\mu$ M de CIN (Figura 2C). Esses resultados são inferiores aos verificados em segmentos nodais de *Hancornia speciosa*, os quais obtiveram maior número gemas (19,22) quando adicionado ao meio de cultura WPM, 8,88 $\mu$ M de BAP,

sendo os menores números (11,32; 10,22) verificados nas concentrações de 9,08 $\mu$ M de TDZ e 9,30 $\mu$ M de CIN, respectivamente (SOARES et al., 2012).

Foi registrado para variável número de folha em função das concentrações de citocininas a maior média (9,72 folhas por explante) na ausência de citocinina (Figura 3A). Esse resultado é inferior ao obtido por COSTA et al. (2010) no cultivo de segmentos nodais de plantas germinadas a partir de sementes da espécie em estudo *E.velutina*, que relataram maior número de folhas (9,4) quando acrescido em meio WPM 17,76  $\mu$ M de BAP e 1,34 $\mu$ M de ANA.

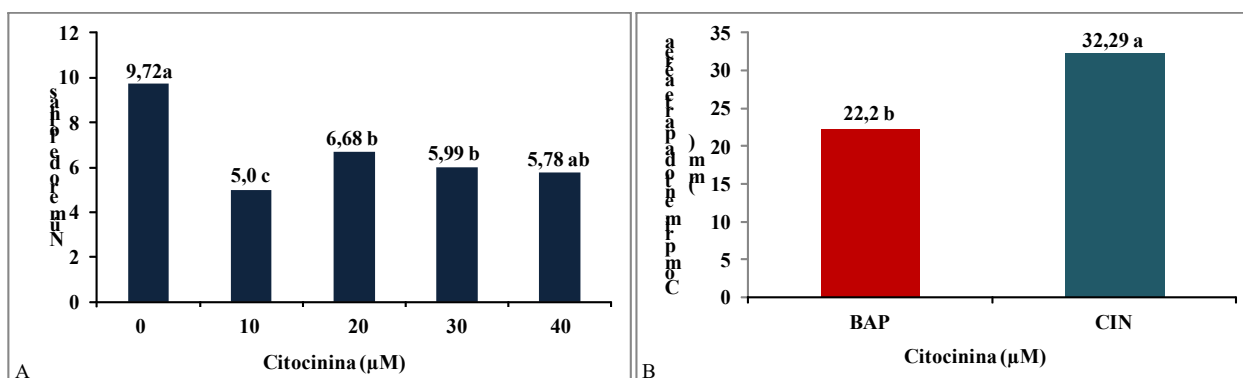


Figura 3– Número de folhas em função das concentrações de citocininas (A) e comprimento da parte aérea em função do tipo de citocinina (B) obtidos de explante de segmentos nodais *E.velutina* após 30 dias de inoculação em meio WPM (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

Em relação ao comprimento da parte aérea, notou-se que os maiores brotos (32,29mm) foram obtidos na presença de CIN (Figura 3B). Esses resultados divergem dos verificados em segmentos nodais de *Hancornia speciosa*, em que obtiveram maior comprimento da parte aérea (45,5mm) quando adicionado ao meio de cultura WPM o regulador de crescimento vegetal BAP, seguido de CIN (34,6mm) e TDZ (31,3mm) (SOARES et al., 2011).

Segundo GEORGE et al. (2008) o crescimento e a proliferação de brotos axilares em culturas é promovido pela incorporação de reguladores de crescimento, normalmente citocininas nos meios de cultura. Contudo é necessário que se adicione ao meio a dose adequada, sendo esta específica para cada espécie (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Observou-se tendência quadrática descendente para comprimento da parte aérea em função às concentrações de citocininas (Figura 2D). O maior comprimento da parte aérea foi registrado na ausência de citocinina.

O acréscimo de citocininas no meio de cultura reduziu o crescimento dos brotos em *E.velutina* (Figura 4). KUMAR et al. (2010), verificaram que o aumento das concentrações das citocininas BAP e CIN promoveram o decréscimo para comprimento dos brotos de segmentos nodais de *Chlorophytum borivillianum* inoculados em meio BM, sendo o maior comprimento da parte aérea (48,0; 43,0mm) registrado na ausência dos reguladores de crescimento vegetal. KIELSE et al.(2009) reportaram que, na regeneração de *Parapiptadenia rigida*, utilizando como fonte de explante segmento nodal e internodal, valores acima de 2,22 $\mu$ M de BAP e 2,33 $\mu$ M de CIN acrescidos ao meio de cultura WPM proporcionaram decréscimo no comprimento dos brotos.

Um alto suprimento exógeno de citocininas aumenta a atividade da enzima citocinina oxidase o que tende a desfavorecer a indução de brotações no explante, e com isso a citocinina deixaria de promover a divisão celular (CID, 2000; GEORGE 2008).

Ao analisar a variável porcentagem de formação de calos na base do explante notou-se comportamento quadrático ascendente em função das concentrações do regulador de crescimento vegetal BAP (Figura 2E).

A maior porcentagem de formação de calos (83,29%) foi observada na concentração de 20,75 $\mu$ M de BAP. Esse resultado é corroborado por COSTA (2010) no cultivo de segmentos nodais de plantas germinadas a partir de sementes da espécie *E.velutina*, pois observaram que a formação de calo na base do explante foi diretamente proporcional à adição de BAP, sendo o tamanho do calo influenciado pelas altas concentrações de BAP e ANA utilizadas. A formação de calos na base do explante também foi relatada no cultivo de segmento nodal de *Caesalpinia echinata* Lam, quando adicionado 4,5 $\mu$ M de BAP verificaram porcentagem de 29,67% para formação de calos (ARAGÃO et al., 2011).

Ao analisar porcentagem de formação de calos na base do explante em função das concentrações de CIN, notou-se comportamento quadrático ascendente (Figura 2E). A maior porcentagem de formação de calos (78,28%) foi observada na concentração de 22,69 $\mu$ M de CIN.

A adição de citocininas mesmo em altas concentrações ao meio, provavelmente pode está favorecendo balanços hormonais intermediários estimulando a divisão e expansão celular formando calos (TAIZ e ZEIGER, 2009) e dessa forma inibindo a indução de brotos.

A formação de calo na base do explante aqui reportado tem sido relatada também por outros autores como um dos muitos fatores que interferem negativamente na taxa de

multiplicação de espécies lenhosas, por exemplo, em *Cordia trichotoma* (MANTOVANI et al., 2001), *Acacia mearnsii* (BORGES JUNIOR et al., 2006), *Peltophorum dubium* (BASSAN et al., 2006) e *Bauhinia cheilantha* (GUTIÉRREZ, 2010), visto que a formação de calos impede a absorção dos nutrientes e conseqüentemente o crescimento, bem como, o enraizamento fator importante para fase de aclimatização dos brotos.

De acordo com GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), a formação de calo na base dos explantes em espécies lenhosas pode está associado a quantidades excessivas de auxinas e sacarose, comprometendo dessa forma o processo de rizogênese, fato que provavelmente inibiu a formação de raízes neste experimento quando utilizado os reguladores de crescimento BAP e CIN, uma vez que não foi visualizada a formação de raízes nas concentrações testadas (dados não mostrados).

|

#### 4. CONCLUSÃO

Na ausência de BAP e CIN foi observada a maior taxa (100%) de explantes responsivos.

Foi verificada uma baixa taxa de multiplicação, entretanto, a melhor concentração para o maior número de brotos (2,35) foi 21,03 $\mu$ M de BAP.

O maior número de gemas (2,87) foi registrado na concentração de 40,0 $\mu$ M de CIN.

Para número de folhas e comprimento da parte aérea foi registrado as maiores médias na ausência de citocinina.

A maior porcentagem de formação de calos (83,29%; 78,28%) foi observada na concentração de 20,75 $\mu$ M de BAP e 22,69 $\mu$ M de CIN, respectivamente.

## 5. REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. *Cerne*, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.
- BALARAJU, K. et al. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)—a valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, v. 44, p. 436-441, 2008.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafistula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). *Ciência Florestal*, v. 16, n. 4, p. 381-390 381, 2006.
- BENMAHIOUL, B et al. In vitro embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae*, v.122, p.479-483, 2009.
- BORGES JUNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação in vitro de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). *Revista Árvore*, v.28, n.4, p.493-497, 2004.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.87-132.
- CID, Luiz Pedro Barreto. Auxinas. In: CID, L. P. B. (Ed.) **Introdução aos Hormônios Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.
- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação in vitro de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, v.40, n.5, p. 1090-1096, 2010.
- FRABETTI, M. et al. Micropropagation of *Teucrium fruticans* L., an ornamental and medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, v.45, p.129-134, 2009.
- GAO, X. et al. In Vitro Micropropagation of *Freesia hybrida* and the Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Regenerated Plantlets. *Journal Plant Growth Regulation*, v.29 n.3 p.257-267, 2009.
- GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1998. p.183-260.
- GUTIERREZ, I. E. M. et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v.41, n.2, p. 260-265, 2011.
- HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v.8, p.453-459, 2003.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and cultures. In: EVANS, D.A. et al. (Ed). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983, v.1, p.177-227.
- KIELSE, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1098-1104, 2009.
- KUMAR, A. et al. Factors affecting *in vitro* propagation and field establishment of *Chlorophytum borivillianum*. **Biologia Plantarum**, v.54, n.4, p.601-606, 2010.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v.15, p.415, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Nova Odessa: Ed. Plantarum. 1992.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louropardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.
- MHATRE, M.; SALUNKHE, C. K.; RAO, P. S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Scientia Horticulturae**, v.84, p.357-363, 2000.
- OLIVEIRA, L.M. et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, p.25-30, 2007.
- PAPAFOTIOU, M; MARTINI, A.N. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). **Scientia Horticulturae**, v.120, n1, p.115-120, 2009.
- PÉREZ-TORNERO, O; TALLÓN, C. I; PORRAS, I. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.100, n.3, p.263-271, 2010.
- RADMANN, E. B. et al. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1'(Prunus persica L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.3, p. 656-663, 2009.



SOARES, F. P. et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e agrotecnologia**, v.35, n.1, p. 152-157, 2012.

STRNAD M. et al. A highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis* Moench., cv. Robusta). **Phytochem**, v. 45, p.213-218, 1997.

TAIZ, L & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 849.

VAN STADEN J.; ZAZIMALOVA E.; GEORGE E. F. (2008). Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George ef, hall ma, de klerk gj (eds) **Plant propagation by tissue culture**, 3rd edn. Springer, Dordrecht, p. 205-226.

WERBROUCK, S. P. O. et al. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? **Physiol Plant**, v.98, p.291–297, 1996.

### Capítulo 3

---

**Caracterização morfo-anatômica e bioquímica de calos induzidos a partir de embriões zigóticos de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae).**

## RESUMO

*Erythrina velutina* é uma espécie pertencente à família Leguminosae, nativa do bioma Caatinga e de grande interesse econômica para região semiárida. A regeneração das plantas *in vitro*, diretamente do explante ou através do cultivo de calos, pode ser uma alternativa para obtenção de multibrotações. Objetivou-se a indução de calos em diferentes tipos de explante a partir de embriões zigóticos maduros, submetidas a diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético. No primeiro experimento, embriões zigóticos inteiro e segmentado em: plúmula, região intermediária e radícula foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com regulador vegetal 2,4-D nas concentrações (0,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 $\mu$ M), acrescido de 229,62 $\mu$ M de argenina, 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,6% de Agar. As culturas foram mantidas na condição de escuro. Após 27 dias foram avaliadas as variáveis: porcentagem de calo e de calos friáveis, área do explante recoberta por calo, porcentagem de oxidação e matéria seca do calo. Analisou-se nos calos o crescimento cinético, aspectos anatômicos e quantificou-se os açúcares redutores e açúcares solúveis totais. No segundo experimento, segmentos de folhas e epicótilo foram inoculados em meio de cultura seguindo a metodologia anterior, acrescido de 11,75 $\mu$ M de 2,4-D. Após 27 dias foram avaliadas as variáveis: porcentagem de calo, calos friáveis, área do explante recoberta por calo, porcentagem de oxidação e matéria seca do calo. Verificou-se que embriões zigóticos inteiros foi a melhor fonte de explante para indução de calos friáveis na concentração de 11,31 $\mu$ M de 2,4-D que devem ser transferidos para meio de subcultivo no período entre o 15<sup>o</sup> até o 21<sup>o</sup> dia de cultivo. A análise bioquímica revelou redução dos açúcares redutores e açúcares solúveis totais e a anatomia dos calos células em divisão e reservas de amiloplastos. Segmentos foliares obtiveram melhor resposta para porcentagem de calos em relação ao explante epicótilo.

