



**INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOS EM
EXPLANTES FOLIARES DE PEQUIZEIRO
(*Caryocar brasiliense* Camb.)**

FLÁVIA DE SOUZA LIMA LANDA

1999

SECRET

SECRET

46441
13188MFN.

FLÁVIA DE SOUZA LIMA LANDA

INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* Camb.)

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

Orientador

Prof. Renato Paiva

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



46441

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1999

BIBLIOTECA CENTRAL

N.º CLAS ^{FLA} 7634.973166

LAN

lud

N.º R. GISTRO 46441

DATA 10.06.1999

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

Landa, Flávia de Souza Lima

Indução *In Vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar
brasiliense* Camb.) / Flávia de Souza Lima Landa. – Lavras : UFLA, 1999.
73 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Pequi. 2. *Caryocar brasiliense*. 3. Calo. 4. Cultura de tecido. 5. RAPD
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973166
-63153

FLÁVIA DE SOUZA LIMA LANDA

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE
PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

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

APROVADA em 09 de fevereiro de 1999

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

Edilson Paiva

EMBRAPA/CNPMS



Renato Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À Fernandinha, minha filha

Ao Giovanni, meu marido

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

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

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador Renato Paiva, pela confiança em mim depositada.

Aos professores do Departamento de Biologia e em especial aos professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Evaristo, pelo apoio e convívio.

As amigas Flávia, Solange e Gabriela, pelo convívio e amizade, que resistiu até a “Métodos” .

Aos demais colegas de curso, pelos bons papos nos momentos de folga.

À Josi, pela amizade e incentivo nas horas em que as dificuldades, com a espécie escolhida, pareciam mais fortes do que a determinação.

À professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, do Departamento de Agricultura da UFLA, pelas sugestões dadas.

À professora Giovana Augusta Torres, do Departamento de Biologia da UFLA, pela forma prestativa com a qual sempre me recebeu e pelos preciosos conselhos dados.

Ao professor Júlio Bueno Filho, do Departamento de Ciências Exatas da UFLA, pelo planejamento dos experimentos e análise estatística dos resultados.

À Lena, Tanham, Mauro e Joel, pela ajuda nas horas certas.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pelo atendimento.

Ao Dr. Edilson Paiva, por permitir que parte deste trabalho fosse realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo (EMBRAPA - CNPMS).

À Flávia, Miguel e Bira (EMBRAPA), pela ajuda na interpretação dos resultados e nas atividades de laboratório.

Aos demais funcionários do Núcleo de Biologia Aplicada (EMBRAPA-CNPMS), pelo convívio e ótimo ambiente de trabalho.

À Estação Florestal de Experimentação do IBAMA (EFLEX - Paraopeba), pela doação de mudas de pequizeiro.

A todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Flávia de Souza Lima Landa, filha de Raul Soares de Souza Lima e Edna Siqueira de Souza Lima, nasceu em Belo Horizonte no dia 16 de abril de 1967. No início da adolescência mudou-se com a mãe para Visconde do Rio Branco (MG), onde concluiu o 1º e 2º graus em uma escola pública estadual. Em 1985 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, curso este que concluiu em 1989. Já como bióloga, prestou serviços na área de levantamento florístico, por um ano e meio, para empresas que mantinham atividades na região do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, onde conheceu a pobreza, mas também a hospitalidade desse povo. No ano de 1991 mudou-se para a Holanda com o marido, sem imaginar que esta experiência de “conquistar” outro país, cultura e idioma pudesse revelar sentimentos, conceitos e preconceitos até então desconhecidos. Lá fez um estágio na Empresa-escola Leerbedrijf in Tuinbouw (Waddinxveen). Através desta empresa, teve a oportunidade de tomar um primeiro contato com a cultura de tecidos, surgindo aí, o interesse por esta área de estudo. Participou ainda, de um curso de Taxonomia de Plantas Tropicais na Universidade de Wageningen e obteve um certificado de proficiência da língua holandesa pela Nederlandse Taalunie. De volta ao Brasil, interrompeu temporariamente suas atividades profissionais, para se dedicar a família que havia aumentado. Retomou o trabalho ministrando aulas em 5 módulos dos Cursos de Licenciaturas (Ciências) Emergenciais pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Ingressou no curso de mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras em 1996, curso este que agora se encerra com a apresentação desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Obtenção das mudas.....	13
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	14
3.2.1 Indução de calos.....	14
3.2.2 Manutenção de calos I.....	16
3.2.3 Manutenção de calos II.....	17
3.2.4 Indução de friabilidade em calos de pequizeiro.....	19
3.2.5 Indução de calos a partir de folhas obtidas de diferentes plantas e posição dentro das plantas.....	21
3.2.6 Estudo do crescimento de calos de pequizeiro.....	23
3.3 Estudo de variabilidade genética através de marcadores RAPD	24
3.3.1 Material botânico.....	24
3.3.2 Isolamento de DNA genômico.....	25
3.3.3 Amplificação do DNA.....	26
3.3.4 Análise dos padrões de bandas.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Experimentos <i>in vitro</i>	29
4.1.1 Indução de calos.....	29
4.1.2 Manutenção de calos I e II.....	34
4.1.3 Indução de friabilidade em calos de pequizeiro.....	40

4.1.4 Indução de calos a partir de folhas obtidas de diferentes plantas.e posição dentro das plantas.....	43
4.1.5 Estudo do crescimento de calos de pequiizeiro.....	47
4.2 Estudo de variabilidade genética através de marcadores RAPD	49
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	67

RESUMO

LANDA, F. de S.L. *Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequizeiro (Caryocar brasiliense Camb.)* Lavras: UFLA, 1999. 73p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

Visando determinar uma metodologia para o estabelecimento *in vitro* do pequizeiro, procedeu-se a indução e formação de calos a partir de explantes foliares. O uso de meio WPM suplementado com as combinações de 2,22 μM BAP + 10,74 μM ANA e 4,44 μM BAP + 10,74 μM ANA, mostrou-se adequado para indução e formação de calos a partir de segmentos foliares. Explantes mantidos na ausência de luz, apresentaram maior formação de calos em relação aos explantes mantidos na presença de luz. Os calos formados apresentaram coloração diferenciada variando entre branco, branco-amarelado ou marrom. Foi observada também formação de raízes a partir do calos ou diretamente do explante. Não foi observada formação de calos com aspecto friável. O uso de extrato de malte no meio de cultura favoreceu o subcultivo dos calos e os resultados indicaram que a repicagem deve ser feita com intervalos de 45 dias. O estudo da variabilidade genética através de marcadores RAPD, indicou uma proximidade genética entre os indivíduos, sugerindo que as diferenças observadas no comportamento *in vitro* se devam mais a fatores ambientais e/ou fisiológicos do que a fatores genéticos.

* Orientador: Renato Paiva - UFLA

ABSTRACT

LANDA, F. de S.L. *In vitro* induction of callus on leaf explantes of pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Lavras: UFLA, 1999. 73p. (Dissertation - Agronomy/Plant Physiology)*

With the objective to determine a methodology for the *in vitro* establishment of pequiizeiro, leaves were used as source of explantes for the induction of callus formation. The use of WPM medium supplemented with the combinations of 2.22 μM BAP + 10.74 μM NAA or 4.44 μM BAP + 10.74 μM NAA were able to induce callus formation on leaf explantes. Explantes maintained in the absence of light showed higher callus formation. The formed callus presented white, yellowish or brown coloration. No formation of friable callus was observed. The use of barley extract favored callus subculture which should be performed at each 45 days interval. The studies of genetic variability through RAPD indicated genetic proximity among the analysed individuals suggesting that different explant behaviors observed *in vitro* were due to environmental and/or physiological rather than genetic factors.

* Guidance: Renato Paiva - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O cerrado é um bioma típico da zona tropical que ocupa cerca de 20% do território nacional, compreendendo o sul do Mato Grosso, os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, oeste da Bahia e o Distrito Federal (Eiten,1993). Estende-se ainda para fora do Brasil Central em “ilhas” como no sul do Maranhão, norte do Piauí, em Rondônia e um quinto do estado de São Paulo. Em Minas Gerais ocupa mais de 50% do território do estado (Silveira,1989).

Levantamentos florísticos realizados em regiões de cerrado mostraram uma grande riqueza em espécies, apesar da homogeneidade fisionômica da vegetação (Silva Júnior,1984).

O modo desordenado e a velocidade assustadora de como as áreas de cerrado vêm sendo devastadas dificultam a realização de estudos de levantamento tanto da fauna quanto da flora, acarretam ainda a perda de material genético e inviabilizam estudos sobre conservação e aproveitamento sustentável de espécies nativas.

Dentre as espécies vegetais ocorrentes no cerrado podemos citar o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), uma espécie arbórea de grande interesse sócio-econômico. Além de apresentar um fruto de alto valor nutritivo e madeira de boa qualidade a qual é explorada de forma extrativista para subsistência ou comercializado para indústrias, esta espécie sofre pressões da expansão das fronteiras pecuárias e agrícolas.

Este tipo de ação antrópica traz risco para a sobrevivência da espécie. Uma alternativa seria a implantação de plantios comerciais e conservação de

germoplasma. Entretanto, não são conhecidos atualmente plantios comerciais de pequizeiro em Minas Gerais e em outros Estados.

* Uma das principais barreiras para a implantação e a conservação dos recursos genéticos do pequizeiro é a ocorrência de dormência e a inexistência de domínio de técnicas de cultivo e de estudos sobre as condições de armazenagem de suas sementes.

Assim, a cultura de tecidos surge como uma importante ferramenta de propagação, a qual vem sendo utilizada com sucesso em várias espécies. Entretanto, problemas como oxidação, contaminação e variabilidade genética em plantas nativas podem representar uma barreira ao processo de estabelecimento de propagação *in vitro* de espécies lenhosas.

Desta forma este trabalho teve como objetivos: ① promover o estabelecimento *in vitro* do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), através da formação de calos em segmentos foliares, e ② verificar a presença de variabilidade genética no material, através de técnicas de biologia molecular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Desde a primeira referência a uma espécie pertencente à *Caryocaraceae*, *Caryocar nuciferum* sob a denominação de *Amygdala guyanensis* (Clusius, 1605 citado por Prance e Silva, 1973), os membros desta família ocuparam diversas posições sistemáticas, estando atualmente incluídos na ordem *Theales* junto com famílias como *Guttiferae*, *Theaceae*, *Ochnaceae*, *Maregravinaceae*, dentre outras (Cronquist, 1968 citado por Prance e Silva, 1973).

A família *Caryocaraceae* compreende 26 espécies agrupadas em 2 gêneros: *Caryocar* L., que engloba 16 espécies e *Anthodiscus* G. F. W. Meyer (Araújo, 1995; Barradas, 1972). O gênero *Caryocar* engloba muitas espécies no Brasil, quase todas árvores de grande porte (Heringer, 1970).

Dentre estas podemos citar *Caryocar brasiliense* Camb., popularmente conhecido como pequi, piqui, pequizeiro, pequi-do-cerrado, ou pequihi (Ribeiro, Proença e Almeida, 1986; Heringer, 1970). Existem porém, outras espécies como *C. nuciferum* L. e *C. villosum* (Aubl.) Pers sob a mesma denominação popular.

O pequi (FIGURA 1) é uma árvore de ampla ocorrência em cerrados (*latu sensu*) do Distrito Federal e dos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Bahia e Piauí (Ribeiro, Proença e Almeida, 1986; Araújo, 1995), com um porte médio de 3m de altura, mas podendo atingir 8m no cerradão e 1m em áreas de campo sujo. As folhas são trifolioladas, de filotaxia oposta com bordas onduladas. Geralmente apresenta queda foliar na época seca e de acordo com Soave e Silva (1993) a queda foliar em *C. brasiliense* parece estar relacionada com temperatura e baixa precipitação ou, ainda, a redução do fotoperíodo. As flores são hermafroditas, brancas com estames numerosos. A floração ocorre, geralmente, entre junho e dezembro

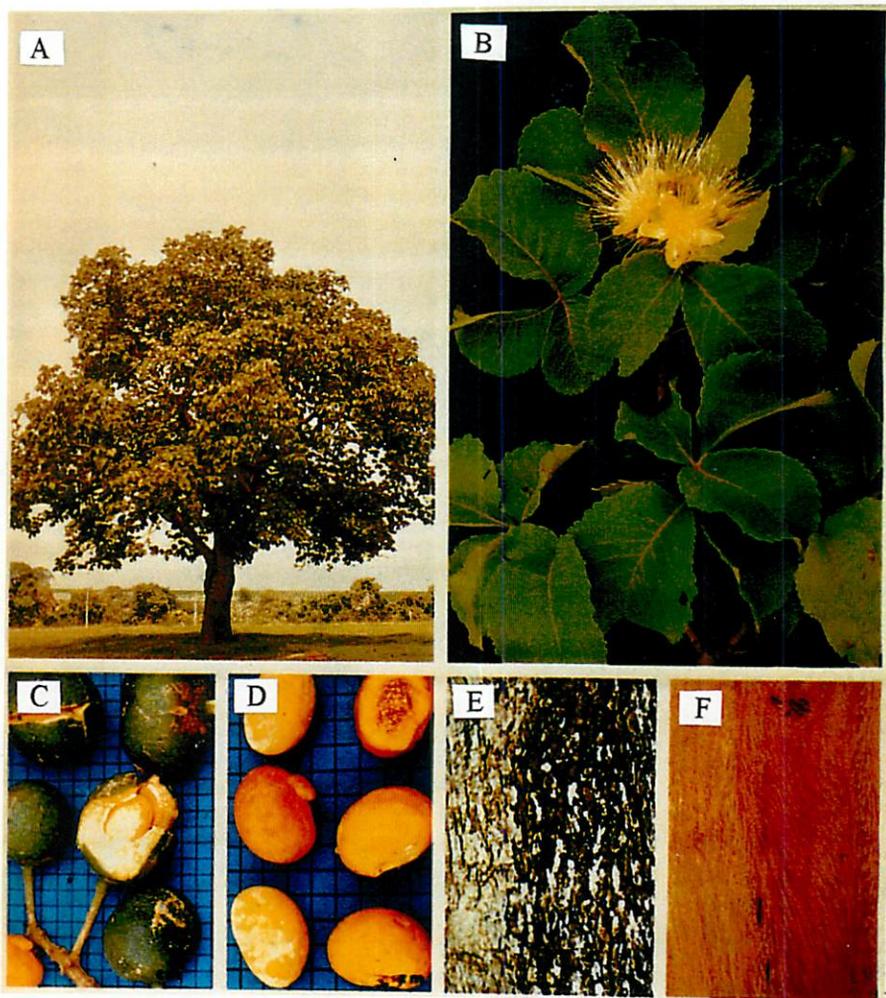


FIGURA 1: Aspecto visual de uma planta adulta de pequi (*C. brasiliense*) (A), detalhe dos ramos (B); frutos (C); putámens (D); tronco (E) e madeira (F). Fonte: Lorenzi, 1992

(Barradas, 1972; Ribeiro, 1980; Ribeiro, Proença e Almeida, 1986; Melo,1987). Apresenta frutos do tipo drupa, arredondados ou com lóbulos em função do número de pequis ou putâmens (de 1 a 4), que são as unidades de dispersão (Melo,1987; Barradas, 1972). Uma fina casca de cor verde acinzentada constitui o epicarpo. Com o desenvolvimento do fruto o mesocarpo torna-se heterogêneo, apresentando duas regiões distintas denominadas mesocarpo externo e interno (Barradas, 1971 citada por Melo, 1987). Este último envolve uma camada de espinhos finos e rígidos originados no endocarpo que é rígido, lenhoso e aloja uma semente oleaginosa e de cor branca denominada de “amêndoa” (Cetec, 1983) (FIGURA 2).

