

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE  
LECHIEIRA (*Litchi chinensis* Sonn.) ATRAVÉS  
DO CULTIVO DE SEGMENTOS FOLIARES E  
NODAIS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS**

**ALESSANDRO CARLOS MESQUITA**

**1999**

48087

33-29MFN

8

**ALESSANDRO CARLOS MESQUITA**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE LECHIEIRA (*Litchi chinensis* Sonn.) ATRAVÉS DO CULTIVO DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS**

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



**Orientador**

**Prof. Renato Paiva**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS  
1999**

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

Mesquita, Alessandro Carlos

Estabelecimento *In Vitro* de Lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos / Alessandro Carlos Mesquita. -- Lavras : UFLA, 1999.

67 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Litchia. 2. Lechieira. 3. Biotecnologia *In Vitro*. 4. Micropropagação. 5. Sapindaceae. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.28

-634.6

**ALESSANDRO CARLOS MESQUITA**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE LECHIEIRA (*Litchi chinensis* Sonn.) ATRAVÉS DO CULTIVO DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS**

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

APROVADA em 01 de Novembro de 1999.

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

Prof. Dr. José Darlan Ramos

UFLA



Prof. Renato Paiva, PhD  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
1999

À minha esposa Carla Cordeiro Botelho Mesquita,  
pelo carinho, amizade e paciência.

Ao meu pai Jorge Carlos Filho;

à minha mãe, Maria F. Mesquita Carlos;

aos meus irmãos Adriano e Luciano,

pelo exemplo de vida e apoio nestes  
anos de estudo,

## **DEDICO**

A meus avôs e avós (in memorian),  
tia Doninha, Gilda, Sebastião e  
Luciano,

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me agraciar com saúde e força.

À minha esposa, pelo exemplo de companheirismo, carinho, amor e respeito.

À Universidade Federal de Lavras, em especial, ao Departamento de Biologia/Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade concedida para realização deste curso.

À CAPES e CNPq, pela concessão de bolsas de estudos.

Ao professor Renato Paiva, pela orientação no decorrer do curso e pela amizade formada nesse período.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, Luiz Edson Mota de Oliveira, Amauri Alves de Alvarenga, José Donizeti Alves e Angela Maria Soares pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do departamento de Biologia, Izonel, Evaristo, Dartagnam, Odorêncio, Joel, Lena e, em especial, ao laboratorista Mauro, pela amizade e apoio no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos amigos Paulo Artur, Márcia Debora, Patricia, Barbara e Cláudia pelos momentos de alegria e compreensão.

Aos colegas Guilherme, Rupert, Simone, Rodrigo, Rafael e Darlan pela atenção e amizade.

Às demais pessoas que tornaram possível a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

**ALESSANDRO CARLOS MESQUITA**, filho de Jorge Carlos Filho e Maria Francisca de Mesquita Carlos, nascido em 11 de novembro de 1970, em Lavras-MG. Concluiu o segundo grau na Escola Estadual “Dr. João Batista Hermeto”, em 1988. No início de 1990 foi aprovado no vestibular para graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em dezembro de 1995. No período de Janeiro de 1996 a agosto de 1997, desenvolveu pesquisas na área de microenxertia em Citros, como bolsista de aperfeiçoamento do CNPq, no Departamento de Agricultura/UFLA. Iniciou o seu curso de Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal, em agosto de 1997, concluindo-o em agosto de 1999.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 Descrição botânica.....	03
2.2 Propagação.....	04
2.3 Análises bioquímicas.....	07
3 Referências Bibliográficas.....	09
CAPÍTULO 2 Propagação <i>in vitro</i> de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn.) a partir de segmentos foliares e nodais.....	13
1 Resumo.....	13
2 Abstract.....	14
3 Introdução.....	15
4 Material e Métodos.....	16
4.1 Local.....	16
4.2 Material.....	16
4.3 Produção de mudas via sementes.....	17

4.4 Cultivo <i>in vitro</i> de explantes foliares de lechieira .....	18
4.4.1 Desinfestação de explantes foliares.....	18
4.4.2 Efeito do 2,4-D na formação de calos a partir de segmentos foliares de lechieira.....	19
4.4.3 Efeito do ácido naftalenoacético (ANA) na formação de calos a partir de segmentos foliares de lechieira.....	19
4.5 Obtenção da curva de crescimento de calos.....	20
4.6 Efeito do ácido naftalenoacético (ANA); benzilaminopurina (BAP); thiadizuron (TDZ) e cinetina no desenvolvimento <i>in vitro</i> de calos a partir de segmentos foliares de lechieira.....	21
4.7 Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de lechieira.....	22
4.7.1 Efeito do PVP no controle da oxidação <i>in vitro</i> ...	22
4.7.2 Efeito do carvão ativado no controle da oxidação em segmentos nodais de lechieira.....	22
4.7.3 Efeito de diferentes tempos de imersão em água corrente no controle da oxidação em segmentos nodais de lechieira.....	23
4.8 Efeito do ANA e BAP no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais obtidos a partir de plantas jovens de lechieira.....	24

5 Resultados e Discussão.....	25
6 Conclusões.....	37
7 Referências Bibliográficas.....	38
<b>Capítulo 3 Análises Bioquímicas de calos obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira (<i>Litchi chinensis Sonn.</i>).....</b>	<b>41</b>
1 Resumo.....	41
2 Abstract.....	42
3 Introdução.....	43
4 Material e Métodos.....	44
4.1 Análises Bioquímicas.....	44
5 Resultados e Discussão.....	48
6 Conclusões.....	58
7 Considerações finais .....	59
8 Referências Bibliográficas.....	60
ANEXOS.....	63

## RESUMO

Mesquita, Alessandro Carlos. Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos. Lavras:UFLA, 1999, 64p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia- Área de concentração em Fisiologia Vegetal)\*.

A lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) é uma frutífera que possui frutos de valor nutricional, cuja propagação via sementes é limitada. O objetivo desse trabalho foi obter um protocolo para o estabelecimento, *in vitro*, de segmentos foliares e nodais e, verificar o comportamento, *in vitro*, de calos através de análises quantitativas dos teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), aminoácidos e proteínas totais. Os explantes foram inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e mantidos em sala de crescimento, com presença e ausência de luz. Os resultados indicaram que a curva de crescimento de calos apresentou-se na forma sigmoideal, porém, apenas calos desenvolvidos na presença de luz e em meio MS, contendo 6,0 mg/L 2,4-D, apresentaram cinco fases distintas (lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária). Os resultados também indicam que a repicagem dos calos obtidos, deve ser efetuada aos 63 dias após a inoculação. As análises quantitativas dos calos de lichia demonstraram que os maiores teores de AST, aminoácidos e proteínas totais foram observados na presença de luz, enquanto que os teores de AR foram mais elevados para explantes cultivados na ausência de luz. Os calos mantidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D apresentaram altos teores de AR, aminoácidos e proteínas totais e calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D apresentaram altos teores de AST.

---

\* Orientador: Renato Paiva- UFLA

## ABSTRACT

Mesquita, Alessandro Carlos . *In vitro* establishment of litchi (*Litchi chinensis* Sonn. ) through the cultivation of leaf and nodal segments and biochemical analyses of calluses. Lavras: UFLA, 1999, 67p. (Dissertation – Master in Agronomy – major in Plant Physiology ).

The litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) is a fruit-bearing tree which possesses fruits of nutritional value, and limited propagation via seeds. The objective of this work was to obtain a protocol for the *in vitro* establishment of leaf and nodal segments and verify the *in vitro* behavior of calluses through the quantitative analyses of total soluble sugar (TSS), reducing sugars (RS), total aminoacids and proteins. The explants were inoculated in MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and maintained in growth room, in the presence and absence of light. The results indicated that the growth curve of calluses presented itself in the sigmoid shape but only calluses developed in the presence of light and in MS medium, containing 6.0 mg/L 2,4-D presented five distinct phases (lag, exponential, linear, deceleration and stationary). The results also indicate that the transplanting of calluses obtained should be done at 63 days after inoculation. The quantitative analyses of litchi calluses showed that the highest contents of TSS , aminoacids and total proteins were observed in the presence of light while the RS contents were higher for the explants grown in the presence of light. The calluses kept in the presence of 2,0 mg/L 2,4-D presented high contents of RS, aminoacids and total proteins and calluses kept in the presence of 6,0 mg /L 2,4-D presented high contents of TSS.

---

Adviser : Renato Paiva – UFLA

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), é uma frutífera pertencente à família *Sapindaceae*, oriunda da China, sendo cultivada há milhares de anos pelos chineses.

A partir do século XIX, a lechieira foi dispersada para países, como Índia, Japão, Austrália, África do Sul, Honduras, Brasil e Estados Unidos, sendo que, foi neste último país, que se originou a variedade mais cultivada atualmente, a 'Brewster' (Lee e Wicker, 1991).

Três subespécies de lechieira são conhecidas: *Litchi chinensis*, *L. philippensis* e *L. javanensis*, mas somente a *Litchi chinensis* produz frutos, que apresentam interesse econômico (Martins, 1992).

Atualmente, a lechieira é considerada, em todo mundo, como a "Rainha das frutas" por sua aparência e sabor delicado semelhante ao da uva "Ítália", com aspecto similar a um morango (Martins, 1992).

Embora, no Brasil, exista comercialização desta fruta, em algumas cidades de maior porte, a lechieira ainda é pouco conhecida pela população. Possui alto valor nutritivo, sabor e aroma agradáveis. Seu consumo é variado, podendo ser encontrada "in natura", na forma de conservas, xaropes; ou seca (Chan e Kwok, 1974; Paul et al. 1984).

A propagação da lechieira pode ser realizada tanto de forma assexuada, quanto sexuada. Segundo Saucó e Menini (1989), a propagação sexuada (via semente), possui desvantagens, como a rápida perda de viabilidade, ocorrência da segregação varietal e presença de longo período juvenil.

Comercialmente, a lechieira é propagada, assexuadamente, via alporquia (Sauco e Menini, 1989). Ram e Majundar (1983), no entanto, consideram esse tipo de propagação, um entrave à expansão da cultura, pois, além de ser considerado um procedimento caro, esse processo possui baixo rendimento e produz pequeno número de mudas por planta matriz.

Baseado nesse contexto, o sucesso do cultivo dessa frutífera depende de processos mais viáveis de produção de mudas. A propagação através da cultura de tecidos, por exemplo, pode ser utilizada como um processo alternativo, visando através de suas técnicas, a obtenção de um grande número de mudas a um custo acessível.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar o cultivo, *in vitro* como alternativa de propagação da lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), utilizando diferentes processos de micropropagação, além da realização de análises bioquímicas dos calos obtidos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A lechieira é uma árvore vigorosa, podendo atingir 10 a 12 metros de altura (Figura 1). Segundo Sauco e Menini (1989), esta frutífera é considerada uma planta perene de grande longevidade.



FIGURA 1- Aspecto visual de plantas de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), em floração (A) e em produção (B).

