

**CARACTERIZAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE MURICI-
PEQUENO (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**

RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA

2006

RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE MURICI-
PEQUENO (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**

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

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2006

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

Nogueira, Raírys Cravo

Caracterização de calos embriogênicos de Murici-Pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) / Raírys Cravo Nogueira. -- Lavras : UFLA, 2006.
41 p. : il.

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

1. Cerrado. 2. Planta medicinal. 3. Cultura de tecidos. 4. Embriogênese somática. 5. Microscopia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-
633.883214

RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE MURICI-
PEQUENO (*Byrsonima intermedia* A. JUSS.)**

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

APROVADA em 26 de julho de 2006

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Prof. Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Profa. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro	UNILAVRAS

Prof. Dr. Renato Paiva, PhD.

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A toda minha família e aos amigos do Pará,

OFEREÇO.

Aos meus pais, Nazaré Cravo e RaiNS Nogueira

Ao meu irmão, Rairyson

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora de Nazaré e Jesus Cristo, por sempre me darem força ao longo do meu caminho.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo amor e atenção durante esses anos de distância.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, PhD., por ter acreditado no meu potencial e por todos os conselhos, durante estes cinco anos de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, professores Dr. Renato Paiva, Dr. Marcelo Murad, Dra. Lisete Chamma Davide, Dr. Eduardo Alves Dra. Ana Hortência e Dr. Evaristo Mauro de Castro.

Aos professores: Renato, Ângela, Donizeti, Evaristo Mauro, Amauri, Luiz Edson e Eduardo Alves, por todos os conhecimentos adquiridos.

Aos funcionários: Evaristinho, D'Artagnan, Izonel, Lena, Joel e Odorêncio, pela alegria sempre constante.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal, em especial: Andréa Shan, Dani, Guto, Fran e Ivana por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

Ao meu maravilhoso namorado, Sidi, por todo apoio, carinho, atenção e paciência.

Às companheiras de república: Élide, Liliana, Giselle e Patrícia, pela amizade maravilhosa.

A todos os integrantes da equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Cristiano, Lenaldo, Fernanda, Patrícia, Gabi, Luciano, Eduardo, Tina, Marcelo Rodrigues, Marcelo Padovani e Alvinho, pela amizade e eficiência na condução dos experimentos.

A minha grande amiga e irmã Ana Carolina (Carol), pela grande amizade, mesmo tanto tempo longe.

À equipe do Laboratório de Citogenética da UFLA, principalmente ao Caio César Salgado, por toda ajuda, dicas e sorriso sempre sincero.

Aos funcionários da biblioteca da UFLA, principalmente ao Carlos Coelho, por todo o auxílio prestado na busca de referências bibliográficas.

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

BIOGRAFIA

Raírys Cravo Nogueira, filha de Nazaré da Silva Cravo e Raimundo Nonato de Souza Nogueira, nasceu em Belém, a Cidade das Mangueiras, no dia 13 de fevereiro de 1980. Coursou o ensino fundamental e médio no Colégio Gentil Bittencourt, concluindo o segundo grau em 1996. Em 1997, foi aprovada no vestibular para o curso de Ciências Biológicas – Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará. De 1999 a 2001, foi bolsista de iniciação científica do CNPq, no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da EMBRAPA Amazônia Oriental. Em agosto de 2001, graduou-se e iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras. Em 2003, defendeu a dissertação e ingressou no doutorado em Fisiologia Vegetal da mesma instituição. Em 2006, concluiu mais esta etapa com a presente tese.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Apresentação	1
1 Introdução	1
2 Referencial teórico	2
3 Referências bibliográficas	8
CAPÍTULO 2 – Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno....	12
1 RESUMO	12
2 ABSTRACT	13
3 Introdução	14
4 Material e métodos	15
5 Resultados e discussão	19
6 Conclusões	36
7 Referências bibliográficas	37

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é considerado a savana de maior biodiversidade vegetal do mundo, com uma área de 204 milhões de hectares. No Brasil, está distribuído, principalmente, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal (Pereira et al., 2001). Esse bioma possui inúmeras plantas que são utilizadas como medicamentos naturais pela população local para o tratamento de muitas doenças, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas, entre outras (Alves et al., 2000).

No entanto, o crescimento populacional e a demanda por mais alimentos, associados às condições edafoclimáticas favoráveis do Cerrado, transformaram esta região em importante área para atividades agropecuárias. O ritmo acelerado desta ação antrópica, nas últimas décadas, tem levado à perda de material genético vegetal nativo, praticamente desconhecido, do ponto de vista científico (Vieira & Martins, 2000).

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é um arbusto do Cerrado pertencente à família Malpighiaceae. É uma planta medicinal rica em taninos, cuja infusão é utilizada como febrífugo, adstringente nas diarreias e disenterias (Rodrigues & Carvalho, 2001), além de possuir atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorragica, cicatrizante e antiinflamatória (Pinto & Bertolucci, 2002; Monteiro et al., 2005). No entanto, segundo Lorenzi (2002), o gênero *Byrsonima* possui taxa de germinação baixa e emergência lenta das plântulas.

Devido à demanda crescente da indústria de fármacos e a necessidade de conservação de germoplasma de plantas medicinais, esta pesquisa objetivou a caracterização do processo de embriogênese somática de murici-pequeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

A família Malpighiaceae compreende cerca de 63 gêneros. São plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas ou, mais frequentemente, trepadeiras com folhas inteiras, de disposição alterna, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração, em geral, amarela ou rosada, cíclicas, hermafroditas, diclamídeas, de simetria zigomorfa, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou terminais. As pétalas, em geral, são fimbriadas, longipenduculadas. O androceu é formado por dez estames, às vezes alguns estaminodiais. Como exemplos brasileiros, ocorrem várias espécies de *Byrsonima* nos campos dos cerrados (Joly, 2002).

O gênero *Byrsonima* pertence à família Malpighiaceae e é essencialmente americano, sendo encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Felício et al., 1995). A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Figura 1) é um arbusto, podendo apresentar vários ramos que partem de uma base subterrânea. Possui folhas opostas lanceoladas 2 glabras, flores em cachos terminais, amarelas, tomando tonalidade alaranjada quando velhas (Ferri, 1969). Designada vulgarmente de murici-pequeno, sua época de florescimento é de outubro a dezembro e seu hábitat é o cerrado (Rodrigues & Carvalho, 2001).

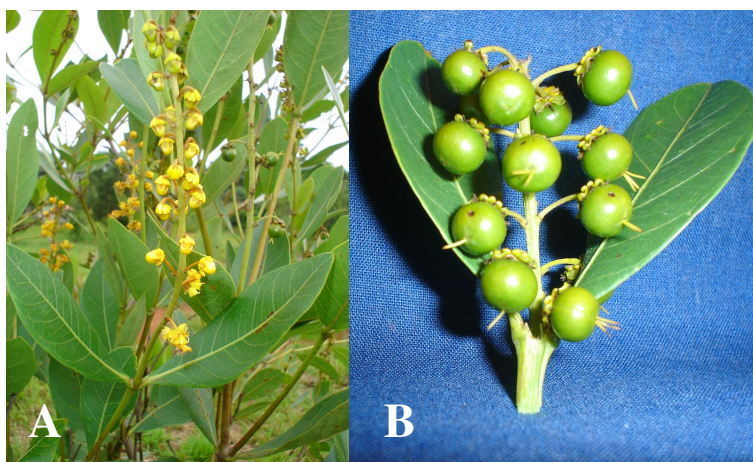


FIGURA 1. Fotografia mostrando folhas, ramos, inflorescência (A) e frutos imaturos (B) de murici-pequeno. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Lorenzi (2002) menciona taxa de germinação baixa e emergência lenta em outras espécies de *Byrsonima*, como *B. coccolobifolia*, *B. lancifolia*, *B. sericea*, *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbacifolia*.

2.2 Propriedades medicinais da espécie

Muitas pesquisas têm direcionado seus esforços para descobrir metabólitos secundários em extratos de plantas com atividade biológica. Estudos conduzidos por Alves et al. (2000) revelaram que o extrato de metanol obtido a partir das folhas de *B. intermedia* destacou-se como um candidato promissor ao combate da esquistossomose por sua atividade molusquicida. A esquistossomose, causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, é uma doença endêmica no Brasil e em muitos outros países tropicais (Davis, 1996).