**Palavras-chave:** Mulungu, auxina, diferenciação, calogênese.

## ABSTRACT

*Erythrina velutina* is a species of the Leguminosae family, native to Caatinga biome and have great interest to economic semiarid region. The *in vitro* plants regeneration directly from explants or via callus culture can be an alternative to obtaining butts multiple. The aim was to induct the callus in different types of explants from mature zygotic embryos, exposed to different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. In the first experiment, zygotic embryos and segmented embryos: plumule, radicle and middle region, were inoculated on MS medium supplemented with plant growth regulator 2,4-D on concentrations (0.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 $\mu$ M) supplemented with 229,62 $\mu$ M of Arginine, 87.64mM sucrose and solidified with 0.6% agar. The cultures were kept in the dark condition. After 27 days following variables were evaluated: callus percentage and friable callus, explant area covered by callus, percentage of dry matter and oxidation of the callus. We analyzed the callus growth kinetics, anatomy and quantified the reducing sugars and total soluble sugars. In the second experiment, leaves and epicotyl segments were inoculated into culture medium following the previous methodology, supplemented with 11.75 $\mu$ M 2,4-D. After 27 days following variables were evaluated: percentage callus, friable callus, explant area covered by callus, matter percentage dry and callus oxidation. It was found that whole zygotic embryos were the best source of explants for induction of friable calluse concentration of 11.31 $\mu$ M 2,4-D and the callus must be transferred to a medium of subculture in the period between the 15th to 21st day of cultivation. Biochemical analysis revealed decreased of reducing sugars and total soluble sugars. The anatomy of the callus showed dividing cells and amyloplasts reserves. Leaves section on the showed better results to percentage of calluses relative to the explant epicotyl.

**Keywords:** Mulungu, auxin, dedifferentiation, callus formation.

## 1. INTRODUÇÃO

*Erithryna velutina* é uma espécie lenhosa, pertencente à família das leguminosas, nativa da região semiárida e que apresenta dificuldade de propagação natural, pois as sementes possuem dormência tegumentar. É uma espécie que tem grande potencialidade econômica para região no setor artesanal, madeireiro, tintorial e, sobretudo medicinal (LORENZI & MATOS, 2008; CARVALHO, 2008). Estudos fotoquímicos já comprovaram a presença de compostos como flavonóides, isoflavanóides (CUNHA et al., 1996), alcalóides eryitrinano, erythodine N-óxido (OZAWA et al., 2008). A espécie em estudo também tem atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (VIRTUOSO et al., 2005), bem como ação anticolinesterásica (ESTEVAM et al., 2007), efeito sedativo, bloqueador neuromuscular (DANTAS et al., 2004) e relaxante (SANTOS et al., 2007), evidenciando grande potencial farmacológico.

Diante da sua importância econômica e da carência de estudos sobre o comportamento fisiológico da espécie em estudo, torna-se necessário a elucidação de mecanismos que auxiliem na propagação de *E.velutina* garantindo a preservação da espécie, uma vez que o extrativismo indiscriminado da espécie representa ameaça de extinção.

Nesse contexto, a aplicação de técnicas biotecnológicas, principalmente a micropropagação, que tem contribuído na compreensão de aspecto inerente a fisiologia das espécies, assim como, para a produção de mudas em escala comercial, sobretudo, em plantas lenhosas como *E. velutina*. Evidenciado resultados satisfatórios para produção em larga escala de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, em um tempo relativamente curto, o que a torna mais eficiente em relação aos sistemas de propagação tradicionais (DOBRÁNSZKI e SILVA, 2010).

Contudo, espécies lenhosas como *E.velutina* comumente apresentam problemas ao serem micropropagadas, demonstrando reduzida taxa de multiplicação (COSTA et al., 2010), geralmente associada a elevadas taxas de oxidação que podem inibir ou causar a morte dos explantes, como foi reportado no cultivo de plantas de macieira *Malus domestica* Borkh. cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala (ERIG e SCHUCH, 2003) e *Lippia sidoides* (COSTA et al., 2007).

Outro fator que interfere na taxa de multiplicação, sendo um dos problemas que limitam a obtenção de múltiplos brotos no cultivo da espécie em estudo *E.velutina*, se dá pela formação de calos na base do explante, o que impede a absorção dos nutrientes e

conseqüentemente o desenvolvimento dos brotos, como também foi relatado em outras espécies lenhosas, *Cordia trichotoma* (MANTOVANI et al., 2001); *Acacia mearnsii* (BORGES JUNIOR et al., 2006); *Peltophorum dubium* (BASSAN et al., 2006).

Diante do exposto, a propagação de espécies por meio da indução de calos permite que o estabelecimento de massas calogênicas seja mais efetivo na obtenção de brotações múltiplas, desvendando aspectos do crescimento e desenvolvimento dos explantes (SANTOS et al., 2010). Estes são provenientes de células originadas por sucessivas mitoses, sendo caracterizados por um arranjo de células em resposta a estímulos do balanço entre reguladores de crescimento (auxinas/citocininas) e outros fatores do meio de cultura e ambiente (TERMIGNONI, 2005).

Em geral, para obtenção de massas calogênicas as auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um dos mais empregados nos processos de desdiferenciação celular, considerado como um potente sinalizador no processo de rediferenciação (GUERRA et al., 1999).

No entanto, a expressão da totipotência no estabelecimento de massas calogênicas, além de ser delimitada pelo uso de reguladores de crescimento, é influenciada por diversos outros fatores, dentre eles, composição do meio nutritivo, condições físicas de incubação, como luz ou temperatura e tipo de explante (PINTO e LAMEIRA, 2001). Porém, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Uma alternativa quem vêm sendo empregado com sucesso como fonte de explante na obtenção de massas calogênicas e posterior embriogênese somática é o cultivo de embriões zigóticos. Diversos autores têm reportado a obtenção de calos com potencial embriogênico a partir de embriões zigóticos por apresentarem tecidos jovens de elevada capacidade para expressar a totipotência: *Coffea arabica* (ANDRADE et al., 2001); *Pinus radiata* (LIN & LEUNG, 2002); *Arachis hypogaea* (CHENGALRAYAN et al., 2001); *Anacardium occidentale* (GOGATE & NADGAUDA et al., 2002); *Passiflora edulis* Sims (PINTO et al., 2012).

Entretanto, é necessário ter conhecimento a cerca do desenvolvimento dos calos com o intuito de otimizar as técnicas de cultivo e multiplicação, uma vez que estes podem ser empregados para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, assim como, para obtenção de suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000).

Dessa forma, o conhecimento sobre o crescimento cinético e bioquímico dos calos podem auxiliar nos processos de estabelecimento *in vitro* e propiciar a otimização das condições de cultivo de espécies, como já foi descrito por diversos autores (SERRA et al., 2000; MESQUITA et al., 2002; AZEVEDO, 2003; LIMA et al., 2007).

O estudo das fases dos processos fundamentais do crescimento cinético é essencial para saber o momento exato de transferência do calo para um novo meio de subcultivo, bem como, para ser utilizado no estabelecimento de suspensões de células (AZEVEDO, 2003) visando estudos fitoquímicos ou à obtenção de brotações.

Logo, as análises bioquímicas também são importantes para compreensão das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento e o desenvolvimento de calos permitindo a identificação de metabolitos secundários (LIMA et al., 2007), assim como, a elucidação de processos morfogenéticos e identificação de substâncias presentes durante este processo.

Nesse contexto, os processos morfogenéticos podem ser melhor compreendidos com o auxílio do conhecimento da anatomia vegetal, pois a identificação dos aspectos estruturais é importante para o sucesso da propagação, a qual depende da regeneração de tecidos vegetais (SILVA et al., 2005).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo obter calos a partir de embriões zigóticos de *E. velutina* e caracterizar anatomica e bioquimicamente.

## 2. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 Local de realização dos experimentos e desinfestação das sementes

Idem capítulo 1, Item 2.1, pág.15

### 2.2 Cultivo do embrião zigótico

Idem capítulo 1, Item 2.2, pág.15

### 2.3 Efeito do ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) na indução de calos em embriões zigóticos intactos e seccionados de sementes de *E.velutina*.

Os embriões zigóticos (item 2.2) foram utilizados intactos e seccionados em: plúmula, região intermediária e radícula (Figura 1) inoculados em frascos (119 x 70mm), contendo 60 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 87,65mM de sacarose, solidificado com 0,6% de Agar (Himedia®) e suplementado com 2,4-D nas concentrações 0,0; 4,0; 8,0; 12,0;16,0 $\mu$ M, sendo adicionado ao meio 229,62 $\mu$ M de argenina.

Após 27 dias foram avaliadas as variáveis: porcentagem de calo (%C) e de calos friáveis (%CF), área do explante recoberta por calo (ARC) de acordo com seguinte escala: 0 = ausência de calo, 1 = 0,5 > 1 cm calo pequeno, 2= 1 > 2 cm médio e 3 = 2 >3 cm calo de tamanho grande, porcentagem de oxidação (% OX) segundo a escala: 0= ausência de oxidação, 1= pouca, 2= parcialmente e 3= totalmente oxidado e matéria seca do calo (MSC).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 5 x 4 (concentrações de auxina x tipo de explante ) totalizando 20 tratamentos, constituído de 10 repetições cada, sendo que cada repetição foi composta de 2 unidades experimentais de cada tipo de explante.

### 2.4 Efeito do ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) na indução de calos em segmentos foliares e epicótilo de *E.velutina*.

Segmentos de folhas e epicótilo foram inoculados em meio de cultura MS seguindo a metodologia anterior, acrescido apenas de 11,75 $\mu$ M do regulador de crescimento vegetal 2,4-D e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado constituído de 6 repetições cada, sendo que cada repetição foi composta de 5 unidades experimentais.

### 2.5 Condições experimentais

As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica e os recipientes fechados com filme de PVC. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  sob escuro contínuo.



## 2.6 Curva de crescimento e análise bioquímica dos calos

Foi utilizada a metodologia do item 2.3, no entanto, os embriões zigóticos inteiros foram inoculados em meio de cultura suplementado com 11,75 $\mu$ M da auxina 2,4-D.

### 2.6.2 Curva de crescimento: delineamento experimental e variáveis analisadas

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, constituído de 5 repetições, sendo que cada repetição foi composta de 2 unidades experimentais, avaliando-se a matéria seca dos calos. Para a determinação da curva de crescimento dos calos foram realizadas determinações do peso seco do material inoculado a partir do dia da inoculação (tempo 0) até o 27º dia de cultivo, com intervalos de coleta a cada 3 dias.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo Lameira (1997) por meio da equação:  $Pf - Pi / Pf \times 100$ , onde: Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos.

### 2.7 Análise bioquímica: delineamento experimental e variáveis analisadas

Para quantificação bioquímica, os extratos foram obtidos conforme metodologia descrito por Nogueira et al., (2007). Para determinação dos açúcares redutores (AR) e açúcares solúveis totais (AST), a cada 6 dias de cultivo foram retiradas amostras de calos baseado na curva de crescimento. Os calos frescos foram inicialmente macerados e pesados 3g. Em seguida foram colocados em tubo de centrífuga e adicionados 12 mL de água destilada. Estes foram levados em banho-maria na temperatura de 40°C por 30 minutos e logo após, centrifugados a 4800g por 30 minutos a 25°C. O sobrenadante foi recolhido para posterior análise.

A quantificação dos AST foi realizada por refratometria; do AR pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando solução de glicose como padrão. A leitura da absorbância (Abs) foi realizada em espectrofotômetro Uv-Vis a 540 nm para AR. As análises foram feitas em triplicata, tanto para a curva quanto para as amostras. O equipamento foi zerado com o branco (0,5 mL de água no lugar da amostra) sendo a quantificação baseada em curva padrão para glicose.

### 2.8 Anatomia dos calos

O material fresco foi colocado em placas de vidro (vidro relógio, 5cm) com os reagentes prévios de caracterização anatômica, lugol 1% e Azul de Astra 1% por um período de 10 minutos. Logo após, foram selecionados com auxílio de um pincel nº 2 e transferidos para uma lâmina contendo uma gota de glicerina e recoberta com lamínula. As lâminas preparadas foram observadas em Microscópio Olympus Optical BX 40.

### 2.9 Análise estatística

Idem capítulo 1, Item 2.6, pág.15

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito do ácido 2,4-diclorofenóxiacético na indução de calos em embriões zigóticos intactos e seccionados de sementes de *E. velutina*.

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da interação “concentração de 2,4-D x tipo de explante” para a variável matéria seca do calo e efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a variável porcentagem de calos friáveis. Observou-se também efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) dos fatores isolados concentração de 2,4-D para as variáveis: porcentagem de calo, área do explante recoberta por calo, porcentagem de oxidação e do fator tipo de explante para a variável área do explante recoberta por calo (Tabela 1).

Tabela 1– Resumo da análise de variância para porcentagem de calo (%C), calos friáveis (%CF), área do explante recoberta por calo (% AEC), matéria seca do calo (MSC), porcentagem de oxidação (% OX) e matéria seca do calo (MSC) obtidas a partir de diferentes explantes combinadas com diferentes concentrações de 2,4-D em meio de cultura MS. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados médios				
		%C	%CF	AEC	OX	MSC
Concentração (C)	4	24107,55**	22395,63**	6761,22**	729,88**	750,09**
Explante (E)	3	386,00 <sup>NS</sup>	947,81**	1203,66**	154,3 <sup>NS</sup>	581,71**
C x E	12	357,08 <sup>NS</sup>	518,13**	191,54 <sup>NS</sup>	132,88 <sup>NS</sup>	67,68**
Resíduo	60	209,80	205,31	113,58	68,73	25,86
CV (%)		21,62	22,45	30,10	84,02	43,71

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Foi observado a partir do décimo segundo dia, formação de calos nos explantes de embriões zigóticos inteiro e nos segmentos intermediário, radícula e plúmula. Ao analisar a variável porcentagem de calos, observou-se comportamento quadrático ascendente em relação às concentrações de 2,4-D, com ponto máximo para indução de calo (100%) estimado em meio de cultura suplementado com  $9,73\mu\text{M}$  de 2,4-D, independente do tipo de explante (Figura 1A). Não foi registrado presença de calos na ausência de regulador de crescimento.