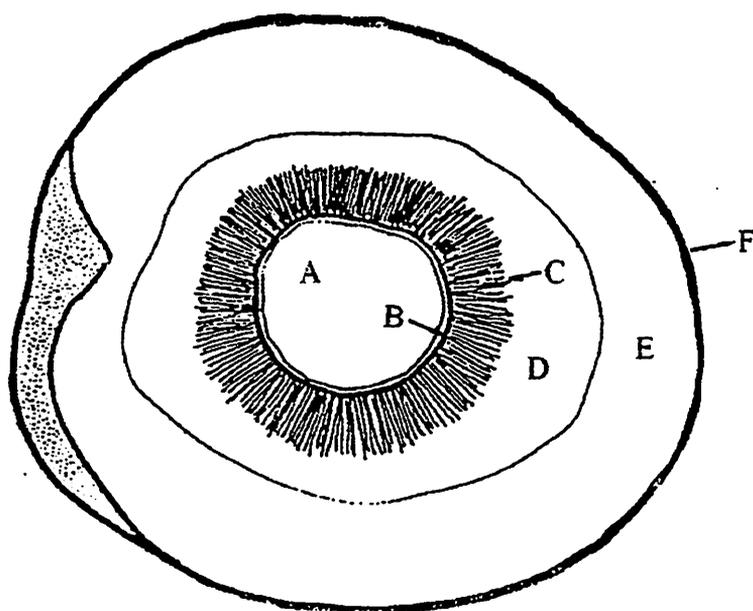


FIGURA 2: Desenho esquemático de um fruto seccionado de *C. brasiliense*. A) semente; B) endocarpo; C) espinhos; D) mesocarpo interno; E) mesocarpo externo; F) epicarpo. Fonte: Araújo, 1994 (modificado)

A frutificação ocorre geralmente de agosto a março, dependendo das condições locais onde a espécie se encontra. É uma espécie tolerante ao alumínio, mas não acumula este elemento (Haridasan, 1982 citado por Araújo, 1994). Segundo Forni - Martins, Pinto - Maglio e Cruz (1995) a espécie apresenta número de cromossomos $2n = 46$.

A polinização ocorre através do vento e animais como morcegos, aves, mariposas e abelhas do gênero *Trigonia* (Barradas, 1972; Ribeiro, 1980; Silveira, 1989; Gribel e Hay, 1993).

É uma espécie de grande interesse sócio-econômico chegando a representar, na região de Montes Claros (MG), 54,7% da renda anual dos trabalhadores rurais, quando além do pequi "in natura" estes vendem o óleo. Para o produtor familiar, a comercialização dos frutos chega a contribuir com 17,73% da renda anual e ocupa o terceiro lugar dos produtos que geram renda. Para os varejistas, a venda do pequi contribui com 49,83% na renda anual (Chávez Pozo, 1997).

Os frutos são bastante utilizados na culinária (polpa cozida) pela população local. Além disso, a madeira do pequizeiro por ser bastante resistente é usada de forma diversificada na marcenaria e carpintaria, bem como na fabricação de estacas, pilares, moirões, dormentes, carvão siderúrgico e na indústria civil e naval. Suas folhas são ricas em tanino e o seu extrato alcoólico revela alguma ação contra o câncer, como por exemplo o sarcoma 180. O fruto é rico em vitamina A e E. O óleo extraído das sementes é usado pela indústria de cosméticos (para fabricação de cremes e sabonetes), iluminação, lubrificação e na medicina popular é utilizado no tratamento de problemas respiratórios (Almeida Silva, 1994; Brasil, 1985; Ribeiro, Proença e Almeida, 1986; Ribeiro, 1987; Araújo, 1994; Dombroski, 1997; Melo, 1987).

Apesar de seu grande valor econômico e social, estudos relacionados à propagação do pequiizeiro são ainda escassos ou com pouco sucesso.

Segundo Miranda (1986) e Melo e Gonçalves (1991) o pequiizeiro apresenta problemas no processo de propagação devido a ocorrência de dormência de suas sementes, o que dificulta a produção de mudas. Várias foram as tentativas de quebra da dormência, mas os resultados apresentados não foram satisfatórios. Autores como Melo (1987), Miranda et al. (1988) e Araújo (1994) observaram que a quebra da dormência é difícil visto que sua causa não é conhecida. Dombroski (1997) no entanto, observou em seus estudos que o endocarpo provoca restrição na germinação. Sua remoção total e embebição da semente em solução com 1,44 mM de GA₃ proporcionou uma taxa de germinação de 68,4%. Estes resultados são bastante superiores aos 20% conseguidos por Melo (1987) trabalhando com sementes isoladas. A utilização da giberelina GA₃ como estimulador de germinação tem sido verificada em várias espécies.

A propagação assexuada geralmente é vista como uma alternativa a propagação de espécies que apresentam dificuldade por via sexuada.

Estudos realizados por Miranda (1986), utilizando técnicas de propagação como alporquia e estacas, não apresentaram resultados satisfatórios com relação à regeneração. Já Silva e Fonseca (1991), apresentando resultados preliminares de seus estudos, citam a utilização da enxertia por garfagem lateral e de topo em fenda na produção de mudas de pequiizeiro.

Nos últimos anos, a cultura de tecidos tem sido considerada uma técnica bastante eficaz na propagação de várias espécies.

Segundo Pierik (1985) os métodos clássicos de reprodução *in vivo* são lentos, difíceis, caros e muitas vezes completamente inviáveis. Desde a descoberta de que as plantas podem ser clonadas mais rapidamente *in vitro* do que *in vivo*, os conhecimentos sobre a propagação vegetativa *in vitro* têm crescido rapidamente.

Para este autor, as principais vantagens da propagação *in vitro* são o pequeno espaço utilizado em relação ao grande número de mudas produzidas, a obtenção de plantas livres de patógenos e de clones de difícil propagação, e a possibilidade de produção de mudas durante todo o ano.

A propagação *in vitro* das plantas pode ser feita por via direta ou indireta (via indução e formação de calos), podendo esta última ser considerada como um método potencial de propagação, caso as variações genéticas (mutações) não atinjam valores percentuais elevados (Pierik, 1985).

Entende-se por calos, um tecido tumoral, parcialmente organizado, que geralmente surge sobre feridas de órgãos ou tecidos diferenciados (Pierik, 1985) como resposta à lesões químicas ou físicas.

Pesquisas realizadas com calos formados a partir de fragmentos de caules, folhas e raízes são realizadas principalmente para determinar as condições de cultura *in vitro* que os explantes requerem para sobreviver e crescer (Siqueira e Inoue, 1992), para estudar o desenvolvimento celular, para explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, para obter suspensão celular e ainda para a propagação com a formação de gemas ou embriões somáticos.

A aplicação da cultura de tecidos em plantas lenhosas tem proporcionado o estabelecimento *in vitro* através da formação de calos em espécies como amoreira (Paiva Neto, 1996), *Hypericum brasiliense* (Cardoso e Oliveira, 1996), castanheira - do - Brasil (Camargo, 1997) e a regeneração *in vitro* de *Kielmeiera coriacea* (Arellano e Pinto, 1993), *Sesbania* spp. (Yan - Xiu, Dun - Yi e Harrison, 1993) e do barbatimão (*Stryphnodendron polyphythum*) (França et al., 1995).

A cultura de tecidos de plantas é geralmente dependente da adição de reguladores de crescimento e de outras substâncias promotoras do crescimento no meio de cultivo. As auxinas, citocininas e a interação auxina - citocinina são normalmente, consideradas os reguladores de crescimento mais importantes para

a regulação do crescimento e desenvolvimento *in vitro*. As auxinas, dentre outras funções, participam de processos como a expansão celular, iniciação da divisão e promoção de diferenciação vascular. As citocininas geralmente estimulam a divisão celular, quebra da dormência de gemas laterais e indução da formação de gemas adventícias. A divisão celular é regulada pela ação conjunta das auxinas e citocininas, cada uma influenciando numa determinada fase do ciclo celular. As auxinas afetam a replicação do DNA, enquanto as citocininas parecem exercer algum controle sobre os eventos que levam a mitose e citocinese. Desta forma os níveis de auxinas e citocininas em culturas *in vitro* são balanceados e controlados. Entretanto, as respostas de células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* podem variar de acordo com as condições da cultura, do tipo de explante e do genótipo (Gaspar et al., 1996).

No caso específico de plantas lenhosas, alguns fatores como contaminação, liberação de substâncias oxidantes no meio, bem como a grande variabilidade genética existente dificultam os estudos de propagação *in vitro*. Além disso, a frequência de regeneração *in vitro* geralmente diminui em função da idade da fonte de explantes (Rao e Venkateswara, 1985). A influência do genótipo sobre o comportamento *in vitro* e/ou capacidade de regeneração é, muitas vezes, determinante para o sucesso de cultivos *in vitro* (Abe et al., 1991; Dornelles et al., 1997a; Dornelles et al., 1997b; Khanna e Raina, 1998 e Litz et al., 1998).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular disponíveis são capazes de determinar a variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, detectam polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Estes marcadores, segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tais como a identificação de

genótipos, avaliação de germoplasma, mapeamento genético e análise filogenética.

Os diferentes tipos de marcadores moleculares podem ser utilizados como marcadores genéticos. Entende-se por marcador genético todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso, como no caso de proteínas e características morfológicas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentes as regiões expressas ou não do genoma), cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas, e que possui comportamento de acordo com as leis básicas da herança de Mendel (Valois, Salomão e Allen, 1996).

Os marcadores moleculares como o RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição e o PCR - Reação da polimerase em cadeia e sua derivação, o RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso surgiram em decorrência dos conhecimentos adquiridos com as técnicas de sequenciamento de DNA (Cloutier e Landry, 1994).

A técnica de RAPD, desenvolvida simultaneamente por Welsh e McClelland, (1990) e Williams et al. (1990), consiste em usar “primers” de sequência arbitrária para a amplificação de fragmentos de DNA, com a utilização de quantidades reduzidas (nanogramas) de DNA, sem a necessidade de conhecimento prévio de sua sequência. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), o RAPD veio democratizar a análise de polimorfismo nuclear, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies menos tradicionais.

Para uma melhor visualização dos relacionamentos entre indivíduos avaliados, a escolha de um coeficiente de similaridade entre dois indivíduos representa o ponto de partida para várias técnicas de análise dos resultados (Krzanowsky, 1988). Similaridade é considerada como um relacionamento simétrico requerendo $S_{ij} = S_{ji}$, onde S_{ij} representa uma medida de similaridade entre o par de genótipos i e j , respectivamente (Sokal e Sneath, 1963). Pa

marcadores do tipo RAPD, são 4 as possíveis observações de comparação entre dois genótipos baseados na presença (1) e ausência (0) de um marcador para cada genótipo de acordo com a TABELA 1.

TABELA 1: Quatro possíveis resultados de comparação de dois genótipos por marcadores RAPD

		Genótipo i	
		1	0
Genótipo j	1	a (1,1)	b (0,1)
	0	c (1,0)	d (0,0)

Análises de agrupamento (Cluster analysis), são frequentemente usadas com a finalidade de reunir, de acordo com algum critério de classificação, as unidades amostrais (indivíduos, locais, etc) em vários grupos, de modo que exista homogeneidade dentro e heterogeneidade entre grupos (Cruz, 1990) e a construção de uma matriz de similaridade ou distância entre os genótipos avaliados viabilizam estas análises (Duarte, 1998). Um dos métodos de construção dos dendrogramas, que são um tipo de agrupamento, é o UPGMA (Unweighted pair-group mean arithmetics). Nele a distância entre dois clusters é a medida da distância entre todos os pares possíveis de indivíduos, um de um grupo e um de outro (Kotz e Johnson, 1985).

Exemplos como a detecção de variação somaclonal em beterrã (Munthali, Newbury e Ford - Lloyd, 1996), caracterização da diversidade genética de cultivares de mandioca (Colombo et al., 1998), determinação parentesco entre taxas brasileiros de *Stylosanthes* SW. (Vieira et al., 1997), diferenciação geográfica e identificação do tipo de embrião em cultivares *Manginifera indica* L. (López - Valenzuela, Martínéz e Paredes - López, 1999) podem ser encontrados na literatura, com relação ao uso de marcadores RAPD.

Segundo Cloutier e Landry (1994) a cultura de tecidos e a biologia molecular iniciaram um sinergismo dinâmico. Enquanto a cultura de tecidos produz sistemas de modelos para estudos de biologia molecular, as técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas para revelar possíveis limitações dos sistemas de cultura de tecidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das mudas

Frutos maduros provenientes do município de Montes Claros (MG), coletados no ano de 1997, foram utilizados como fonte de semente. A casca (epiderme) e parte externa do mesocarpo foi retirada manualmente, restando apenas o putâmem. O putâmem foi então submetido ao método do motor para retirada do mesocarpo interno e espinhos (parte externa do endocarpo).

O método do motor, segundo Dombroski (1997) consiste em acoplar um motor de $\frac{3}{4}$ cv. à um eixo de 60 cm de comprimento formado por uma barra de rosca de $\frac{1}{2}$ " , onde na extremidade livre são colocadas quatro escovas de aço de 3". Com o conjunto montado na vertical, os putâmens foram colocados dentro de um recipiente com água corrente, com capacidade de 18 litros e acondicionado na extremidade das escovas de aço. Os putâmens permaneceram nesta condição até a retirada total dos espinhos, ficando somente o endocarpo rígido e lenhoso que aloja a semente. O endocarpo então, foi partido transversalmente com a ajuda de um esmeril, liberando por completo a semente. Em seguida, as sementes foram colocadas em papel para germinação embebidos numa solução de 500 ppm de ácido giberélico (GA_3), onde permaneceram por 24h à temperatura ambiente. Após 24h na presença de GA_3 as sementes foram transferidas para outro papel para germinação embebido apenas com água destilada, onde permaneceram até a emissão da radícula.

As sementes germinadas foram transferidas para sacos plásticos com capacidade de 3,5 litros contendo como substrato terra: areia: super simples:

cloreto de potássio (2 : 1 : 5 : 2,5). As mudas desenvolvidas foram mantidas em casa de vegetação e viveiro do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Mudas, com 4-5 meses de idade, também foram adquiridas da Estação Florestal de Experimentação do IBAMA em Paraopeba - MG, sendo suas sementes (do ano de 1997) germinadas naturalmente. Estas mudas foram mantidas em sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA.

Pulverizações regulares com o fungicida Benlate (4mg/L) foram realizadas em intervalos de 10 dias.

3.2 Experimentos *in vitro*

3.2.1 Indução de calos

Este experimento teve como objetivo verificar as melhores condições de cultivo para a indução e formação de calos.

Foram utilizados como explantes, segmentos foliares com cerca de 1 cm² retirados de mudas de Montes Claros (MG), com aproximadamente 4 meses de idade.