Felício et al. (1995), analisando extrato bruto de folhas secas, concluíram que *B. intermedia* produz lupeol e β -amirina. Segundo Schenkel et al. (2000) lupeol e β -amirina são saponinas do tipo triterpenos pentacíclicos. As saponinas triterpênicas encontram-se, predominantemente, em dicotiledôneas. A

capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determina um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre as membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando a sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre as membranas estão as atividades hemolíticas, ictiotóxica e molusquicida, freqüentemente observadas.

O gênero *Byrsonima* também apresenta casca rica em taninos (Corrêa, 1984). O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que eles estejam envolvidos na defesa química contra o ataque de herbívoros e contra microrganismos patogênicos (Schenkel et al., 2000).

Os taninos estão entre os principais grupos de metabólitos secundários. São compostos fenólicos, em geral polifenóis de alto peso molecular, de estrutura química variável, com moléculas grandes; por isso, não costumam ser absorvidos pelo tubo digestivo. Por terem afinidade e precipitarem proteínas, são empregados na curtição de couros e peles. Possuem atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória (Pinto & Bertolucci, 2002).

O murici-pequeno é, principalmente, utilizado como adstringente nas diarreias e disenterias a partir da casca do caule. É indicada a dosagem de 1 xícara de chá da casca picada para 1 litro de água, tomando-se de 3 a 4 xícaras de chá ao dia (Rodrigues & Carvalho, 2001).

2.3 Embriogênese somática

A cultura de tecidos de plantas é considerada bastante eficaz na propagação de várias espécies, permitindo o crescimento de células, tecidos e órgãos isolados da planta-mãe, em condições assépticas e controlada. Com a demanda crescente da indústria de fármacos e a necessidade de conservação de

germoplasma, esta técnica tem sido extensamente empregada para a propagação de espécies medicinais (Rout et al., 2000).

A partir de uma otimização dos componentes do meio de cultura, a regeneração *in vitro* pode ser realizada por organogênese ou por embriogênese somática. A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Esta técnica apresenta grande potencial, entretanto, o seu sucesso em plantas lenhosas ainda é baixo (Guerra et al., 1999).

De acordo com Sharp et al. (1980), a embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: a embriogênese somática direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calos, e a embriogênese indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo. De acordo com Guerra et al. (1999), em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

2.4 Análises bioquímicas

Uma outra estratégia que possibilita evidências sobre a capacidade embriogênica do tecido é a avaliação de padrões bioquímicos dos calos. Nesse aspecto observa-se, nos tecidos vegetais, a ocorrência de metabólitos primários e secundários (Demain, 2000).

O crescimento de culturas embriogênicas é, geralmente, associado com as mudanças na síntese e na mobilização de proteínas, carboidratos e lipídeos. Os níveis destas substâncias dependem de diferentes fases de crescimento e eles têm a função de fornecer de energia para o crescimento celular.

Os aminoácidos, as proteínas e os carboidratos são considerados metabólitos primários. São compostos de alto peso molecular que formam e mantêm as estruturas de células e órgãos. Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas et al., 1998).

Os metabólitos secundários, em geral, não apresentam ação direta sobre a fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Também diferem dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que os metabólitos primários são encontrados em todo reino vegetal (Taiz & Zeiger, 2004).

As culturas de células vegetais possibilitam a produção de diferentes metabólitos. No entanto, na maioria dos casos, a proliferação de células e a biossíntese de metabólitos são fenômenos separados, tendo cada qual suas condições favoráveis (Buffa Filho et al., 2002).

A biossíntese de determinados compostos secundários pode ocorrer em todos os tecidos e células de uma dada espécie vegetal devido à totipotência celular. Durante o desenvolvimento dos calos, estes compostos têm sua origem no final da fase exponencial e predominam durante a fase estacionária, sendo estruturalmente derivados dos produtos do metabolismo primário (Demain, 2000).

2.5 Análises ultra-estruturais

O entendimento do desenvolvimento inicial de massas embriogênicas requer correlação com alterações bioquímicas e a observação subcelular. As

análises ultra-estruturais, por meio da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, têm sido utilizadas em vários estudos de embriogênese somática, como relatado em *Carica papaya* (Fernando et al., 2001), *Hordeum vulgare* (Eudes et al., 2003), *Vitis vinifera* (Jayasankar et al., 2003), *Arabidopsis* (Wagner et al., 2004) e *Theobroma grandiflorum* (Ferreira et al., 2005).

2.6 Análises citológicas

As células são as menores unidades que exibem as características funcionais da vida. A reprodução celular é a base da hereditariedade, do crescimento e do desesenvolvimento. O ciclo celular é o processo completo de divisão celular que pode ser simplificado em dois estágios – a intérfase e a mitose. O índice mitótico, definido como a percentagem de células na fase mitótica em relação ao total de células, é a reflexão positiva da capacidade da população celular de crescer (Hao et al., 2002).

A partir da determinação das fases lag, exponencial, linear e estacionária da curva de crescimento de calos, pode-se determinar o índice mitótico para cada fase desta curva. Com isso, é possível estipular o intervalo médio de subcultivos, que serão feitos quando as culturas estiverem no ponto mediano da fase linear da curva de crescimento, e a quantidade de biomassa celular que gerará o número desejado de embriões somáticos ao final do ciclo (Guerra et al., 1999).

O conhecimento de características, como o índice mitótico e a viabilidade celular ao longo do cultivo *in vitro*, pode gerar subsídios para a seleção de células com maior capacidade embriogênica, ainda na fase de calos. A utilização de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) facilita a visualização dos núcleos em divisão, pois este corante possui especificidade pelas ligações adenina-timina do DNA. Bons resultados, utilizando essa metodologia, foram

obtidos nos trabalhos com *Citrus* (Hao et al., 2002), *Nicotiana tabacum* (Winicur et al., 1998) e *Helianthus maximiliani* (Binsfeld et al., 2000).

As técnicas com provas fluorescentes são comumente utilizadas como corantes de viabilidade. A ação do diacetato de fluoresceína (FDA) é baseada na habilidade de detectar reações enzimáticas específicas dentro do citossol. O FDA é um corante de viabilidade essencialmente não-fluorescente, o qual é absorvido passivamente pela célula. Se a célula é viva, ela apresenta atividade da enzima esterase e o FDA é deesterificado para fluoresceína polar, o qual é fluorescente e acumula-se dentro da célula. Se a célula é morta, falta a atividade da esterase e não há fluorescência após a adição do FDA (Oparka & Harris, 1994; Widholm, 1972).

A análise em conjunto destas técnicas fornece um embasamento mais sólido para caracterizar tecidos com maior potencial embriogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. M. de A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, maio/jun. 2000.

BINSFELD, P. C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n.3, p. 263-272, 2000.

BUFFA FILHO, W. et al. Induction of bioactive metabolites in plant cell tissue culture of *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, v.27, p.403-416, 2002. Número Especial.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e**

transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF, 1984. v. I-VI.

DAVIS, A. Schistosomiasis. In: COOK, G. C. **Manson' tropical diseases.** London: W. B. Saunders Company, 1996. p. 1413-1456.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology,** London, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan. 2000.

EUDES, F.; et al. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v. 73, p. 147-157, 2003.

FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; LINS, A. L.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M. Triterpenos isolados das folhas de tres espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia,** São Paulo, v. 62, p. 91-92, jan./dez. 1995.

FERNANDO, J.; et al. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology And Technology,** v. 44, N. 3 : pp. 247 – 255, September, 2001.

FERREIRA, M. das G. R.. et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura,** v. 27, n. 3, p. 500-503, Dezembro 2005.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil – espécies do cerrado.** São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 239 p.

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

HAO, Y. J.; YOU, C. X.; DENG, X. X. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. **Plant Cell Report,** New York, v. 20, n. 3, p. 1123-1127, Oct. 2002.

JAYASANKAR, S., et al. Comparative anatomy and morphology of *Vitis Vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived

proembryogenic masses. **American Journal of Botany** v. 90, n.7, p.973–979. 2003.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 1, 386 p.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, vol. 28, No. 5, 892-896, 2005.