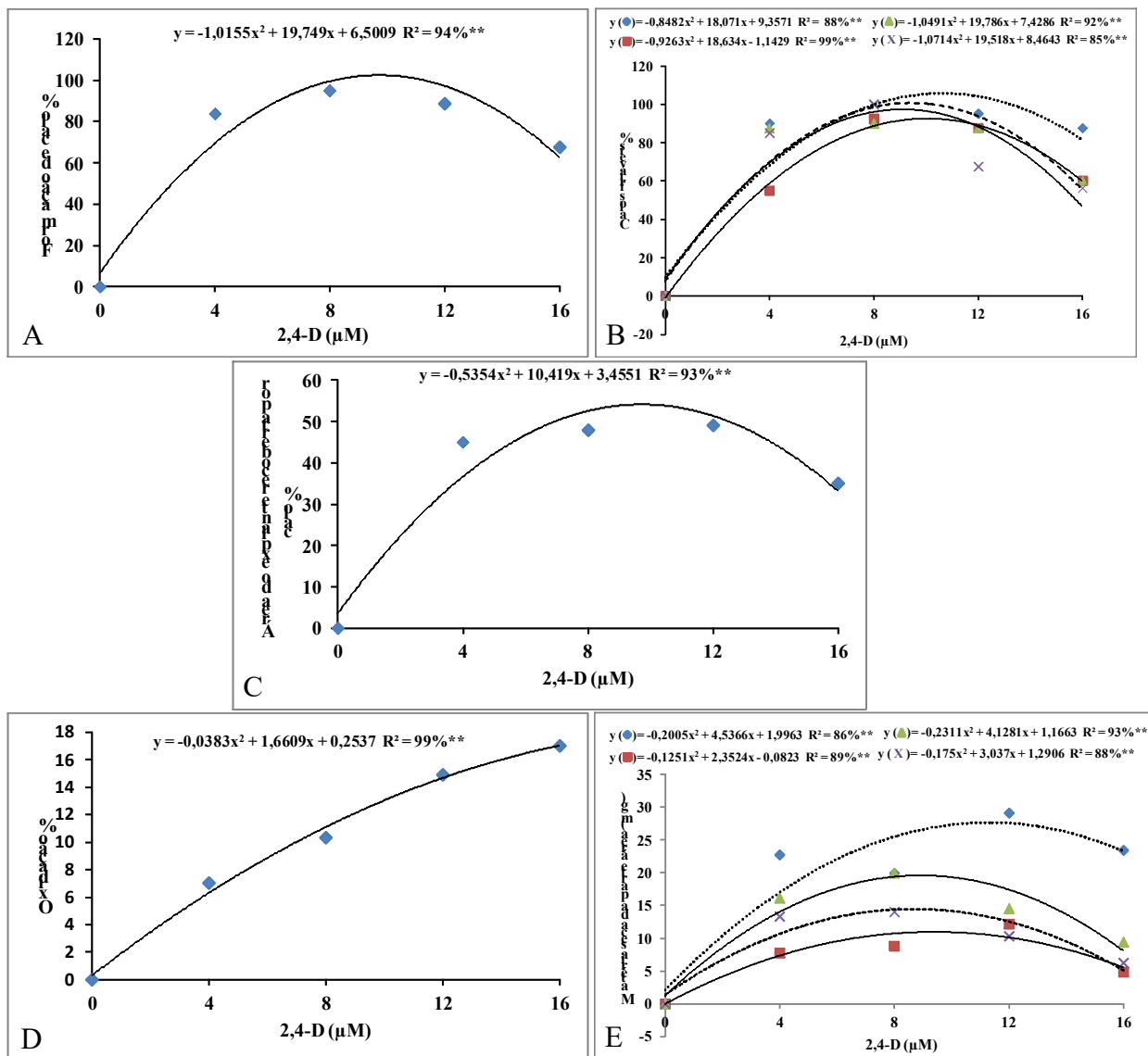


Figura 1– Porcentagem de formação de calos em função das concentrações de 2,4-D (A); Calos friáveis em função das concentrações de 2,4-D e tipos de explantes embrião inteiro (♦) plúmula (■) região intermediária (▲) e radícula (X) (B); área do explante recoberta por calo em função das concentrações de 2,4-D (C); Porcentagem de oxidação dos explantes em função das concentrações de 2,4-D (D) e matéria seca de calos em função da interação concentração de 2,4-D e tipos de explantes embrião (♦) plúmula (■) R. intermediária(▲) e radícula (X) (E) de *Erythrina velutina* após 27 dias de inoculação em meio MS (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

Este resultado permite inferir que ao suplementar o meio de cultura com regulador de crescimento vegetal 2,4-D, esse promoveu a formação de calos nos explantes de tecidos embrionários, em razão da ação potente que as auxinas exercem, atuando como sinalizador para o início das divisões celulares e rediferenciação celular (GUERRA et al., 1999). A atuação da auxina 2,4-D no processo de desdiferenciação e rediferenciação tem sido reportada com sucesso. THOMAS e MASEENA (2006) no cultivo de *Halicacabum*

*cardiospermum* L., obtiveram alta taxa de explante responsivos (96 e 99%) para formação de calos em segmentos nodal e de folha quando o meio foi suplementado 5 $\mu$ M de 2,4-D. YIN GUI-XIANG et al. (2012) estudando a família das gramíneas no cultivo de embriões maduros de linhagens de trigo testou diferentes meios de cultura para indução de calos em segmentos de embrião sendo o melhor meio (SD2) o qual foi adicionado 9,06 $\mu$ M de 2,4-D, obtendo de 36% a 100% de formação de calos .

No entanto, pressupõe-se que juvenilidade dos tecidos explantados também tenha contribuindo para a alta taxa de formação de calos, posto que, a natureza juvenil dos tecidos embrionários lhe confere alto potencial regenerativo, por serem tecidos com elevada totipotência (HU & FERREIRA, 1998).

Ao adicionar o regulador de crescimento vegetal 2,4-D no meio de cultura, este age estimulando a hipermetilação do DNA, processo fundamental na regulação da totipotencialidade (CID, 2000), ou seja, na capacidade das células em se dividirem ou se diferenciarem favorecendo a calogênese. Porém, a partir de determinadas concentrações as auxinas podem apresentar efeito fitotóxico, como foi observado neste experimento. A partir da concentração de 9,73 $\mu$ M de 2,4-D houve decréscimo para formação de calos, sugerindo que a partir da concentração estimada a auxina 2,4-D age inibindo a formação de calos.

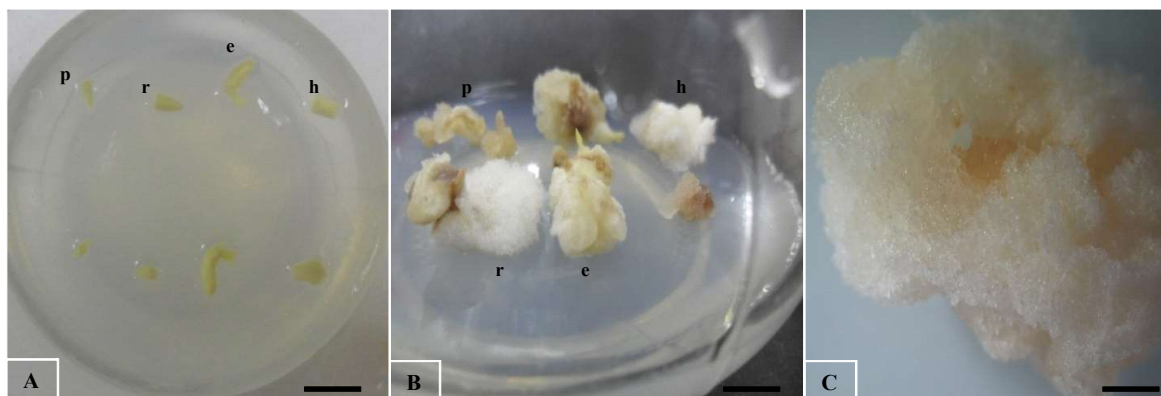


Figura 2– Embrião zigótico inteiro e segmentado em Plúmula, Radícula e R.intermediária (A); Calos friáveis oriundos do embrião zigótico inteiro e segmentado em meio de cultura acrescido de 12 $\mu$ M da auxina 2,4-D (B); Calos friáveis oriundos do embrião zigótico inteiro inoculados em meio MS acrescido de 11,75 $\mu$ M da auxina 2,4-D após 27 dias de cultivo (C). Embrião zigótico inteiro (e) e segmentado em Plúmula (p); Radícula (r) e R.intermediária (h). (Barra = 1cm). Feira de Santana, BA, 2012.

Em relação a variável porcentagem de calos friáveis, notou-se a formação de calos de fácil desagregação e coloração branca (Figura 2) que pode está relacionada a alta

atividade auxínica, pois tecidos juvenis possuem elevados níveis endógenos de auxinas (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A análise de regressão mostrou tendência quadrática ascendente das concentrações de 2,4-D para a variável porcentagem de calos friáveis para todos os tipos de explantes. A maior porcentagem de calos friáveis (100%) foi estimado na concentração 10,65 $\mu$ M para embrião inteiro, seguido do explante região intermediária (100%) na concentração de 9,43 $\mu$ M. O explante radicular apresentou maior formação de calos friáveis (97,35%) na concentração de 9,11 $\mu$ M e o explante plúmula (92,57%) na concentração de 10,06 $\mu$ M (Figura 1B).

A variação ocorrida para porcentagem de calos friáveis em função do tipo de explante pressupõe que a adição de auxina ao meio de cultura, nos valores supracitados interagiu com os teores endógenos presentes nos tecidos, promovendo uma elevação da relação auxina/citocinina suficiente para induzir a formação de calos friáveis, bem como, pela maior proporção de células meristemáticas nos explantes. Uma vez que, tecidos embrionários apresentam regiões meristemáticas consideradas centros potencialmente ativos ocorrendo à maior parte da atividade de divisão celular capazes de redefinir seu padrão de diferenciação celular (TERMIGNONI, 2005; KERBAUY, 2008).

Os resultados obtidos corroboraram aqueles reportados por GOMES et al. (2007) no cultivo de *Cocos nucifera L.*. Esses autores constataram que as regiões meristemáticas próximas ao eixo embrionário, obtiveram as melhores porcentagens para formação de calos friáveis (97,5%, 97,5%, 60%) quando comparados com os explantes das regiões intermediárias (20%, 5%).

NTUI et al. (2010) verificaram variação na formação de calos friáveis utilizando segmentos caulinares de *Digitaria exilis*, em que obtiveram maior porcentagem de calos friáveis para as variedades Kurelep (91,3%), seguido de Churiwe (88,9%) e Agyong (87,8%) quando adicionado 9,06 $\mu$ M de 2,4-D em meio MS. SADO et al. (2009) reportou variação na formação de calos friáveis de *Senna spectabilis* em relação as concentrações de 2,4-D, obtendo 85% e 80% de formação de calos friáveis na concentração de 2,27 $\mu$ M de 2,4-D para explante hipocótilo e epicótilo, seguido dos explantes segmento de folhas e cotilédones 80 e 70%, respectivamente na concentração de 11,33 $\mu$ M de 2,4-D.

De acordo com GEORGE et al. (2008), células que respondem à auxina reverterem para um estado indiferenciado e começam a se dividir favorecendo a formação de calos friáveis. No entanto, como foi relatado para a variável porcentagem de calos, acima dos

valores estimados para variável porcentagem de calos friáveis a adição da auxina 2,4-D tem efeito fitotóxico inibindo a formação de calos friáveis.

Embora não tenha sido verificada a expressão de embriogênese somática, os calos friáveis obtidos, possivelmente, possuem células com potencial para formação de embriões somáticos. No entanto, é necessária a transferência dos calos para meios específicos de subcultivo de forma que possibilite o processo morfogênético, principalmente quando os calos possuem células nos estágios iniciais do desenvolvimento dos embriões.

Como os calos obtidos de explantes de *E.velutina* aparentemente apresentam alta atividade auxínica, uma vez que a coloração branca dos calos pode estar relacionada a alta atividade auxínica (TERMIGNONI, 2005), talvez seja necessário cultivá-los em meio livre de regulador vegetal para eliminar o efeito residual do 2,4-D. WERNER et al. (2009) relata que após a indução de calogênese de *Caesalpinia echinata* em meio contendo 22,65  $\mu\text{M}$  a 90,6 $\mu\text{M}$  de 2,4-D, os calos foram transferidos inicialmente para meio sem regulador de crescimento onde permaneceram por 30 dias e posteriormente para meio indutor suplementado com diferentes concentrações de BAP e 2,4-D, nos quais foram observados embriões somáticos.

Em relação à variável área do explante recoberta por calo, observou-se comportamento quadrático ( $p < 0,01$ ) ascendente em função das concentrações de 2,4-D. Por meio da derivação da equação, foi obtido o ponto máximo para área do explante recoberta por calo (54,14%) utilizando a concentração estimada de 9,75 $\mu\text{M}$  (Figura 1C).