As folhas permaneceram em água corrente por 16h antes de sofrerem processo de desinfestação, que consistiu em lavá-las 2 vezes com água destilada e 2-3 gotas de detergente neutro; imersão rápida em álcool etílico 70%; imersão em hipoclorito de sódio 30% (v/v) de produto comercial por 15 minutos e 4 lavagens

com água destilada autoclavada. As duas últimas etapas foram realizadas em câmara de fluxo laminar, onde todas as normas usuais para este tipo de trabalho foram adotadas. As folhas permaneceram em água destilada até o momento da inoculação no meio de cultura presente em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio.

O meio de cultura usado foi o WPM (Wood Plant Medium, Lloyd e McCown, 1980, TABELA 1A em anexo) suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. Os tratamentos utilizados foram:

- To: controle (meio sem reguladores de crescimento);
- T1: meio acrescido de $2,22\mu\text{M}$ BAP (benzilaminopurina);
- T2: meio acrescido de $4,44\mu\text{M}$ BAP;
- T3: meio acrescido de $10,74\mu\text{M}$ ANA (ácido naftalenoacético) ;
- T4: meio acrescido de $10,74\mu\text{M}$ ANA e $2,22\mu\text{M}$ BAP;
- T5: meio acrescido de $10,74\mu\text{M}$ ANA e $4,44\mu\text{M}$ BAP.

Os tubos contendo os explantes foram mantidos na ausência de luz e também sob baixa intensidade luminosa ($\text{RAF} = 14\mu\text{Mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz branca fluorescente, com fotoperíodo de 16h de luz) em sala de crescimento com temperatura de 27°C .

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) (Compton, 1994) com 12 repetições por tratamento. Ao final de 60 dias foi feita avaliação visual observando-se o aspecto visual do explante, ou seja, coloração, tamanho, presença de oxidação e/ou raízes e brotações; além da percentagem de calos formados.

3.2.2 Manutenção de calos I

Neste experimento, objetivou-se identificar o melhor meio de cultura para o subcultivo dos calos formados *in vitro* em explantes foliares, utilizando substâncias complexas como extrato de malte, extrato de levedura, água de côco caseína hidrolizada.

Foram usados os calos obtidos através do tratamento com meio WPM acrescido de 10,74 μM ANA e 2,22 μM BAP mantidos na ausência de luz. Esses calos foram submetidos então, aos seguintes tratamentos:

- ☛T1: Meio de indução (meio WPM suplementado com 10,74 μM ANA e 2,22 μM BAP);
- ☛T2: meio WPM sem reguladores de crescimento;
- ☛T3: meio WPM suplementado com 5,37 μM ANA e 1,11 μM BAP;
- ☛T4: meio WPM sem reguladores de crescimento suplementado com 50ml/L de água de côco;
- ☛T5: meio WPM suplementado com 5,37 μM ANA ; 1,11 μM BAP e 500 mg/L de extrato de malte;
- ☛T6: meio WPM suplementado com 5,37 μM ANA ; 1,11 μM BAP e 50 ml/L de água de côco;
- ☛T7: meio WPM suplementado com 5,37 μM ANA ; 1,11 μM BAP e 250 mg/L de extrato de levedura;
- ☛T8: meio WPM suplementado com 5,37 μM ANA ; 1,11 μM BAP e 200 mg/L de caseína hidrolizada.

Ao meio de cultura de todos os tratamentos foi adicionado 3% de sacarose, 0,65 % de ágar e o pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. Após a inoculação, que foi realizada em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio, o material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 27°C, na ausência de luz.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados (DBC) (Compton, 1994) com 5 blocos contendo cada um 8 parcelas com 1 repetição, totalizando 5 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância 5% e Teste de Tukey 5% pelo Proc GLM (General Linear Models Procedure) do programa estatístico SAS (SAS® Institute, 1993). A avaliação foi feita ao final de 30 dias, onde foram observadas a ocorrência de crescimento, oxidação e formação de outras estruturas, tais como, raízes e/ou brotações. À primeira observação foi atribuído um critério de notas, especificado a seguir: ausência de crescimento = 0; pouco crescimento = 1 e muito crescimento = 2.

OBS: Pouco crescimento refere-se à formação de calos sem ocupar toda a superfície do explante inoculado e muito crescimento refere-se à formação de calos ocupando toda a superfície do explante inoculado e suas adjacências.

3.2.3 Manutenção de calos II

Com base nos resultados encontrados no experimento anterior, calos obtidos à partir de explantes foliares provenientes do primeiro par de folhas totalmente expandido abaixo do ápice (mudas de Montes Claros - MG), foram produzidos utilizando-se o meio WPM suplementado com 10,74 µM ANA e 2,22

μM BAP, 3% de sacarose, 0,65% de ágar, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes autoclavagem, foram submetidos aos seguintes tratamentos com ANA e BAP:

►T0: meio WPM suplementado com $5,37 \mu\text{M}$ ANA e $1,11 \mu\text{M}$ BAP;

►T1: meio WPM suplementado com $5,37 \mu\text{M}$ ANA, $1,11 \mu\text{M}$ BAP e 500 mg/L de extrato de malte;

►T2: : meio WPM suplementado com $5,37 \mu\text{M}$ ANA, $1,11 \mu\text{M}$ BAP e 1000 mg/L de extrato de malte;

►T3: meio WPM suplementado com $5,37 \mu\text{M}$ ANA, $1,11 \mu\text{M}$ BAP e 1500 mg/L de extrato de malte.

Ao meio básico utilizado (WPM) foi acrescentado 3% de sacarose, 0,65% de ágar, 100 mg/l de PVP-40, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes autoclavagem. Após a inoculação o material foi colocado na ausência de luz e sala de crescimento com temperatura de 27°C .

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) (Compton, 1994) com 4 blocos contendo cada um 4 parcelas com repetições, totalizando 12 repetições por tratamento. Trinta dias após inoculação foi realizada a avaliação final do experimento, onde se verificou a percentagem de crescimento dos calos formados *in vitro*, de acordo com a fórmula abaixo, onde PF = peso final e PI = peso inicial:

$$\% \text{ cresc.} = \frac{\text{PF} - \text{PI}}{\text{PI}} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância 5% e teste de Tukey 5% pelo Proc GLM do programa estatístico SAS (SAS® Institute, 1993).

3.2.4 Indução de friabilidade em calos de pequiizeiro

Por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, este experimento teve como objetivo promover a friabilidade dos caõs de pequiizeiro para sua posterior utilizaãõ em cultivo de suspensõ de células.

Foram utilizadas como plantas matrizes, mudas de aproximadamente 4-5 meses de idade provenientes do município de Paraopeba - MG.

O primeiro par de folhas totalmente expandido abaixo do ápice foi coletado e mantido em água corrente por 20 h. A seguir foram lavados por duas vezes com água destilada e 2-3 gotas de detergente neutro, imerso rapidamente em soluãõ de álcool etílico 70%, seguido de imersõ em soluãõ de hipoclorito de sódio a 30% (v/v) de produto comercial, por 15 minutos e finalmente lavado por 4 vezes com água destilada autoclavada, permanecendo em água destilada até o momento da inoculaãõ.

O meio básico utilizado foi o WPM, com exceãõ de um dos tratamentos cujo meio foi constituído de NH_4NO_3 (1650 mg/L) e KNO_3 (1900 mg/L) do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) além das outras soluãõs estoque (C, D, E, F, G, Mio-inositol e Glicina, TABELA 1A, em anexo) do meio WPM. Em ambos os casos não foram acrescentados reguladores de crescimento e o meio de cultivo foi suplementado ainda com 0,5 mg/L de Benlate, 3% de sacarose, 0,65% de ágar e pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Os explantes com cerca de 1 cm^2 aí permaneceram em sala de crescimento por 24h, na ausênciã de luz, até serem transferidos para os meios contendo os seguintes tratamentos:

☛T0: controle (meio WPM acrescido de $10,74\mu\text{M}$ ANA e $4,44\mu\text{M}$ BAP);

☛T1: meio contendo NH_4NO_3 (1650 mg/L) e KNO_3 (1900 mg/L) meio MS 100% e o restante das soluções estoque do meio WPM, além 10,74 μM ANA e 4,44 μM BAP;

☛T2: meio WPM suplementado com 9,05 μM 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 4,44 μM BAP;

☛T3: meio WPM suplementado com 18,1 μM de 2,4-D e 4,44 μM BAP

☛T4: meio WPM suplementado com 9,05 μM de 2,4-D e 2,22 μM BAP

☛T5: meio WPM suplementado com 18,1 μM de 2,4-D e 2,22 μM BAP

☛T6: meio WPM contendo 10,74 μM ANA e 4,44 μM BAP suplementado com 200 mg/L de caseína hidrolizada;

☛T7: meio WPM contendo 10,74 μM ANA e 4,44 μM BAP suplementado com 400 mg/L de caseína hidrolizada;

☛T8: meio WPM contendo 10,74 μM ANA e 4,44 μM BAP suplementado com 800 mg/L de caseína hidrolizada;

☛T9: meio WPM contendo 10,74 μM ANA e 4,44 μM BAP suplementado com 1600 mg/L de caseína hidrolizada.

Em todos os meios foi adicionado 3% de sacarose, 0,65% de ágar, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, com temperatura de 26°C.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBD) (Compton, 1994) com 4 blocos contendo 10 parcelas com 3 repetições cada, totalizando 12 repetições por tratamento. A avaliação foi visual e constituiu em observar a formação de calos friáveis, aspecto geral dos explantes (coloração, tamanho e oxidação) e obter a percentagem de crescimento através da mesma fórmula utilizada no experimento anterior (item 3.2.3).

3.2.5 Indução de calos a partir de folhas obtidas de diferentes plantas e posições dentro das plantas.

Em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, este experimento teve como objetivo verificar se a posição das folhas, em cada planta, estava influenciando no comportamento diferenciado observado *in vitro* ou se esta diferença de comportamento ocorria apenas entre plantas.

Foram utilizadas como plantas matrizes mudas (FIGURA 3) formadas à partir de sementes do município de Montes Claros (MG).

Onze plantas foram marcadas e delas foram retiradas o 1º e o 2º pares de folhas totalmente expandidos abaixo do ápice. As folhas permaneceram em água corrente por 16h, sendo em seguida, lavadas duas vezes com água destilada e 2-3 gotas de detergente neutro, seguidas de imersão rápida em uma solução de álcool etílico 70% (v/v), imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 30% (v/v) de produto comercial por 15 minutos e lavadas 4 vezes com água destilada autoclavada, permanecendo em água destilada até a inoculação.

Os explantes com cerca de 1 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio WPM suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. Foram adicionados ao meio os reguladores de crescimento ANA e BAP nas melhores concentrações e combinações obtidas no experimento de indução de calos (item 3.2.1):

- ☛T0: meio sem reguladores de crescimento (controle);
- ☛T1: meio acrescido de 10,74µM ANA e 2,22 µM BAP;
- ☛T2: meio acrescido de 10,74µM ANA e 4,44 µM BAP.

3.2.5 Indução de calos a partir de folhas obtidas de diferentes plantas e posições dentro das plantas.

Em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, este experimento teve como objetivo verificar se a posição das folhas, em cada planta, estava influenciando no comportamento diferenciado observado *in vitro* ou se esta diferença de comportamento ocorria apenas entre plantas.

Foram utilizadas como plantas matrizes mudas (FIGURA 3) formadas à partir de sementes do município de Montes Claros (MG).

Onze plantas foram marcadas e delas foram retiradas o 1º e o 2º pares de folhas totalmente expandidos abaixo do ápice. As folhas permaneceram em água corrente por 16h, sendo em seguida, lavadas duas vezes com água destilada e 2-3 gotas de detergente neutro, seguidas de imersão rápida em uma solução de álcool etílico 70% (v/v), imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 30% (v/v) de produto comercial por 15 minutos e lavadas 4 vezes com água destilada autoclavada, permanecendo em água destilada até a inoculação.

Os explantes com cerca de 1 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio WPM suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. Foram adicionados ao meio os reguladores de crescimento ANA e BAP nas melhores concentrações e combinações obtidas no experimento de indução de calos (item 3.2.1):

- ☛T0: meio sem reguladores de crescimento (controle);
- ☛T1: meio acrescido de 10,74µM ANA e 2,22 µM BAP;
- ☛T2: meio acrescido de 10,74µM ANA e 4,44 µM BAP.



FIGURA 3: Aspecto visual das plantas matrizes de *C. brasiliense* formadas a partir de sementes coletadas de frutos produzidos no ano de 1997 no município de Montes Claros (MG).

Cada par de folha, dentro de cada planta recebeu todos os tratamentos e o modelo experimental utilizado foi:

$$Y_{ij} = M + P_i + V_{(P)j(i)} + T_k + (PT)_{ik} + \delta_{ijk}$$

onde : Y_{ij} : valor observado de cada caráter em estudo, em cada explante;

M : média geral (efeito fixo);

P_i : efeito aleatório da planta i , $i = 1 \dots 11$;

$V_{(P)j(i)}$: efeito fixo do par de folha dentro da planta i , $j = 1 \dots 2$;

T_k : efeito fixo do tratamento k , $k = 1 \dots 3$;

(PT) α_k : efeito aleatório da interação entre a planta i e o tratamento k (análogo ao erro experimental entre parcelas);

δ_{ijk} : erro amostral dentro das parcelas.

Os explantes, num total de 3 repetições por tratamento, permaneceram em sala de crescimento na ausência de luz, com temperatura ambiente de 26° C.

A análise foi feita usando-se a Proc GLM do SAS (SAS® Institute, 1993), tomando-se os SQ tipo III (para corrigir os dados perdidos). Procedeu-se também o teste t para identificar possível diferença entre plantas e o teste de Tukey para avaliar os efeitos de tratamentos testados.

3.2.6 Estudo do crescimento de calos de pequiizeiro.

Este experimento teve como objetivo identificar o período mais adequado para o subcultivo dos calos, através das fases de crescimento.

Para obtenção da curva de crescimento de calos, foram usadas como plantas matrizes mudas de Paraopeba (MG) com cerca de 4-5 meses de idade

O meio usado foi o de WPM contendo 3% de sacarose, 0,65% de ágar e pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. Os explantes permaneceram por 24h em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio, antes da indução do tratamento com $10,74\mu\text{M}$ ANA e $4,44\mu\text{M}$ BAP, em meio sem reguladores de crescimento, mas acrescido de 0,5 mg/L de Benlate.

Foram anotados o peso de matéria fresca inicial de cada explante e a cada 7 dias foram obtidos o peso de matéria fresca de 12 tubos num período de 56 dias. Uma vez pesados, os explantes foram colocados em N líquido e em

seguida transferidos para um freezer vertical Forma Scientific mod. 925 -8 C. Para obtenção do peso de matéria seca, os explantes foram colocados em estufa de secagem FABBE mod. 170 com circulação de ar forçada à 70° C por 48h, período no qual foi obtido o seu peso constante. A construção da curva de crescimento foi realizada com base na média dos 12 tubos, para cada avaliação.

3.3 Estudo de variabilidade genética através de marcadores RAPD

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) do Centro Nacional de Pesquisa do Milho e Sorgo (EMBRAPA/CNPMS), Setor de Lagoas (MG).

3.3.1 Material botânico

Mudas de aproximadamente 5 meses de idade, produzidas a partir de sementes coletadas de frutos produzidos no ano de 1997, no município de Monte Claros (MG), foram utilizadas como fonte de material para extração de DNA. Estas sementes foram extraídas de frutos que vieram em sacos de 60 Kg, sem identificação das plantas de origem.