Seu sistema radicular possui raiz pivotante e raízes absorventes que são encontradas até um metro de profundidade, quando propagada por sementes. Plantas obtidas a partir de alporquia, não apresentam raiz pivotante, apenas raízes fasciculadas (Saucu, 1990). Suas folhas são compostas, alternadas, possuindo de 2 a 5 pares de folíolos pequenos, com coloração, variando do verde pálido ao bronzeado (Calabrese, 1978).

O florescimento ocorre na primavera, após a diferenciação floral, que ocorre no inverno anterior. As flores não apresentam pétalas e são de coloração branco-escurecidas, pequenas, com tamanho aproximado de 0,3cm, reunidas em panículas terminais ou subterminais (Calabrese, 1978).

Os frutos são do tipo baga, com casca coriácea, áspera e avermelhada. A polpa, parte comestível (denominada de arilo), é translúcida, branca, semelhante à jabuticaba. Segundo Bittenbender (1984), o arilo, em média apresenta as seguintes características químicas, por 100g: água (81,2g), calorias (65cal), proteínas (0,8g), gorduras (0,4g), carboidratos (16,3g), fibras (0,2g), cálcio (10mg), fósforo (29mg), ferro (0,3mg), sódio (3mg), potássio (170mg), tiamina (0,05mg), riboflavina (0,06mg), niacina (0,6mg) e vitamina C (50mg).

A lechieira possui apenas uma semente, que varia em tamanho e forma de acordo com a variedade.

Atualmente, as variedades mais cultivadas por todo o mundo são a 'Bengal' e 'Brewster', ambas de maturação precoce. Outras variedades de pouca importância econômica são a 'Amboina', 'Grofff', 'Hak ip', 'Kwa luk', 'Maurício (Kwai Mi)', 'No Mai Tsze', 'Tai tsao' (Saucó, 1990).

## **2.2 PROPAGAÇÃO**

A propagação da lechieira pode ocorrer, tanto através de sementes, como de forma vegetativa.

A propagação sexuada da lechieira pode apresentar o inconveniente da queda de viabilidade, quando exposta às condições ambientais e produzir plantas com um período juvenil extenso (Saucó e Menini, 1989).

A propagação vegetativa é geralmente realizada através dos processos de mergulhia, alporquia, enxertia e estaquia. A mergulhia, embora lenta e custosa, é o processo mais usado na China e na Índia, juntamente com a alporquia (Gomes, 1984). Comercialmente, a propagação é realizada por alporquia, através do enraizamento de ramos ainda unidos à planta matriz (Abutiati e Nakasone, 1972). A alporquia pode ser realizada em qualquer época do ano, desde que se tenha umidade suficiente e tipo adequado de substrato

(Kadmam e Slor, 1974). O fator juvenildade pode influenciar a porcentagem de ramos enraizados: ramos de plantas mais jovens proporcionam um enraizamento 35% superior ao obtido, quando se utilizam de plantas mais velhas. Para se obter alta porcentagem de enraizamento, Kadman (1985) recomenda que os alporques sejam tratados com ácido indol butírico (AIB) a 2.500 mg/L.

A estaquia é um processo de propagação assexuada simples e rápido, que origina plantas idênticas à matriz. O sucesso desse método depende de fatores genotípicos, condições ambientais (Menzel, 1985), tipo de estaca, condições fisiológicas da planta matriz e tipos de reguladores de crescimento utilizados (Calabrese, 1978).

Segundo Martins (1998), utilizando-se a estaquia como método de propagação de lechieira, tem sido observada uma diferença varietal, quanto à porcentagem de enraizamento de estacas e resposta ao tratamento com regulador de crescimento AIB. Segundo Leonel, Rodrigues e Cereda (1994), o uso de AIB na concentração de 5.000 ppm é capaz de promover, aproximadamente, 83,0% de enraizamento de estacas de lechieira 120 dias após o tratamento.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação. A cultura de tecidos é um processo, através do qual, pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de uma planta e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos, em um meio nutritivo previamente definido (Mantell, Matthees e Mckee, 1994).

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das aplicações de mais larga utilização. Destina-se, principalmente, àquelas plantas que são de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes em curto período de tempo. A utilização da micropropagação, ao nível comercial, já é realizada em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa

Ocidental e os Estados Unidos, objetivando satisfazer os métodos convencionais de propagação vegetativa.

A condição fitossanitária da planta matriz é importante à medida que irá determinar a facilidade em se descontaminar o explante durante o isolamento. Apesar de se realizar uma desinfestação dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados já na planta matriz. A primeira medida é a manutenção dessas plantas, em ambiente mais limpo, como uma casa de vegetação, ou câmara de crescimento, uma vez que, nos ambientes naturais, a planta está exposta a todo tipo de intempérie e insetos, que provocam ferimentos, permitindo a entrada de microrganismos (Torres e Caldas, 1990).

O emprego de cultura de tecidos em lechieira já foi descrito por alguns pesquisadores. Segundo Kuang et al. (1996), o cultivo de embriões de lechieira, em meio MS, suplementado com 2,4-D, foi capaz de induzir calogênese e no meio MS, suplementado com ANA e AIB, promovendo a embriogênese somática.

De acordo com Zhou, Kuang e Ma (1993), o cultivo de embriões imaturos de lechieira é possível, utilizando o meio de cultivo "MS", suplementado com 2,4-D; BAP e ANA. Embriões cultivados em meio contendo concentrações elevadas de 2,4-D e concentrações inferiores de BAP e ANA, são capazes de diferenciar em calos. Embriões somáticos cultivados em meio "MS" associados às baixas concentrações de ANA e BAP, são capazes de regenerar plântulas completas.

## 2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Calos, segundo Torres e Caldas (1990) são tecidos que podem apresentar diferenciação parcial, constituídos por uma massa de células irregulares, diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente, em resposta às injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciarem em tecidos e órgãos.

Segundo Yeoman e Macleod (1977), apesar de calos serem tecidos não diferenciados e crescerem como grupos de células desorganizadas, estes podem apresentar composição bioquímica e exigências distintas, em relação ao explante e planta de origem (Phan, Do e Hegedus, 1987). O requerimento de nutrientes e compostos orgânicos em tecidos vegetais, mantidos *in vitro*, tem sido estudado, visto que, tais tecidos podem perder, diminuir ou aumentar, em certos casos, a síntese de substâncias exigidas para o seu desenvolvimento normal (Serra, 1999).

A determinação do nível de proteínas e aminoácidos em tecidos é uma das análises mais comuns em fisiologia vegetal (Passos, 1996). Outra substância de importância, em tecidos vegetais, são os carboidratos ou açúcares, os quais atuam como forma de armazenamento de energia, como importantes constituintes de suporte de tecidos, ou também, como provedores de esqueletos de carbono, para compostos orgânicos sintetizados pelas células.

Segundo Phan, Do e Hegedus (1987), o cultivo *in vitro* induz a uma diminuição nos teores de açúcares solúveis totais e compostos fenólicos, enquanto os ácidos orgânicos e proteínas solúveis tendem a aumentar.

Em calos de castanha do Brasil obtidos a partir de segmentos foliares, observou-se uma redução nos teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores e uma alta síntese ou absorção de aminoácidos (Serra, 1999). Paiva Neto (1996), cultivando calos obtidos a partir de explantes foliares e segmentos

nodais de moreira (*Maclura tinctoria*) observaram uma diminuição nos teores de açúcares, aminoácidos e proteínas cultivados na presença ou ausência de 2,4-D.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUTIATE, W.S.; NAKASONE, N.Y. Studies of vegetative propagation of the lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) with special reference to graftage. **Journal Agriculture Science, Ghana**, v.5, p.201-211, 1972.
- BITTENBENDER, H.C. **Handbook of tropical fruits and spices**. Michigan State University, 1984. 127p.
- CALABRESE, F. **Frutticoltura tropicale e subtropicale**. Bologna: Editrice, 1978. 498p.
- CHAN, H.T.; KWOK, S.C.M. Non-volatile acids in lychee. **Journal of Food Science, Chicago**, v.39, n. 4, p. 792 – 793, July/Aug. 1974.
- GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira 8 ed.**. São Paulo: Nobel, 1984. 446p.
- KADMAN, A. Improvements in the airlayering propagation methods for lychee and macadamia trees. **Acta Horticulturae, Leuven**, v.158, p.143-149, 1985.
- KADMAN, A.; SLOR, E. Experiments with propagation of the litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **Indian Journal Horticulture, Bangalore**, v.31, n.1, p.28-33, Mar. 1974.
- KUANG, Z.; ZHOU, L.; MA, X.; CHEN, J.; CAI, J. Study on the types of embryoid in tissue culture of *Litchi chinensis* Sonn. **Journal of Fruit Science**, p.25-28, 1996.

- LEE, H.S.; WICKER, L. Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigeration storage. *Food Chemistry, Essex*, v.40, p. 263-70, 1991.
- LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D.; CEREDA, E. Ação de fitorreguladores e ácido bórico em estacas de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.). *Cientifica*, São Paulo, v.22, n.1, p.95-104, Fev. 1994.
- MANTELL, S.H.; MATTHEES, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão Preto: 1994. 344p. Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.
- MARTINS, A.B.G. Cultura da lichia. In: DONADIO, L.C.; MARTINS A.B.G.; VALENTE, J.P. (ed.). **Fruticultura tropical**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 282p.
- MARTINS, A.B.G. **Enraizamento de estacas enfolhadas de três variedades de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.)**. Jaboticabal: 100p. 1998 (Tese Doutorado em Produção Vegetal).
- MENZEL, C.M. Propagation of lychee: a review. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.25, n.1, p.31-48, 1985.
- 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 Agronomia).

- PASSOS, L.P. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal.**  
Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996. 223p.
- PAUL, R.E.; CHEN, N.J.; DEPUTY, J.; HUANG, H.; CHENG, G.; GAO, F.**  
Litchi growth and compositional changes during fruit development. **Journal American Society Horticulturae Science**, Alexandria, v.109, n.6, p. 817-21, 1984.
- PHAN, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P.** Metabolic aspects of *in vitro* culture of plants; problems and applications comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. **Experimental Biological**, v. 46, n.3, p.58, 1987.
- RAM, M.; MAJUNDAR, P.K.** Effect of indole butyric acid on stooling in litchi **India Journal Horticulture**, Bangalore, v.40, n.3, p.211-212, 1983.
- SAUCO, V.G.** Los frutales tropicales en los subtropicos. I. Aguacate, mango, litchi longan. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 113p.
- SAUCO, V.G.; MENINI, U.G.** Litchi cultivation. Roma: FAO, 1989. 136p.
- SERRA, A.G.P.** Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Lavras:UFLA, 1999. 72p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal).
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.** Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.

**YEOMAN, N.M.; MACLEOD, A.J.** Tissue callus cultures techniques. In:  
**STREET, H.E. (ed.). Plant tissue and cell culture.** Berkeley: University of  
California, 1977. p.31-59.