Os resultados obtidos mostraram que houve decréscimo para área do explante recoberta por calo em função das concentrações do regulador 2,4-D. Acima do valor estimado 9,75 $\mu\text{M}$  não houve incremento da intensidade de formação dos calos, independente do tipo de explante. É provável que os teores de auxina eram altos nos tecidos explantados, sendo necessária a adição de baixas concentrações de auxina para induzir a expansão celular. Segundo TAIZ e ZEIGER (2009), tecidos juvenis possuem elevados níveis endógenos de auxinas.

Resultados semelhantes foram relatados por NOGUEIRA et al. (2007) na indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno, na ausência de luminosidade, em que a concentração de 9,06 $\mu\text{M}$  de 2,4-D correspondeu ao ponto máximo da curva, no qual estimou-se cobertura máxima de 99,18%.

Em relação ao tipo de explante, observou-se que a maior média (43,03%) de área do explante recoberta por calo foi obtida quando se utilizou o explante embrião inteiro, todavia não diferindo estatisticamente dos explantes região intermediária (35,01%) e

radícula (38,73%), sendo a menor média obtida para o explante plúmula (24,86%) (Figura 3).

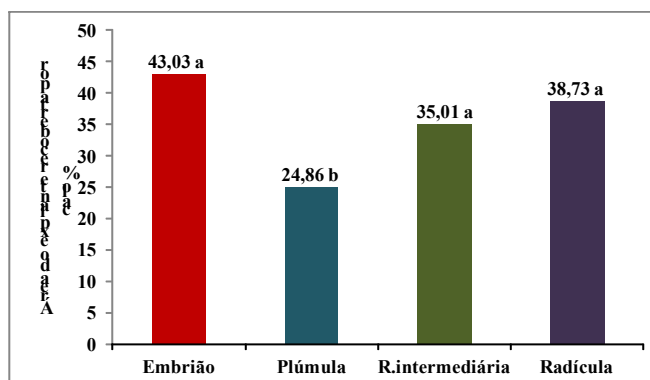


Figura 3– Porcentagem de área do explante recoberta por calos de *Erythrina velutina* em função do tipo de explante após 27 dias de inoculação em meio MS (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

Os resultados obtidos corroboram aqueles reportados MIAO-MIAO YAN et al. (2009) no cultivo de *Chinese jiaotou* em meio suplementado com  $0,44\mu\text{M}$  de BAP e  $4,44\mu\text{M}$  de 2,4-D, que observaram variação na intensidade dos calos formados em relação ao tipo de explante cultivado, promovendo maior indução de calos em segmento internodal (47,5%), seguido de raiz (14,7%) e a menor porcentagem (0,4%) para explante folha.

Para variável porcentagem de oxidação, foi verificado comportamento quadrático ascendente em função das concentrações do regulador vegetal 2,4-D. Por meio da derivação da equação, obteve-se o ponto máximo para porcentagem de oxidação (18,26%) na concentração de  $21,68\mu\text{M}$  de 2,4-D (Figura 1D).

Observou-se que a oxidação foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de 2,4-D, independente do tipo de explante. Conjetura-se que, a adição de 2,4-D favoreceu a liberação de compostos fenólicos no meio, pois geralmente, a oxidação em espécies lenhosas esta associada a fenóis (PAIVA e PAIVA, 2001).

Uma alternativa para reduzir a oxidação seria a adição de compostos antioxidantes, como reportado por WERNER et al., (2009) na calogênese de *Caesalpinia echinata*. Os autores relatam redução na taxa de oxidação em discos de foliólolos quando utilizado como antioxidante o carvão ativado em meio MS suplementado com  $45,3\mu\text{M}$  2,4-D e  $8,88\mu\text{M}$  de 6-BAP. Porém, como a taxa de oxidação nos explantes de embriões de *E. velutina* foi mediana e não inibiu a formação de calos, o uso de antioxidantes não se fez necessário, uma vez que, a adição destes poderia inibir a formação de calos.

Os resultados obtidos mostraram baixa porcentagem de oxidação, independente das concentrações de 2,4-D e dos tipos de explantes testados, o que possivelmente está associada à juvenildade do tecido, uma vez que em tecidos jovens a liberação de compostos fenólicos é menor (PAIVA e PAIVA, 2001). Estes dados estão de acordo com o relatado por FLORES et al. (2006) na indução de calos de *Pfaffia tuberosa*, observaram porcentagens variadas de oxidação nos calos em função do tipo de explante, registrando uma maior intensidade de oxidação em folhas (3,7%) seguido de raízes (2,4%), segmento nodal (1,6%) e entrenó (1,0%) quando cultivados em meio com ANA ou 2,4-D nas concentrações (1 ou 10  $\mu\text{M}$ ) e 1  $\mu\text{M}$  de BAP.

O controle da oxidação é fundamental para resposta do explante no cultivo *in vitro*, pois, segundo THOMAS (2008), substâncias inibitórias no meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes podem diminuir a resposta morfogênica, ou ainda, causar necrose e em casos mais severos a morte do explante.

A análise de regressão mostrou tendência quadrática ascendente das concentrações de 2,4-D para a variável matéria seca dos calos para todos os tipos de explantes. Por meio da derivação da equação notou-se que, em relação à resposta do tipo de explante ao regulador de crescimento vegetal 2,4-D, embrião inteiro foi o que melhor respondeu obtendo ponto máximo para matéria seca (27,66mg), na concentração de 11,31 $\mu\text{M}$ , seguido de região intermediária (19,60mg), na concentração estimada de 8,93 $\mu\text{M}$  e radícula (14,47mg) na concentração de 8,68 $\mu\text{M}$ . Para o explante plúmula, observou-se a menor produção de matéria seca (10,98mg) na concentração de 9,40 $\mu\text{M}$  (Figura 1E).

Os resultados obtidos mostraram que houve redução de cerca de 29,14% da matéria seca do explante região intermediária, seguido 47,69% radícula e 60,30% para o explante plúmula quando comparado com explante embrião inteiro. Taiz diferenças, podem refletir à capacidade do tecido vegetal cultivado em se tornar receptivo e responsivo a atividade fito-hormonal, de forma que se possa promover o crescimento.

A adição de auxina ao meio de cultura foi positiva para o crescimento das células até os valores estimados, para embrião inteiro (11,31 $\mu\text{M}$ ), região intermediária (8,93 $\mu\text{M}$ ), radícula (8,68 $\mu\text{M}$ ) e plúmula (9,40 $\mu\text{M}$ ), demonstrando que as auxinas desempenham papel importante na expansão celular, essenciais para que ocorram os processos morfogênicos (TAIZ e ZEIGER, 2009). No entanto, observou-se que acima dos valores supracitados a auxina 2,4-D promove efeito fitotóxico inibindo o crescimento dos calos. Resultados semelhantes foram reportados por SANTOS et al. (2005) no cultivo de explantes foliares



de *Salix humboldtiana*, que verificaram redução em 60% da produção de matéria seca quando a concentração de 2,4-D passou de 27,18 $\mu$ M para 54,36 $\mu$ M.

A matéria seca e a taxa de crescimento de calos são importantes para a determinação da capacidade de crescimento e para a manutenção dos mesmos em meio de cultura (BISPO et al., 2007).

### 3.2 Curva de crescimento de calos friáveis a partir embriões zigóticos de *Erythrina velutina*.

A curva de crescimento apresentou padrão sigmoidal, evidenciando no período analisado (27 dias de cultivo) a presença de quatro fases de crescimento distintas (Figura 4).

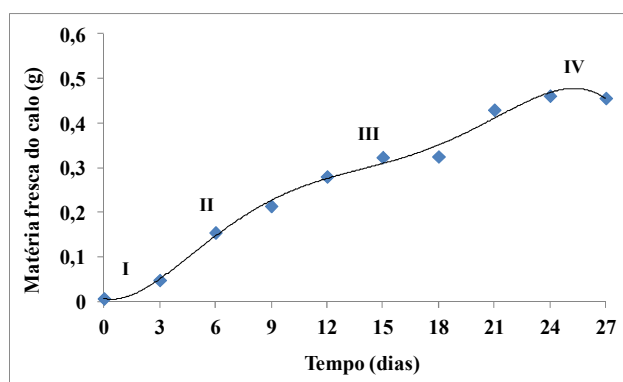


Figura 4 - Curva de crescimento de calos formados a partir embriões zigóticos de *E. velutina*. Fase I- lag; Fase II- exponencial; Fase III- linear e Fase IV- estacionária, inoculados em meio MS suplementado com 11,75 $\mu$ M de 2,4-D, durante 27 dias de cultivo. Feira de Santana, BA, 2012.

O padrão de crescimento dos calos formados mostrou que, o período precursor a iniciação das divisões celulares ocorreu até o 3º dia de cultivo. Este período que compreende a fase lag apresentou percentual de crescimento de 86,38%, evidenciando rápida ativação metabólica necessária para iniciar posteriormente a divisão celular.

Este resultado diverge dos reportados por ABBDE et al. (2010) no cultivo de calos de *Tabebuia roseo alba*, que reportaram a ocorrência da fase lag até o 30º dia, sendo considerado lento, apresentando percentual de crescimento de 43%.

O padrão de crescimento dos calos na fase lag de *E. velutina* foi confirmado pela análise bioquímica, que indicou redução dos teores de açúcares redutores (24,37%) e solúveis totais (Figura 5A e B) até o 6º dia de inculação, provavelmente utilizados para ativação do metabolismo celular.

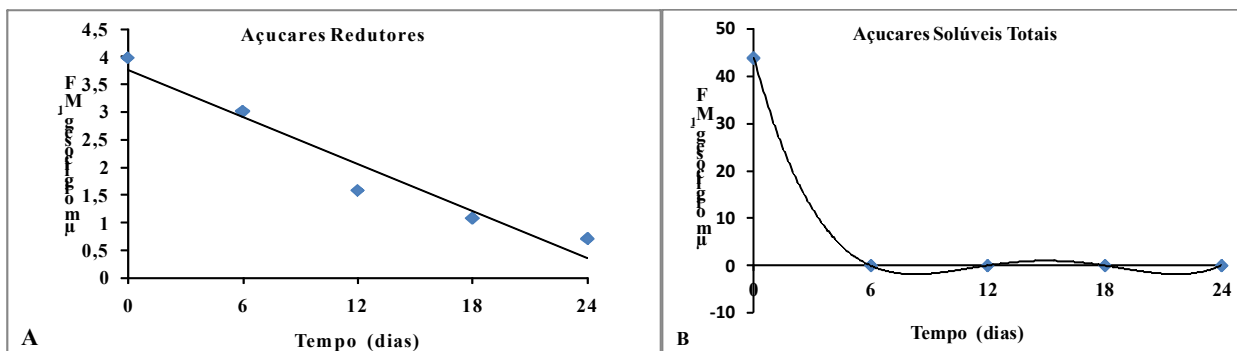


Figura 5 – Teores de açúcares redutores (A); Teores de açúcares solúveis totais (B) de calos formados a partir embriões zigóticos de *E. velutina* de inoculados em meio MS suplementado com 11,75 $\mu$ M de 2,4-D, durante 24 dias de cultivo. Feira de Santana, BA, 2012.

O teor máximo de açúcares redutores foi observado no 1<sup>o</sup> dia da inoculação e o teor mínimo no último dia (24<sup>o</sup>) da inoculação. No entanto, a presença de açúcares solúveis totais foi detectada apenas no primeiro dia de cultivo, ou seja, nos embriões zigóticos. Resultados semelhantes foram obtidos por SANTOS et al. (2008) em calos de *Coffea canephora* L., em que o teor máximo de açúcares redutores ocorreu no dia da inoculação dos explantes, a partir do qual sofreu redução, atingindo um teor mínimo no no último dia de cultivo.

Supõe-se que o acúmulo de reservas nos tecidos embrionários de *E. velutina* para posterior ativação do metabolismo no processo de germinação (TAIZ e ZEIGER, 2009), tenha sido suficiente para suprir a demanda metabólica para iniciar o processo de crescimento do calo.

A partir 3<sup>o</sup> dia de cultivo, inicia-se a fase de crescimento exponencial se estendendo até o 12<sup>o</sup> dia de cultivo, o qual apresentou percentual de crescimento de 82,86%. Esse resultado permite inferir que os tecidos explantados apresentam intensa divisão mitótica promovendo rápido aumento no número de células. SANTOS et al. (2008) observaram lento aumento do número de células em calos induzidos a partir de segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora*, ocorrendo nos explantes foliares entre o 28<sup>o</sup> e o 63<sup>o</sup> dia após a inoculação e nos explantes nodais entre o 49<sup>o</sup> e o 63<sup>o</sup> dia, obtendo percentual de crescimento 92% e de 79%, respectivamente, resultados contraditórios ao observado neste experimento.

Na fase de crescimento exponencial o nível de AR continuou reduzindo constantemente, isso indica que este pode ter sido usado pelo explante como fonte de energia durante a fase de divisão celular. SERRA et al. (2000) constatou decréscimo dos

teores de açúcares redutores, porém de uma forma menos acentuada em calos de *Bertholletia excelsa* H. B.K., entre o 30º e 60º dia de inoculação período que sucede a fase exponencial e linear.