Foram utilizadas 28 mudas, das quais onze (do nº 1 ao 11) foram fonte de explante para o experimento de indução de calos a partir de diferentes plantas e posições dentro das plantas (item 3.2.5), sendo aqui então, adotada a mesma numeração e seqüência para os demais indivíduos.

3.3.2 Isolamento de DNA genômico

A extração do DNA foi baseada no método de Saghai-Marooof et al., 1984 com algumas modificações. Foram usadas entre 700 e 1400 mg de matéria fresca de folhas jovens.

As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida adicionado 5 ml de tampão CTAB 2% (TRIS HCl 0,2 M pH 7,5; NaCl 1,4 M; EDTA 0,02 M pH 8,0; CTAB - 2 g; β - Mercaptoetanol - 2 ml). O material permaneceu por 90 minutos em banho-maria a 65°C, sendo que a cada 15 minutos sofreu agitação leve, para homogeneização. Depois de percorrido este tempo o material foi mantido a temperatura ambiente por 5 minutos, para abaixar a temperatura, e a ele foi adicionado 2,5 ml de clorofórmio : octanol (24 : 1), sofrendo novamente agitação por 10 minutos, para homogeneização, e então, centrifugado a 1400 g por 10 minutos em centrífuga IEC - CENTRA - CL2. O sobrenadante foi separado e a ele acrescentado 6 ml de isopropanol (- 20° C) para precipitação imediata do DNA, ou então, deixados de um dia para o outro quando isto não ocorreu.

Uma vez precipitado, o DNA foi removido com um anzol de vidro e transferido para um tubo de ensaio de 15 ml contendo 2 ml de TE pH 8,0 (TRIS 0,01 M pH 8,0; EDTA 0,001 M pH 8,0) permanecendo por cerca de 12h a 4° C, para dissolução. Após este período o DNA foi novamente precipitado com 150 μ l de NaCl 5M e 3 ml de álcool etílico, removido com um anzol de vidro e transferido para outro tubo contendo 1 ml de WASH 1 (Álcool etílico - 76 ml, Acetato de sódio 2,5 M - 8 ml), permanecendo nesta solução por no mínimo 30 minutos. Uma segunda lavagem foi feita com WASH 2 (Álcool etílico - 76 ml, Acetato de amônio 1 M - 1 ml), por onde o DNA foi mantido rapidamente, para

finalmente ser transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml contendo cerca 300 μ l de TE pH 8,0.

Uma vez extraído e purificado, o DNA foi quantificado visualmente em gel de agarose. Para isso alíquotas de 2 μ l de DNA, 15 μ l de TE pH 8,0 e 5 μ l de corante DYE (TRIS 0,05 M pH 8,0; Glicerol - 50 %; EDTA 0,005 M pH 8,0; SDS 0,5%; Corante xilene + orange - 0,15 % de cada corante) foram submetidas à eletroforese (50V) em gel de agarose 0,8% e tampão de corrida TAE (EDTA 0,005 mM pH 8,0; TRIS 40 mM pH 8,0; Ácido acético 20 mM). O gel foi corado com solução de brometo de etídio (1 μ g/ml) sob agitação contínua e submetido à luz ultravioleta possibilitando a visualização da qualidade do DNA e estimativa de quantidade.

3.3.3 Amplificação do DNA

Foram testados inicialmente 180 primers pertencentes aos kits Operon B, C, J, L, O, R, S e W. Apenas o material extraído de uma única planta foi utilizado neste teste inicial, sendo adotado, como critério de seleção de primers, a capacidade e a qualidade da amplificação. Os primers selecionados foram então utilizados em todos os indivíduos. As reações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer - Gene Amp PCR System 9600 programado para um primeiro ciclo de 95° C por 1 minuto, 35 ciclos com 3 fases: temperatura de desnaturação de 95° C por 10 segundos, temperatura de anelamento de 36° C por 1 minuto e temperatura de extensão de 72° C por 2 minutos. Foi acrescentado ainda um ciclo final de 72° C por 7 minutos, seguido de 4° C até a retirada das reações do aparelho.

Cada reação (25µl) foi constituída de 9,5 µl de água ultrapura autoclavada, 2,5µl de tampão de PCR (10mM TRIS - HCl ph 8,6; 50mM KCl; 0,01% gelatina; 2 mM MgCl₂) , 1µl de um mix de dNTPs Promega (10mM, sendo 2,5mM de cada nucleotídio), 1µl de primer (4µM), 1 µl de Taq polimerase (1 unidade/µl) e 10µl de DNA (5ng/µl). A Taq polimerase utilizada foi purificada no próprio Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada.

Para verificar a amplificação, as reações foram submetidas a eletroforese a 100V, em gel de agarose 1,2% utilizando-se tampão de corrida TAE. A visualização dos fragmentos amplificados ocorreu da mesma maneira descrita no item 3.3.2.

Foi usado como peso molecular DNA lambda digerido com Bam I, Eco RI e Hind III (Sigma) com fragmentos variando entre 125 e 15.721 Kb.

Para os primers polimórficos, as bandas foram registrados como presença (1) ou ausência (0), para posterior análise.

3.3.4 Análise dos padrões de bandas

A partir da matriz de 0 e 1, foi obtida uma matriz de distância utilizando o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice (Duarte, 1998):

$$S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

onde: a: indica concordância entre o par de genótipos analisados,

b e c: indicam ausência de concordância entre os genótipos analisados.

A distância genética foi calculada subtraindo de 1 o valor da similaridade encontrada.

A representação gráfica foi feita utilizando-se dendrograma construído pelo método UPGMA (Unweight pair-group average), no programa STATISTICA for WINDOWS, v.4.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos *in vitro*

4.1.1 Indução de calos

Foram utilizados ANA e BAP em diferentes concentrações e combinações em explantes foliares de *C. brasiliense*, mantidos na presença e ausência de luz, afim de verificar as melhores condições de cultivo para a formação de calos.

A formação de calos foi detectada 20 dias após a inoculação, tanto nos explantes mantidos na presença de luz (sob baixa intensidade luminosa) quanto os mantidos no escuro. Observou-se que, para este mesmo período, a formação de calos nos explantes mantidos sob iluminação foi maior em relação aos mantidos no escuro. No entanto, a partir do vigésimo dia de inoculação, o material mantido na presença de luz foi-se deteriorando enquanto que os que estavam no escuro permaneceram em melhores condições até a avaliação final aos 60 dias (FIGURA 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Wickremesinhe e Arteca (1993) onde os calos de *Taxus* spp. mantidos num regime de 16h luz / 8h escuro obtiveram menor taxa de sucesso, quando comparados com os calos mantidos na ausência total de luz.

Na FIGURA 4, podemos verificar ainda, que nos tratamentos que continham BAP isolado, nas concentrações de 2,22 μ M e 4,44 μ M (T1 e T2,

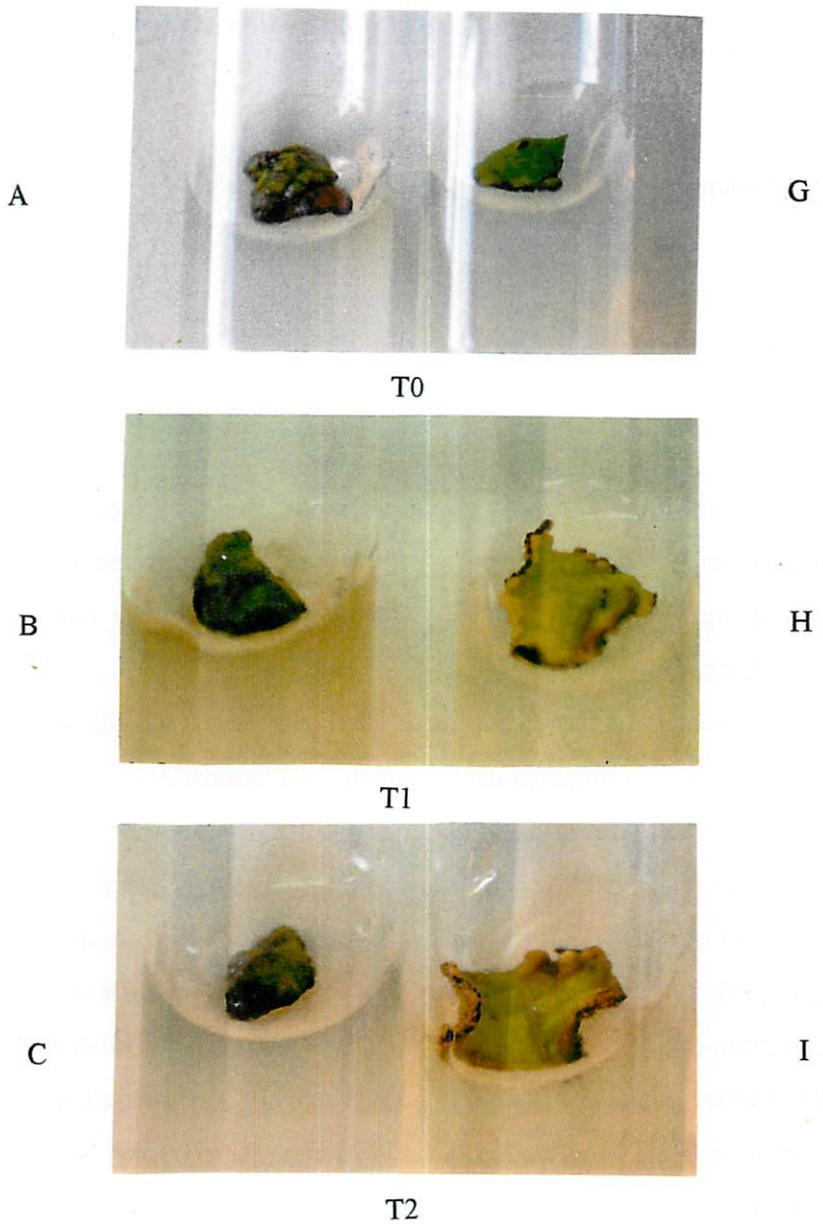


FIGURA 4: Aspecto visual dos explantes foliares de *C. brasiliense* mantidos na presença (A, B, C, D, E e F) e ausência (G, H, I, J, K e L) de luz 60 dias após a inoculação, mantidos na presença de T0 (controle); T1 (2,22µM BAP); T2 (4,44µM BAP); T3 (10,74µM ANA); T4 (2,22µM BAP e 10,74µM ANA); T5 (4,44µM BAP e 10,74µM ANA). (Lavras - UFLA, 1998)

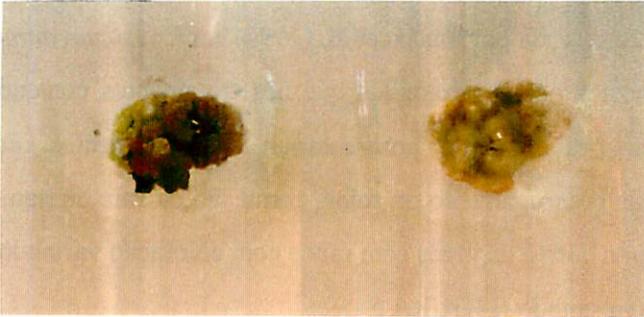
D



J

T3

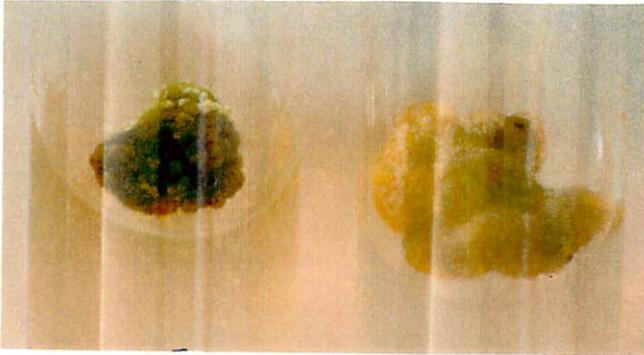
E



K

T4

F



L

T5

FIGURA 4, Cont.

respectivamente) houve pequena formação de calos, sugerindo que o BAP isolado seja capaz de induzir a formação de calos. O efeito do BAP na formação de calos também foi demonstrado em segmentos foliares de castanheira-do-Brasil (Camargo, 1997) e de caqui (Tao e Sugiura, 1992). Segundo Metivier (1986) a divisão celular é a propriedade mais frequentemente associada às citocininas, sendo o BAP uma citocinina sintética altamente ativa. Porém, quando esta citocinina está associada ao ANA (T4: 2,22 μ M BAP e 10,74 μ M ANA; T5: 4,44 μ M BAP e 10,74 μ M ANA) os calos formados apresentam-se maiores, indicando uma interação entre estes reguladores de crescimento. Tal interação também foi observada por Inneco et al. (1995) em *Capsicum annum*.

Podemos observar também que nos tratamentos contendo ANA e BAP em interação, os explantes apresentaram comportamentos diferenciados tais como, apenas o enrugamento da folha, formação de raiz diretamente à partir do explante, calos duros e às vezes com raiz e com coloração variando entre o branco, marrom e acinzentado (FIGURA 5).



FIGURA 5: Comportamento diferenciado de explantes foliares de *C. brasiliense* submetidos à presença de ANA e BAP. (Lavras - UFLA, 1998)

O enraizamento ocorreu naturalmente à partir do 45º dia após a inoculação, no mesmo meio inicial de inoculação, somente nos explantes mantidos na ausência de luz. Calogênese e rizogênese também foram observados por Paiva Neto (1996) trabalhando com tecido foliar de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).

A TABELA 3 indica a percentagem de formação de calos em cada tratamento, nas duas condições de iluminação. Observa-se que todos os explantes mantidos na ausência de luz apresentaram formação de calos superior em relação aos explantes mantidos na presença de luz, com exceção para o meio sem reguladores de crescimento (T0) e o meio acrescido de 10,74µM ANA (T3), que foram iguais em ambas condições de iluminação.

TABELA 3: Percentagem de formação de calos para cada tratamento, em explantes foliares de pequiheiro, submetidos à presença e ausência de luz. (Lavras - UFPA, 1998)

Tratamento	Luz (%)	
	Presença	Ausência
Controle	0	0
2,22µM BAP	16,66	33,33
4,44µM BAP	8,33	41,66
10,74µM ANA	0	0
2,22µM BAP + 10,74µM ANA	66,66	83,33
4,44µM BAP + 10,74µM ANA	58,33	91,33

No tratamento em que se adicionou ao meio apenas 10,74µM ANA (T3) não houve alteração em relação ao controle, indicando que este regulador de crescimento isoladamente não tem efeito na indução de calos a partir de

segmentos foliares de pequizeiro (FIGURA 4). Resultados semelhantes foram observados por Rey e Mroginski (1996), trabalhando com *Aeschynomene* spp.

4.1.2 Manutenção de calos I e II

Foram testados vários meios, para o subcultivo de calos, suplementados com ANA, BAP e substâncias complexas tais como, extrato de malte, água de côco, caseína hidrolizada e extrato de levedura.

Pela análise de variância à 5% de significância (FIGURA 2A em anexo) para a observação “crescimento” no experimento de manutenção (subcultivo) de calos I, verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos. Pelo teste de Tukey 5% (FIGURA 6), observa-se que a diferença estatística encontrada foi entre o meio sem reguladores de crescimento (T2) e o meio suplementado apenas com 50 ml/L de água de côco (T4) e o meio acrescido de 5,37µM ANA, 1,11µM BAP e 500 mg/L extrato de malte (T5).