**ZHOU, L.N.; KUANG, Z.S.; MA, X.J.** Preliminary studies on culture of  
immature embryos and embryogenesis of somatic cells of litchi (*Litchi*  
*chinensis* Sonn.). **Guangdong Agricultural Sciences**, n.5, p.14-15, 1993.

## CAPÍTULO 2

### **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE LECHIEIRA (*Litchi chinensis* Sonn.) A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES E NODAIS.**

#### **1 RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi propagar, *in vitro*, a lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), a partir de segmentos nodais e foliares. Os explantes foram inoculados, em meio MS suplementado, com diferentes concentrações de 2,4-D e mantidos em sala de crescimento, em presença e ausência de luz. Os resultados indicaram que a curva de crescimento de calos apresentou-se na forma sigmoideal, porém, apenas calos desenvolvidos na presença de luz e em meio MS contendo 6,0 mg/L 2,4-D, apresentaram cinco fases distintas (lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária). Os resultados também indicam que a repicagem dos calos obtidos, deve ser efetuada aos 63 dias após a inoculação. A produção expressiva de calos com maior volume foi obtida inoculando-se segmentos foliares na presença de 2,0 ou 6,0 mg/L 2,4-D. Não houve influência de BAP, Cinetina e TDZ, na organogênese de calos de lechieira obtidos a partir dos segmentos foliares. A metodologia proposta para o controle de oxidação, com o uso de PVP, carvão ativado e lavagem dos explantes em água corrente, não foi eficiente.

## CHAPTER 2

### ***IN VITRO* PROPAGATION OF LITCHI (*Litchi chinensis* Sonn.) FROM LEAF AND NODAL SEGMENTS.**

#### **2 ABSTRACT**

The objective of this work was to *in vitro* propagate the litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) through the use of from leaf and nodal segments . The explants were inoculated in MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D, maintained in growth room in the presence and absence of light. The results indicated that the calluses growth curve presented in the sigmoid shape but only calluses developed in the presence of light and MS medium containing 6.0 mg /L 2,4-D presented five distinct phases ( lag, exponential, linear, deceleration and stationary ). The results also indicated that the transplanting of the calluses obtained should be performed at 63 days after inoculation. The expressive yield of calluses with greater volume was obtained by inoculating leaf segments in the presence of 2.0 or 6.0 mg/L 2,4-D. There was no influence of BAP, kinetin and TDZ on the organogenesis of litchi calluses obtained from leaf segments. The methodology proposed for oxidation control with the use of PVP, activated charcoal and explant washing in running water was not efficient .

### 3 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais, um explante, que pode ser constituído de uma célula, um tecido ou um órgão, é isolado e cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. Segundo Torres e Caldas (1990), o fundamento básico da cultura de tecidos se baseia na totipotência das células, onde qualquer célula do organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa.

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das aplicações de mais larga utilização na cultura de tecidos. Destina-se, principalmente, àquelas espécies de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e, geneticamente uniformes, em curto período de tempo. A utilização da micropropagação ao nível comercial, já é realidade, em diversos países do mundo, com destaque aos da Europa Ocidental e Estados Unidos, tendo como objetivo satisfazer os métodos convencionais de propagação vegetativa.

As espécies lenhosas são mais difíceis de se propagar *in vitro*, em comparação às espécies herbáceas. Segundo Pierik (1987), isto é devido, principalmente, ao fato das plantas lenhosas apresentarem, em geral, uma maior variabilidade genética, além de uma menor capacidade regenerativa dos tecidos, dormência das gemas e maior concentração de fenóis, além da dificuldade de manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação.

Um dos fatores limitantes, no estabelecimento *in vitro* de plantas de lechiera (*Litchi chinensis* Soon.), é a grande quantidade de compostos fenólicos liberados ao meio de cultura, pelo explante, os quais polimerizados, alteram a cor do meio e impedem o crescimento dos explantes.

O objetivo deste trabalho, foi determinar uma metodologia para o estabelecimento *in vitro* de lechieira, através de segmentos foliares e nodais, visando a posterior obtenção de mudas através da micropropagação.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL**

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras/MG.

### **4.2 MATERIAL**

Duas árvores adultas de lechieira (*Litchi chinensis*) localizadas em um sítio situado no município de Nepomuceno – MG, foram selecionadas como fonte de segmentos nodais e sementes para produção de mudas. Frutos maduros foram coletados em janeiro de 1998.

### **4.3 PRODUÇÃO DE MUDAS VIA SEMENTES**

As sementes foram retiradas dos frutos maduros e, em seguida, lavadas com hipoclorito de sódio, na concentração de 70%, por 20 minutos. Em seguida, foram imersas em solução contendo Benomyl, na concentração de 4g/L por 45 minutos. Após esse tratamento com Benomyl, as sementes foram imersas em soluções, contendo diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> por 30 minutos e, em seguida, foram colocadas para germinar em bandejas plásticas, contendo como substrato, areia lavada e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12h de luz e temperatura de 27° C.

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, em um fatorial 4x4, constituído de 4 concentrações de GA<sub>3</sub> (0,0; 3,5; 7,0 e 14,0 mg/L) e 4 tempos de avaliação (21; 28; 35 e 42 dias), sendo que, cada tratamento possuía 2 repetições contendo 5 sementes cada.

As características avaliadas foram: percentagem de germinação; comprimento médio de raízes e comprimento médio da parte aérea. As avaliações para germinação e comprimento médio das raízes (cm) foram realizadas em intervalos de 7 dias, até 21 dias.

Após o 21° dia, avaliou-se o comprimento médio da parte aérea (cm), em intervalos de 7 dias, até os 42 dias após a germinação. Posteriormente, as mudas com o 2° par de folhas completamente expandidos foram transplantadas em sacos plásticos, contendo areia, terra e esterco, na proporção de 3:2:1. Após o transplântio, as mesmas foram colocadas em uma sala de crescimento com fotoperíodo controlado e temperatura de 27° C.

## **4.4 CULTIVO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES DA LECHIEIRA**

### **4.4.1 DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES**

Foram utilizados como explantes, segmentos foliares das mudas obtidas no experimento anterior, cujas folhas jovens foram extraídas de plantas pulverizadas com Benomyl (4g/L) 24 horas antes da coleta.

O delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado em fatorial 4x3, com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio ( 0; 30; 50 e 70%) e diferentes tempos de imersão (10; 30 e 45 minutos).

Após os tratamentos, as folhas foram lavadas em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), por 3 vezes, em água destilada autoclavada. Os explantes constituíram-se de segmentos foliares seccionados sem a presença da nervura central.

A inoculação dos explantes foi feita em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo 30g/L sacarose, 7 g/L ágar e pH 5,8. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, na presença de luz (fotoperíodo de 16h) a uma temperatura de 27°C.

O comportamento *in vitro* dos segmentos foliares foi verificado em intervalos de 4 dias até 24 dias após a inoculação.

#### **4.4.2 EFEITO DO 2,4-D NA FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA.**

Folhas jovens desinfestadas com álcool etílico 70%, por 15 segundos e, hipoclorito de sódio 30% por 10 minutos, foram utilizadas como explante. Segmentos foliares com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e ausentes da nervura central foram inoculados em meio de cultura MS, contendo 30g/L de sacarose, pH 5,8, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D ( 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/L). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à presença de luz, com fotoperíodo de 16h, a uma temperatura de 27°C.

O delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de 4 tubos com um explante por tubo.

A porcentagem de segmentos foliares com formação de calos e a melhor concentração de 2,4-D, para indução de calos foram avaliados em intervalos de 7 dias após a inoculação, por um período de 35 dias.

#### **4.4.3 EFEITO DO ÁCIDO NAFTALENOÁCETICO (ANA) NA FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA**

Folhas jovens desinfestadas com álcool etílico 70%, por 15 segundos e, hipoclorito de sódio 30%, por 10 minutos foram utilizadas como explante. Segmentos foliares com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e ausentes da nervura central foram inoculados, em meio de cultura MS, contendo 30g/L de sacarose, pH 5,8, suplementado com diferentes concentrações de ANA ( 0,0;

2,0; 4,0; 6,0 e 8,0mg/L). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na presença (fotoperíodo 16h) e ausência de luz a uma temperatura de 26°C.

O delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de 4 tubos com um explante por tubo.

A porcentagem de segmentos foliares com formação de calos e a melhor concentração de ANA, na presença ou ausência de luz, para indução de calos foram avaliados em intervalos de 7 dias após a inoculação, por um período de 90 dias.

#### **4.5 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS**

Para a obtenção da curva de crescimento de calos, segmentos foliares obtidos de plantas jovens foram inoculados na presença e ausência de luz, em meio MS, contendo 30g/L de sacarose, pH ajustado para 5,8; 7,0g/L de ágar e acrescido de 2,0 ou 6,0mg/L de 2,4-D.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, na presença (fotoperíodo 16h) e ausência de luz a uma temperatura de 27° C.

Em intervalos de 7 dias, os calos obtidos, foram limpos com papel absorvente, pesados em balança de precisão, imersos em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados em freezer à temperatura de -80°C.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo Lameira (1997), através da equação:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{\text{Pf}-\text{Pi}}{\text{Pf}} \times 100,$$

onde Pi = peso inicial e Pf = peso final de calos

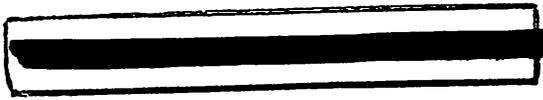
O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, com 12 repetições por pesagem.

#### **4.6 EFEITO DO ÁCIDO NAFTALENOÁCETICO (ANA); BENZILAMINOPURINA (BAP); THIDIAZURON (TDZ) E CINETINA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA**

Calos de lechieira, obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS, contendo 2,4-D, foram transferidos para meio MS, contendo 30g/L de sacarose; 7g/L de ágar; pH ajustado para 5,8 e acrescido de combinações de diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,1; 0,5mg/L) com BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L); TDZ (0,0; 0,01; 0,1mg/L) e Cinetina (0,0; 0,1; 1,0; 4,0 mg/L).

Após a inoculação, os calos foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 26°C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado com 6 repetições e um tubo por repetição, sendo que cada tubo era composto por um explante.

O desenvolvimento dos calos foi observado aos 30 dias após a inoculação.



#### **4.7 CULTIVO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE LECHIEIRA.**

##### **4.7.1 EFEITO DO PVP NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO EM SEGMENTOS NODAIS DE LECHIEIRA CULTIVADOS *IN VITRO*.**

Segmentos nodais de aproximadamente 5cm, contendo uma gema foram coletados de plantas adultas e inoculados em meio MS, acrescido de 30g/L de sacarose, 7g/L de ágar, pH ajustado em 5,8 e PVP nas seguintes concentrações: 0, 50; 200; 400 e 800 mg/L.