Foi observado do 12º até o 24º dia de cultivo a fase de crescimento linear, sucedendo à diminuição da divisão celular e aumento da área celular, observando percentual de crescimento de 39,26%. Conjetura-se que, após o cessar das divisões mitóticas aconteceu rápida expansão celular.

Estes dados divergem dos obtidos por SERRA et al. (2000) no cultivo de calos de *Bertholletia excelsa*, o período de crescimento linear foi observado entre o 53º e o 60º dia de inoculação, representando 35% de crescimento *in vitro* ou aos reportados SANTOS et al. (2003) na formação de calos de *Coffea arabica* L., cultivar rubi, notaram que o período de crescimento linear ocorreu entre o 77º e o 84º dia de cultivo, apresentando apenas 6% de crescimento.

Durante a fase de crescimento linear foi possível por meio da análise anatômica realizada no 21º de cultivo dos calos obtidos a visualização de células em divisão (Figura 6A). Conforme SANTANA et al. (2001) o período de expansão celular é considerado a fase ideal para procedimento da repicagem, devido ao crescimento celular ativo.

Foi observado que durante as fases anteriores houve constante redução dos teores de AR obtendo 82,35% de decréscimo no último dia de inoculação (24º), não sendo identificado, como citado anteriormente, açúcares solúveis totais. Essa redução pode está relacionada a síntese de amido para os processos subseqüentes, pois a anatomia dos calos revelou a presença de amiloplastos (Figura 6B).

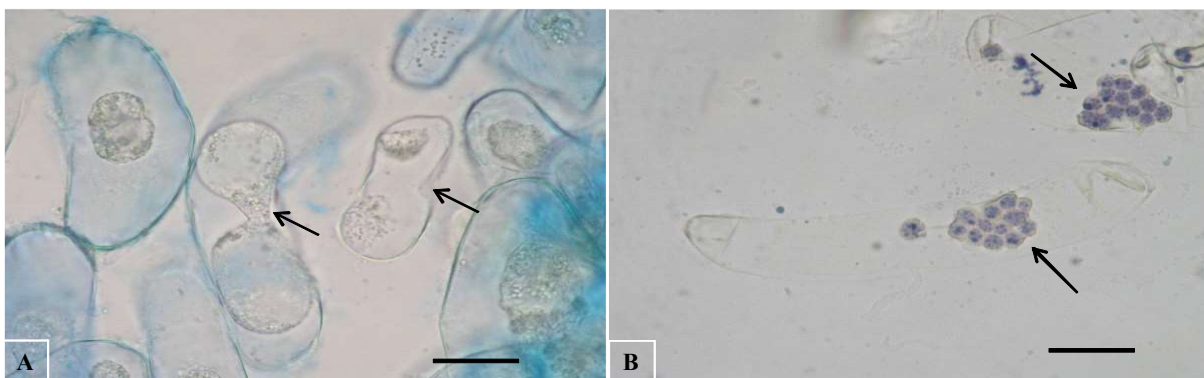


Figura 6– Células de calos friáveis oriundos de embriões zigóticos em divisão mitótica (indicada pela seta) coradas com azul de Astra (A) e (B) reservas de amiloplastos (indicada pela seta), coradas com lugol após o 21º dia de cultivo em MS acrescido 11,75µM de 2,4-D. Com aumento de 40x cl opt 2. (Barra= 1,25µm). Feira de Santana, BA, 2012.

Segundo CASTRO et al.( 2009) a síntese de amido é diretamente dependente da disponibilidade de AST e AR, pois o amido é formado pela polimerização de moléculas de glicose em ligações  $\alpha$ 1-4 e  $\alpha$ 1-6.

Os resultados aqui mostrados corroboram aqueles reportados por PINTO et al. (2012) nos calos de *Passiflora edulis*. Esses autores verificaram, por meio de análise histológica das lâminas cotiledonar de embriões zigóticos, epiderme unisseriada de parenquimáticas alongadas células com paredes celulares finas, núcleos pequenos e depósitos de amido limitados a poucas células.

O período estacionário foi verificado a partir 24<sup>o</sup> de cultivo, fase em que ocorre o desaceleramento do crescimento, sendo notado a partir do 27<sup>o</sup> o escurecimento dos calos. Este processo pode está associado ao decréscimo da disponibilidade de substâncias minerais e energéticas no meio de cultura (SANTIAGO, 2003).

### 2.3 Efeito do ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) na indução de calos em segmentos foliares e epicótilo de *E.velutina*.

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da fonte de variação tipo de explante para a variável porcentagem de calo (%C). (Tabela 2).

Tabela 2– Resumo da análise de variância para porcentagem de formação de calo (%C), calos friáveis (%CF), área do explante coberta por calo (AEC), porcentagem de oxidação (%O) e matéria seca do calo (MSC) de plantas de *Erythrina velutina*, obtidas a partir de diferentes explantes, em meio de cultura MS acrescido de 11,75 $\mu$ M de 2,4-D. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrados médios				
		%C	CF	AEC	%O	MSC
Explante (E)	1	4225,00**	2,78 <sup>NS</sup>	1,56 <sup>NS</sup>	76,56 <sup>NS</sup>	107,12 <sup>NS</sup>
Resíduo	14	73,75	98,33	22,71	9,06	11,69
CV (%)		21,59	4,94	83,13	165,11	54,56

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Foi observado a partir do décimo segundo dia, formação de calos nos explantes de segmentos foliar e epicótilo. Ao analisar a variável porcentagem de calos verificou-se maior porcentagem (90%) de calos em segmento foliar (Figura 7).

Verificou-se que a porcentagem de formação para explante foliar diferiu em 32,5% quando comparado com o explante epicótilo. Provavelmente os segmentos foliares são mais responsivos à auxina 2,4-D do que o segmento de epicótilo, expressando uma maior sensibilidade aos reguladores de crescimento vegetal, o que pode está relacionado aos

níveis endógenos de fito-hormônios presentes nos tecidos influenciando uma melhor resposta para o segmento foliar.

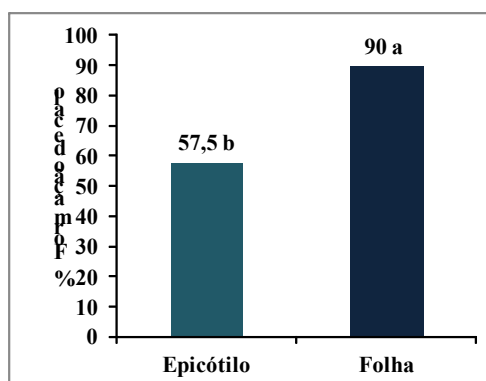


Figura 7– Porcentagem de calos obtidos nos explante de segmentos de epicótilo e folhas após 27 dias de inoculação em meio MS acrescido de  $11,75\mu\text{M}$  de 2,4-D (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

A resposta do explante ao tipo de regulador de crescimento foi reportada por ARENHART e ZAFFARI (2008) em explantes foliares e nodais de *Eucalyptus grandis*, que observaram a maior porcentagem de calos (100%) para explante foliares quando foi induzido em meio de cultura MSM, acrescido de  $4,53\mu\text{M}$  de 2,4-D enquanto que, para segmento nodal ocorreu quando utilizado 2,27 de TDZ combinado com  $5,37\mu\text{M}$  de ANA. Segundo TAIZ e ZEIGER (2009) as auxinas agem estimulando a divisão de células maduras que não mais se dividiriam, podendo induzir a proliferação de massas celulares.

Os calos provenientes de segmento foliar e da região do epicótilo apresentaram textura friável de fácil desagregação. Provavelmente, a característica de friabilidade tenha sido favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, bem como, pelo genótipo e outros componentes acrescido ao meio de cultura (HU & FERREIRA, 1998).

A ação da auxina 2,4-D na formação de calos friáveis tem sido bem reportada na literatura, Ntui et al., (2010) verificaram formação de calos friáveis em segmentos de caule de *Digitaria exilis* quando o meio de cultura foi acrescido de  $9,06\mu\text{M}$  de 2,4-D. SILVA et al.(2009) observaram formação de calos friáveis em anteras de *Coffea arabica* quando o meio foi suplementado também com  $9,06\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Foi notado que os calos diferiram quanto ao formato das células. Calos oriundos de segmento foliar apresentou células de formato globular diferentemente dos calos da região do epicótilo (Figura 8). Estes possuem células menores e com aparência filamentososa semelhante aos calos friáveis induzidos a partir de embriões zigóticos da espécie em estudo.

A obtenção de estruturas distintas em segmento foliar e epicótilo de *E. velutina* são características morfológicas que depende da plasticidade morfogênética dos tecidos em si desdiferenciar e rediferenciar, quanto maior a complexidade estrutural do explante mais rápida e mais direta é a resposta *in vitro* (HALPERIN, 1986; HU & FERREIRA, 1998).

Resultados semelhantes foram reportados por WERNER et al. (2009) para espécie *Caesalpinia echinata*. Esses autores relatam que calos oriundos de foliólulos juvenis cultivados em diferentes tratamentos com 2,4-D formaram massas pró-embriônicas (MPEs) enquanto que, quando adicionado 2,27 $\mu$ M 2,4-D no meio de cultura MS, 10% dos calos apresentaram estruturas semelhantes à dos embriões somáticos globulares e codiformes.

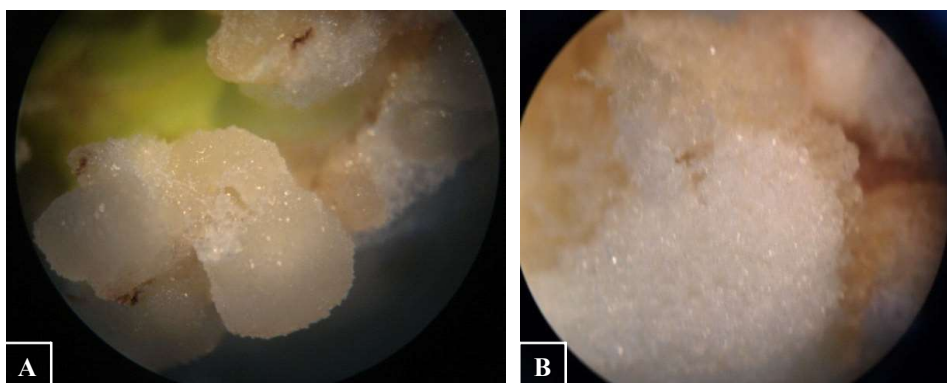


Figura 8– Calos friáveis oriundos de segmento de folha apresentado células globulares (A) e calos friáveis oriundos de segmento de epicótilo (B) a partir de plantas de embrião em meio de cultura acrescido de 11,75 $\mu$ M da auxina 2,4-D após 25 dias de cultivo. Feira de Santana, BA, 2012.

Segundo HU & FERREIRA (1998) células de calos podem apresentar morfologia, tamanho, coloração e ploidia variada dependendo da espécie, período de cultura e composição do meio. Os calos apresentaram coloração branca independente do tipo de explante (Figura 8), semelhante ao observado em calos induzidos a partir de embriões zigóticos da espécie em estudo, que pode está relacionada a alta atividade auxínica nos tecidos explantados (TERMIGNONI, 2005).

Tecidos foliares têm mostrado uma excelente fonte de explante para indução de calos friáveis com potencial embriogênico *Salix humboldtiana* (SANTOS et al., 2005); *Cleome rosea* Vahl (SIMÕES et al., 2010); *Ruta graveolens* (AHMAD et al., 2010), corroborando os resultados obtidos com segmentos foliares de *E. velutina*.

### 3. CONCLUSÃO

A maior formação de calo (100%) foi verificado na concentração de 9,73 $\mu$ M de 2,4-D.

Foi observado formação de calos friáveis em todos os explantes testados.

A maior produção de matéria seca (27,66mg) foi registrado na concentração de 11,31 $\mu$ M da auxina 2,4-D para o explante embrião zigótico.

Os calos induzidos a partir de embriões zigóticos de *E. velutina* devem ser transferidos para meio de subcultivo no período entre o 15<sup>o</sup> até o 21<sup>o</sup> dia de cultivo.

Foi verificado redução do AR e AST em função do tempo de cultivo, bem como a presença de células em divisão e amiloplastos nos calos.

Os segmentos foliares obtiveram melhor resposta para formação de calos friáveis.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABBADE, L.C. et al. growth curve and biochemical analyses of callus of ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v.33, p.45-56, 2010.
- AHMAD, N. et al. In vitro callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. **South African Journal of Botany**, v. 76, Issue 3, p.597-600, 2010.
- ANDRADE, L. M. C. O et al. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: Influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n.5, p.1063-1070, 2001.
- ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, n.1, p. 16-22, 2008.
- AZEVEDO, K.S. Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). 2003. 86 p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, MG.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390 381, 2006.
- BISPO, N. B. et al. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v.37, p. 890-893. 2007.
- BORGES JUNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v.28, n.4, p.493-497, 2004.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo:Embrapa Florestas, v. 3, 2008.
- CASTRO, E.M. de et al. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 1v.
- CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v.161, p.415-421. 2001.
- CID, L. P. B. Auxinas. In: CID, L. P. B. (Ed.) **Introdução aos Hormônios Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.
- COSTA, A. S et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.1, p. 68-72, 2007.



- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p. 1090-1096, 2010.
- CUNHA, E. V. L. et al. Eryvelltinone, na isofavanose from the stem bark of *Erythrina velutina*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1371-1373, 1996.
- DANTAS, M. C. et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 129-133, 2004.
- DOBRAŃSZKI, J.; SILVA, J. A. T. Micropropagation of apple: a review. **Scientia Horticulturae. Biotechnology Advances**, v.28, n.4, p.462-488, 2010.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de Macieira (*Malus domestica* BORKH.) CVS. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 3, p.221-227, 2003.
- ESTEVAM, C. S. et al. Atividade anticolinesterásica do extrato aquoso e da fração alcalóide total das folhas de *Erythrina velutina*. In 30ª reunião anual da sociedade brasileira de química, 2007.
- FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)**, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FLORES, R. et al. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.89-95, 2006.
- GEORGE, E. F.; ARNOLD, S.V. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.
- GOGATE, S. S.; NADGAUDA, R. S. Direct induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.) **Scientia Horticulturae**, v.97, p. 75-82, 2003.
- GOMES, K. K. P. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p. 124-126, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998. p. 183-260.

- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1.p.371-93.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2008. p116-223.
- LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 56-63, 2000.
- LIMA, E. C. et al. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (Croton urucurana Baill.). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.
- LIN, X; LEUNG, D. W. M. Culture of isolated zygotic embryos of Pinus radiata d. don. part I: factors influencing *in vitro* germination and growth of isolated embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.38, p.191-197, 2002.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p.57.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louropardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.
- MESQUITA, A. C. et al. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechiera (*Litchi chinensis* Sonn.) **Magistra**, v. 14, n. 1, 2002.
- MIAO-MIAO YAN. et al. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). **Scientia Horticulturae**, v.123, p.124-128, 2009.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497. 1962.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

- NTUI, V. O. et al. Plant regeneration from stem segment-derived friable callus of “Fonio” (*Digitaria exilis* (L.) Stapf.). **Scientia Horticulturae**, v.125, p.494-499, 2010.
- OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing activity of Erythrinan alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 234-236, 2009.
- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos – Textos acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.
- PINTO, A. P. C. et al. In vitro organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.46, p.28-33, 2010.
- PINTO, D. L. P et al. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.107, n.3, p.521-530, 2012.
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 80p.
- SADO, MONALY. Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva / Monaly Sado -- São Paulo, 2009. 90 p. il. Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- SANTIAGO, EDSON JOSÉ ARTIAGA. Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, DeCandolle) / Edson José Artiaga de Santiago. -- Lavras: UFLA, 2003. p. 183.
- SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 510-514, 2005.
- SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.571-577, 2003.
- SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. APOATÃ. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- SANTOS, C. G. et al. Propagação de *coffea arabica* c.v Acaiá cerrado por meio do cultivo in vitro de embriões. **Plant cell culture micropropagation**, v.1, n.1, p. 19-23, 2005.
- SANTOS, D. N. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v.40, n.11, p.2268-2273, 2010.
- SANTOS, M. R. V. et al. Relaxant effect of the aqueous of *Erythrina velutina* leaves on rat van deferens. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 343-348, 2007.
- SERRA, A. G. P; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.4, p. 833-840, 2000.

- SILVA, A. S. et al. BAP, 2,4-D e ácido acetilsalicílico na indução e diferenciação de calos em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.5, p.1205-1212, 2009.
- SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Interrelações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasilica**, v.19, n.1, p.183-194, 2005.
- SIMOES, C. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl, C.L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.3, p. 679-686, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- TERMIGNONI, Regina Ramos. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.
- THOMAS T. D.; MASEENA, E. A. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 332-336, 2006.
- THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p.618-631, 2008.
- VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana de cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 137-142, 2005.
- WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil in vitro. **Revista Árvore**, v.33, p. 987-996, 2009.
- YIN Gui-xiang. et al. Establishment of a Highly Efficient Regeneration System for the Mature Embryo Culture of Wheat. **Agricultural Sciences in China**, v.10, n.1, p. 9-17, 2012.

## Capítulo 4

---

**Conservação *in vitro* de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae).**

## RESUMO

*Erythrina velutina* é uma espécie pertencente à família Leguminosae, nativa do bioma caatinga que se encontra suscetível a degradação e exploração indiscriminada. As técnicas de cultura de tecidos têm sido uma importante ferramenta para conservação de germoplasma em laboratório utilizando agentes osmóticos, retardantes de crescimento e por meio da redução da temperatura. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito das concentrações de sacarose, do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol (PBZ) e da temperatura no crescimento *in vitro* de *E. velutina*. As sementes foram inoculadas em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) contendo 0,7% de ágar. No primeiro experimento o meio foi suplementado com diferentes concentrações de sacarose: 87,65; 131,56; 175,28 mM correspondendo aos potenciais:  $\Psi_o = -0,2170$ ;  $-0,3255$  e  $-0,4340$  MPa, respectivamente. No segundo experimento o meio de cultura foi acrescido com diferentes concentrações de retardante de crescimento PBZ: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0  $\mu$ M. As culturas foram mantidas sob duas condições, sala de crescimento, nas temperaturas de 18 e  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. Ao final de 60 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento das plantas, número de folhas, número de folhas senescentes, matéria seca da parte aérea e número de raízes. Foi observado crescimento mais lento das culturas na temperatura de  $18^\circ\text{C}$ , entretanto, o aumento das concentrações de sacarose até 175,28mM não foi suficiente para reduzir o crescimento das plantas. Ao utilizar o regulador de crescimento vegetal PBZ nota-se redução de 47,21% para comprimento da parte aérea e 64,16% da matéria seca da parte aérea quando acrescido ao meio de cultura de 4  $\mu$ M de PBZ. O aumento gradativo das concentrações de PBZ e a redução da temperatura promovem o crescimento mais lento das culturas, no entanto, faz-se necessário novo estudo com concentrações maiores de sacarose ou outros agentes osmóticos.

**Palavras-chave:** Mulungu, extrativismo, cultivo *in vitro*, crescimento mínimo.

## ABSTRACT

*Erythrina velutina* is a family Leguminosae species of the family Leguminosae, native from caatinga biome that is susceptible to degradation and indiscriminate exploitation. The culture techniques tissue have been an important tool for conservation of germplasm in the laboratory using osmotic agents, retarding growth, and reduction of the temperature. The objective of this study was to evaluate the effect of sucrose concentrations, plant growth regulator paclobutrazol (PBZ) and reduction of the temperature on *in vitro* growth of *E. velutina*. The seeds were inoculated on WPM medium (Lloyd & McCown, 1980) agar containing 0.7%. In the first experiment, the medium was supplemented with different concentrations of sucrose, 87.65, 131.56, 175.28mM corresponding to the potential:  $\Psi_o = -0.2170, -0.3255$  and  $-0.4340$  MPa, respectively. In the second experiment the culture medium was supplemented with different concentrations of growth retardant PBZ: 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 $\mu$ M. The cultures were maintained under two conditions, a growth chamber at temperatures on 18 and  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . The statistical design was completely randomized. After 60 days of inoculation, were analyzed the following variables: number of butts, plant length, leaves number, dead leaves number, dry butts and roots number. We observed slower growth of the cultures at a temperature of  $18^\circ\text{C}$ , however, the increase in concentrations up to 175.28mM sucrose was not enough to reduce plant growth. By using the plant growth regulator BPZ, were noteced a reduction of 47.21% for sprout length and 64.16% of dry matter of butts when added to the culture medium 4 $\mu$ M of BPZ. The gradual increase of BPZ concentration and temperature reduction, promoted slower cultures growth, however, it is necessary to further study with higher concentrations of sucrose or other osmotic agents.

**Keywords:** Mulungu, extraction, culture *in vitro*, minimal growth.

## 1. INTRODUÇÃO

A região semiárida possui economia fortemente sustentada pela exploração dos recursos naturais, que, em geral, são desenvolvidas sem qualquer tipo de preocupação conservacionista (SAMPAIO, 2002), colocando em risco de extinção inúmeras espécies nativas, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasma valiosos (GIULIETTI e QUEIROZ, 2006; FRANÇA et al., 2007), dentre eles está *Erythrina velutina*.

*E. velutina* é uma espécie pertencente à família Leguminosae, conhecida popularmente como mulungu (LORENZI, 1992). Esta possui grande relevância econômica para a região semiárida, tanto no setor madeireiro quanto artesanal, tintóreais, bem como, para fins paisagísticos e medicinais.

Diante do seu amplo potencial econômico, encontra-se suscetível ao extrativismo indiscriminado. A utilização das sementes da espécie para a confecção de adornos e no tratamento de doenças e o emprego da madeira no setor madeireiro, tem levado a reduções drásticas das populações naturais, uma vez que, o mecanismo de perpetuação da espécie ocorre por sementes.

Aliados a esse fator, a espécie apresenta uma barreira natural de propagação, pois suas sementes possuem dormência tegumentar, o que impede sua germinação sobre condições naturais, sendo necessário delinear estratégias de conservação *ex situ* para manutenção e utilização de forma sustentável da espécie.

Alternativamente, as técnicas de cultura de tecidos têm sido uma importante ferramenta para conservação *in vitro* de germoplasmas com grande potencial econômico que se encontram ameaçados de extinção pelo extrativismo e/ou uso não sustentável.

A conservação de germoplasma *in vitro* consiste no crescimento lento das culturas, reduzindo drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, podendo ser utilizado como fonte de explante meristemas e/ou ápices meristemáticos, embriões e sementes. A redução do crescimento pode ser induzida mediante estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento, bem como, diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS e WILLIAMS, 1998), favorecendo a ampliação do tempo entre subcultivos e proporcionando menor custo para manutenção do banco de germoplasma em laboratório (CANTO et al., 2004).



A redução da temperatura nas salas de crescimento aliada aos agentes osmóticos e retardantes de crescimento no meio de cultura, têm sido estratégias que, ao serem aplicadas conjuntamente, vêm obtendo sucesso no estabelecimento de condições favoráveis a conservação *in vitro* (AMARAL, 2005).

Os agentes osmóticos, tais como a sacarose, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993). Já os retardantes de crescimento, como o ancimidol e paclobutrazol agem inibindo a síntese da giberelina, bloqueando a etapa da conversão do ent-caureno a ácido ent-caureno na rota metabólica da biossíntese de giberelina (RADEMACHER, 2000; SARKAR et al., 2001).

Portanto, a conservação *in vitro* é uma técnica vantajosa de conservação *ex situ* se comparada aos métodos de conservação *in situ*, pois são culturas livres de agentes patogênicos e intempéries, que garantem a manutenção da fidelidade genética, facilita a disponibilidade de material para o intercâmbio de germoplasma e redução dos custos de manejo e cultivo, além de permitir o desenvolvimento de estudos ampliando o conhecimento sob o germoplasma cultivado.

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo averiguar o efeito das concentrações de sacarose e do retardante de crescimento vegetal paclobutrazol (PBZ) no crescimento *in vitro* de *E.velutina*.

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### *2.1 Local de realização dos experimentos e desinfestação das sementes*

Idem capítulo 1, Item 2.1, pág.15

### *2.2 Meio de cultura e Condições experimentais*

Item 2.3 do capítulo 1, entretanto, as culturas foram mantidas sob duas condições, sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e câmara do tipo B.O.D. à  $18^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas.

### *2.3 Agentes osmóticos*

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com diferentes concentrações de sacarose: 87,65; 131,56; 175,28mM (correspondendo aos potenciais:  $\Psi_0 = -0,2170$ ;  $-0,3255$  e  $-0,4340$  MPa, respectivamente).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 2 (concentração de sacarose x temperatura) com 6 repetições por tratamento, cada uma composta por 5 unidades experimentais.

### *2.4 Retardante de crescimento vegetal*

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) acrescido com diferentes concentrações de retardante de crescimento vegetal PBZ (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 $\mu\text{M}$ ).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 2 (concentração de PBZ x temperatura) com 6 repetições por tratamento, cada uma composta por 5 unidades experimentais.

### *2.5 Variáveis analisadas*

Ao final de 60 dias da inoculação foram analisadas as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento das plantas, número de folhas, número de folhas senescentes, matéria seca da parte aérea e número de raízes.

### *2.6 Análise estatística*

Idem capítulo 1, Item 2.6, pág.15

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito da sacarose e da temperatura no crescimento mínimo de plantas de *E. velutina*.

A análise de variância mostrou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da interação “concentração de sacarose x temperatura” para as variáveis número de folhas e matéria seca da parte aérea. Foi verificado efeito altamente significativo da temperatura ( $p < 0,01$ ) para a variável número de folhas senescentes e efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de sacarose para a variável número de raízes (Tabela 1).

Tabela 1– Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de folhas senescentes (NFS), matéria seca da parte aérea (MSPA) e número de raízes (NR), de plantas de *Erythrina velutina* inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de sacarose e mantida em duas condições de temperatura. Feira de Santana, BA, 2012.