As maiores médias (FIGURA 6) foram encontradas para os meios acrescidos de 5,37µM ANA, 1,11µM BAP e 500 mg/L extrato de malte (T5), 5,37µM ANA, 1,11µM BAP e 200 mg/L caseína hidrolizada (T8) e 5,37µM ANA e 1,11µM BAP (T3). Estes três tratamentos foram os que apresentaram, de modo geral, calos com melhor aspecto visual (FIGURA 7).

Os tratamentos cujos meios não foram suplementados com reguladores de crescimento (T2: meio sem reguladores de crescimento e T4: meio suplementado apenas com 50 ml/L água de côco), apresentaram as menores médias, indicando que a adição destes componentes ao meio de cultivo é fundamental para o subcultivo dos calos de pequizeiro.

Os meios suplementados com 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 50 ml/L água de côco (T6) e 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 250 mg/L extrato de levedura (T7), apesar de não diferirem estatisticamente dos outros tratamentos empregados, apresentaram calos com aspecto mais oxidado/necrosado. Estes resultados sugerem que a combinação de ANA e BAP com a água de côco e extrato de levedura, nas concentrações utilizadas, apesar de promoverem algum crescimento, também apresentam efeitos prejudiciais ao material.

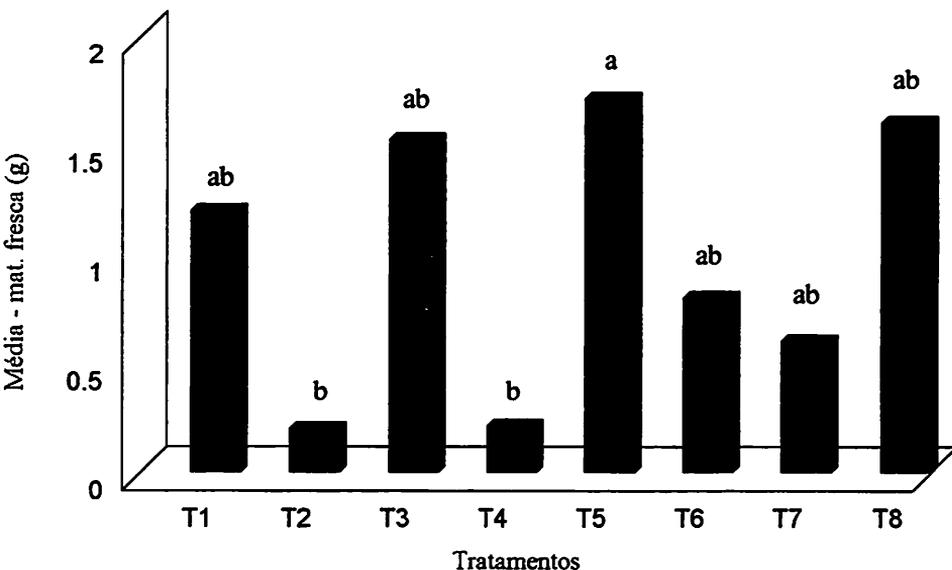


FIGURA 6: Peso de matéria fresca (g) para calos de explantes foliares de pequiheiro, submetidos aos tratamentos T1: 10,74 μ M ANA e 2,22 μ M BAP; T2: meio sem reguladores de crescimento; T3: 5,37 μ M ANA e 1,11 μ M BAP; T4: 50 ml/L água de côco; T5: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 500 mg/L extrato de malte; T6: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 50 ml/L água de côco; T7: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 250 mg/L extrato de levedura; T8: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 200 mg/L caseína hidrolizada). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância. (Lavras - UFLA, 1998)

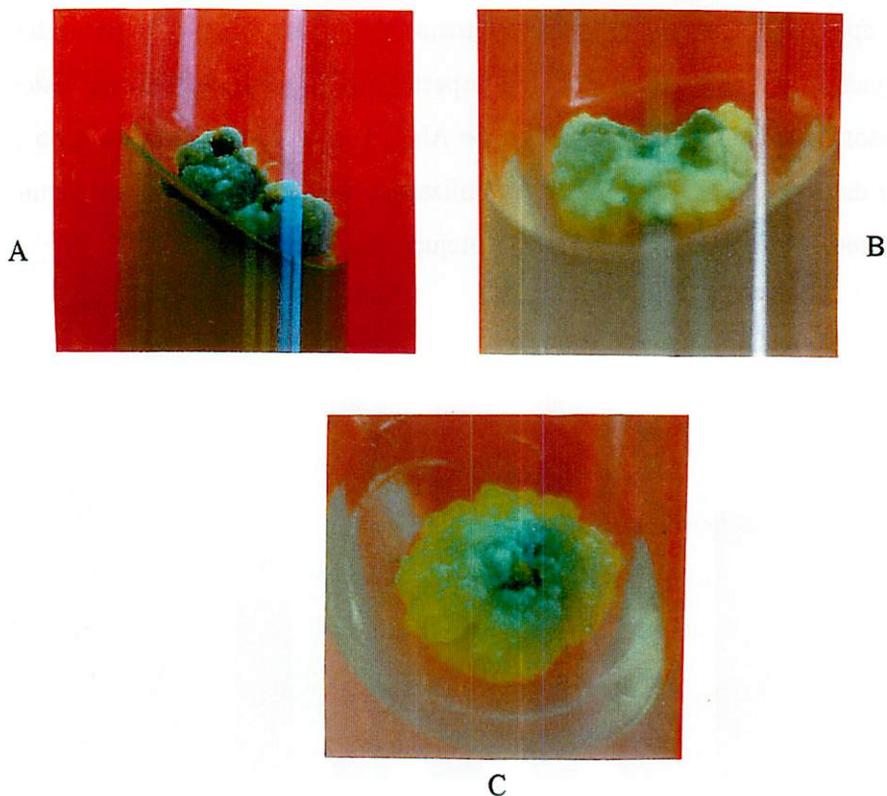


FIGURA 7: Aspecto geral dos calos nos tratamentos 3 ($5,37\mu\text{M}$ ANA e $1,11\mu\text{M}$ BAP - A); 5 ($5,37\mu\text{M}$ ANA, $1,11\mu\text{M}$ BAP e 500 mg/L extrato de malte - B) e 8 ($5,37\mu\text{M}$ ANA, $1,11\mu\text{M}$ BAP e 200 mg/L caseína hidrolizada - C), no experimento de manutenção (sucultivo) de calos I. (Lavras - UFLA, 1998)

Segundo Caldas, Haridasn e Ferreira (1990) e Pierik (1985) misturas complexas como extrato de levedura, água de côco, extrato de malte e caseína

hidrolizada podem ser usadas para incrementar os meios nutritivos para a cultura de tecidos de plantas.

Pode-se encontrar na literatura exemplos, como os de Baumert et al. (1992) e Rajbhandari e Stomp (1997), que utilizaram água de côco e caseína hidrolizada, na indução e manutenção de calos. Camargo (1997) observou que a taxa de crescimento dos calos de castanheira-do-Brasil subcultivados, foi semelhante para os meios contendo reguladores de crescimento e água de côco; sendo significativamente superiores ao meio sem reguladores de crescimento. Estes resultados vêm, de certa forma, confirmar os resultados obtidos neste experimento, onde a diferença significativa encontrada foi entre o tratamento contendo reguladores de crescimento e extrato de malte e os tratamentos sem reguladores de crescimento.

A coloração dos calos formados variou entre o branco acinzentado, branco amarelado e marrom. Oxidação foi observada em pequeno grau e houve a formação de brotações e raízes (FIGURA 8).

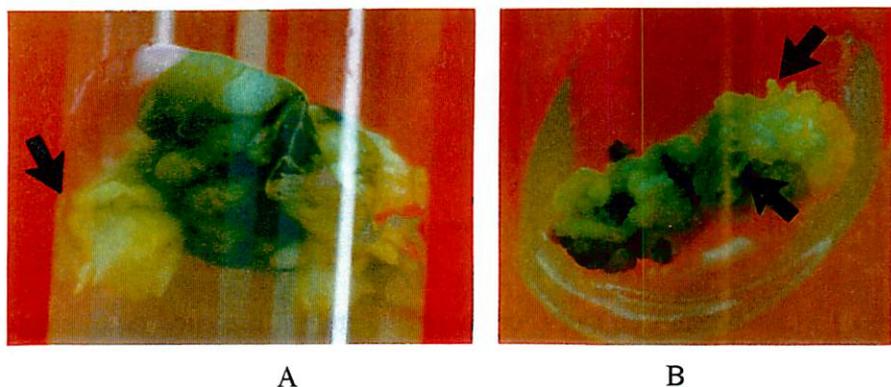


FIGURA 8: Aspecto visual de brotações (A) e raízes (B), indicados pelas setas, formados a partir de calos subcultivados na presença de reguladores de crescimento, extrato de malte e caseína hidrolizada. (Lavras - UFLA, 1998)

A formação de estruturas como raízes e/ou brotações em calos também foram observadas por Rey e Mroginski (1996) trabalhando com *Aeschynomene* spp. ; Camargo (1997) em castanheira-do-Brasil e Kumar (1992) em *Bauhinia purpurea* .

A porcentagem de crescimento dos calos formados, no experimento de manutenção (subcultivo) de calos II, é demonstrada na FIGURA 9. Na presença de extrato de malte a formação de calos foi maior quando utilizou-se a concentração de 1000 mg/L (T2). No entanto, a maior porcentagem de crescimento foi obtida no meio acrescido de 5,37 μ M ANA e 1,11 μ M BAP (T0: controle).

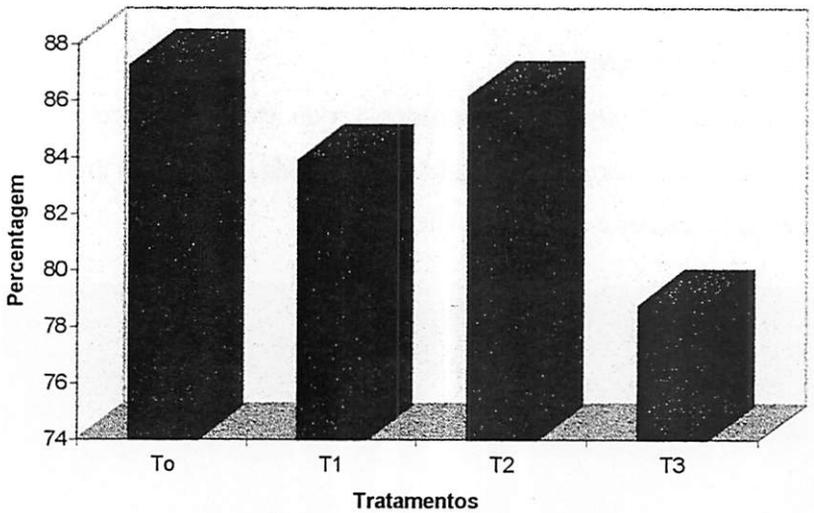
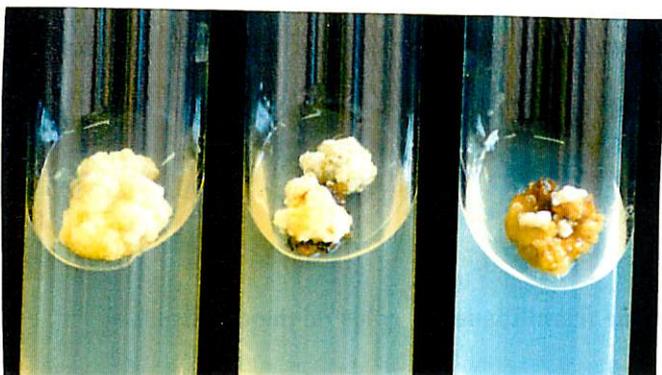
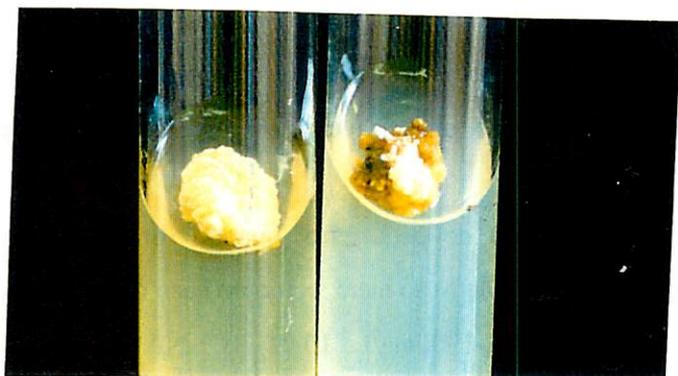


FIGURA 9: Crescimento de calos, em porcentagem, na presença de diferentes concentrações de extrato de malte (T0: 5,37 μ M ANA e 1,11 μ M BAP; T1: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 500 mg/L extrato de malte; T2: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 1000 mg/L extrato de malte; T3: 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 1500 mg/L extrato de malte). (Lavras - UFLA, 1998)

Verifica-se na FIGURA 10 que em todos os tratamentos foram observados calos com bom aspecto visual e também calos com áreas escurecidas.



A



B

FIGURA 10: Aspecto visual dos calos do tratamento 0 (5,37 μ M ANA e 1,11 μ M BAP - A) e tratamento 2 (5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 1000 mg/L extrato de malte - B), no experimento de manutenção de calos II. (Lavras - UFLA, 1998)

Através da análise de variância à 5% (FIGURA 3A em anexo) observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Isto indica que, mesmo com o aumento na sua concentração, o extrato de malte adicionado ao

meio não favorece um maior crescimento dos calos em relação ao tratamento controle. O tratamento controle neste caso, correspondeu ao meio suplementado com 5,37 μ M ANA e 1,11 μ M BAP (T3) no experimento de manutenção (subcultivo) de calos I o qual, por sua vez, não diferiu estatisticamente do meio suplementado com 5,37 μ M ANA, 1,11 μ M BAP e 500 mg/L extrato de malte (T5).

4.1.3 Indução de friabilidade em calos de pequiheiro

De acordo com Montoro et al. (1993) fatores tais como, reguladores de crescimento, composição mineral do meio e o fator genético do material vegetal utilizado, frequentemente são responsáveis pela modificação do tipo de calos formado *in vitro*.

Entretanto, no caso do pequiheiro, quando foram adicionadas novas fontes e maior concentração de N ao meio, como no caso dos meios acrescidos de NH_4NO_3 -1650mg/L e KNO_3 -1900mg/L, 10,74 μ M ANA e 4,44 μ M BAP (T1); 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 200 mg/L caseína hidrolizada (T6); 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 400 mg/L caseína hidrolizada (T7); 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 800 mg/L caseína hidrolizada (T8); e 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 1600 mg/L caseína hidrolizada (T9); e modificados os reguladores de crescimento, com substituição do ANA pelo 2,4-D, nos meios suplementados com 9,05 μ M 2,4-D e 4,44 μ M BAP (T2); 18,1 μ M 2,4-D e 4,44 μ M BAP (T3); 9,05 μ M 2,4-D e 2,22 μ M BAP (T4) e 18,1 μ M 2,4-D e 2,22 μ M BAP (T5), não foi observada a formação de calos friável em nenhum tratamento.