Após a inoculação, os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento, na presença de luz, a uma temperatura de aproximadamente 26°C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, com 4 repetições, sendo cada uma composta por 3 tubos com um segmento nodal por tubo.

A porcentagem de segmentos nodais oxidados foi avaliada 7 dias após a inoculação, observando-se a ocorrência de coloração marrom no meio de cultura.

##### **4.7.2 EFEITO DO CARVÃO ATIVADO NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO EM SEGMENTOS NODAIS DE LECHIEIRA**

Segmentos nodais de aproximadamente 5cm e uma gema lateral foram coletados de plantas adultas e inoculados em meio MS, acrescido de 30g/L de sacarose, 7g/L de ágar, pH ajustado em 5,8 e carvão ativado nas concentrações de 0; 0,5; 2,0; 4,0 e 8,0 g/L.

Após a inoculação, os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento, na presença de luz, a uma temperatura de aproximadamente 26° C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o

**Inteiramente Casualizado**, com 4 repetições, sendo cada uma composta por 3 tubos com um segmento nodal por tubo.

A porcentagem de segmentos nodais oxidados foi avaliada 7 dias após a inoculação dos mesmos, observando-se a presença de coloração marrom no meio de cultura.

#### **4.7.3 EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM ÁGUA CORRENTE SOB O CONTROLE DA OXIDAÇÃO EM SEGMENTOS NODAIS DE LECHIEIRA**

Segmentos nodais de aproximadamente 5cm e uma gema lateral foram coletados de plantas adultas e mantidos em contato com água corrente durante 0; 6; 12 e 24 horas.

Após a lavagem em água corrente os segmentos foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 30g/L de sacarose, 7g/L de ágar, pH ajustado em 5,8 e mantidos em presença e ausência de luz, em sala de crescimento a uma temperatura de aproximadamente 26°C.

O delineamento experimental utilizado foi o **Inteiramente Casualizado** com 10 repetições e um tubo por repetição.

A ocorrência de oxidação foi avaliada 3 dias após a inoculação, observando-se a presença de coloração marrom no meio de cultura.

#### **4.8 EFEITO DO ANA E BAP NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS OBTIDOS A PARTIR DE PLANTAS JOVENS DE LECHIEIRA.**

Segmentos nodais de lechieira, contendo uma gema lateral foram retirados de plantas jovens obtidas através de sementes. Os segmentos foram tratados com álcool 70%, por 15 segundos e hipoclorito de sódio 30%, por 10 minutos.

Após o tratamento com hipoclorito de sódio, os segmentos nodais foram lavados por três vezes, em água destilada autoclavada, imersos em uma solução contendo 150 mg/L de ácido ascórbico e em seguida, inoculados em meio MS, acrescido de 30g/L de sacarose, 7,0g/L de ágar, pH ajustado em 5,8, 150 mg/L de PVP e de combinações de diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,5 e 1,0 mg/L) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L).

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26°C.

O delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado com 12 repetições, tendo um tubo por repetição com um segmento nodal.

A formação de calos e o desenvolvimento da gema lateral foram avaliados em intervalos de 7 dias, até 28º dia após a inoculação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE MUDAS VIA SEMENTES

Não foi observada diferença significativa para as características porcentagem de germinação e comprimento médio das raízes (TABELA 1A). A porcentagem de germinação das sementes foi de aproximadamente 70% para todos os tratamentos.

Entretanto, observa-se na Figura 2, que o maior comprimento médio da parte aérea das plântulas (2,87cm), foi obtido através do tratamento das sementes com 7,0 mg/L de GA<sub>3</sub>. Em sementes germinadas na ausência de GA<sub>3</sub>, observa-se um crescimento de parte aérea semelhante ao observado para sementes tratadas com 14,0 mg/L de GA<sub>3</sub>, porém, em valores inferiores ao observado em plantas obtidas a partir de sementes tratadas com 7,0 mg/L de GA<sub>3</sub>.

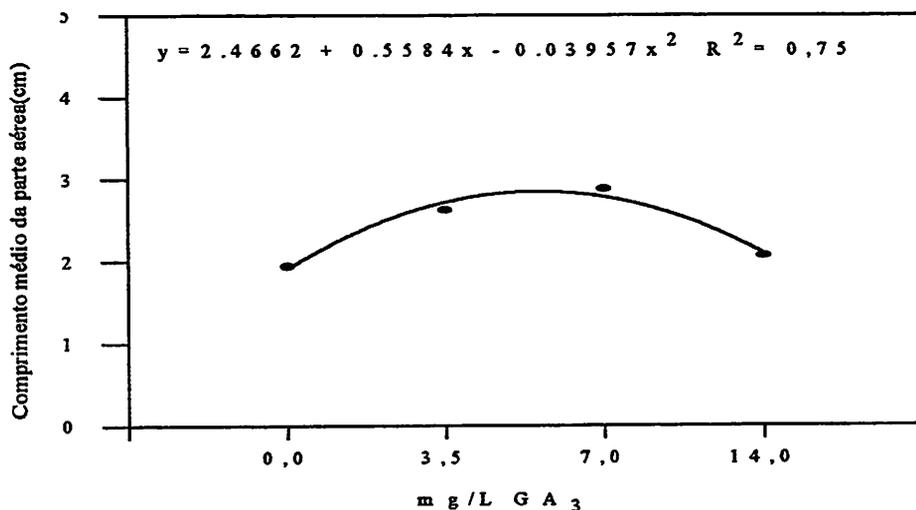


FIGURA 2- Influência do GA<sub>3</sub>, no comprimento da parte aérea de plântulas, obtidas de sementes lechieira. UFLA, Lavras/MG, 1998.

Esses resultados indicam um efeito inibitório do GA<sub>3</sub>, na germinação de sementes de lechieira, quando aplicados em concentrações superiores a 7,0 mg/L.

Estudos realizados por Ono et al. (1998) sobre o efeito do tempo de armazenamento e uso de GA<sub>3</sub>, na germinação de sementes de lechieira, demonstraram ausência de efeito significativo do GA<sub>3</sub>, na germinação de sementes e redução desta, com o aumento do tempo de armazenamento. Reduzida influência do GA<sub>3</sub>, na germinação de sementes de *Setaria anceps* e *Paspalum paniculatum*, também são apresentados por Lula (1998).

Segundo Pasqual, Hoffman e Ramos (1997), um dos principais efeitos das giberelinas acontece no alongamento das brotações durante o seu desenvolvimento, o que foi observado em plântulas de lechieira, obtidas a partir de sementes tratadas com concentrações de GA<sub>3</sub> inferiores a 14,0 mg/L.

Segundo Prasad, Kumar e Mukund (1996) estudando a germinação de sementes de diferentes cultivares de lechieira, sob várias condições, concluíram que a aplicação de GA<sub>3</sub> (100mM), influenciou na germinação de todas as cultivares, que corresponderam melhor, quando colocadas para germinar em areia sombreada, úmida e com temperatura de 35° C.

## **5.2 DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES**

Explantos foliares coletados de plantas jovens, obtidas através da germinação de sementes, foram desinfestadas utilizando-se várias concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão (TABELA 2A). Os resultados (Figura 3) desse estudo, indicam que a melhor concentração de hipoclorito de sódio foi de 30%, em um tempo de imersão de 10 minutos. O uso de concentrações mais elevadas de hipoclorito e maior tempo de exposição ao

produto provocaram queimadura na borda foliar, impedindo o desenvolvimento *in vitro* dos explantes.

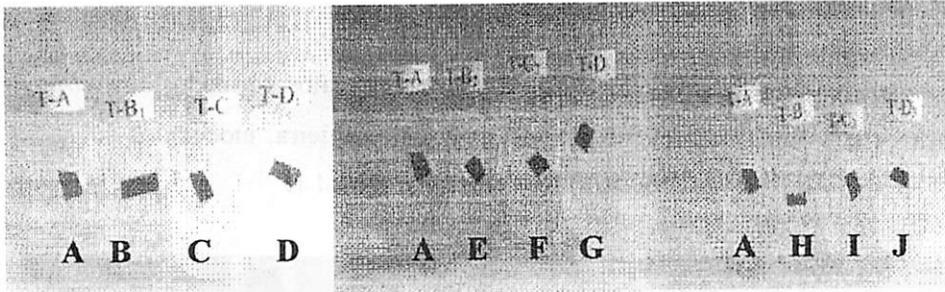


FIGURA 3 Aspecto visual de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) inoculados *in vitro* após desinfestação, em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão: controle(A); 30% hipoclorito + 10 minutos de imersão(B), 30 minutos de imersão(E) e 45 minutos de imersão(H); 50% hipoclorito + 10 minutos de imersão(C), 30 minutos de imersão(F) e 45 minutos de imersão(I); 70% hipoclorito + 10 minutos de imersão(D), 30 minutos de imersão(G) e 45 minutos de imersão(J). UFLA, Lavras, MG, 1998.

Landa (1999) obteve sucesso na desinfestação de segmentos foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb. ), através de imersão rápida em álcool etílico 70%, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 30% (v/v) de produto comercial por 15 minutos.

Santos (1998) estudando a desinfestação de explantes de rizoma de *Smilax japecanga* , utilizou com sucesso lavagem dos explantes, em detergente, por 10 minutos, seguido de imersão em álcool 70%, por um minuto e em hipoclorito de sódio 50% por 20 minutos.

Baseado nos resultados obtidos, o uso de imersão por 10 minutos, em solução de hipoclorito de sódio 30% (v/v) de produto comercial, foi adotado nesse estudo, como procedimento padrão, para a desinfestação de explantes foliares de lechieira.

### 5.3 OBTENÇÃO, *IN VITRO*, DE CALOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA CULTIVADOS NA PRESENÇA DE 2,4-D E ANA.

A Figura 4, apresenta o aspecto visual de calos formados, *in vitro*, a partir de explantes foliares, de plantas jovens de lechieira, inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D.