FV	GL	Quadrados médios					
		NB	CPA	NF	NFS	MSPA	NR
Concentração (C)	2	0,21 <sup>NS</sup>	2257,86 <sup>NS</sup>	26,81 <sup>NS</sup>	0,95 <sup>NS</sup>	994,2*	38,68*
Temperatura (T)	1	0,19 <sup>NS</sup>	131,46 <sup>NS</sup>	714,43**	22,88**	4763,30**	7,70 <sup>NS</sup>
C x T	2	0,24 <sup>NS</sup>	1168,68 <sup>NS</sup>	32,24*	1,62 <sup>NS</sup>	1076,59*	23,64 <sup>NS</sup>
Resíduo	24	0,19	1648,91	7,90	1,22	288,61	9,57
CV (%)		39,52	20,89	29,68	20,89	82,71	26,42

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

O aumento das concentrações de sacarose e a redução da temperatura não interferiram na germinação e crescimento de *E. velutina*, sendo a taxa de sobrevivência de 100% (dado não mostrado). Esses resultados são corroborados por NUNES et al. (2008) no cultivo de embriões de *Jatropha curcas*, que verificaram 83,68% de germinação e o aumento das concentrações de sacarose até 175,28mM no meio de cultura proporcionou crescimento do comprimento da parte aérea das plântulas.

Para a variável número de folhas, observou-se que não houve diferença estatística entre as concentrações de sacarose avaliadas, quando as plantas foram submetidas à temperatura de 18°C e 25°C. Em relação a temperatura para número de folhas a menor média (4,44) foi registrada a 18°C e a maior média (16,88) na temperatura de 25°C (Tabela 2).

Foi observada redução de 71% no número de folhas proporcional a redução da temperatura. Provavelmente, a diminuição do número de folhas é uma resposta ao estresse hídrico provocado pela redução da temperatura, diminuindo a área de transpiração e dessa forma reduzindo a perda de água (TAIZ E ZEIGER, 2009).

Tabela 2– Número de folhas (NF) e matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas provenientes de sementes de *Erythrina velutina* aos 60 dias de inoculados em meio de cultura WPM em função de diferentes concentrações de sacarose e da temperatura. Feira de Santana, BA, 2012.

Temperatura (°C)	Sacarose (mM)		
	87,65	131,56	175,28
	NF		
18	4,76 Ba	4,56 Ba	4,44 Ba
25	10,44 Ab	15,72Aa	16,88 Aa
	MSPA (mg)		
18	173,38 Bab	158,44 Bb	198,68 Aa
25	202,58 Aa	202,10 Aa	201,43 Aa

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultado semelhante foi relatado por PASQUAL et al (2002), que constataram redução no número de folhas (6,77 e 5,55) para embriões zigóticos de Tangerineira “Poncã” quando cultivados em meio de cultura MS acrescido de diferentes concentrações de sacarose 43,83 e 87,65mM, respectivamente. PÉREZ et al. (2001) observaram em *Festuca arundinaceae* Schreb. Cv. Tima, que a redução na temperatura de 25 °C a 12 °C causou decréscimo no crescimento e na área foliar das plantas.

Ao analisar a variável matéria seca da parte aérea em resposta as concentrações de sacarose quando submetida a temperatura de 18°C, verificou-se aumento da matéria seca (198,68mg) na concentração de 175,28mM de sacarose. Na temperatura de 25°C não houve diferença estatística para o acúmulo de matéria seca da parte aérea em relação as concentrações testadas.

No entanto, nota-se redução da matéria seca da parte aérea em relação à temperatura. A maior média (202,10mg) foi verificada na temperatura de 25°C e a menor média (158,44mg) na temperatura de 18°C quando o meio foi acrescido com 131,56mM de sacarose, não diferindo da concentração de 87,64mM de sacarose (Tabela 2).

O decréscimo na matéria seca da parte aérea foi diretamente proporcional a diminuição da temperatura, verificando redução de 14,41% quando submetida à temperatura de 18 °C. Possivelmente a redução da matéria seca pode está associado a uma translocação mais lenta de carboidratos devido à exposição a temperaturas mais amenas refletindo no decréscimo da biomassa.

Os resultados encontrados para *E. velutina* diferem dos registrados no cultivo de

morangueiro por CALVETE et al.(2002), que obtiveram maior acúmulo de matéria seca com o aumento da concentração de sacarose a 25°C, e na ausência deste foi verificado peso médio de 10,2mg e na maior concentração 175,28mM peso médio de 33,9mg para matéria seca. Já para bromélias *Vriesea inflata*, Pedroso et al. (2010) verificaram que baixas temperaturas diminuía o incremento de matéria seca da parte aérea, na temperatura de 18°C obtiveram peso médio de 2,8 mg e em 25°C peso médio 4,3 mg da matéria seca, corroborando os resultados para *E. velutina*.

Segundo GEORGE (1996) a taxa na qual o material vegetal cresce *in vitro*, geralmente diminui lentamente à medida que as temperaturas são reduzidas abaixo do ideal.

Em relação a variável número de folhas senescentes, foi observado decréscimo em detrimento a diminuição da temperatura. Na temperatura de 25 °C foi registrada a maior média (2,54) e a menor média (0,80) em 18 °C (Figura 1A).

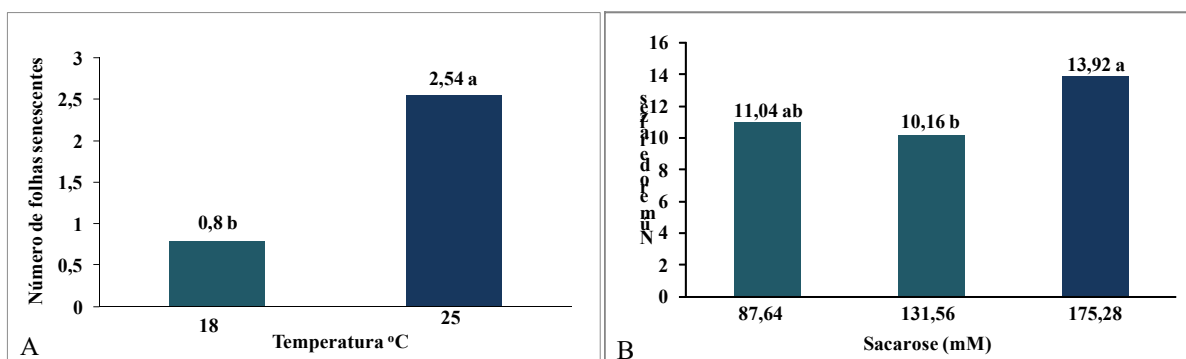


Figura 1– Número de folhas senescentes (A) e número de raízes (B) de plantas provenientes de sementes de *Erythrina velutina* aos 60 dias de inoculados em meio de cultura WPM em função da temperatura (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

As folhas de *E. velutina* apresentaram coloração verde clara (dados não mostrados) em temperatura de 18 °C, podendo ser um reflexo do estresse sofrido pelas plantas ao serem submetidas à temperatura mais baixa, ocasionando redução da síntese de clorofila (TAIZ E ZEIGER, 2009).

Para variável número de raízes, a maior média (13,92) foi observada na concentração de 175,28mM e a menor média (10,16) na concentração de 131,56mM que não diferiram estatisticamente da concentração de 87,65mM (Figura 1B).

O número de raízes foi semelhante aquele reportado para a cultura de *Cattleya walkeriana* por DIGNART et al. (2009), no qual obtiveram a menor média (4,14) na

concentração de sacarose 43,8mM e a maior média (5,86) quando acrescido ao meio de cultura 87,64mM sacarose.

A adição de maiores concentrações de sacarose no meio de cultura favoreceu o aumento do número de raízes em *E. velutina*. Isto ocorreu, provavelmente porque a redução da absorção de água afetou o consumo de carbono e energia pela parte aérea, favorecendo uma distribuição maior de assimilados vegetais para o sistema radicular levando a um crescimento preferencial das raízes e limitando o crescimento da parte aérea (TAIZ E ZEIGER, 2009).

O agente osmótico sacarose, ao ser adicionado ao meio de cultura, atua externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993), contudo, foi verificado que as concentrações utilizadas não foram satisfatórias para a redução do crescimento de *E. velutina*.

### 3.2 Efeito do retardante de crescimento placlobutrazol e da temperatura no cultivo in vitro de plantas de *Erythrina velutina*.

A análise de variância mostrou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da interação “concentração de PBZ x temperatura” apenas para variável número de folhas senescentes. Observou-se efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da concentração de PBZ para as variáveis comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea e efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para número de raízes. O fator isolado temperatura foi significativo ( $p < 0,01$ ) para as números de folhas e matéria seca da parte aérea, enquanto que, verificou-se efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a comprimento da parte aérea (Tabela 3).

Tabela 3- Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de folhas senescentes (NFS), matéria seca da parte aérea (MSPA) e número de raízes (NR) de plantas de *Erythrina velutina* inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de PBZ e mantidas em duas condições de temperatura. Feira de Santana, 2012.

FV	GL	Quadrados médios					
		NB	CPA	NF	NFS	MSPA	NR
Concentração (C)	4	0,007 <sup>NS</sup>	11094,67 <sup>**</sup>	11,49 <sup>NS</sup>	2,75 <sup>*</sup>	4227,90 <sup>**</sup>	54,31 <sup>*</sup>
Temperatura (T)	1	0,02 <sup>NS</sup>	3504,52 <sup>*</sup>	745,75 <sup>**</sup>	19,22 <sup>**</sup>	14604,43 <sup>**</sup>	15,79 <sup>NS</sup>
C X T	4	0,04 <sup>NS</sup>	1358,26 <sup>NS</sup>	12,97 <sup>NS</sup>	2,47 <sup>*</sup>	553,56 <sup>NS</sup>	10,67 <sup>NS</sup>
Resíduo	40	0,07	791,31	21,39	0,91	1083,70	18,16
CV (%)		8,21	18,09	45,78	73,30	20,53	40,92

\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. \*\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>NS</sup>Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A porcentagem de sobrevivência dos explantes aos 60 dias de cultivo *in vitro* foi de 100% (dado não mostrado). Ao analisar a variável comprimento da parte aérea em função da concentração de PBZ a curva de regressão que melhor se ajustou foi a linear ( $p > 0,01$ ) decendente, indicando que há decréscimo no comprimento das plantas quando submetidas a concentrações maiores do retardante de crescimento vegetal PBZ (Figura 2A).

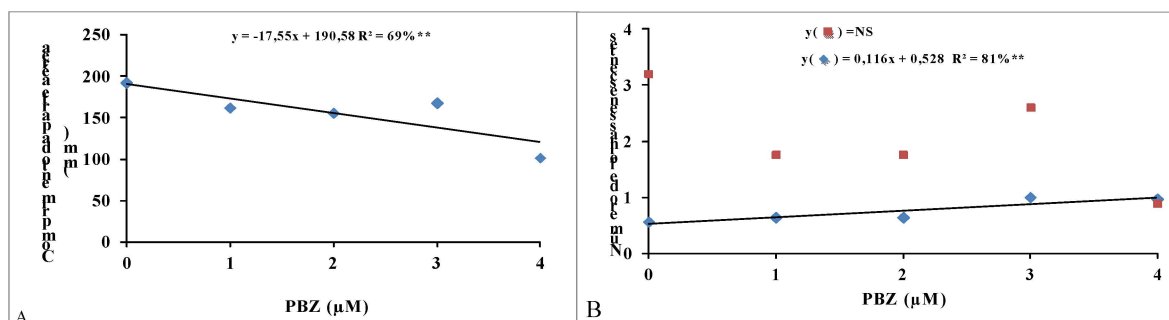


Figura 2– Efeito das diferentes concentrações de PBZ (Paclobutrazol) sobre comprimento da parte aérea (A) e efeito de diferentes concentrações de Paclobutrazol (PBZ) em função da temperatura 25 (■) e 18 (◆)°C sobre o número de folhas senescentes (B) de *Erythrina velutina*, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM (\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

Foi observado redução de 47,21% para comprimento da parte aérea, quando acrescido ao meio de cultura 4μM de PBZ, o que provavelmente está associado à inibição da síntese de giberelina, hormônio que atua na extensão da parede e alongamento celular (TAIZ & ZAIGER, 2009).

A ação do BPZ inibindo o processo de crescimento vegetal foi relato por FERNANDES (2004) no cultivo de limoeiro Volkameriano, estes constataram que o aumento da concentração deste regulador de crescimento vegetal PBZ promoveu decréscimo no comprimento dos caules. Efeito positivo também foram relatados por Souza et al. (2010), para as cultivares de banana ‘Prata-Anã’ e ‘FHIA 01’ inibindo o crescimento das plantas.

Para comprimento da parte aérea em função da temperatura observou-se comportamento semelhante à concentração de PBZ. Notou-se decréscimo para comprimento da parte aérea quando houve redução da temperatura, a 25°C obteve-se média 163,86 mm e média 147,11mm na temperatura de 18°C (Figura 3A).

A redução 10,22% no comprimento da parte aérea promovida pela diminuição da temperatura, provavelmente está associado a uma translocação mais lenta de carboidratos devido à exposição a temperaturas mais amenas. Resultados semelhantes foram observados

por PEDROSO et al. (2010), os autores verificaram no cultivo de plantas *Vriesea inflata* que em baixas temperaturas houve uma redução no crescimento das plantas observando na temperatura de 15°C média de 8,7mm e 28,0mm na temperatura de 28°C.