OPARKA, K. J.; HARRIS, N. OPARKA, K.J., READ, N.D. (1994). The use of fluorescent probes for studies of living plant cells. In: **Plant Cell Biology. A Practical Approach** (ed. by N. Harris & K.J. Oparka), pp. 27-50. IRL Press: Oxford.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E.B.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura Brasileira**, v.19, 2001. Suplemento.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169 p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology advances**, v. 18, p. 91-120, 2000

SHARP, W.R., SONDAHL, M., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. The physiology *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticulturae Review**, 2: 268-310, 1980.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 2000. p. 597-622.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer, 2002. 690 p.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.1, p. 13-36, 2000.

WAGNER, D.; et al.. Floral induction in tissue culture: a system for analysis LEAF – dependent gene regulation. **The Plant Journal**, v.39, p. 273 – 282, 2004.

WIDHOLM, J. M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 47, n. 4, p. 189-194, 1972.

WINICUR, Z. M., ZHANG, G. F., STAEHELIN, L. A. Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology**, v.117, p.501-513. 1998.

CAPÍTULO 2 – Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno

(*Byrsonima intermedia* A. Juss.)

1 RESUMO

NOGUEIRA, Raírys Cravo. Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2006. 41p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é uma planta medicinal do Cerrado, utilizada principalmente como febrífugo e adstringente nas diarreias e disenterias, que apresenta dificuldades de propagação sexuada. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar calos embriogênicos obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio de cultura MS suplementado de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Após sessenta dias, com a formação dos calos, estes foram repicados, por três vezes. A cada subcultivo, avaliou-se a formação de embriões globulares. Amostras de calos do cultivo inicial e dos subcultivos foram utilizadas para as análises de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, avaliação dos teores de amido e fenóis totais, além da determinação do índice mitótico e da viabilidade celular. O terceiro subcultivo apresentou a maior porcentagem de embriões somáticos, aproximadamente 70%. As células progrediram de um formato alongado para o isodiamétrico, caracterizando células meristemáticas com capacidade embriogênica. Células de calos obtidos do terceiro subcultivo apresentam organelas celulares mais desenvolvidas, apresentando evidências subcelulares de competência embriogênica. Calos subcultivados apresentaram o maior teor de amido aos 60 dias de incubação e a maior porcentagem de fenóis totais aos 80 e 100 dias. No segundo subcultivo, aos 40 dias de incubação, ocorre maior índice de divisão celular (18%) e aos 50 dias ocorre maior porcentagem de células viáveis (83%) com características embriogênicas.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Lisete Chamma Davide - UFLA (Co-orientadora), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva - UFLA (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

NOGUEIRA, Raírys Cravo. **Characterization of *Byrsonima intermedia* A. Juss. embryogenic callus.** 2006. 41p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The *Byrsonima intermedia* A. Juss. is a medicinal plant from Cerrado, used mainly as febrifuge and astringent in diarrheas and dysentery, and present difficulties in relation to its sexual propagation. This objective of this work was to characterize the embryogenic callus obtained from leaf segments inoculated in MS culture medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D. After sixty days, the formed callus was replicated three times. For each sub cultivation, the number of globular embryos formed was evaluated. Samples of initial callus and those obtained from the sub cultivations were used for scanning electronic microscopy, starch and total phenols quantification, in addition to the determination of mitotic index and cell viability. The third sub cultivation showed the highest percentage of somatic embryos, approximately 70%. The cells changed the shape from elongated to isodiametric, characterizing meristematic cells with embryogenic capacity. Cells of the callus obtained in the third sub cultivation showed cellular organelles more developed, evidencing the embryogenic competence at cellular level. Callus sub cultivated showed a higher starch level at 60 days after incubation and the highest total phenolic concentration at 80 and 100 days cultivation. In the second sub cultivation, at 40 days of incubation, it was observed the highest cellular division index (18%) and at 50 days it was verified the highest percentage of viable cells (83%) with embryogenic characteristics.

* Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Adviser), Lisete Chamma Davide - UFLA (Co-adviser), Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser).

3 INTRODUÇÃO

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das principais aplicações da cultura de tecidos, especialmente para as plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais (Barbosa et al., 1993). A cultura de tecidos também é de grande interesse em espécies que se encontram em vias de extinção em função, principalmente, da intervenção do homem em seu hábitat. Com essa tecnologia, é possível conservar essas espécies *in vitro*, em meios de manutenção e programar a produção comercial (Cerqueira, 1999).

Os protocolos baseados na cultura de segmentos nodais, gemas apicais e axilares, utilizados na organogênese, geralmente mostram baixa eficiência em termos regenerativos potenciais. Esse tipo de cultura ainda é caro, devido à manipulação intensa de mão-de-obra. Além disso, em algumas plantas, o estágio inicial de estabelecimento é lento e a sobrevivência das plantas, no final da fase *ex vitro*, é frequentemente baixa, o que reduz a produção potencial da micropropagação via organogênese. Em paralelo, esforços têm sido direcionados para a indução e o controle da embriogênese somática (Guerra et al., 1999).

Apesar das vantagens deste tipo de cultivo em relação à organogênese, a conversão de embriões somáticos em plantas ainda é uma etapa que pode apresentar dificuldades e, dessa forma, estudos complementares, para a caracterização morfológica, citológica e bioquímica, elucidariam as possíveis causas relacionadas a este processo. Para o murici-pequeno, estes dados ainda são desconhecidos.

O objetivo desta pesquisa foi o monitoramento citológico, bioquímico e ultra-estrutural das células envolvidas no processo de regeneração via embriogênese somática, a fim de fornecer subsídios para a otimização de protocolos de propagação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Embriogênese somática

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

De acordo com a metodologia descrita por Nogueira (2003), segmentos foliares de tamanho de 0,25 cm², obtidos de plântulas de murici-pequeno germinadas *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado de 1,0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e o pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C, por 15 minutos. Antes da inoculação, foram efetuados cortes na superfície adaxial do explante, a qual ficou em contato com o meio nutritivo. As culturas foram incubadas no escuro, a 27 ± 2°C.

Após sessenta dias, os calos foram repicados segundo a curva de crescimento determinada por Nogueira (2003). As repicagens foram efetuadas por três vezes, todas aos sessenta dias, resultando em três subcultivos. Avaliou-se a porcentagem de ocorrência estruturas globulares em calos provenientes do cultivo inicial e dos três subcultivos.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 25 tubos de ensaio, cada tubo contendo um explante. Utilizou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a determinação da porcentagem de ocorrência de estruturas globulares para cada repetição, considerou-se que a ocorrência de calos em 25 tubos de ensaio representaria 100%, em 13 tubos seria 50% e assim por diante.

4.2 Microscopia eletrônica

Calos de murici-pequeno foram induzidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Após a indução, os calos foram repicados aos 60 dias e proliferados por mais dois subcultivos, realizados a cada 60 dias, no meio de cultura de indução.

Amostras de calos do cultivo inicial e dos três subcultivos foram imersas em solução fixadora Karnovisk (pH 7,2) por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, em capela de exaustão, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato por três vezes e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em água, por 4 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas (três vezes) em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100 %, três vezes).

Para a microscopia eletrônica de varredura, calos do cultivo inicial e do terceiro subcultivo foram conduzidos ao aparelho de ponto crítico para a secagem e, então, montados em *stubs* para cobertura com ouro. Os espécimes foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural no Departamento de Fitopatologia da UFPA.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, após o gradiente de acetona, foi realizada a inclusão da resina, inicialmente, em Spurr/acetona 30% por 8 horas e, em seguida, resina 70%. Após 12 horas, as amostras passaram duas vezes por resina 100% por 24 horas cada vez, sendo o material colocado em molde adequado e conduzido para a polimerização em estufa a 70°C, por 48 horas. Os blocos obtidos foram conduzidos para estereoscópio para a retirada dos excessos de resina. Em seguida, secções semifinas ($0,85\mu\text{m}$) e ultrafinas ($<100 \text{ nm}$) foram seccionadas em ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut E), com o auxílio de navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel

de ouro, colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina filtrado em filtro Millipore (0,2 μ m), e observados em microscópio de luz para confirmação das ares de interesse. Posteriormente, novos cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de 300 mesh. As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo, por 3 min cada. A observação dos espécimes foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

4.3 Avaliação de teores de amido e fenóis totais

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Produtos Vegetais, do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA).