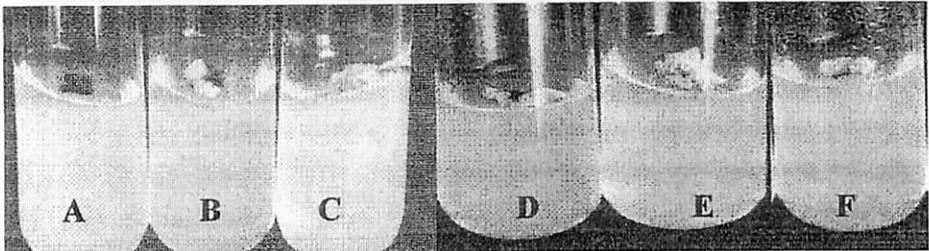
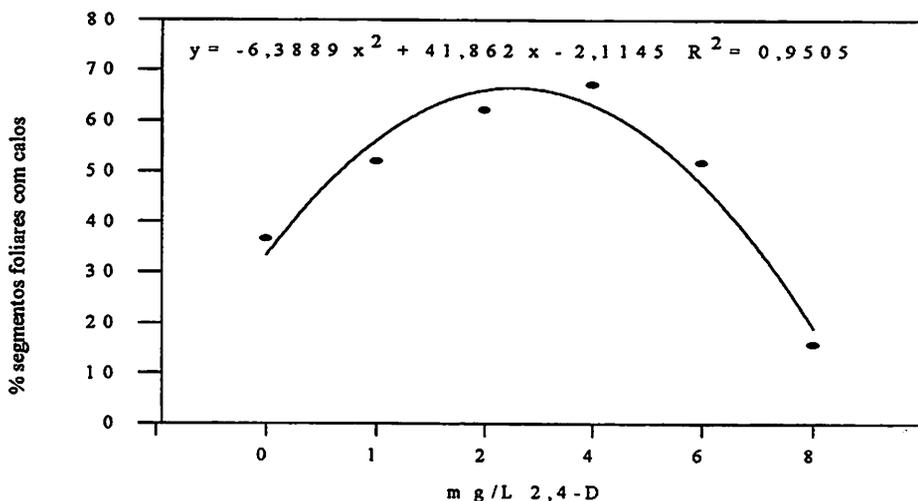


FIGURA 4. Aspecto visual de calos formados a partir de explantes foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) mantidos *in vitro*, durante 30 dias, após a inoculação em meio MS, suplementado com 0,0 (A); 1,0 (B); 2,0 (C); 4,0 (D); 6,0 (E) e 8,0 (F) mg/L de 2,4-D. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Na ausência de 2,4-D, além da formação de calos, em pequena quantidade, nos explantes (Figura 4A), que foram observados em apenas 35% de folhas (Figura 5). O uso de 4,0 mg/L 2,4-D proporcionou a formação de calos, no maior número de explantes (65%) (Figura 5), no entanto, sob essa mesma dosagem, a quantidade de calos formados foi bastante reduzida (Figura 4D). A ocorrência de calos com maior volume foi obtida quando utilizaram-se as concentrações de 2,0 e 6,0 mg/L 2,4-D (Figura 4C e 4E) respectivamente. O uso de concentração elevada (8,0 mg/L) inibiu a formação de calos (Figura 4F).

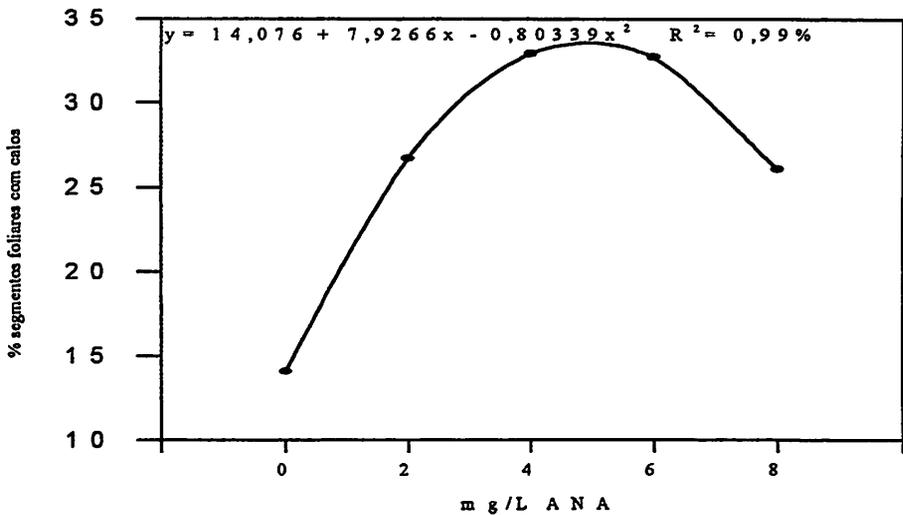


**FIGURA 5** Percentagem de segmentos foliares de Lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D com formação de calos. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Segundo Pasqual, Hoffman e Ramos (1997), a auxina mais frequentemente empregada para iniciar a formação de calos é o 2,4-D.

Serra (1999), também obteve a formação de calos em segmentos foliares de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K), acrescentando ao meio MS, 2,4-D mas em combinação com BAP. O uso de 2,4-D, isoladamente, ou em combinação com BAP ou TDZ, também induziu à formação de calos em explantes foliares de *Smilax japecanga* (Santos, 1998). A indução de formação de calos também já foi observada em segmentos foliares de cafeeiro (*Coffea arabica*), inoculados em meio MS contendo 2,4-D (Forni, 1993).

A influência do ANA na formação de calos, em explantes foliares de lechieira, está apresentada na Figura 6.



**FIGURA 6** Percentagem de segmentos foliares de Lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) com formação de calos, inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Observa-se que, apenas 14% dos segmentos foliares apresentaram formação de calos, quando inoculados na ausência de ANA. O uso de 4,0 e 6,0 mg/L ANA proporcionaram a formação de calos em, aproximadamente, 32,0% dos explantes. Não houve diferença significativa no número de segmentos apresentando formação de calos, quando estes foram inoculados na presença de 2,0 ou 8,0 mg/L ANA.

Além de proporcionar a melhor indução de calos, o uso de 4,0 ou 6,0 mg/L ANA, também induziu à formação de raízes nos segmentos foliares. Segundo Torres e Caldas (1990), concentrações elevadas de auxina podem inibir a multiplicação, favorecer o enraizamento, ou mesmo induzir a formação de calos em explantes.

Indução de calogênese e formação de raízes também foram observadas em segmentos foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), inoculados na presença de ANA (Landa, 1999).

## 5.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS FORMADOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA

As curvas de crescimento de calos obtidos a partir de explantes foliares, inoculados em meio MS, suplementado com 2,0 e 6,0 mg/L de 2,4-D, em presença e ausência de luz são apresentadas na Figura 7.

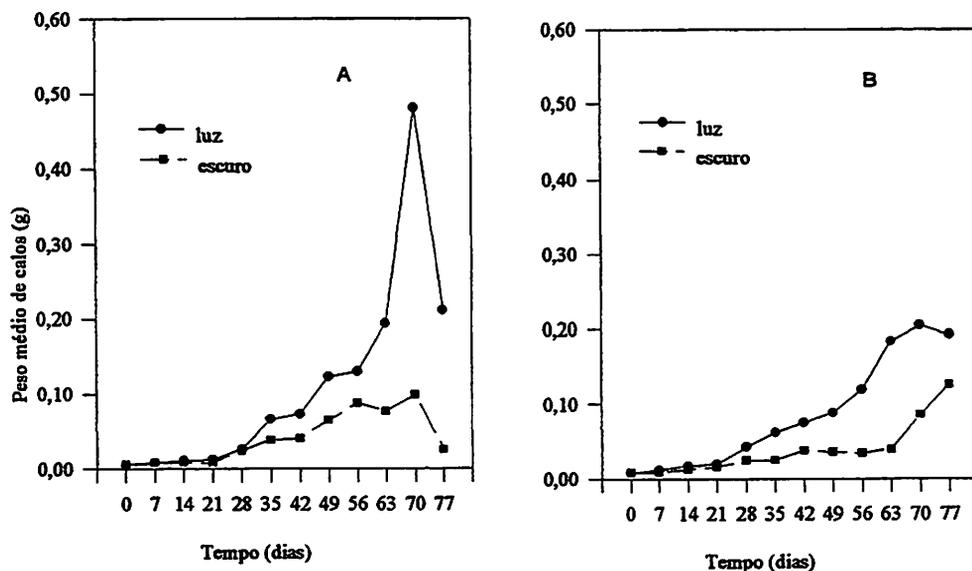


FIGURA 7 Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis Sonn*), inoculados em meio MS, suplementado com 2,0 (A) e 6,0 mg/L (B) de 2,4-D, em presença e ausência de luz, durante 77 dias. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Observa-se na Figura 7, a ocorrência de crescimento sigmoidal, indicando a presença de fases de crescimento distintas nos tratamentos. Segundo Santos (1998), a curva de crescimento de calos, obtidos a partir de segmentos foliares de *Smilax japecanga*, apresenta padrão sigmoide, com cinco fases distintas, sendo que a repicagem dos calos deve ser efetuada entre o 36° e 39° dia após à inoculação dos explantes.

A fase lag, na qual células do explante, preparam-se para a divisão celular e produção de energia, o que ocorreu até o 21º dia de inoculação, para ambos tratamentos (Figura 7A e B). Landa (1999) verificou que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequiheiro, a fase ocorre até o 7º dia após a inoculação.

Segundo Shimizu et al.(1977) e Scragg e Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia e a fase exponencial, como fase biossintética. A fase de crescimento exponencial- período em que ocorre a máxima divisão celular, aconteceu entre o 21º e 49º dia após a inoculação. Paiva e Santos (1998) observaram ocorrência dessa fase, entre o 16º e o 35º dia de inoculação, em calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Annona glabra*. Em segmentos foliares de pequiheiro essa fase foi observada entre o 7º e o 35º dia após a inoculação (Landa, 1999).

Entre o 49º e 63º dias após à inoculação ocorreu o período de crescimento linear, fase em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular. Segundo Smith (1992) o crescimento e o desenvolvimento celular nesta fase são mais evidentes.

O período de desaceleração ocorreu entre o 63º e o 77º dia após a inoculação. Segundo Smith (1992), nesse período, as culturas devem ser transferidas para um meio de cultura novo, devido a redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas. Landa (1999) verificou a ocorrência dessa fase, entre o 46º e o 49º dias, em calos obtidos de segmentos foliares de pequiheiro.

A quinta fase correspondente à fase estacionária foi observada a partir do 70º dia após a inoculação, para calos obtidos em meio acrescido de 6,0 mg/L e mantidos na presença de luz. Segundo Landa (1999), essa fase caracteriza-se pela ausência de divisão celular e síntese de biomassa, sendo observada em calos de pequiheiro, aproximadamente 50 dias após a inoculação.

Os resultados da curva de crescimento indicam que a repicagem dos calos, formados a partir de segmentos foliares de plantas jovens de lechieira, deve ser efetuada no início do período de desaceleração, ou seja, aos 63 dias após a inoculação, exceto para calos obtidos em meio suplementado, com 6,0 mg/L de 2,4-D e mantidos na ausência de luz (Figura 7B). Durante o período de avaliação, não foi observada a ocorrência da fase de desaceleração, para calos obtidos em meio suplementado com 6,0 mg/L 2,4-D e mantidos na ausência de luz.

Observa-se que, o desenvolvimento de calos obtidos na presença de 2,0 ou 6,0 mg/L 2,4-D (Figura 7) foi superior, quando estes foram cultivados na presença de luz (TABELA 3). Segundo Pasqual, Hoffmann e Ramos (1997), em geral, o crescimento e a morfogênese, *in vitro*, são influenciados pelo comprimento de onda, densidade de fluxo e fotoperíodo apesar de serem considerados fatores limitantes para o desenvolvimento, *in vitro*, de algumas espécies, as divisões iniciais das células e a formação de calos podem ser inibidos pela luz.