Nos tratamentos 0 (10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP), 1, 6, 7, 8 e 9 os explantes apresentaram, de modo geral, calos duro, branco amarelado e com poucas áreas oxidadas/necrosadas, quando estas estavam presentes. Nos tratamentos contendo 2,4-D, foi observado calos duro, apresentando contudo, um aumento nas áreas oxidadas/necrosadas. A percentagem de crescimento dos calos destes tratamentos, no entanto, foi similar aos outros tratamentos (FIGURA 11).

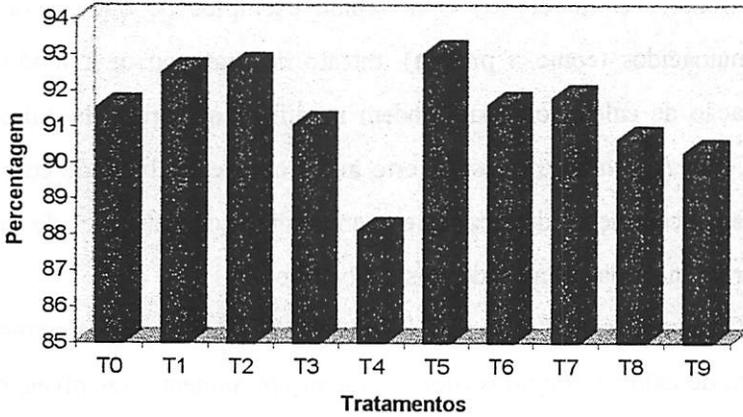


FIGURA 11: Percentagem de crescimento de calos em explantes foliares submetidos à diferentes tratamentos para indução de friabilidade. (T0: 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP; T1: soluções A (NH_4NO_3 -1650 mg/L) e B (KNO_3 -1900 mg/L) do meio MS além de 10,74 μ M ANA e 4,44 μ M BAP; T2: 9,05 μ M 2,4-D e 4,44 μ M BAP, T3: 18,1 μ M 2,4-D e 4,44 μ M BAP, T4: 9,05 μ M 2,4-D e 2,22 μ M BAP, T5: 18,1 μ M 2,4-D e 2,22 μ M BAP; T6: 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 200 mg/L caseína hidrolizada; T7: 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 400 mg/L caseína hidrolizada; T8: 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 800 mg/L caseína hidrolizada; T9: 10,74 μ M ANA, 4,44 μ M BAP e 1600 mg/L caseína hidrolizada). (Lavras - UFLA, 1998)

Estes resultados vêm confirmar os resultados obtidos por Dombroski (1997) os quais indicam que o tamanho e a aparência dos calos de pequizeiro produzidos com 2,4-D melhoraram com o aumento na concentração de 2,4-D. No entanto, concentrações acima de 2,22 μ M 2,4-D proporcionaram um aumento na área oxidada ou necrosada dos explantes.

Yan - Xiu, Dun - Yi e Harris (1993) trabalhando com *Sesbania* sp. verificaram que a aparência dos calos variou com o tipo de explante e o meio utilizado, no entanto apresentava-se similar entre as diferentes espécies estudadas. Os explantes cultivados em meio contendo 2,4-D produziram calos geralmente branco amarelados e friáveis. Calos obtidos em meio contendo AN apresentavam coloração amarelo escuro ou verdes e de textura mais compacta.

Montoro et al. (1993) citam ainda exemplos de outros componentes como aminoácidos (como a prolina), nitrato de prata ou uma modificação na concentração de cálcio, os quais podem modificar a textura do calos. Em seu trabalho com *Hevea brasiliensis*, este autor obteve friabilidade com o uso de reduzidas concentrações de auxinas e quando altas concentrações de sacarose e cálcio foram mantidas através de dois subcultivos.

De acordo com Tsutsumi e Sakai (1995) a aplicação de estresse hídrico na cultura de calos de *Populus alba*, induziu um aumento nos níveis de lignina, material de fortalecimento presente na parede celular de plantas superiores.

Os trabalhos acima citados, bem como os resultados obtidos neste estudo sugerem que vários fatores podem influenciar na friabilidade de calos. O presente trabalho sugere ao pesquisador, indicando a necessidade da continuidade de novas investigações para a produção de calos friáveis, os quais podem ser utilizados em cultivos em suspensão de células.

1.1.4 Indução de calos a partir de folhas obtidas de diferentes plantas e posições dentro das plantas.

Neste experimento foram identificadas as plantas e a posição das folhas dentro das plantas de onde os explantes foram retirados, a fim de verificar sua possível influência no comportamento *in vitro* do material utilizado.

Pela análise de variância (TABELA 4A em anexo) podemos verificar que para a fonte de variação planta x tratamento (P*T) houve significância ao nível de 5%. Isto significa que cada planta respondeu aos diferentes tratamentos de maneira diferenciada. As predições dos efeitos aleatórios de plantas foram comparados ao nível de referência 0 (que representa a média geral das plantas) pelo teste t, ao nível de 5% de significância, cujos resultados estão representados na FIGURA 12.

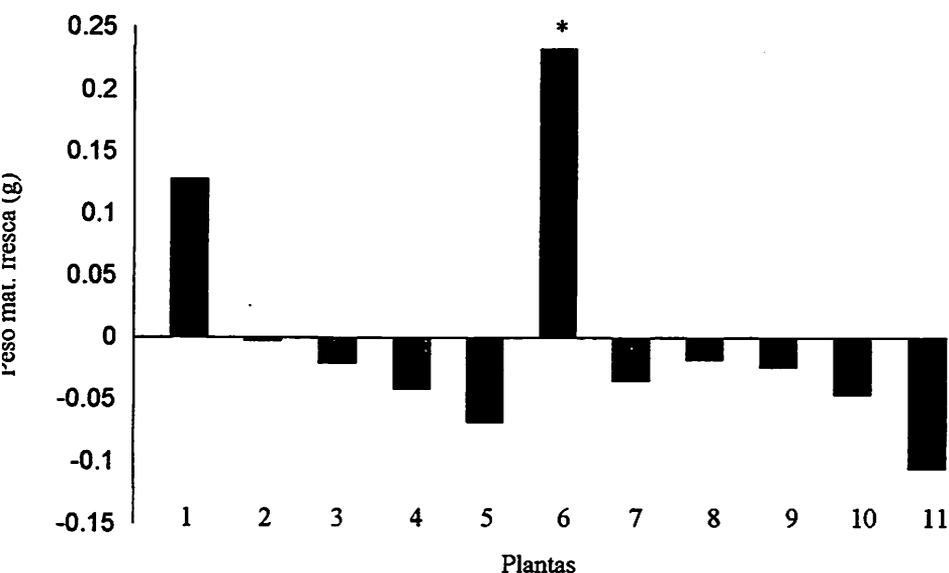


FIGURA 12: Teste t (para efeito aleatório) das plantas submetidas aos tratamentos T₀: controle; T₁: 2,22 μ M BAP e 10,74 μ M ANA; T₂: 4,44 μ M BAP e 10,74 μ M ANA. Médias não seguidas pelo * não diferem estatisticamente de 0. (Lavras - UFLA, 1998)

Estes resultados indicam que a planta número 6 respondeu de forma mais efetiva aos estímulos dos tratamentos empregados, estando de acordo com as observações visuais (FIGURA 13). A planta 1, apesar de estatisticamente não se distinguir do nível de referência 0, visualmente apresentou resultados semelhantes aos obtidos pela planta 6. A planta 11 foi a que respondeu de forma menos efetiva aos tratamentos.

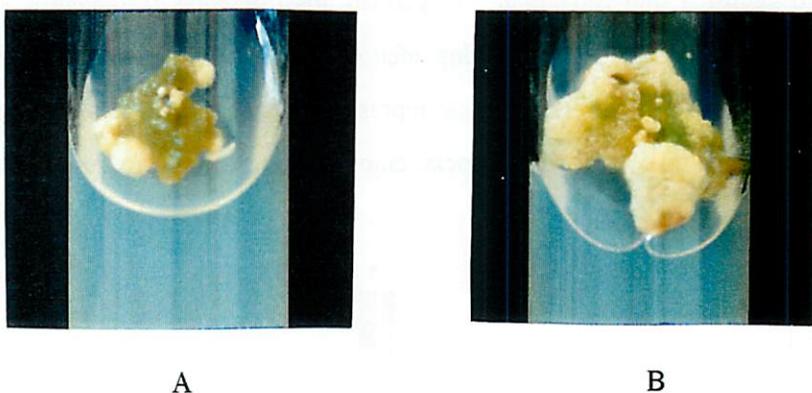


FIGURA 13: Explantes oriundos do segundo par de folhas totalmente expandidas das plantas 5 (A) e 6 (B), submetidas ao tratamento 1 ($2,22\mu\text{M}$ BAP e $10,74\mu\text{M}$ ANA). (Lavras - UFLA, 1998)

A ANAVA (TABELA 4A em anexo) indicou que houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados. O teste de Tukey (FIGURA 14) entretanto, indica que esta diferença ocorreu entre os tratamentos cujos os meios foram suplementados com reguladores de crescimento (T1: $2,22\mu\text{M}$ BAP e $10,74\mu\text{M}$ ANA e T2: $4,44\mu\text{M}$ BAP e $10,74\mu\text{M}$ ANA) e o tratamento controle (T0: meio de cultivo sem reguladores de crescimento). Isto sugere que a presença de $2,22\mu\text{M}$ BAP e $10,74\mu\text{M}$ ANA; e $4,44\mu\text{M}$ BAP e $10,74\mu\text{M}$ é capaz de induzir

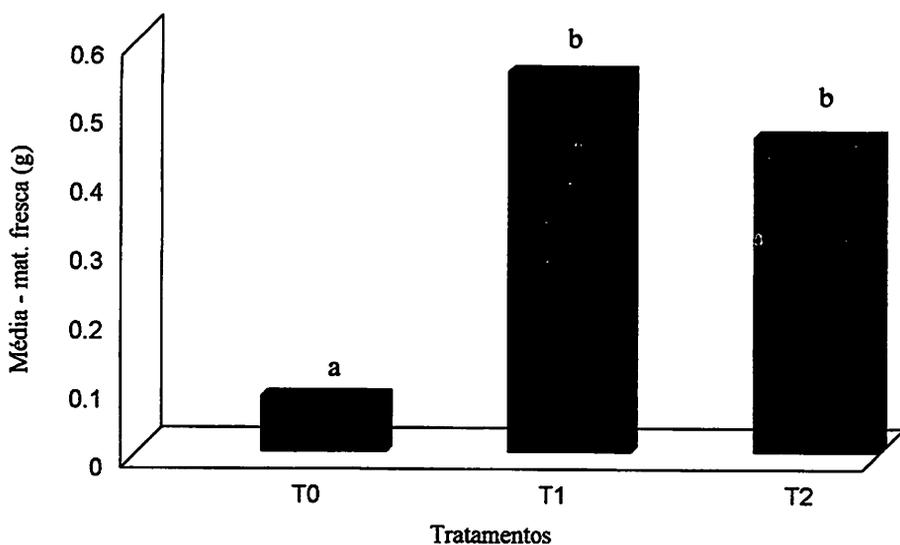


FIGURA 14: Médias dos tratamentos 0 (sem reguladores de crescimento), 1 (2,22 μ M BAP e 10,74 μ M ANA) e 2 (4,44 μ M BAP e 10,74 μ M) submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (Lavras - UFLA, 1998)

a formação de calos em segmentos foliares de pequiizeiro e que para indução e formação de calos são necessários reguladores de crescimento. Estes resultados vêm então, reforçar os resultados obtidos com o experimento de indução de calos, (item 4.1.1).

Não foi detectada diferença significativa entre o 1° e 2° pares de folhas usados, indicando que ambos podem ser utilizados como fontes de explante, sem interferir no ganho de peso de matéria fresca dos calos formados.

De acordo com Pierik (1985) e Grattapaglia e Machado (1990) fatores como genótipo da planta matriz, idade da planta, estado fisiológico e nutricional, condições de crescimento e posição do explante dentro da planta, dentre outros, têm grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. A influência de alguns destes fatores pode ser a interferência na capacidade de

divisão celular e regeneração, entre plantas da mesma espécie, causadas pelo genótipo e estado fisiológico; o fornecimento de melhores explantes em plantas bem nutridas e diferenças no gradiente de regeneração dependendo da posição do explante dentro da planta

Alguns exemplos podem ser encontrados na literatura sobre a influência destes fatores no comportamento *in vitro* de espécies vegetais. Hsia e Korb (1996) verificaram que a frequência de rizogênese e regeneração em calos de explantes foliares e segmentos internodais de vários genótipos de *Rosa hybrida* e *Rosa chinensis minima* responderam diferencialmente às diferentes concentrações de ANA.

A influência do genótipo e da maturidade da folha de algumas cultivares de maçã sobre a resposta *in vitro* foi observada por Yepes e Aldwinckle (1994). Segundo estes autores, a concentração ótima de BA na indução de organogênese, o tamanho ótimo das folhas para regeneração e a capacidade regenerativa diferem entre genótipos. Além disto, mais brotações desenvolveram-se no segmento basal e mediano mais próximos do pecíolo da folha do que em segmentos próximos ao ápice.

Brand e Lineberger (1991), estudando o efeito da origem e estágio de desenvolvimento no potencial organogênico de explantes foliares de *Liquidambar styraciflua* L., observaram que folhas de plantas intactas propagaram mais explantes que explantes foliares de brotações proliferadas *in vitro*. O estágio relativo de desenvolvimento do tecido foliar utilizado, influenciou a resposta organogênica de explantes de plantas intactas. Para estes autores a performance de tecidos de plantas lenhosas *in vitro* pode ser fortemente influenciada pela condição fisiológica inicial do explante, mesmo para explantes apresentando aparências similares. Variações na habilidade de enraizamento e potencial de crescimento podem refletir e

diferenças morfológicas, anatômicas e bioquímicas próprias as quais existiam no explante foliar original.

4.1.5 Estudo do crescimento de calos de pequiizeiro

De acordo com Lameira (1997) pode-se distinguir no crescimento dos calos 5 diferentes fases, bem como os eventos metabólicos que lhe são peculiares. A curva de crescimento obtida, através do peso de matéria fresca e seca dos calos formados (FIGURA 15), apresentou um padrão sigmóide, permitindo a identificação das 5 fases de crescimento.

A fase lag, que ocorreu até o 7º dia, caracteriza-se por ser um período no qual há síntese protéica e de metabólitos específicos, como preparação para a divisão celular. Segundo Scragg e Allan (1993) esta pode ser definida como uma fase produtora de energia.

A fase exponencial, observada neste estudo entre o 7º e o 35º dias de cultivo representa, de acordo com Shimizu (1977) e Scragg e Allan (1993), uma fase onde a divisão celular é máxima, formando agregados de células. Deccetti, Paiva e Santos (1998) observaram que esta fase ocorreu entre o 16º e 35º dias em *Annona glabra*.

O período linear ocorreu aproximadamente entre o 36º e o 45º dia. Nesse período a divisão celular diminui e as células crescem. Segundo Smith (1992) o crescimento e o desenvolvimento celular nesta fase são mais evidentes.

O período de desaceleração ocorreu aproximadamente entre o 46º e o 49º dia. De acordo com Smith (1992) é nesta fase que as culturas devem ser

transferidas para meio fresco devido à redução de nutrientes, produção produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do O₂ nos calos.