Calos de murici-pequeno foram induzidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. A cada sessenta dias, os calos foram repicados, resultando em três subcultivos.

Duas amostras de 10g de matéria fresca de calos foram coletadas de 20 em 20 dias, até 120 dias para a determinação do teor de amido. O amido foi extraído segundo o método hidrolítico de Lane-Enyon, descrito pela AOAC (1970) e determinado colorimetricamente pelo método da antrona, descrito por Dische (1962). Utilizaram-se calos do cultivo inicial e do segundo subcultivo.

A determinação dos teores de fenóis totais foi realizada conforme o método colorimétrico de Folin-Denis (Swain & Hillis, 1959), empregando-se duas amostras de 10g de matéria fresca de calos, provenientes do segundo subcultivo, coletadas de 20 em 20 dias até 100 dias.

Os dados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por período de coleta. Utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4 Índice mitótico e viabilidade celular

Investigou-se o padrão de índice mitótico e viabilidade celular de calos no segundo subcultivo, a fim de confirmar se a época de repicagem dos calos foi ideal para a maior formação de embriões globulares no terceiro subcultivo.

As análises do índice mitótico e da viabilidade celular foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.4.1 Índice mitótico

Duas amostras de calos de, aproximadamente, 0,5 g cada, obtidas a partir do segundo subcultivo em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, foram coletadas aos 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias da curva de crescimento e armazenadas em fixador Carnoy (3 partes de etanol:1 parte de ácido acético) por 20 horas em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram mantidas a -22°C, para posterior preparação para análise microscópica.

As frações de calos foram transferidas para eppendorf contendo 0,5 ml de solução tampão McIlvaine (pH 7,0) e, em seguida, foram filtradas em peneira com malha de 100 µm e centrifugadas a 6.000 rpm por 2 segundos. O precipitado foi ressuspensionado em tampão McIlvaine e, após a formação do pellet, retirou-se o excesso da solução. Em lâmina, adicionaram-se 10µL de 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) na concentração de 2µg mL⁻¹ a 20µL da suspensão celular final. Após 5 minutos, procedeu-se a observação em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, utilizando filtro WU sob aumento total de 400X.

O índice mitótico [(número de células em mitose/número total de células) x 100] foi obtido para 200 células. Os dados foram analisados

utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por período de coleta. Utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4.2 Viabilidade celular

Duas amostras de calos, contendo 1g de matéria fresca cada, foram obtidas a partir do segundo subcultivo, em intervalos de 10 dias, até o final de 120 dias de cultivo.

Cada amostra foi homogeneizada em 10 mL de solução de manitol 0,6M e CaCl_2 0,03M, por 30 minutos, a 90 rpm e em temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Na ausência de luz, estas amostras foram filtradas em peneira com malha de 100 μm , retirando-se 980 μL da suspensão e adicionando-se 20 μL de uma solução 0,5% de FDA (diacetato de fluoresceína) em eppendorf, resultando em 0,01% de FDA. Após 5 minutos, procedeu-se a contagem de células viáveis com fluorescência verde e formato isodiamétrico em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, utilizando-se o filtro WIBA, sob aumento total de 100X.

Os dados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por período de coleta. Utilizou-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Embriogênese somática

No início da cultura, os calos apresentavam-se friáveis e de cor esverdeada, entretanto, após dois subcultivos, a cada 60 dias, ocorreu o aparecimento progressivo de calos com aspecto granular e de cor amarela, juntamente com a formação de estruturas globulares com coloração amarelada ou esbranquiçada (Figura 1).

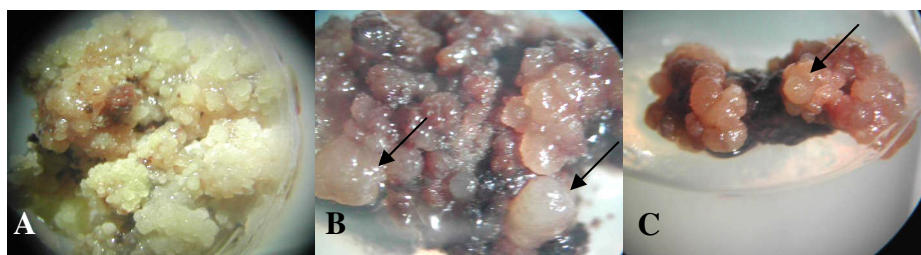


FIGURA 1. Estereofotografias de calos de murici-pequeno com aspecto friável (A) e calos granulares com estruturas globulares (B e C). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O aparecimento das estruturas globulares iniciou-se no segundo subcultivo, com cerca de 17% de ocorrência, entretanto, atingiu, aproximadamente, 70% no terceiro subcultivo (Figura 2).

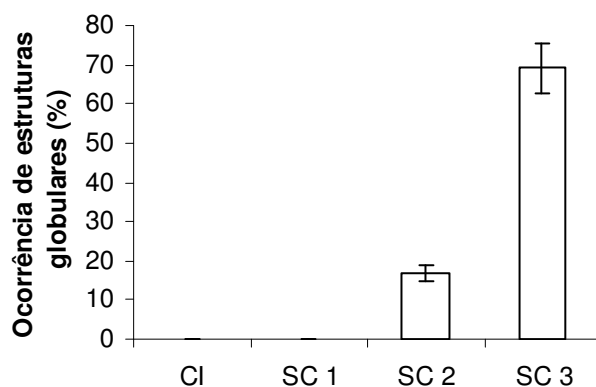


FIGURA 2. Ocorrência de estruturas globulares em calos de murici-pequeno no cultivo inicial (CI) e nos subcultivos (SC) em meio MS contendo 2,4-D e na ausência de luz. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Observa-se uma progressão no aparecimento de estruturas globulares, indicando que o início da embriogênese somática em murici-pequeno caracterizou-se pela mudança de um calo de aspecto friável para o aspecto granular e, posteriormente, ainda em permanência no meio de cultura de indução de calos, possibilitou a formação dos embriões somáticos.

A presença de calos com aspecto granular foi pré-requisito para a embriogênese somática em cafeeiro. Com 4 meses de cultivo, na presença de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, os calos apresentaram setores embriogênicos, os quais apresentavam textura granular, coloração amarela intensa e 1 a 3 mm de comprimento. Após 6 meses, estes setores embriogênicos continuaram a crescer, atingindo de 8 a 10 mm (Teixeira et al., 2004). Calos granulares também foram formados durante o processo de embriogênese somática indireta de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (Verdeil & Buffard-Morel, 1995).

Há relato, na literatura, de que a permanência por longos períodos em 2,4-D ocasiona efeito inibitório sobre a capacidade embriogênica dos calos (Guerra et al., 1999). Entretanto, neste trabalho, o que se observou foi um estímulo à formação de complexos embriogênicos em contato com o 2,4-D.

Trabalhos sobre a influência do tempo de permanência de explantes em 2,4-D na formação de massas embriogênicas são escassos. Guerra et al. (2001) testaram diferentes tempos de exposição de explantes ao 2,4-D e observaram que com 8 semanas em contato com 2,4-D e após a transferência para meio básico, sem regulador de crescimento, ocorreu a maior formação de embriões somáticos.

Em *Araucaria angustifolia*, proembriões somáticos foram obtidos de embriões zigóticos a partir de calos subcultivados, a cada 20 dias, por 4 anos (Astarita & Guerra, 2000).

O aspecto dos calos com estruturas globulares obtidos neste trabalho foi semelhante ao dos calos obtidos na embriogênese somática de *Feijoa sellowiana* B. (Stefanello et al., 2005), os quais foram induzidos em meio de cultura na presença de 2,4-D, por 60 dias e proliferados por 120 dias em meio contendo 2,4-D, combinado com diferentes citocininas. Ignacimuthu et al. (1999), em pesquisa com *Eryngium foetidum* L., também obtiveram calos embriogênicos na presença de 2,4-D com aparência correspondente aos apresentados neste trabalho.