## **5.5 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO NAFTALENOÁCÉTICO (ANA); BENZILAMINOPURINA (BAP); THIDIAZURON (TDZ) e CINETINA, NO DESENVOLVIMENTO DE CALOS OBTIDOS ATRAVÉS DE SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA**

Não foi observado nenhum efeito dos reguladores de crescimento ANA, BAP, TDZ e Cinetina, no desenvolvimento de calos, obtidos a partir de segmentos foliares inoculados na presença de 2,4-D. Percebe-se que, o uso de BAP, TDZ ou Cinetina, não foi eficiente para induzir organogênese em calos de lechieira, obtidos a partir de segmentos foliares.

Esses resultados contradizem aos observados por Fortes (1992), que observaram a ocorrência de organogênese indireta, em calos obtidos através de segmentos foliares de macieira (*Malus sp.*), utilizando-se BAP e TDZ, sendo que na presença de TDZ ocorreu uma superioridade no número de ramos obtidos.

Gomes (1999), também obteve formação de brotações, a partir de calos friáveis de moreira (*Maclura tinctoria*), mantidos na presença de BAP, mas em combinação com ANA.

## **5.6 EFEITO DE TRATAMENTOS COM PVP, CARVÃO ATIVADO E IMERSÃO EM ÁGUA CORRENTE, NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO, *IN VITRO*, DE SEGMENTOS NODAIS DE LECHIEIRA.**

O uso de PVP, carvão ativado e a lavagem dos segmentos nodais de plantas adultas de lechieira, em água corrente, não foram eficientes para controlar a oxidação de segmentos nodais de lechieira, cultivados *in vitro*. Em todos os tratamentos, foi observada a presença de coloração marrom no meio de cultura.

Segundo Assis e Teixeira (1999), compostos fenólicos presentes no tecido, podem provocar o escurecimento das superfícies de corte dos explantes, difundindo-se para o meio de cultura e, conseqüentemente, inibindo o desenvolvimento, *in vitro*, dos explantes.

Segundo Pasqual, Hoffmann e Ramos (1997), o estabelecimento dos explantes é, frequentemente, prejudicado pelo fenômeno da oxidação de compostos fenólicos. As superfícies de muitos explantes começam a descolorir, logo após a excisão, e podem exsudar substâncias de cor escura para o meio.

## 5.7 EFEITO DO ANA e BAP, NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, DE SEGMENTOS NODAIS, OBTIDOS A PARTIR DE PLANTAS JOVENS DE LECHIEIRA.

O uso de combinações entre ANA e BAP promoveu o desenvolvimento de gemas nos segmentos nodais, obtidos de plantas jovens de lechieira, independente das concentrações utilizadas (Figura 8).

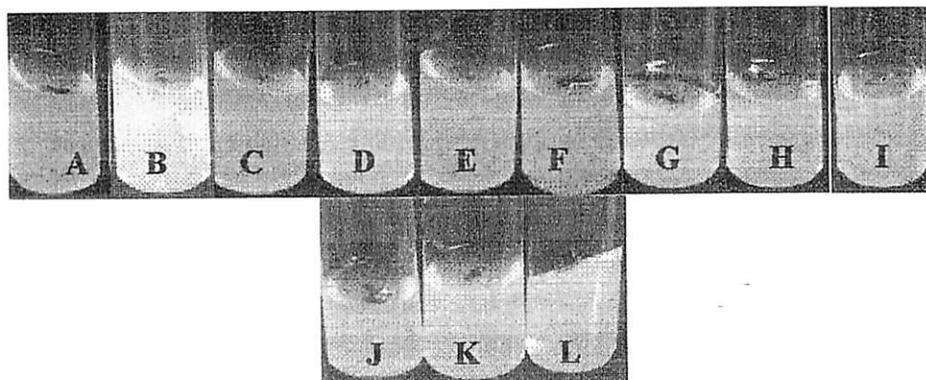


FIGURA 8 Aspecto visual de segmentos nodais de plantas jovens de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), inoculados na ausência de ANA e BAP (A); (B) 1,0mg/L BAP; (C) 2,0mg/L BAP; (D) 4,0mg/L BAP; (E) 0,1mg/L ANA; (F) 0,1mg/L ANA e 1,0mg/L BAP; (G) 0,1mg/L ANA e 2,0mg/L BAP; (H) 0,1mg/L ANA e 4,0mg/L BAP; (I) 0,5mg/L ANA; (J) 0,5mg/L ANA e 1,0mg/L BAP; (K) 0,5mg/L ANA e 2,0mg/L BAP; (L) 0,5 mg/L ANA e 4,0 mg/L BAP. UFLA. Lavras/MG, 1999.

No entanto, quando se utilizou ANA e BAP em todas as concentrações, foi observada a formação de calos na base dos segmentos, 30 dias após a inoculação. Ao contrário desses resultados, Pereira (1999) obteve desenvolvimento, *in vitro*, de raízes e parte aérea em segmentos nodais de chapéu de couro (*Echinodorus scaber*), apenas em meio MS, ausente de regulador de crescimento.

Não foi observado ocorrência de oxidação nos segmentos nodais, evidenciando o fator positivo da juvenilidade, no processo de oxidação em segmentos nodais de espécies lenhosas. Segundo Pasqual, Hoffman e Ramos (1997), a idade do tecido, utilizado como explante, é fator limitante na presença do processo de oxidação. Em geral, a oxidação é reduzida, quando tecidos jovens são utilizados como explantes (Vieccelli, 1997).

## 6 CONCLUSÕES

Não foi verificada influência do GA<sub>3</sub>, na germinação de sementes de lechieira.

Sementes tratadas com 7,0 mg/L GA<sub>3</sub> proporcionaram a formação de plântulas com maior comprimento de parte aérea.

A desinfestação de explantes foliares de lechieira é eficaz através de imersão em hipoclorito de sódio 30% por 10 minutos.

A ocorrência de calos com maior volume é obtida inoculando-se segmentos foliares, na presença de 2,0 ou 6,0 mg/L 2,4-D.

O uso de 4,0 e 6,0 mg/L ANA proporcionaram a maior formação de calos, em segmentos foliares de lechieira, porém com formação de raízes.

As curvas de crescimento de calos obtidas a partir de explantes foliares, inoculados na presença de 2,0 e 6,0 mg/L 2,4-D, na presença e ausência de luz, apresentaram crescimento sigmoidal.

A repicagem dos calos de lechieira obtidos a partir de segmentos foliares, deve ser realizada aos 63 dias após a inoculação dos explantes.

Não houve influência de BAP, Cinetina, TDZ, na organogênese de calos de lechieira, obtidos a partir de segmentos foliares.

Os usos de PVP, carvão ativado e lavagem dos explantes em água corrente, não foram eficientes no controle da oxidação dos segmentos nodais, obtidos a partir de plantas adultas de lechieira.

Segmentos nodais cultivados em meio de cultura, contendo ANA e BAP apresentaram desenvolvimento de gemas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, Técnicas e aplicações da cultura de tecidos.** 1999. p.261-297.
- FORNI, R.C. Níveis de “MS”, BAP, número de gemas do explantes e período de repicagem na produção de brotos, folhas, matéria seca e níveis de 2,4-D e cinetina para tamanho e fenótipo dos calos de *Coffea arabica L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44*. Lavras: ESAL, 1993. 81p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia)
- FORTES, G.R.DE L. Calogênese e organogênese “in vitro” de macieira (*Malus sp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1992. 163p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia)
- GOMES, A.C.G. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). Lavras:UFLA, 1999. 92p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva cabeleira (*Cordia verbenaceae L.*). Lavras:UFLA, 1997. 88p. (Tese- Doutorado em Fitotecnia).
- LANDA, F.S.L. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense Camb.*). Lavras:UFLA, 1999.73p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).

- LULA, A. de A. **Estudos fisiológicos da germinação de *Setaria anceps* cv. Kazungula e *Paspalum paniculatum***. Lavras: UFLA 1998. 58p. (Dissertação Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15. p.473-497, 1962.
- ONO, E.O ; LEONEL, S.; FILHO, J.D.; RODRIGUES, J.D. Efeitos do armazenamento e tratamento com GA<sub>3</sub> na germinação de sementes de lechieira. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**. 15, Poços de Caldas. Conferências.....Lavras:UFLA, 1998. p.446.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A., RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras:UFLA/FAEPE, 1997. 159p.
- PEREIRA, F.D. **Propagação *in vitro* e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (*Echinodorus saber* Rataj), uma planta medicinal**. Lavras: UFLA, 1999. 112p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345p.
- PRASAD, J.S.; RAJ-KUMAR; MUKUND, M. Characteristics of litchi seed germination. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.7, p.1187-1189, July 1996.

- SANTOS, M.R.A. dos. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach.** Lavras: UFLA, 1998. 81p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- 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.** Berlin: Springer-Verlag, v.21, p.249-268, 1993.
- SERRA, A.G.P. **Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).** Lavras:UFLA, 1999. 72p.(Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- SHIMIZU, T.; CLITTO, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. **Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture.** *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.40, p.125-129, 1977.
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.
- VIECCELLI, J.C. **Micropropagação de caquizeiro (*Diospyros Kaki* L.) a partir de gemas laterais e apicais de plantas juvenis e adultas.** Viçosa:UFV, 1997. 57p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).

## CAPÍTULO 3

### **ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS OBTIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE LECHIEIRA (*Litchi chinensis* Sonn.)**

#### **1 RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi analisar calos obtidos, *in vitro*, a partir de explantes foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), quanto aos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas totais e aminoácidos. Explantes foliares com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram inoculados em meio MS, suplementado com 2,0 e 6,0 mg/L de 2,4-D e mantidos na presença e ausência de luz. Os resultados indicaram que os maiores teores de açúcares solúveis totais, aminoácidos e proteínas foram observados em calos mantidos na presença de luz. Um aumento nos teores de açúcares solúveis totais, foi observado em calos cultivados na presença de 6,0 mg/L de 2,4-D. Os maiores teores de açúcares redutores foram obtidos na ausência de luz, em meio suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D. Maiores teores de aminoácidos e proteínas totais foram observados em calos mantidos na presença de luz, em meio suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D.

## CHAPTER 3

### BIOCHEMICAL ANALYSES OF CALLUSES OBTAINED FROM LEAF SEGMENTS OF LITCHI (*Litchi chinensis* Sonn.).

#### 2 ABSTRACT

The objective of this work was to analyse calluses obtained *in vitro* from leaf explants of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) as for their contents of total soluble sugars, reducing sugars, total proteins and aminoacids. Leaf explants of 1.0 cm long were inoculated in MS medium supplemented with 2.0 and 6.0 mg/L 2,4-D and kept in the absence and presence of light. The results indicated that the highest contents of total soluble sugars, aminoacids and proteins were observed in calluses maintained in the presence of light. An increase in the contents of total soluble sugars was noticed on calluses grown in the presence of 6.0 mg/L 2,4-D. The highest contents of reducing sugars were obtained in the absence light in medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D. Higher content of aminoacids and total proteins were found on calluses maintained in the presence of light in medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D.