A quinta fase corresponde à fase estacionária que ocorreu a partir do 5 dia aproximadamente e, caracteriza-se por não haver mais divisão celular síntese de biomassa.

Santos (1998) também verificou a presença destas 5 fases de crescimento em *Smilax japecanga*. No entanto, quando comparada com o *C. brasiliense*, fase exponencial mostrou-se bem menor, refletindo a necessidade de um período mais curto para o subcultivo (entre o 27º e o 35º dias, na fase de desaceleração dos calos desta espécie. A duração das outras fases foi similar para as duas espécies.

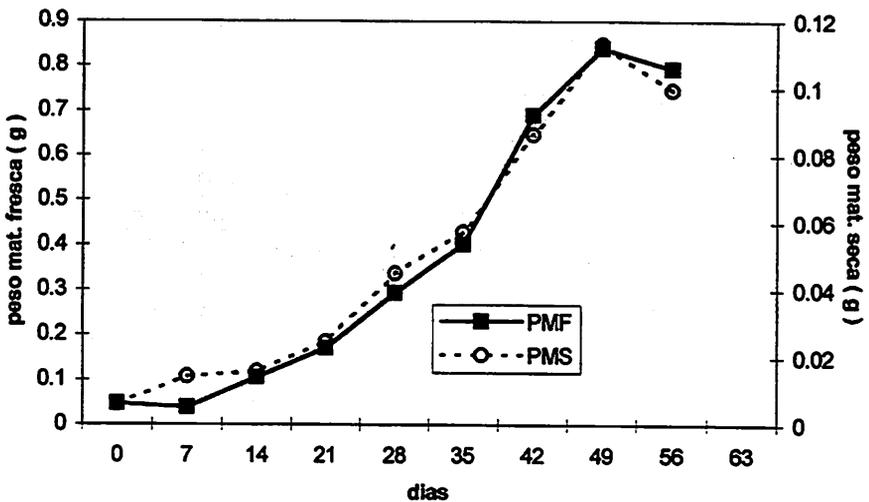


FIGURA 15: Peso de matéria fresca (PMF) e matéria seca (PMS) de calos obtidos a partir de explantes foliares de *C. brasiliense*. (Lavras UFLA, 1998)

4.2 Estudo de variabilidade genética através de marcadores RAPD

Algumas plantas matrizes utilizadas nos experimentos *in vitro* foram submetidas ao RAPD para verificar a presença de variabilidade entre elas.

Dos 180 primers inicialmente testados, 47 (26%) não amplificaram nenhum fragmento e 70 (39%) apresentaram um padrão de amplificação fraco ou confuso. Dos 63 (35%) primers selecionados, 7,93% (OPA 19, OPB 7, OPB 13, OPB 17 e OPC 10) não amplificaram nenhum fragmento, 11,11% (OPA 11, OPA 15, OPB 4, OPL 18, OPO 12, OPS 8 e OPS 19) demonstraram um padrão fraco ou confuso, não repetindo, portanto, nestes dois casos, o padrão anteriormente selecionado, e 0,55% (OPW 18 - FIGURA 16) não apresentou bandas polimórficas e os fragmentos amplificados possuíam cerca de 1120 kb.

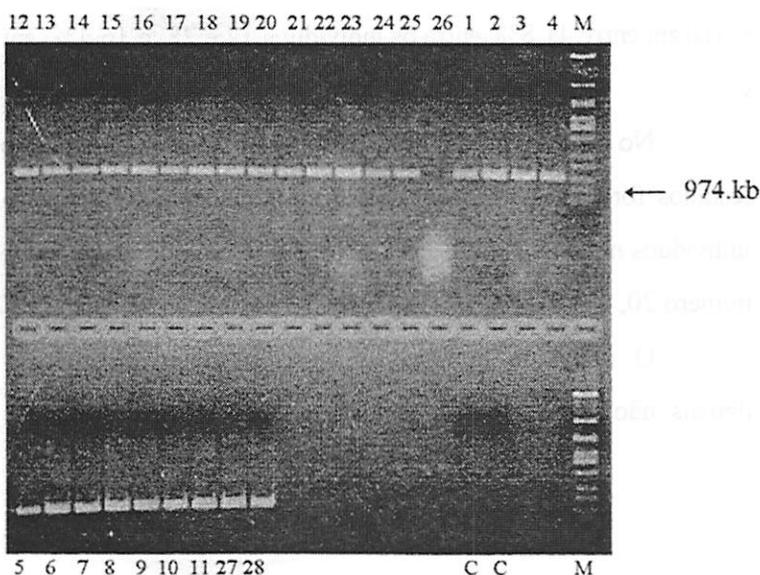


FIGURA 16: Produto da amplificação de DNA de folhas de pequiheiro obtido com primer OPW 18. C = controle negativo; M = peso molecular. (Sete Lagoas/MG - EMBRAPA/CNPMS, 1998)

Os cinquenta primers restantes (79,36%), que repetiram o padrão selecionado, apresentaram pelo menos uma banda polimórfica. Estes primers produziram 119 fragmentos polimórficos, com uma média de 2.3 locos por primer. Um exemplo dos fragmentos polimórficos obtidos com os primers OPA13 e OPA17 são apresentados na FIGURA 17. Os fragmentos amplificados apresentavam-se na faixa entre 1584 e 784 Kb para o primer OPC13 e 2027 e 1584 para o primer OPA17.

A sequência dos 63 primers utilizados encontra-se na TABELA 5A, em anexo.

Foram consideradas 25 plantas, visto que três (5, 15 e 26) foram descartadas por apresentarem grande quantidade de dados perdidos.

Os fragmentos amplificados foram usados para estimar a distância genética entre os indivíduos testados (TABELA 6A, em anexo). Estas distâncias variaram entre 41,8%, entre os indivíduos 12 e 28, e 16,4% entre os indivíduos 12 e 23.

No dendrograma da FIGURA 18 observa-se que a maioria dos indivíduos testados foram inseridos em dois grupos distintos. O primeiro grupo incluiu os indivíduos número 28, 10, 27, 9, 11 e 8 e o segundo grupo englobou os indivíduos número 20, 14, 21, 16, 19, 18, 7, 6, 2, 1, 4, 24, 3, 23, 25, 22, 17 e 13.

O indivíduo número 12 mostrou maior divergência em relação aos demais, não sendo portanto, incluído nos dois grupos formados.

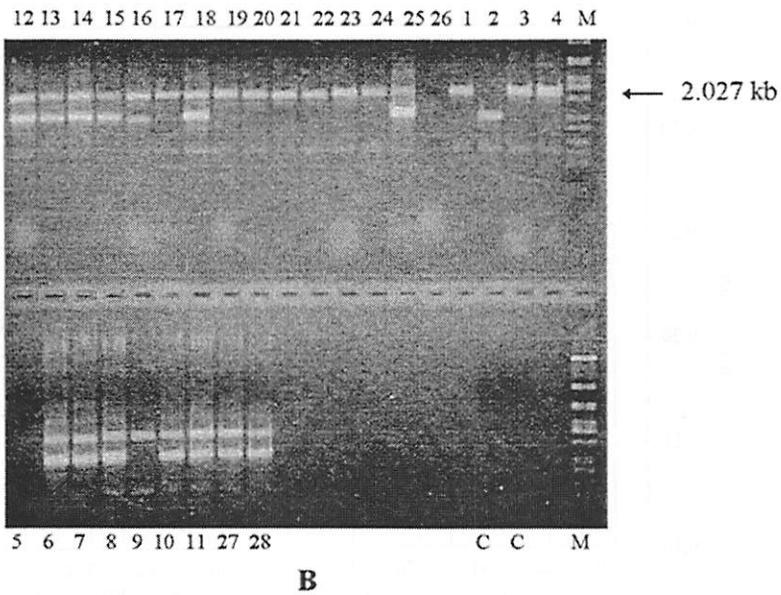
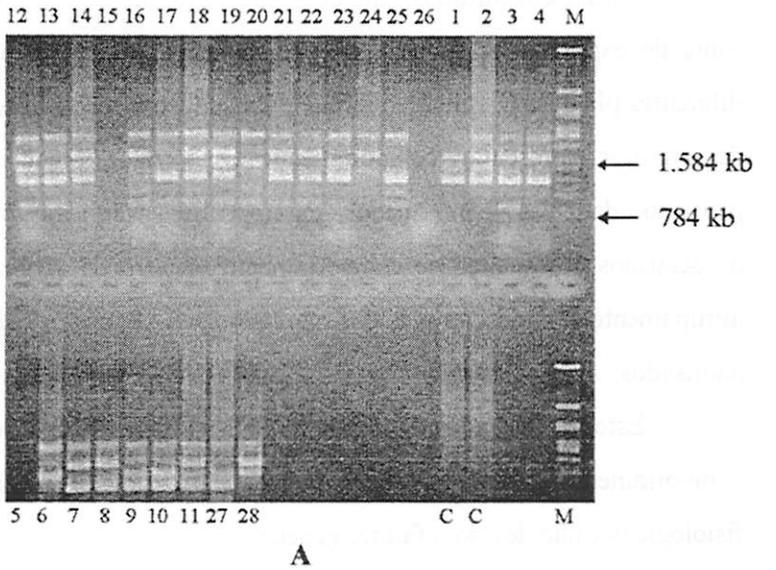


FIGURA 17: Padrões de RAPD obtidos em *C. brasiliense*, com o uso dos primers OPC13 (A) e OPA17 (B). C = controle negativo; M = peso molecular. (Sete Lagoas/MG - EMBRAPA/CNPMS, 1998)

Foram encontrados, em ambos os grupos, indivíduos utilizados como fonte de explantes no experimento de indução de calos a partir de folhas de diferentes plantas. O indivíduo 6, que pela análise visual e teste t se destacou dos demais por apresentar comportamento *in vitro* diferenciado, foi agrupado próximo daqueles com menor desempenho. Não foi possível, portanto, associarmos a diferença no comportamento *in vitro* de algumas plantas, com o agrupamento formado através dos marcadores RAPD; neste grupo de indivíduos analisados.

Estes resultados indicam que a ocorrência de diferenças no comportamento *in vitro* seja, provavelmente, devido a fatores ambientais fisiológicos e não devido a fatores genéticos.

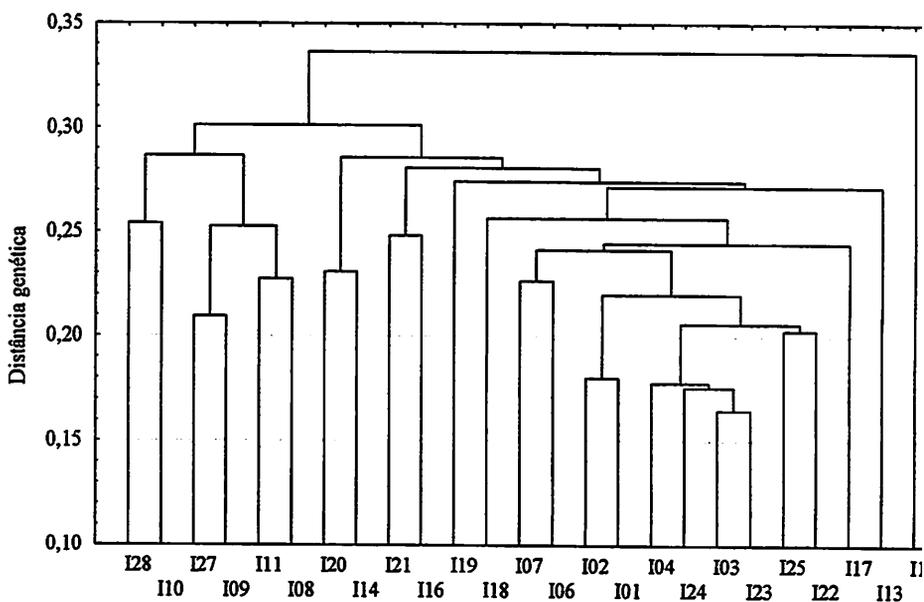


FIGURA 18: Dendrograma construído pelo método UPGMA a partir de similaridades entre 25 indivíduos de pequi obtidas pelo coeficiente de Sorensen-Dice (Duarte, 1998). (Sete Lagoas/MG EMBRAPA/CNPMS, 1998).

5 CONCLUSÕES

- Foi possível promover o estabelecimento *in vitro* do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), através da formação de calos;
- A manutenção dos explantes foliares na ausência de luz induziu a formação de calos com melhor aspecto visual;
- A formação de calos foi observada em meio WPM suplementado com 2,22 μ M BAP + 10,74 μ M ANA bem como com 4,44 μ M BAP + 10,74 μ M ANA;
- Substâncias complexas, como extrato de malte e caseína hidrolizada, adicionadas para o subcultivo dos calos, podem ser utilizadas mas não são estritamente necessárias;
- Não foi possível induzir a friabilidade nos calos formados com os tratamentos empregados;
- O subcultivo dos calos deve ser realizado em intervalos de 45 dias;
- As plantas matrizes de pequizeiro utilizadas, apresentaram comportamento diferenciado *in vitro*, provavelmente devido à fatores ambientais/fisiológicos e não devido a fatores genéticos;
- O estudo de variabilidade genética através de marcadores RAPD, indicou uma proximidade genética entre os indivíduos do grupo analisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, J., NAKASHIMA, K., MITSUI, K., MIKAMI, T.; SHIMAMOTO, T.
Tissue response of Beta germplasm: callus induction and plant regeneration.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture. The Hague, v.27, p. 123-127, 1991.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J.A . Piqui e buriti: importância alimentar para a
população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-APAC. 1994. 38 p.
(Documentos, 54)
- ARAÚJO, F.D. de. The ecology, ethnobotany and management of *Caryocarpus
brasiliense* Camb. around Montes Claros, MG, Brazil. Oxford: University
of Oxford, 1994. 175p (D. Phil. Thesis - Plant Science).
- ARAÚJO, F.D. de. A review of *Caryocar brasiliense* (*Caryocaraceae*): an
economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic
Botany**. The New York Botanical Garden, v.49, n.1, p.40-48, 1995.
- ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera
coriacea*: efeito das diversas concentrações de benzilaminopurina e ácido
naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária
Brasileira**. Brasília, v.28, n.1, p.25-28, jan., 1993.
- BARRADAS, M. M. Informações sobre floração, frutificação e dispersão de
piqui *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*). **Ciência e Cultura**. São
Paulo, v.11, n.24, p.1063-1072, nov., 1972.

- BAUMERT, A .; GRÖGER, D.; KUZOVKINA, I. N.; REISCH, J. Secondary metabolites produced by callus cultures of various *Ruta* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Hague, v.28, p. 159-162, 1992.
- BRAND, M. H.; LINEBREGER, D. The effect of leave source and developmental stage on shoot organogenic potential of sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.) leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Hague, .v.24, p 1 -7, 1991.
- BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio/Sec. de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/CTI, 1985 (Documentos, 16).
- CALDAS, L. S.; HARIDASN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A . C.; CALDAS, L. S.(ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP / EMBRAPA CNPH, p. 37 - 70, 1990, 433p.
- CAMARGO, I. P. de. **Estudos sobre a propagação da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.)**. Lavras: UFLA, 1997.(Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- CARDOSO, M. A .; OLIVEIRA, D. E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Hague,v.44, p.91-94, 1996.

CETEC - Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: estudos das oleaginosas de Minas Gerais.** Belo Horizonte. p.154-246, 1983.