Apesar de ser uma planta lenhosa, o murici-pequeno apresentou indução de embriogênese somática semelhante à da planta herbácea, pois necessitou da permanência prolongada em 2,4-D para a formação de massas embriogênicas.

Em milho (*Zea mays*), a indução de calos usando $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e as repicagens realizadas em meio com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ por 2 a 3 meses proporcionaram a maturação dos embriões somáticos (Santos-Serejo & Aguiar-Perecin, 2000).

No caso do caqui (*Diospyros kaki*), a indução de massas embriogênicas foi realizada em meio contendo $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina (Carvalho et al., 2004). Os embriões globulares de caqui também foram muito semelhantes aos deste trabalho.

Vários experimentos foram conduzidos nesta pesquisa para promover o desenvolvimento destes embriões somáticos de murici-pequeno, mas houve forte oxidação em todos os tratamentos, apesar da presença de carvão ativado no meio de cultura, não havendo evolução para os demais estádios embrionários.

Resultados similares foram obtidos por Ferreira et al. (2005), em embriogênese somática de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Estruturas semelhantes a embriões apareceram em pequenos grupos ou em forma de “cachos” sobre a superfície de tecido foliar inoculado na presença de TDZ e ANA. As culturas foram subcultivadas a cada 15 dias nesse meio, durante dois meses. Entretanto, uma semana após a transferência destas estruturas para o meio de regeneração, a fim de estimular o completo desenvolvimento do embrião, observou-se que as estruturas estavam mais densas, com aspecto mais escuro e secaram. Assim, não foi possível estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos além desse estágio; contudo, ficou demonstrado o potencial morfogênico de folhas de cupuaçu.

5.2 Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as células passaram de formato alongado, predominante no cultivo inicial e no primeiro subcultivo, para um formato arredondado presente no segundo e no terceiro subcultivos (Figura 3). Além disso, nas amostras do terceiro subcultivo, foi possível a distinção de regiões em organização esférica, semelhante a embriões somáticos em estágio globular.

As células do cultivo inicial e do primeiro subcultivo apresentaram dimensões de $140 \times 30 \mu\text{m}$ e as células do segundo e terceiro subcultivos possuíam dimensões de $35 \times 40 \mu\text{m}$, caracterizando um formato esférico.

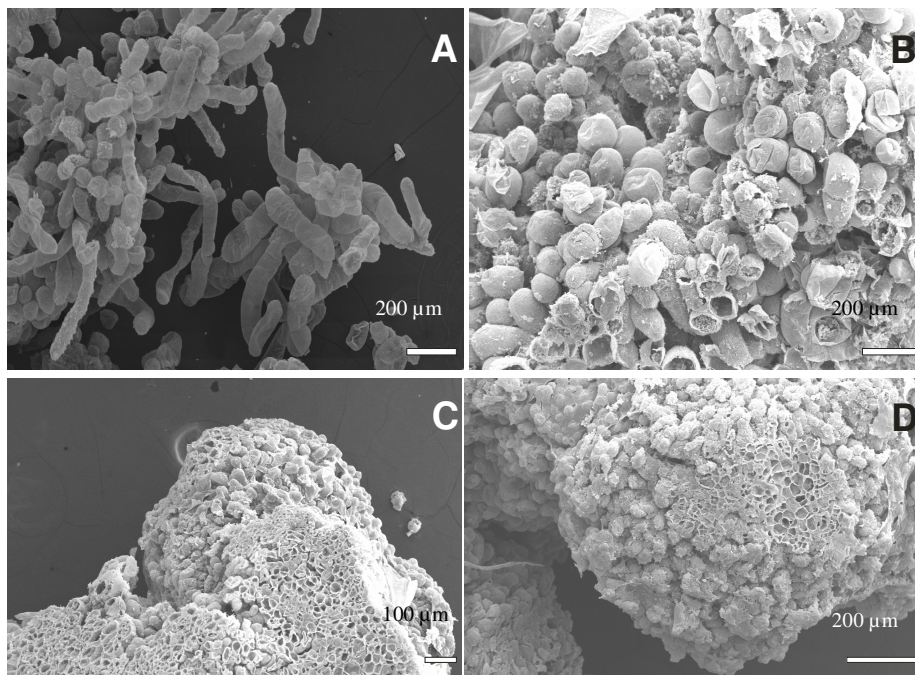


FIGURA 3. Eletromicrografia de varredura de células de calos de murici-pequeno com formato alongado no cultivo inicial (A); células de formato arredondado no segundo subcultivo (B) e estruturas globulares em calos no terceiro subcultivo (C e D). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2003). Os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (Tomes, 1985).

A morfologia celular isodiamétrica do segundo e terceiro subcultivos, detectada neste trabalho, é semelhante à das células *Carya illinoensis*, apesar da utilização de ácido naftaleno acético (ANA) para a indução de regiões embriogênicas (Rodriguez & Wetzstein, 1998). Ferreira et al. (2005) também observaram estruturas semelhantes a embrióides, em pequenos grupos ou em forma de “cachos” sobre a superfície de tecido foliar, demonstrando o potencial morfogenético de folhas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) para embriogênese somática.

Pelas eletrofotomicrografias de varredura, foi possível a visualização nítida de mudança do formato celular ao longo do tempo de exposição ao 2,4-D, supondo que a permanência nesta auxina fosse fator crucial para a sinalização de desdiferenciação celular e conseqüente retomada de características meristemáticas, favorecendo a embriogênese somática (Ammirato, 1993).

Em *Cynodon dactylon*, Chaudhury & Qu (2000) também realizaram observações semelhantes a este trabalho, verificando também células alongadas e tubulares em meio de indução de calos em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D, sem sinais de qualquer tipo de regeneração. No entanto, ao adicionar $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP ao meio com 2,4-D, os calos apresentaram estruturas de coloração amarelada e células arredondadas, caracterizando células com potencial meristemático.

Quanto à análise de microscopia de transmissão, as células de calos obtidos no cultivo inicial apresentaram núcleos desorganizados e grãos de amido (Figura 4A-B). Já as células de calos obtidos do terceiro subcultivo apresentaram

núcleos mais organizados, nucléolos mais proeminentes e maior presença de amiloplastídeos (Figura 5A-B).

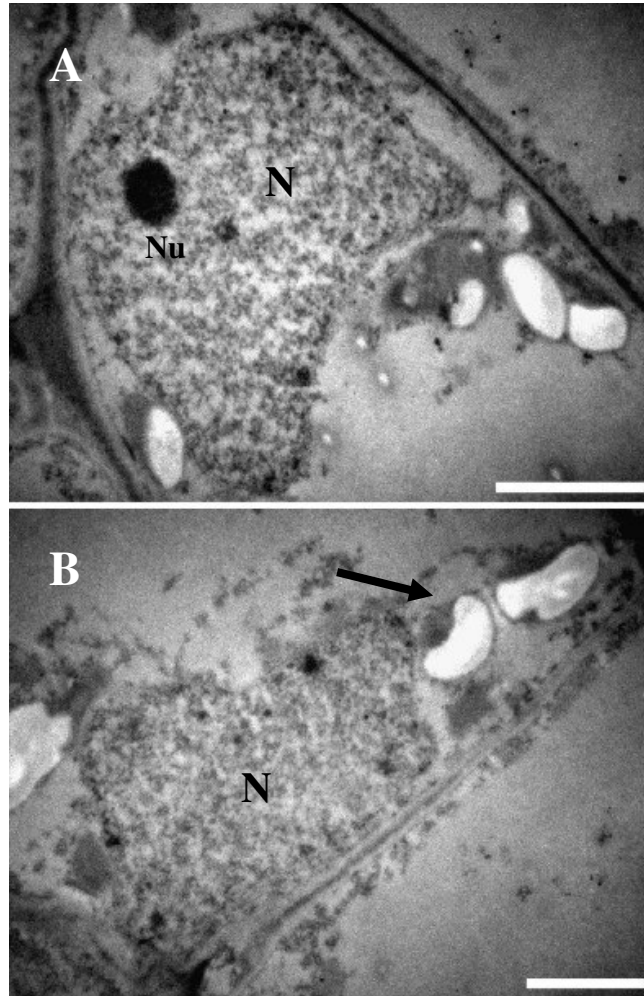


FIGURA 4. Eletromicrografia de transmissão de células obtidas de calos no cultivo inicial. Presença de núcleo (N) e amiloplastídeos (setas pretas). As barras equivalem a 2 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