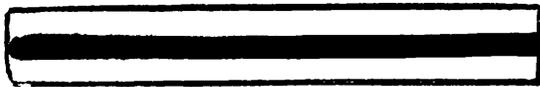
### 3 INTRODUÇÃO

Calos são tecidos que podem apresentar diferenciação parcial, constituídos por uma massa de células irregulares, que se multiplicam desordenadamente, em resposta a injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos e órgãos (Torres e Caldas, 1990). Segundo Phan, Do e Hegedus (1987), esses tecidos podem apresentar composição bioquímica e exigências nutricionais distintas, em relação ao explante de origem. São exemplos de substâncias presentes nos tecidos vegetais, as proteínas, os aminoácidos, açúcares estruturais e não estruturais, açúcares solúveis, açúcares redutores, amido, lipídeos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos e pigmentos, os quais podem ser classificados de acordo com o seu peso molecular.

Existem diversos métodos de identificação dessas substâncias, baseados em reações químicas específicas, com reagentes, as quais podem ser quantificadas através de métodos colorimétricos.

Segundo Passos (1996), a determinação dos níveis de carboidratos, revela a reserva prontamente disponível ao crescimento da planta e possui várias aplicações em estudos fisiológicos. Os açúcares, são acrescentados ao meio de cultura, como fonte de energia, para o desenvolvimento do explante, uma vez que esses tecidos apresentam uma taxa fotossintética bastante reduzida, tomando-os praticamente heterotróficos.

Segundo Serra (1999), calos obtidos a partir de explantes foliares de castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), analisados quantitativamente, reduziram os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, ao longo do período de inoculação; o que não foi observado para os teores de aminoácidos e proteínas, que foram reduzidos a partir do 30º dia após a inoculação.



Calos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*), cultivados na presença de 2,4-D, apresentaram teores superiores de açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, e teores inferiores de açúcares solúveis totais, quando comparados aos explantes cultivados na ausência desse regulador de crescimento (Paiva Neto, 1996).

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

O objetivo deste trabalho foi o de estudar o comportamento, *in vitro*, de calos obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), através da quantificação dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos e proteínas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Calos, obtidos a partir de segmentos foliares, de plantas jovens de lechieira, inoculados em meio MS, suplementado com 2,0 ou 6,0mg/L de 2,4-D na ausência e presença de luz, foram coletados em intervalos de 14 dias, até 70 dias após a inoculação. Esses calos foram analisados, quanto aos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos e proteínas.

O procedimento, na obtenção do extrato enzimático bruto dos calos, foi baseado na metodologia descrita por Lemos (1996). As amostras, contendo 300 mg de calos, foram homogeneizadas em gral, com 3 ml de tampão de fosfato

de potássio 0,1 M pH 7,5. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10000g, durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado do "pellet" e armazenado a -80°C, para ser utilizado na quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos. O "pellet" foi ressuspenso em 3,0 ml NaOH 0,1N, centrifugado a 10000g, durante 30 minutos e, o sobrenadante, armazenado à -80°C, para posterior quantificação de proteínas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial (2x2), com diferentes épocas de inoculação ( 0,0; 14; 28; 42; 56 e 70 dias), mantidos na presença ou ausência de luz, sendo 2 repetições por cada data de coleta, com cada repetição composta por 6 tubos e um explante foliar por tubo.

Os valores médios das quantificações foram submetidos a uma análise de variância e teste F ao nível de 1% de probabilidade.

#### **4.1.1 Análise de Açúcares Solúveis Totais**

O teor de açúcares solúveis totais foi determinado segundo a metodologia descrita por Yemm e Willis (1954). Aliquotas de 30ul do sobrenadante foram adicionadas em 990ul de água destilada e 2,0ml do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5ml de água destilada e 2,0ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). Após agitação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. As amostras foram levadas para leitura, em espectrofotômetro, a 620 nm e a quantificação dos açúcares foi baseada na curva padrão, obtida a partir de diferentes quantidades de glicose.

### **4.1.2 Análise de Açúcares Redutores**

Para a obtenção do teor de açúcares redutores, foi empregada a metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Aliquotas de 400ul do sobrenadante, foram adicionadas em 1,1ml de água destilada e 1000ul do reagente DNS. Esta mistura foi homogeneizada em agitador e colocada em água fervente (100°C), por 5 minutos, sendo, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foi realizada a leitura das amostras, em espectrofotômetro, a 540nm, sendo a quantificação baseada em curva padrão para glicose.

### **4.1.3 Análise de Proteínas**

A quantificação protéica foi realizada pelo método de Bradford (1976), baseando-se no princípio da associação entre proteína e corante. Aliquotas de 80ul do "pellet" ressuspendido em NaOH, foram adicionadas em 20ul de água destilada e 5,0ml do reagente Commassie Blue, constituído de 0,01% de Commassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em agitador, para posterior leitura em espectrofotômetro, a 595nm, sendo os valores expressos em ug proteína/g de materia fresca, com base na curva padrão, obtida a partir de concentrações conhecidas de soro-albumina bovina (BSA).

#### 4.1.4 Análise de Aminoácidos

O teor de aminoácidos foi determinado segundo o método descrito por Stein e Moore (1948). Aliquotas de 10ul do sobrenadante foram adicionadas a 990ul de água destilada e 1,7 ml do reagente ABC( A=tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,8; B= reagente de ninhidrina 5%, em metilcelosolve e C= KCN 2%, em metilcelosolve), agitadas e mantidas em banho maria, a 100°C, durante 20 minutos. Para leitura a 570nm em espectofotômetro, foi adicionado 1,3 ml de etanol 60% (v/v). A quantificação dos aminoácidos foi baseada em curva padrão para glicina.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AÇÚCARES REDUTORES

Os teores de açúcares solúveis totais (AST) dos calos de lechieira estão apresentados na Figura 9.

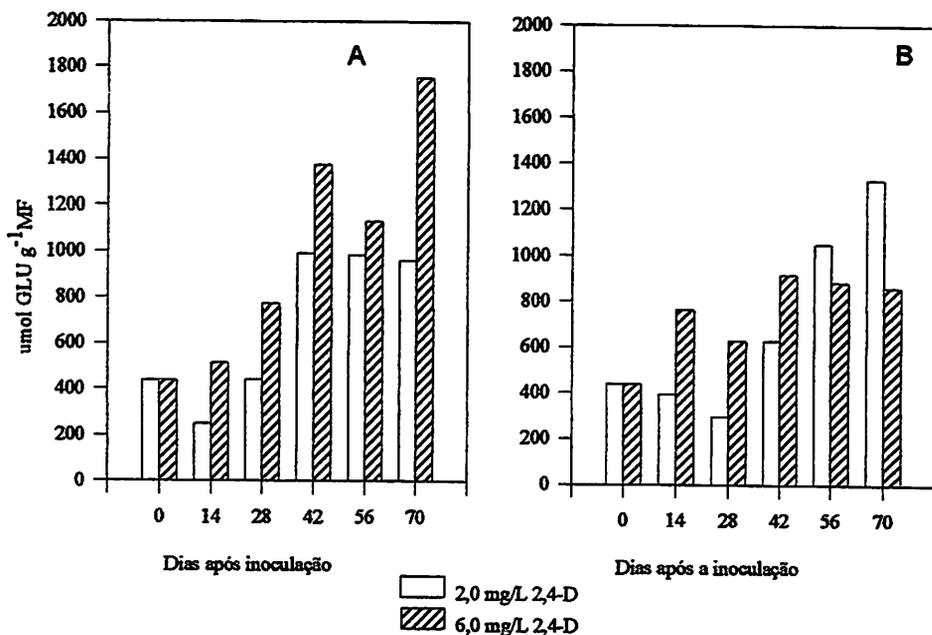


FIGURA 9 Teores de açúcares solúveis totais do explante e de calos de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) formados a partir de segmentos foliares, inoculados, *in vitro*, em meio MS, suplementado com 2,0 mg/L ou 6,0 mg/L de 2,4-D, na presença (A) ou ausência de luz (B). UFLA, Lavras/MG, 1999.

Os açúcares solúveis totais são compostos, basicamente, por hexoses (açúcares redutores) e outros açúcares de cadeias maiores (não redutores) com função de armazenamento e transporte (Tupy, 1985; Castro, 1990; Lima, 1998).

Em geral, maiores teores de AST foram observados em calos, obtidos na presença de luz (Figura 9A), em comparação aos calos obtidos na ausência de luz (Figura 9B).

Na presença de luz (Figura 9A) observou-se diferença, quanto aos teores de AST, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L, quando comparados aos calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D. Em calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D foram observados aumentos nos teores de AST durante o período de inoculação. Na presença de 2,0 mg/L, foram verificados aumentos nos teores de AST, até os 42 dias após a inoculação, a partir da qual não foi observada nenhuma alteração significativa.

O teor máximo de AST (1756  $\mu\text{mol Glu g}^{-1}$  MF), na presença de luz, foi observado aos 70 dias após à inoculação em calos, mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D, observando-se um ganho de 83%, em comparação aos teores obtidos em calos inoculados na presença de 2,0 mg/L. O uso de 2,0 mg/L 2,4-D proporcionou um aumento máximo de, aproximadamente, 961  $\mu\text{mol GLU g}^{-1}$  MF, de AST aos 42 dias após a inoculação.

Na ausência de luz (Figura 9B), foram verificadas diferenças quanto aos teores de AST. Os maiores teores foram observados em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L em comparação aos calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D. Foi observada uma pequena redução nos teores de AST, nos calos mantidos na presença de 2,0 mg/L, até o 28º dia após a inoculação, sendo que a partir desse dia, ocorreu um aumento crescente nos teores de AST até o 70º dia de inoculação.