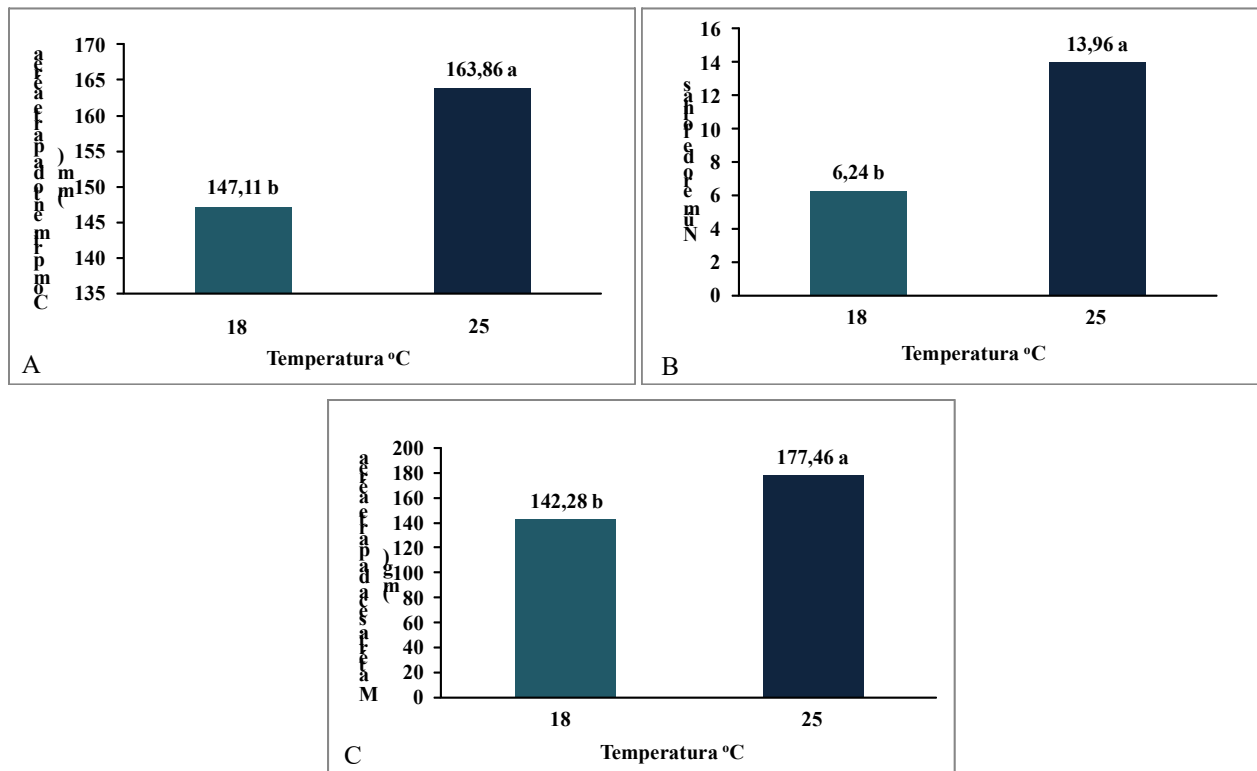


Figura 3– Efeitos da temperatura sobre comprimento da parte aérea (A); número de folhas (B) e matéria seca da parte aérea (C) de *Erithryna velutina*, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM (Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey e ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey). Feira de Santana, BA, 2012.

Para variável número de folhas, notou-se decréscimo em relação ao fator temperatura, registrando média 13,96 folhas por explante na temperatura de 25°C e a média 6,24 folhas por explante na temperatura de 18°C (Figura 3B).

A diminuição da temperatura promoveu redução de 55,3% para número de folhas, o que possivelmente foi uma resposta ao estresse submetido. Resultado este semelhante ao reportado por PÉREZ et al. (2001) com *Festuca arundinaceae* Schreb. cv. Tima, a redução da temperatura de 25°C a 12 °C causou uma redução no crescimento e na área foliar das plantas. PEDROSO et al. (2010), verificaram no cultivo de plantas *Vriesea inflata* em baixas temperaturas redução no número de folhas, observado na temperatura de 15°C uma média de 8,77 folhas e 9,50 folhas na temperatura 28 °C.



Em relação ao número de folhas senescentes na temperatura de 25°C não houve modelo matemático que se ajustasse para essa variável. Já na temperatura 18°C o modelo que melhor se ajustou para essa variável foi à equação linear crescente em relação às concentrações de PBZ (Figura 2B).

Foi verificado acréscimo de 46,67% para número de folhas senescentes indicando que o aumento do número de folhas senescentes é proporcional ao aumento da concentração de PBZ e diminuição da temperatura.

As folhas de *E. velutina* apresentaram coloração verde escura em ambas as temperaturas (dados não mostrados), o que pode estar associado a um maior conteúdo de clorofila, uma vez que o PBZ ao bloquear a produção das giberelinas, permite maior alocação dos compostos intermediários da síntese de giberelinas para a produção de maior quantidade de fitol, parte essencial da molécula de clorofila e responsável pelo aumento desta (CHANEY, 2004).

Ao analisar a variável matéria seca da parte aérea representada pela equação linear ( $p < 0,01$ ) descendente em função das concentrações de PBZ, notou-se decréscimo da matéria seca da parte aérea em 64,16% à medida que se aumentou as concentrações de PBZ (Figura 4A).

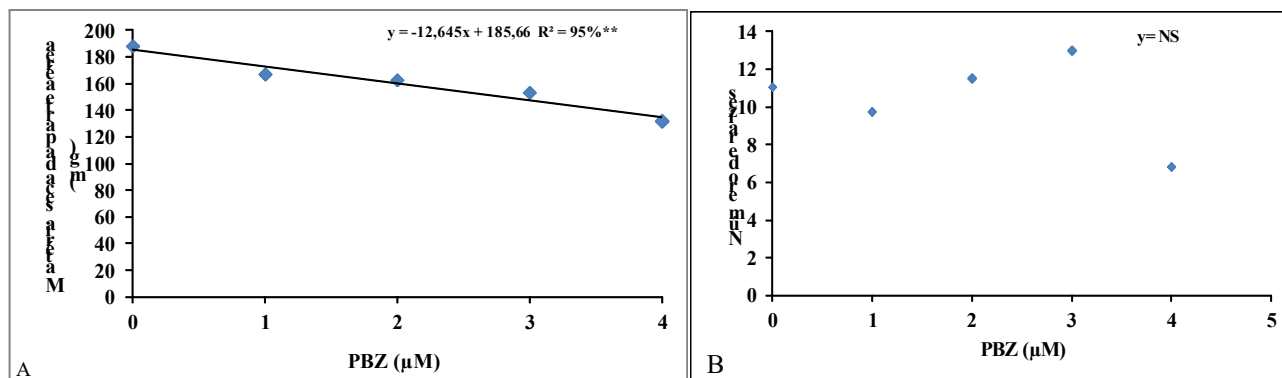


Figura 4– Efeito das diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) sobre matéria seca da parte aérea (A) e número de raízes (B) de *Erythrina velutina*, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM (\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>NS</sup>Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F). Feira de Santana, BA, 2012.

Isso significa que ao aumentar as concentrações de PBZ houve uma diminuição na incorporação de carbono que pode ser atribuída à diminuição da quantidade total de açúcares induzido pela ação do PBZ (MEHOUACHI et al., 1996). Resultados similares foram registrados para *Anadenanthera colubrina*, em que verificou-se redução na matéria seca da parte aérea quando foi utilizada a maior concentração de PBZ (13,6 μM) em 32,9% em comparação ao controle (NEPOMUCENO et al., 2007).

Para matéria seca da parte aérea em relação à temperatura, foi observado decréscimo da matéria seca da parte aérea. Na temperatura de 25°C foi registrado média de 177,46mg e 142,28mg na temperatura de 18°C (Figura 3C).

Foi registrado redução de 19,82% da matéria seca da parte aérea em relação a diminuição da temperatura, possivelmente porque temperaturas mais baixas tornam o metabolismo das culturas mais lento. PEDROSO et al.(2010), verificaram no cultivo de plantas *Vriesea inflata* redução de 81,33% da matéria seca da parte aérea quando submetidas a temperatura de 15°C em comparação a temperatura de 28°C.

Para variável número de raízes não houve modelo matemático que se ajustasse para essa variável (Figura 4B). Esses resultados discordam dos reportados por SOUZA et al. (2010), que registram para as cultivares banana ‘Prata-Anã’ e ‘FHIA 01’, aumento no número de raízes, para ambas as cultivares quando acrescido ao meio o regulador de crescimento vegetal PBZ.

Foi possível, por meio dos resultados obtidos, observar o crescimento mais lento das culturas quando utilizado 4µM de PBZ e redução da temperatura a 18°C.

#### 4. CONCLUSÃO

O crescimento mais lento das culturas foi observado na temperatura de 18°C.

O aumento das concentrações de sacarose até 175,28Mm não foi suficiente para reduzir o crescimento das plantas, sendo necessário novos estudos com concentrações maiores de sacarose ou outros agentes osmóticos.

O aumento gradativo das concentrações de PBZ promoveu o crescimento mais lento das culturas, indicando que concentrações maiores devem ser avaliadas em novos estudos.

A redução da temperatura indicaram crescimento mais lento das culturas em *E. velutina*.

## 5. REFERÊNCIAS

- AMARAL, Lincoln. Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis. 2005. **Dissertação** (Mestrado em Melhoramento Genético) Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 186-191, 2002.
- CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.717-720, 2004.
- CHAMPAGNAT, P. Dormance des bourgeons chez les végétaux ligneux. In: CÔME, D. (Ed.). **Les végétaux et le froid**. Paris: Hermann, éditeurs des sciences et des arts, 203-260, 1992.
- CHANEY, W. R. Paclobutrazol: more than just a growth retardant. In: **PRO-HORT CONFERENCE**, Peoria, Illinois. 5.p, 2004.
- DIGNART, S. L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p. 780-787, 2009.
- DUMET, D. et al. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, n. 14, p. 243-250, 1993.
- EL-OTMANI, M. et al. Plant growth regulators in citriculture: world current uses. **Critical Reviews in Plant Science**, [S.l.], v. 5, p. 395- 447, 2000.
- FERNANDES, Antonio Resendes. Crescimento de plântulas de limoeiro ‘volkameriano’ submetidas a doses de paclobutrazol e ácido giberélico. 2004. 50 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) – UFV, Viçosa, Minas Gerais.
- FERREIRA, DANIEL FURTADO . SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v. 6, p. 36-41, 2008.
- FLETCHER, R. A. et al. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, v.24, p.55- 138, 2000.
- FRANÇA, S.C. et al. [ORG]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 2007.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.
- GIULIETTI, A.M; QUEIROZ, L.P. **Recursos genéticos do semiárido nordestino**. Instituto do Milênio do Semiárido. v.5. Recife-PE: IMSEAR, 2006.

- LLOYD, G & MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendronn* ssp. **HortScience**, Alexandria, v.15, p.415, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Nova Odesseia: Ed. Plantarum. 1992.
- MEHOUACHI, J. et al. Effects of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings. **Journal of Horticultural Science**, v.71, p.747-754, 1996.
- METIVIER, J.R. Dormência e Germinação. In: FERRI, M.G. (Ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. São Paulo: E.P.U, v.2, 1985. p. 343-392.
- NEPOMUCENO, C. F. et al. Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v.33, n.3, p.481-490, 2009.
- NUNES, C. F. et al. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p. 9-14, 2008.
- PASQUAL, M. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de Tangerineira “Poncã”: concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, v.48, pag. 181-189, 2002.
- PEDROSO, A. N. V. et al. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, p.407-414, 2010.
- PÉREZ, P. et al. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. **Physiology Plantarum**, v.112, p.478-486, 2001.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 501-531, 2000.
- SARKAR, D. et al. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.221-227, 2005.
- SOUZA, D. S. et al. **Micropropagação das bananeiras ‘PRATA-ANÃ’ e ‘FHIA 01’ a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol**. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 561-570, 2010.
- TAIZ, L & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, p.849, 2009.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. (1998) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C. et al. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CBPH, 1998.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos para obtenção de plantas é vantajoso para sistema de micropropagação, uma vez que produz duas vezes mais gemas laterais e brotos uniformes.
- É possível a regeneração dos explantes embrião zigótico e plúmula na concentração 4,0 $\mu$ M de BAP.
- O regulador de crescimento BAP na concentração de 20,03 $\mu$ M proporcionou os melhores resultados para indução de brotos a partir de plantas germinadas de embriões zigóticos.
- É possível obter calos friáveis em meio MS contendo 10,65 $\mu$ M da auxina 2,4-D.
- Os calos induzidos a partir de embriões zigóticos de *E. velutina* devem ser transferidos para meio de subcultivo no período entre o 15<sup>o</sup> até o 21<sup>o</sup> dia de cultivo.
- Os calos cultivados durante 27<sup>o</sup> dia apresentam redução de redução do AR e AST.
- É possível observar a presença de células em divisão e amiloplastos nos calos no 21<sup>o</sup> dia de cultivo.
- Os segmentos foliares obtiveram melhor resposta para formação de calos friáveis.
- Foi observado crescimento mais lento das culturas na temperatura de 18°C.
- Concentrações maiores de agentes osmóticos e PBZ devem ser avaliadas em novos estudos.