CHÉVEZ POZO, O . V. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado do Norte de Minas Gerais.** Lavras: UFLA, 1997. 100 p. (Dissertação - Mestrado em Administração Rural).

CLOUTIER, S.; LANDRY, B. S. Molecular markers applied to plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology - Plant**, Columbia, v.30, p.33-39, jan. 1994.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L.; CHARRIER, A . Gene diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* (Crantz) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 1, p. 105 - 111, 1998.

COMPTON, M. E. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, .v.37, p.203 - 242, 1994.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 188 p. (Tese de doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)

DECCETTI, S. F. C.; PAIVA, R.; SANTOS, M. R. A. . Estudo do crescimento de calos de explantes foliares de *Annona glabra*. In: Congresso de iniciação científica da UFLA - CICESAL, 11. Lavras, 1998. **Resumos...Lavras: UFLA, p.85, 1998.**

DOMBROSKI, J. L. D. **Estudos sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Lavras: UFLA, 1997. 80p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal).

DORNELLES, A. L., CARVALHO, F. I. F., FEDERIZZI, L. C., LANGE, C. E., HANDEL, C. L.; BERED, F. Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.2, p. 293 - 297, 1997a.

DORNELLES, A. L. C., CARVALHO, F. I. F., FEDERIZZI, L. C., HANDEL, C. L., BERED, F., SORDI, M. E. B.; SCHNEIDER, F. Callus induction and plant regeneration by brazilian triticale and wheat genotypes. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.1, p. 41 - 44, 1997b.

DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD**. Lavras: UFLA, 1998. 78p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)

EITEN, G. **Vegetação do cerrado**. In: PINTO, M. N. (org.). **Cerrado**. 2.ed. Brasília: Ednub, cap. 1, p.17-73, 1993.

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** 2.ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1996, 220p. (Embrapa - Cenargen Documentos)
- FORNI - MARTINS, E. R.; PINTO - MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Chromosome numbers in brazilian cerrado plants. **Revista Brasileira Genética** Ribeirão Preto, v. 18, n. 2, p. 281 - 285, 1995.
- FRANÇA, S. C.; DUARTE, I. B.; MORAES, R. M.; PEREIRA, A. M. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.42, p.291-293, 1995.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M. THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology - Plant**, Columbia, v. 32, p. 281 - 289, oct. - dec. 1996.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, J. C.; CALDAS, L. S.(ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP / EMBRAPA CNPH, p. 99 - 169, 1990, 433p.
- GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (*Caryocaraceae*) in Central Brazil cerrado vegetation. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.9, n.2, p.199- 211, may, 1993.
- HERINGER, E. P. Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess). **Boletim Florestal**, Rio de Janeiro, v.1, p.28-31, fev., 1970.

- HSIA, CHI- NI; KORBAN, S. S. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus culture of *Rosa hiphybrida* and *Rosa chinensis minima*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, .v.44, p 1 -6, 1996.
- INNECO, R.; PINTO, J. E. B. P.; BARBOSA, M. H. P.; MALUF, W. F.; MENDONÇA, E. de. Capacidade morfogenética *in vitro* de diferentes explantes de *Capsicum annum* L. **Ciência e Prática**. Lavras, v.19, n.3, p. 247 - 251, jul./set., 1995.
- KHANNA, H. K. e RAINA, S. K. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.52, p.145-153, 1998.
- KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. UPGMA clustering method. In: _____. **Encyclopedia of statistical sciences**. New York: J. Wiley, 1985. v. 9, p. 423 - 424.
- KRZANOWSKI, W. J. **Principles of multivariate analysis. A user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988. 563p.
- KUMAR, A . Micropropagation of a mature leguminous tree - *Bauhinia purpurea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, . v.31, p.257-259, 1992.

- LAMEIRA, O . A . **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea*).** Lavras: UFLA, 1997, 88p. (Tese - Doutorado em Agronomia/Fitotecnia).
- LITZ, R. E., HENDRIX, R. C., MOON, P. A, CHAVEZ, V. M. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.53, p13 - 18, 1998.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially - feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v.30, p. 421 - 427, 1980.
- LÓPEZ - VALENZUELA, J. A .; MARTINEZ, O .; PAREDES - LÓPEZ, C. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 6, p. 1105 - 1108, mar. 1997.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa (SP): Plantarum, 1992.
- MELO, J. T. de. **Fatores relacionados com a dormência de sementes de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.).** Piracicaba: Esc. Sup. de Agric. "Luiz de Queiroz" - USP, 1987.91p. (Tese de mestrado).

- MELO, J. T. de; GONÇALVES, A . N. **Inibidores de germinação no fruto e em sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1991.11p. (Boletim de pesquisa, 34).
- METEVIER, J. R. Citocininas. In: FERRI, M. G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal 2**. 2. Ed. São Paulo: EPU, p. 93 - 127, 1986.
- MIRANDA, J. de M. **Contribuição ao estudo da cultura do piqui (*Caryocar* sp.) : propagação e concentração de nutrientes**. Areia: Univ. Fed. da Paraíba.1986.103p. (Tese de mestrado).
- MIRANDA, J. de S.; SILVA, H.; MATOS, M. A . de O ;SILAVA, A .Q. da. **Emergência e vigor de sementes de pequi submetidos a pré-tratamentos mecânicos e térmicos**. In: Cong. Bras. de Fruticultura, 9, 1987.**Anais...** Campinas: Soc. Bras. Frut., p.647- 651, 1988. 814p.
- MONTORO, P, ETIENNE, H.; MICHAUX - FERRIÈRE, N.; CARRON, M. P. **Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis***. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, .v.33, p 331 - 338, 1993.
- MUNTHALI, M. T.;NEWBURY, H. J.; FORD - LLOYD, B. V. **The detection of somaclonal variants of beet using RAPD**. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 474 - 478, 1996.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bio - assays with tobacco tissue cultures**. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 474 - 497, 1962.

- PAIVA NETO, V. B. de. Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). Lavras: UFLA, 1996. 39p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PIERIK, R. L. M. **Plantenteelt in kweekbuizen**. 2.vol. herdruk. Wageningen: Ponsen & Looijen, 1985. 202 p.
- PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. **Flora Neotropica: Caryocaraceae**. New York: Hafner Press, 1973. 77p. (Monograph, 12).
- RAJBHANDARI, N.; STOMP, A. M. Embryogenic callus induction in *Fraxinus*. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 4, p. 737 - 738, 1997.
- RAO, K. S.; VENKATESWARA, K. Tissue culture of forest trees: cloning and multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Amsterdam, Elsevier, v. 4, p. 51-55, 1985.
- REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomene* spp. (*Leguminosae*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 45, p. 185 - 190, 1996.
- RIBEIRO, J. F. A importância econômica do pequi. **Cerrado**. v. 11, n. 36, p. 26, 1980.

RIBEIRO, J. F.; PROENÇA, C. E. B.; ALMEIDA, S. P. Potencial frutífero de algumas espécies nativas do cerrado. In: Cong. Bras. de Fruticultura, 8. Brasília,DF, 1986. *Anais...* Brasília: EMBRAPA-DDT/CNPq. v.2, p.491-500, 1986.

SANTOS, M. R. A . Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. Lavras: UFLA, 1998. 81p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal).

SAS INSTITUTE INC. SAS Procedures Guide for computers, v.3, 6 ed, Cary NC; SAS Institute Inc., 1993, 373p.

SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlim: Springer - Verlag, v. 21, p. 249 - 268, 1993

SHIMIZU, T. et al. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, p. 125 -129, 1977.

SILVA JÚNIOR, M. C. da. **Composição florística, estrutura e parâmetros fitossociológicos do cerrado e sua relação com o solo na Estação de Experimentação de Paraopeba, Minas Gerais**. Viçosa:UFV. 1984. 130p. (Tese de mestrado).

- SILVA, J. A . da ; FONSECA, C. E. L. da. **Propagação vegetativa do coqueiro: enxertia em garfagem lateral e no topo.** Planaltina: EMBRAPA CPAC, n.53, fev., 1991. (Série Pesquisa em andamento).
- SILVEIRA, F. A . da. **Abelhas silvestres (*Hymenoptera: Apoidea*) e suas fontes de alimento no cerrado na Estação de Experimentação Paraopeba, Minas Gerais.** Viçosa: UFV. 1989. 50p. (Tese de mestrado).
- SIQUEIRA, E. R. de; INOUE, M. T. **Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 27, n. 1, p. 639 - 646, abr. 1992.
- SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** San Diego: Academic Press, 1992, 171 p.
- SOAVE, R. de C. F.; SILVA, O .A . da. **Aspectos fenológicos e variação do conteúdo das clorofilas a e b em *Caryocar brasiliense* Camb.** *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. Curitiba, v. 36, n. 1, p. 57 -69, mar. 1993.
- SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A . **Principles of numeric taxonomy.** San Francisco: W. H. Freeman, 1963. 359p.
- TAO, R.; SIGIURA, A . **Adventitious bud formation from callus cultures of Japanese persimmon.** *HortScience*, Alexandria, v. 27, n. 3, p. 259 -261, mar. 1992.

- TSUTSUMI, Y.; SAKAI, K. Lignin biosynthesis in woody angiosperm tissues I. Lignification and peroxidase activity stimulated in water stressed *Populus* callus cultures. **Journal of the Japan Wood Research Society**, v. 39, n. 2, p. 214 - 220, 1993.
- VALOIS, A . C. C.; SALOMÃO, A . N.; ALLEN, A . C. (orgs.) **Glossário de Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: EMBRAPA - SPI, 1996. 62 p. (Embrapa - Cenargen. Documentos, 22)
- VIEIRA, M. C. L.FUNGARO, M. H. P.,JUBIER, M. F. LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among brazilian taxa of *Stylosanthes* SW., Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 297 - 304, mar. 1997.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213 - 7218, 1990.
- WICKREMESINHE, E. R. M.; ARTECA, R. N. Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, .v.35, p 181 - 193, 1993.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A . R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A .; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531 - 6535, 1990.

YAN-XIU, Z.; DUN-YI, Y.; HARRIS, P. J. C. Plant regeneration from callus and explants of *Sesbania spp.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague v.34, p.253-260, 1993.

YEPES, L. M.; ALDWINCKLE, H. S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.37, p 257 - 269, 1994.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A: Composição e concentração final do meio de WPM (Lloyd e McCown, 1980)	68
TABELA 2A: Análise de variância ao nível de 5% de significância da observação “crescimento” para o experimento de manutenção de calos I.....	69
TABELA 3A: Análise ao nível de 5% de significância do experimento de manutenção de calos II.....	69
TABELA 4A: Análise de variância dos resultados obtidos no experimento de indução de calos à partir de folhas de diferentes plantas de pequiheiro.....	70
TABELA 5A: Sequência dos <i>primers</i> usados para amplificação do DNA	71
TABELA 6A: Matriz de distância genética em <i>C. brasiliense</i> , do grupo de indivíduos analisados, baseada no coeficiente de similaridade de Sorensen - Dice (Duarte, 1998).....	73

TABELA 1A: Composição e concentração final do meio de WPM (Lloyd McCown, 1980).

Soluções estoque	SAIS	[final] mg/l
A	NH_4NO_3	400,0
	$\text{Ca}[\text{NO}_3].4\text{H}_2\text{O}$	556,0
B	K_2SO_4	990,0
C	$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	96,0
D	KH_2PO_4	170,0
	H_3BO_3	6,2
	$\text{NaMoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	370,0
E	$\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	8,6
	$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	27,8
F	$\text{Na}_2.\text{EDTA}$	37,2
	Tiamina.HCl	1,0
G	Piridoxina.HCl	0,5
	Ác. nicotínico	0,5
	Mio-inositol	100,0
I	Glicina	2,0

TABELA 2A: Análise de variância ao nível de 5% de significância da observação “crescimento” para o experimento de manutenção de calos I.

Fonte	GL	QM	F
Bloco	4	0,4881	NS
Tratamento	7	1,6563	*
Resíduo	25	0,04539	
Total	36		

CV = 69,24%

TABELA 3A: Análise ao nível de 5% de significância do experimento de manutenção de calos II.

Fonte	GL	QM	F
Bloco	3	0,1147	NS
Tratamento	3	0,0807	NS
Resíduo	39	0,096	
Total	45		

CV = 46,88%

TABELA 4A: Análise de variância dos resultados obtidos no experimento indução de calos à partir de folhas de diferentes plantas pequizeiro.

Fonte	GL	QM	F
Planta	10	0,16	NS
Folha _(Planta)	10	0,02	NS
Tratamento	2	1,13	*
PlantaXTrat.	17	0,06	*
Resíduo	17	0,02	
Total	57		

CV =39,27%

TABELA 5A: Sequência dos primers usados para amplificação do DNA

Primer	Sequência 5' → 3'	Primer	Sequência 5' → 3'
OPA 1	CAGGCCCTTC	OPC 10	TGTCTGGGTG
OPA 4	AATCGGGCTG	OPC 11	AAAGCTGCGG
OPA 5	AGGGGTCTTG	OPC 12	TGTCATCCCC
OPA 9	GGGTAACGCC	OPC 13	AAGCCTCGTC
OPA 10	GTGATCGCAG	OPC 15	GACGGATCAG
OPA 11	CAATCGCCGT	OPJ 19	GGACACCACT
OPA 15	TTCCGAACCC	OPL 08	AGCAGGTGGA
OPA 17	GACCGCTTGT	OPL 18	ACCACCCACC
OPA 18	AGGTGACCGT	OPO 03	CTGTTGCTAC
OPA 19	CAAACGTCGG	OPO 06	CCACGGGAAG
OPB 1	GTTTCGCTCC	OPO 07	CAGCACTGAC
OPB 4	GGA CTGGAGT	OPO 09	TCCCACGCAA
OPB 7	GGTGACGCAG	OPO 10	TCAGAGCGCC
OPB 8	GTCCACACGG	OPO 12	CAGTGCTGTG
OPB 10	CTGCTGGGAC	OPO 13	GTCAGAGTCC
OPB 12	CCTTGACGCA	OPO 15	TGGCGTCCTT
OPB 13	TTCCCCGCT	OPO 20	ACACACGCTG
OPB 17	AGGGAACGAG	OPR 04	CCCGTAGCAC
OPB 18	CCACAGCAGT	OPR 09	TGAGCACGAC
OPC 02	GTGAGGCGTC	OPR 10	CCATTCCCCA
OPC 03	GGGGGTCTTT	OPR 12	ACAGGTGCGT
OPC 06	GAACG GACTC	OPR 15	GGACAACGAG
OPC 08	TGGACCGGTG	OPS 07	TCCGATGCTG

(continua)

TABELA 5A: cont.

Primer	Sequência 5'→3'	Primer	Sequência 5'→3'
OPS 08	TTCAGGGTGG	OPW 05	GGCGGATAAG
OPS 09	TCCTGGTCCC	OPW 07	CTGGACGTCA
OPS 11	AGTCGGGTGG	OPW 08	GACTGCCTCT
OPS 16	AGGGGGTTCC	OPW 09	GTGACCGAGT
OPS 17	TGGGGACCAC	OPW 10	TCGCATCCCT
OPS 19	GAGTCAGCAG	OPW 13	CACAGCGACA
OPW 01	CTCAGTGTCC	OPW 18	TTCAGGGCAC
OPW 02	ACCCCGCCAA	OPW 19	CAAAGCGCTC
OPW 03	GTCCGGAGTG		