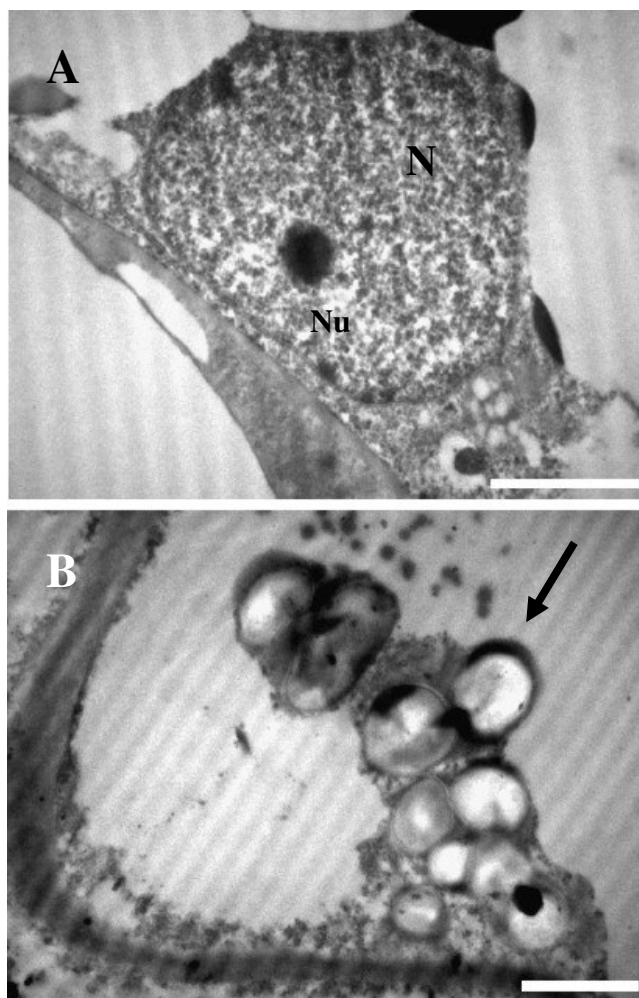


FIGURA 5. Eletromicrografia de transmissão de células obtidas de calos no terceiro subcultivo. Presença de núcleo (N) e amiloplastídeos (setas pretas). As barras equivalem a 2 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

As células do cultivo inicial apresentavam mitocôndrias com poucas cristas e formato alongado, além de poucas organelas. Já as células do terceiro subcultivo possuíam mitocôndrias com formato oval (Figura 6 A-B).

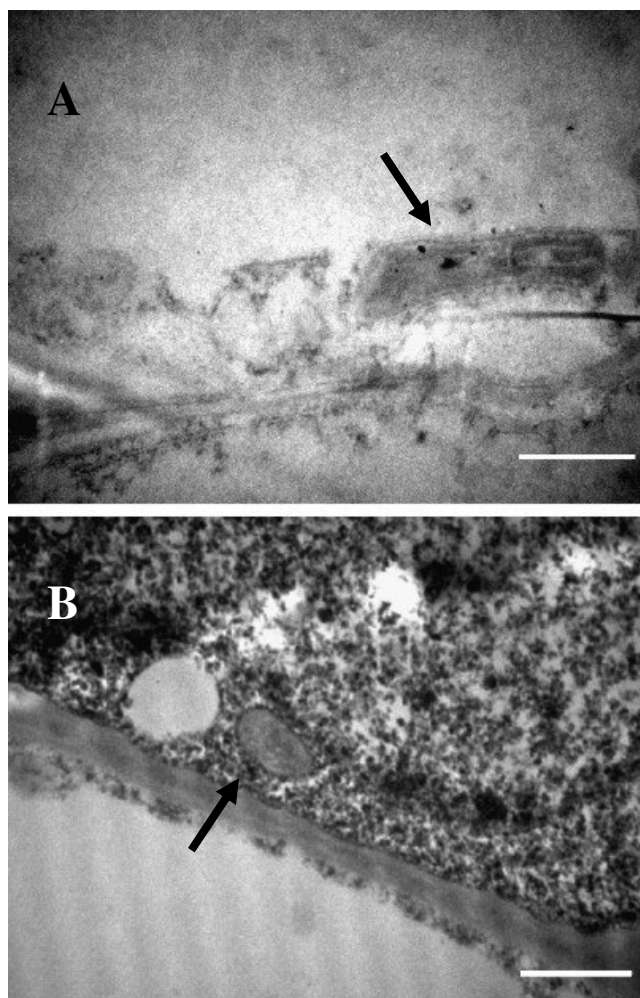


FIGURA 6. Eletromicrografia de transmissão de células obtidas de calos no cultivo inicial (A) e no terceiro subcultivo (B). Presença de mitocôndrias (setas pretas). As barras equivalem a 1 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Por estas observações, verifica-se que houve alterações celulares a partir do cultivo inicial até o terceiro subcultivo, de maneira que as células adquirissem condições fisiológicas suficientes para desenvolver a capacidade embriogênica.

Observações semelhantes foram realizadas por Canhoto et al. (1996), em *Feijoa sellowiana*, cujas células embriogênicas apresentaram núcleo bem desenvolvido com nucléolo proeminente, grânulos de amido e mitocôndrias com forma oval, enquanto que células não-embriogênicas apresentavam mitocôndrias alongadas.

As mitocôndrias existentes nos calos de murici-pequeno do terceiro subcultivo, além do formato oval, apresentavam melhor viausalização das cristas mitocondriais. A presença destas organelas é descrita em sistemas embriogênicos, sendo associada com alta taxa respiratória (Canhoto et al., 1996).

No entanto, os dois tipos celulares apresentaram baixíssima ocorrência de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Este aspecto poderia ser considerado como um tipo de anormalidade celular causada pela presença de 2,4-D, como relatado por Cangahuala-Inocente et al. (2004) e Rodriguez & Wetztein (1996) em pesquisas com *Feijoa sellowiana* e *Carya illinoensis*, respectivamente. Entretanto, a menor ocorrência destas organelas é relatada, por Junqueira & Carneiro (1997), como característica de células meristemáticas ou embrionárias.

Quanto à ocorrência abundante de grãos de amido, esta tem sido relacionada à aquisição de potencial embriogênico (Maheswaran & Williams, 1985; Profumo et al., 1987; McCleary and Matheson, 1976).

Mikula et al. (2004) também relataram grande quantidade de amido em células embriogênicas de calos de *Gentiana punctata*, relacionando este padrão bioquímico como fonte de energia para a intensa divisão celular e para o posterior desenvolvimento dos embriões.

5.3 Avaliação de teores de amido e fenóis totais

Os teores de amido em calos provenientes do cultivo inicial e do segundo subcultivo encontram-se na Figura 7. Para a interação de subcultivo e dias, houve efeito significativo para os teores de amido.

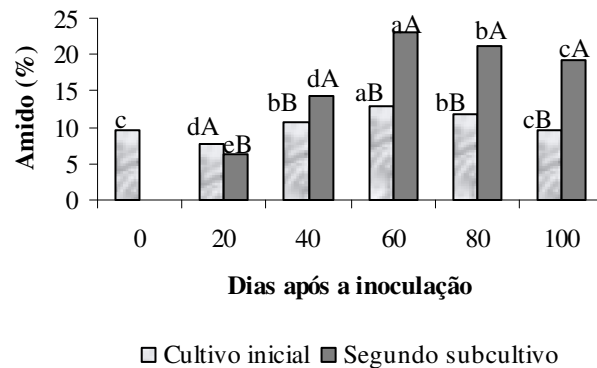


FIGURA 7. Teores de amido em células de calos obtidas no cultivo inicial e no segundo subcultivo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, de acordo com o teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Observou-se que os teores de amido obtidos no cultivo inicial foram bem menores que os encontrados no segundo subcultivo. Enquanto a maior porcentagem de amido no cultivo inicial foi 12,88%, no segundo subcultivo foi 23,04%, ambos aos 60 dias.

O nível desta molécula pode mudar, dependendo da fase de crescimento, uma vez que a divisão celular demanda uma grande quantidade de carbono e ATP para o metabolismo (Silveira et al., 2004).

Esta maior quantidade de amido de um cultivo para o outro pode ser relacionada com uma possível reserva de carbono para os eventos de desenvolvimento do embrião em fases finais de desenvolvimento, como alta divisão celular e taxa respiratória (Profumo et al., 1987; Mikula et al., 2004).

A presença de amido também foi marcante em células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Astarita & Guerra, 1998).

Quanto aos teores dos fenóis totais no segundo subcultivo, segundo a análise de regressão, estes apresentaram as maiores porcentagens aos 80 dias e 100 dias, com 6,41% e 6,15% de fenóis totais, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 8).

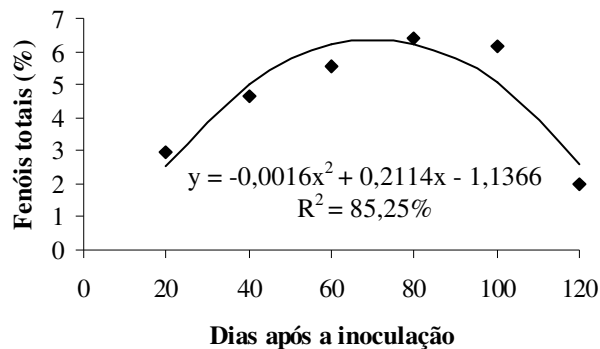


FIGURA 8. Teor de fenóis totais em células de calos obtidos do segundo subcultivo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Estes compostos já haviam sido determinados no cultivo inicial de calos de murici-pequeno por Nogueira (2003), atingindo 0,142% e 0,133%, aos 40 e 80 dias, respectivamente. A permanência prolongada em meio contendo 2,4-D pode ter proporcionado a maior formação de metabólito secundário em células de calos e seu declínio a partir dos 100 dias, principalmente, pode ter sido ocasionado pela redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (Smith, 1992).

É importante destacar que a maior formação de fenóis totais, aos 80 e 100 dias, foi precedida da maior síntese de amido aos 60 dias (Figura 9).

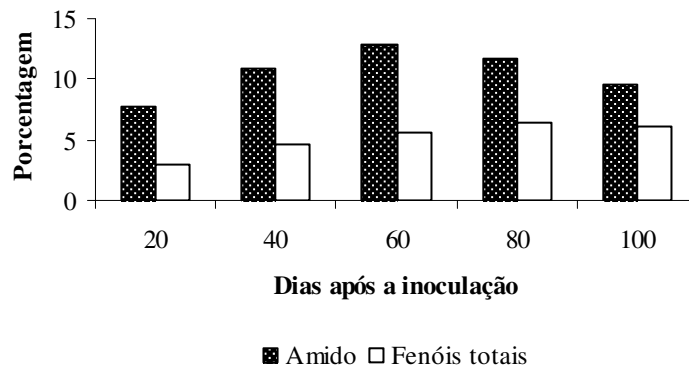


FIGURA 9. Relação entre o teor de amido e de fenóis totais em células de calos obtidos do segundo subcultivo. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O amido é um polissacarídeo formado por dois componentes, amilose e amilopectina, ambos formados por glicose. Esta molécula é um metabólito primário envolvido na formação de eritrose-4-fosfato, um dos compostos-chave da interligação do metabolismo primário com o secundário. Fornecida pela rota das pentoses-fosfato, a eritrose é precursora da rota do ácido chiquímico, de onde derivam os compostos fenólicos a partir dos aminoácidos aromáticos. Os resultados desta pesquisa evidenciam um redirecionamento do amido formado aos 60 dias para a uma posterior síntese de fenóis aos 80 e 100 dias.

Segundo Nogueira (2003), na curva de crescimento do murici-pequeno, a fase lag ocorreu até o 20º dia após a inoculação; a fase exponencial estendeu-se do 20º ao 40º dia de cultivo; a fase linear foi observada entre o 40º e o 60º dia de cultivo; entre o 60º e o 80º dias ocorreu a fase de desaceleração e do 80º ao 100º dia ocorreu a fase estacionária, na qual pode ocorrer o acúmulo de metabólitos secundários. A partir do 100º dia, a cultura entrou na fase de declínio (Smith, 1992).

No caso de *Stryphnodendron adstringens* M. (barbatimão), Vitor et al. (2005) obtiveram 1% de fenóis totais em calos cultivados na presença de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, aos 60 dias de cultivo. O subcultivo destes calos poderia ter favorecido a maior produção destes metabólitos secundários, como ocorrido neste trabalho.

No entanto, a maior formação de fenóis pode ser estimulada pela utilização isolada de citocininas, como no trabalho de Amaral et al. (2005), que obtiveram 28% de fenóis totais em calos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich.), utilizando 2,0 mg L⁻¹ de BAP na presença de luz e 2,65% com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, na ausência de luz.

Cangahuala-Inocente et al. (2004) já mencionavam que células com competência para embriogênese somática apresentam além de grãos de amido, compostos fenólicos. A presença de compostos fenólicos seria uma característica notável de centros meristemáticos que produzem embriões somáticos para inibir a hiper-hidricidade dos tecidos.

5.4 Índice mitótico e viabilidade celular

A coloração com DAPI permitiu a visualização dos núcleos em diferentes fases do ciclo celular como intérfase e metáfase (Figura 10).

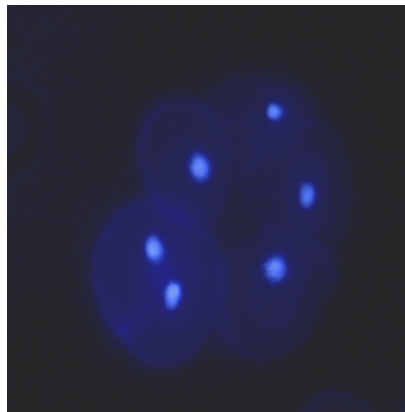


FIGURA 10. Fotomicrografia de fluorescência de células de calos de murici-pequeno coradas com DAPI. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O índice mitótico, entre os 20 e 40 dias do segundo subcultivo, não diferiram estatisticamente entre si, apresentando os maiores índices de divisão, 17% e 18,16%, respectivamente. A partir dos 60 dias, houve redução até os 120 dias de cultivo (Figura 11).

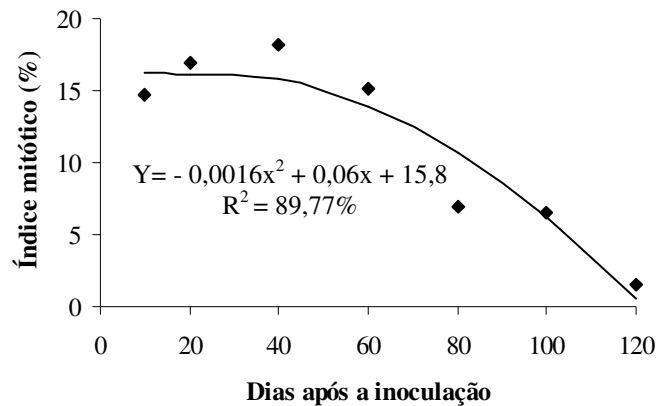


FIGURA 11. Índice mitótico de calos subcultivados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D durante 120 dias de permanência no escuro. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Apesar de Nogueira (2003) recomendar que a repicagem seja efetuada entre os 60 e 80 dias, caracterizada como a fase de desaceleração da curva de crescimento de calos de murici-pequeno, os resultados deste trabalho demonstraram que a época ideal para a transferência de células com potencial embriogênico não deve ultrapassar os 40 dias.

Hao et al. (2002) detectaram um índice mitótico de 40% em suspensão celular de citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) aos seis dias após a inoculação em meio de cultura. Já Winicur et al. (1998), investigando a ação do 2,4-D na divisão celular de suspensão de tabaco (*Nicotiana tabacum*), obtiveram aproximadamente 7% de índice mitótico no quinto dia de cultivo.

Em protoplastos de *Solanum lycopersicoides* aos sessenta dias de cultivo e em protoplastos de *Helianthus maximiliani*, aos 4 dias de cultivo, o índice alcançou 10% e 17%, respectivamente (Tylicki et al., 2002; Binsfeld et al., 2000).

Em calos de *Allium commutatum* Guss., subcultivados por 3 e 15 vezes, o maior índice mitótico foi de aproximadamente 2,5%, aos sete dias em meio de cultura contendo 2,4-D combinado com cinetina (Prolic et al., 2002).

Quanto à viabilidade celular, o período entre os 10 e 80 dias não diferiram estatisticamente entre si, entretanto, a maior porcentagem de células isodiamétricas com fluorescência verde (Figura 12) ocorreu aos 50 dias, com 83% (Figura 13).

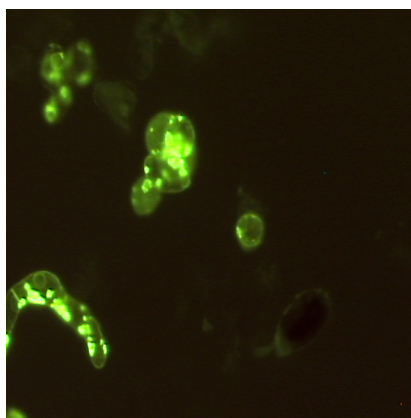


FIGURA 12. Fotomicrografia de fluorescência de células de calos de murici-pequeno coradas com FDA e visualizadas em microscópio de fluorescência. UFLA, Lavras, MG, 2006.

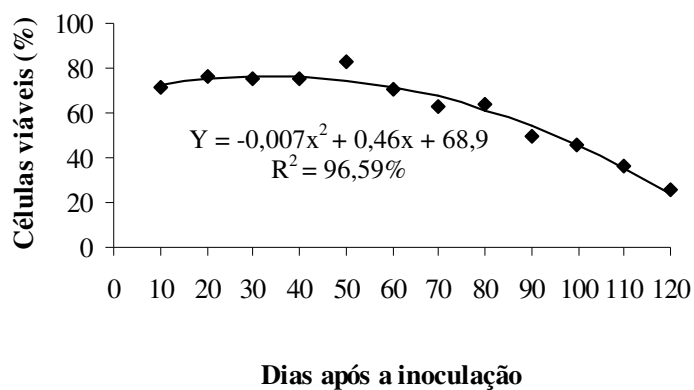


FIGURA 13. Número de células viáveis isodiamétricas ao longo da curva de crescimento de calo de murici-pequeno subcultivado. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A partir dos 90 dias, o número de células com características meristemáticas declinou consideravelmente até o último dia de incubação (120 dias), atingindo menos de 30%.

Considerando que o índice mitótico não apresentou diferenças significativas entre os 20 e 40 dias, a análise da viabilidade celular definiu que a melhor época para a transferência do segundo para o terceiro subcultivos de células, de modo a possibilitar a embriogênese somática, deve ser realizada até os 80 dias, a que corresponde ao final da fase de desaceleração determinada por Nogueira (2003).

As análises de índice mitótico e viabilidade celular permitiram a determinação de um período de tempo maior para a transferência de células com alta capacidade embriogênica. Nossos resultados discordam com Guerra (1999), o qual comenta que a fase linear da curva de crescimento da cultura seria o período ideal de transferência das células para meio líquido, a fim de otimizar a biomassa para a produção de embriões somáticos.

A utilização de FDA foi sugerida por Wildhom (1972) em calos de tabaco. Vários trabalhos passaram a certificar a viabilidade celular com este corante, como o trabalho de Steward et al. (1999) com alfafa (*Medicago sativa* L.) cuja suspensão apresentou 80% de viabilidade nos primeiros dias de cultivo. Te-chato et al. (2005) detectaram a viabilidade de protoplastos de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) de, aproximadamente, 82%.

6 CONCLUSÕES

A maior indução de calos embriogênicos com estruturas globulares em murici-pequeno ocorre no terceiro subcultivo.

As células progrediram de um formato alongado, no cultivo inicial e no primeiro subcultivo, para um formato isodiamétrico no segundo e terceiro subcultivos.

As células de calos do terceiro subcultivo apresentaram evidências, em âmbito subcelular, de competência embriogênica.

Calos de murici-pequeno submetidos a dois subcultivos apresentam características embriogênicas, como grande teor de amido e compostos fenólicos.

No segundo subcultivo, aos 20 e 40 dias, ocorrem os maiores índices de divisão celular.

Até os 80 dias de incubação dos calos, ocorre a maior porcentagem de células viáveis com características embriogênicas, o que torna esse período o ideal para a repicagem do material.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P. A.; CASTRO, A. H. F. Efeito do BAP na indução de calos e nos teores de fenóis e taninos totais em murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex. A. Juss.). In: **Resumos do XI Seminário Mineiro de plantas medicinais**, 2^a jornada farmacêutica de Diamantina. P.102, 2005.

AMMIRATO, P. V. **Embryogenesis**. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V., Yamada, Y. (Eds.), *Handbook of plant cell culture*, v. I. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 81-181. 1993.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**; Viçosa - Editora UFV, 2003, 438p.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Conditioning of the culture médium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Conifera). **In vitro Cell, Development Biology – Plant**, v. 36, may-june, 194-200, 2000.

ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal – suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 2, p.113-118, 1998.

BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. *Applebloesem*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n.1, p. 15-19, jan.1993.

BINSFELD, P. C.; PETERS, J. A.; SCHNABL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n.3, p. 263-272, 2000.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

CANHOTO, J. M.; MESQUITA J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v.78, p.513-521, 1996.

CARVALHO, D. C. de; et al. Embriogênese somática do caquizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 280-283, Agosto 2004.

CERQUEIRA, E. S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal**. Lavras, 1999, 81p. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal).

CHAUDHURY, A.; QU, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.113-120, 2000.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

FERREIRA, M. das G. R.. et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 500-503, Dezembro 2005.

GUERRA, P. M. et al. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

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

- HAO, Y. J.; YOU, C. X.; DENG, X. X. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. **Plant Cell Report**, New York, v. 20, n. 3, p. 1123-1127, Oct. 2002.
- IGNACIMUTHU, S.; et al. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, n. 56, p. 131-137, 1999.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 1997. 299p.
- MCCLEARY, B. V., MATHESON, N. K. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. **Phytochemistry**, v.15, p.43-47. 1976.
- MIKULA, A.; et al. Ultrastructural changes in zygotic embryos of gentiana punctata L. during callus formation and somatic embryogenesis. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 46, p.109-120, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- NOGUEIRA, R. C. **Propagação in vitro, análises bioquímicas de murici-pequeno** (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Fisiologia Vegetal)) - Universidade Federal de Lavras.
- PROFUMO, P., GASTALDO, P. & RASCIO, N. 1987. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. **Protoplasma**. v. 138, n. 2-3, p. 89-97, junho 1987.
- PROLIC, M.; RADIC, S.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B. Cytogenetic stability of *Allium commutatum* Guss. callus tissue. **Periodicum biologorum**, v. 104, n.4; p. 463-467. 2002.
- RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v.204, p.71-83, 1998.
- SANTOS-SEREJO J. A. dos; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, p.717-722, out./dez. 2000.

SHARP, W.R., SONDAHL, M., CALDAS, L.S., MARAFFA, S.B. The physiology *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticulturae Review**, 2: 268-310, 1980.

SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S., HANDRO, W.; GUERRA M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, Janeiro 2004, p. 53-60.

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

STEFANELLO, S., VESCO, L. L. DAL, DUCROQUET, J. P., NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae** 105: 117–126, 2005.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The fenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 10, p. 135-144, 1959.

STEWART, N.; et al. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 171 – 176, 1999.

TEIXEIRA, J. B.; et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica*) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos 121. 2004. 39p.

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

TYLICKI, A.; BURZA, W.; MALEPSZY, S. Structural and Ultrastructural Analysis of *Solanum lycopersicoides* Protoplasts during Diploid Plant Regeneration. **Annals of Botany**, v.90, p. 269-278, 2002.

VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**, Berlin: Springer-Verlag, 1995. v.30, p. 299-317.

WIDHOLM, J. M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 47, n. 4, p. 189-194, 1972.

WINICUR, Z. M., ZHANG, G. F., STAEHELIN, L. A. Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology**, v.117, p.501-513. 1998.