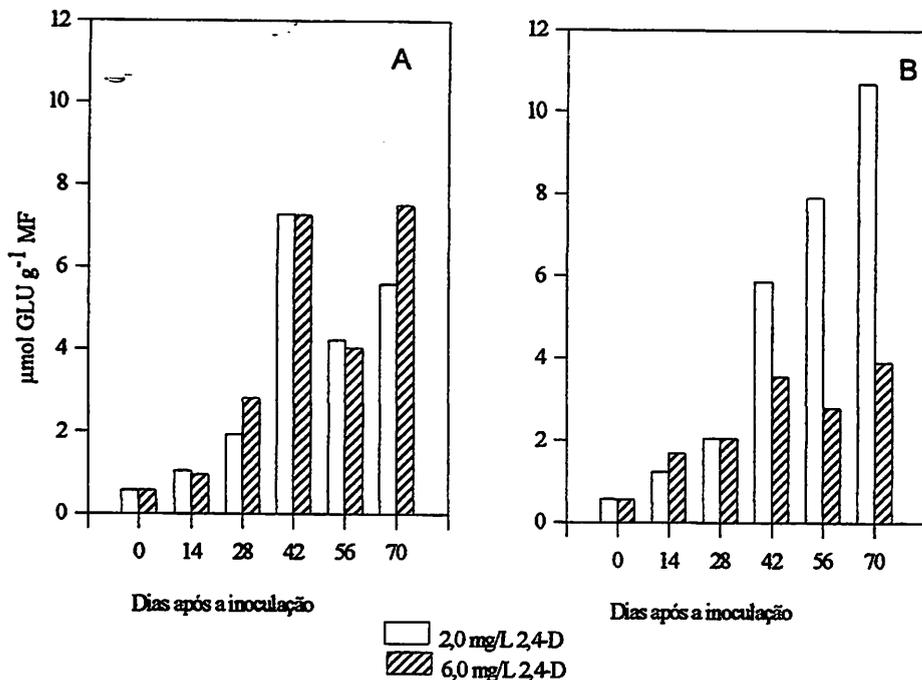
O teor máximo de AST (1327  $\mu\text{mol GLU g}^{-1}$  MF), na ausência de luz, foi observado aos 70 dias após a inoculação, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D, observando-se um ganho de 38%, comparação aos teores obtidos em calos mantidos na presença de 6,0 mg/L. O uso de 6,0mg/L 2,4-D

proporcionou um aumento máximo de 916  $\mu\text{molGLU g}^{-1}$  MF de AST aos 42 dias após a inoculação.

Ao contrário dos resultados obtidos, Serra (1999) verificou uma redução nos teores de açúcares solúveis totais, em calos originados a partir de segmentos foliares de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), após a inoculação dos explantes no meio nutritivo. Segundo o autor, os explantes não absorveram a fonte de carboidrato sacarose, presente no meio de cultura e houve a degradação desses açúcares, possivelmente, para serem utilizados em outras formas. Paiva Neto (1996), também observou degradação dos açúcares solúveis totais, após o 12º dia de inoculação em segmentos foliares de moreira, cultivados em meio MS, acrescido de 28,8 $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

Com relação às análises de açúcares redutores (AR), teores elevados de açúcares redutores (AR), foram observados em calos mantidos na ausência de luz (Figura 10B), em comparação aos calos mantidos na presença de luz (Figura 10A). Explantes mantidos na ausência de luz, ao contrário de que se observou na análise de AST, apresentaram maiores teores de AR.

Na presença de luz (Figura 10A) observa-se um comportamento semelhante nos teores de AR, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L e 6,0 mg/L, até o 56º dia após a inoculação, ocorrendo um aumento nos teores de AR, apenas no 70º dia após a inoculação em calos mantidos na presença de 6,0 mg/L, em comparação aos calos mantidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D.



**FIGURA 10** Teores de açúcares redutores do explante e de calos de lechiera (*Litchi chinensis* Sonn.) formados a partir de segmentos foliares inoculados, *in vitro*, em meio MS, suplementado 2,0 mg/L ou 6,0 mg/L de 2,4-D, na presença (A), ou ausência de luz (B). Lavras/MG, 1999.

O teor máximo de AR (7,52  $\mu\text{mol GLU g}^{-1}$  MF) na presença de luz, foi observado aos 70 dias após a inoculação, em calos mantidos em meio contendo 6,0 mg/L 2,4-D. No mesmo período de inoculação, observa-se um ganho de 34% nos teores de AR, em comparação aos calos inoculados na presença de 2,0 mg/L. O uso de 2,0 mg/L 2,4-D proporcionou um aumento máximo (7,2  $\mu\text{mol GLU g}^{-1}$  MF) de AR, apenas aos 42 dias após a inoculação na presença de luz.

Na ausência de luz (Figura 10B), foram verificadas diferenças nos teores de AR, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L, quando comparados aos calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D. Foi observado um aumento crescente nos teores de AR, durante o período de inoculação, em calos mantidos

na presença de 2,0 mg/L, com o teor máximo (10,68  $\mu\text{mol GLU g}^{-1}$  MF), sendo observado aos 70 dias após a inoculação. Observa-se um ganho de 173%, em comparação com os teores obtidos em calos inoculados na presença de 6,0mg/L.

Na presença de 6,0 mg/L foi verificado um aumento nos teores de AR, até o 42° dias após a inoculação, apresentando a seguir (56° dia após a inoculação), uma pequena redução seguida de elevação, nos teores aos 70 dias após a inoculação. O teor máximo (3,90  $\mu\text{mol GLU g}^{-1}$  MF), no entanto, foi observado aos 70 dias após a inoculação.

Esse comportamento diferencia dos resultados obtidos para AST, que demonstraram maior acúmulo, quando os calos foram mantidos em meio MS, contendo 6,0 mg/L 2,4-D e na presença de luz. Resultados semelhantes foram obtidos por Sacchi, Morgutti e Abruzzese (1995), quantificando açúcares redutores e sacarose em calos de *Actinidia deliciosa*.

Entretanto, Serra (1999) estudando calos, originados de segmentos foliares de Castanha do Brasil, verificou redução nos teores de açúcares redutores, após a inoculação, possivelmente, para produção de energia a ser utilizada na fase de crescimento.

Paiva Neto (1996) observou em segmentos foliares de moreira cultivados em meio MS, acrescido de 2,88 $\mu\text{M}$  de 2,4-D, uma redução nos teores de AR, no período que sucedeu a inoculação, seguido de um aumento até o 12° dia após a inoculação e, posterior redução, até o 30° dia após a inoculação. Essa redução nos teores de AR é atribuída a um desequilíbrio entre absorção e consumo de carboidratos durante o período de inoculação. O autor também demonstra que segmentos foliares de moreira cultivados em meio com 2,4-D, apresentam níveis superiores de açúcares redutores e inferiores, para açúcares solúveis totais, apresentando um menor teor de açúcares não redutores, o que indica a ocorrência de maior atividade metabólica nas células.

## 5.2 AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

Os teores de aminoácidos em calos de lechieira, obtidos a partir de explantes foliares inoculados em meio MS, suplementado com 2,0 ou 6,0mg/L de 2,4-D, na presença ou ausência de luz estão apresentados na Figura 11.

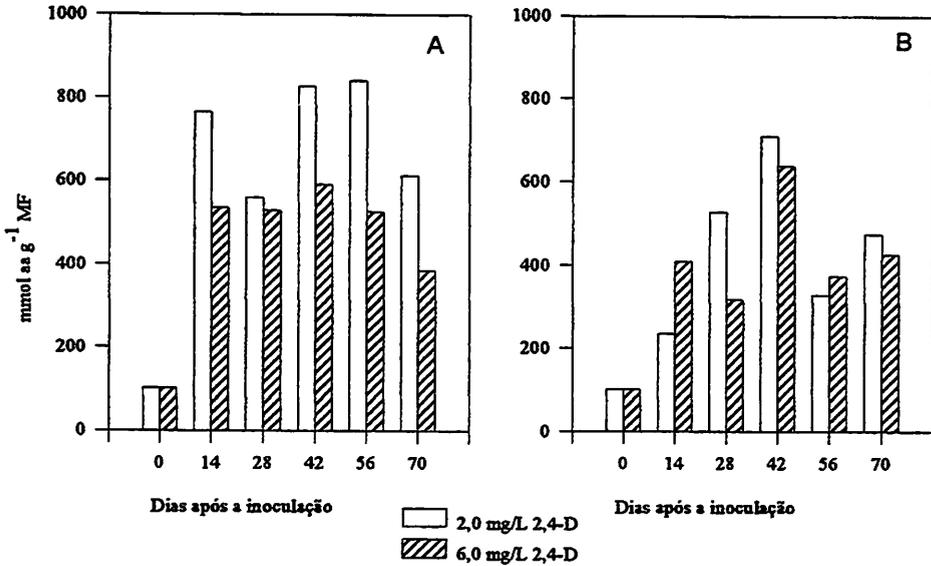


FIGURA 11 Teores de aminoácidos totais do explante e de calos de Lechieira (*Litchi chinensis* Sonn) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 2,0 mg/L ou 6,0 mg/L de 2,4-D, na presença (A) ou ausência de luz (B). UFLA, Lavras/MG, 1999.

Observa-se que, os maiores teores de aminoácidos foram observados em calos, mantidos na presença de luz (Figura 11A), em comparação aos calos mantidos na ausência de luz (Figura 11B).

Na presença de luz (Figura 11A), observou-se diferença, quanto aos teores de aminoácidos em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L, quando comparados com calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D. Foi observado um aumento nos teores de aminoácidos, em calos mantidos na presença de 2,0

mg/L até o 14º dia após a inoculação. A partir do 14º dia de inoculação houve um decréscimo nos teores de aminoácidos até o 28º dia, a partir do qual foi observado novo acréscimo, atingindo teor máximo aos 56 dias após a inoculação. Na presença de 6,0 mg/L 2,4-D observou-se um aumento nos teores até 42 dias após a inoculação.

O teor máximo de aminoácidos (840umol) foi observado aos 56 dias após a inoculação, em calos mantidos à presença de luz e em meio MS, acrescido de 2,0 mg/L 2,4-D. Observou-se ao final dos 56 dias de inoculação um ganho de 73%, em comparação aos teores obtidos em calos inoculados na presença de 6,0mg/L 2,4-D. O uso de 6,0 mg/L 2,4-D proporcionou um acúmulo máximo de aminoácidos aos 42 dias após a inoculação (591umol).

Em geral, calos cultivados na ausência de luz, independente da concentração de 2,4-D, apresentaram padrão semelhante de acúmulo de aminoácidos. Foi observado um aumento nos teores de aminoácidos durante o período de inoculação até o 42º dia.

Na ausência de luz (Figura 11B), o teor máximo de aminoácidos (710umol) foi observado aos 42 dias após a inoculação, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D, obtendo um ganho de 10% em comparação com os calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D. O uso de 6,0 mg/L 2,4-D proporcionou um acúmulo máximo de 637umol de aminoácidos aos 42 dias após a inoculação.

O aumento no teor de aminoácidos, observado na figura 11, pode ser devido a uma absorção considerável do nitrogênio e de glicina do meio de cultura, os quais são produzidos, utilizando-se energia liberada no catabolismo de carboidratos. Segundo George, Puttock e George (1988), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais, geralmente, são produzidos utilizando energia liberada no catabolismo dos carboidratos.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Paiva Neto (1996), onde teores elevados de aminoácidos, em segmentos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*) inoculados *in vitro*, foram detectados até o 12º dia após a inoculação, seguido de redução até o 30º dia após a inoculação. Esse aumento inicial e posterior redução no teor de aminoácidos também foi detectada por Sacchi, Morgutti e Abruzzese (1995) em calos de *Actinidia deliciosa*.

Com relação aos estudos proteicos, observa-se, na Figura 12, que em geral, os maiores teores de proteínas totais foram observados em calos mantidos na presença de luz (Figura 12A), em comparação aos calos mantidos na ausência de luz (Figura 12B).

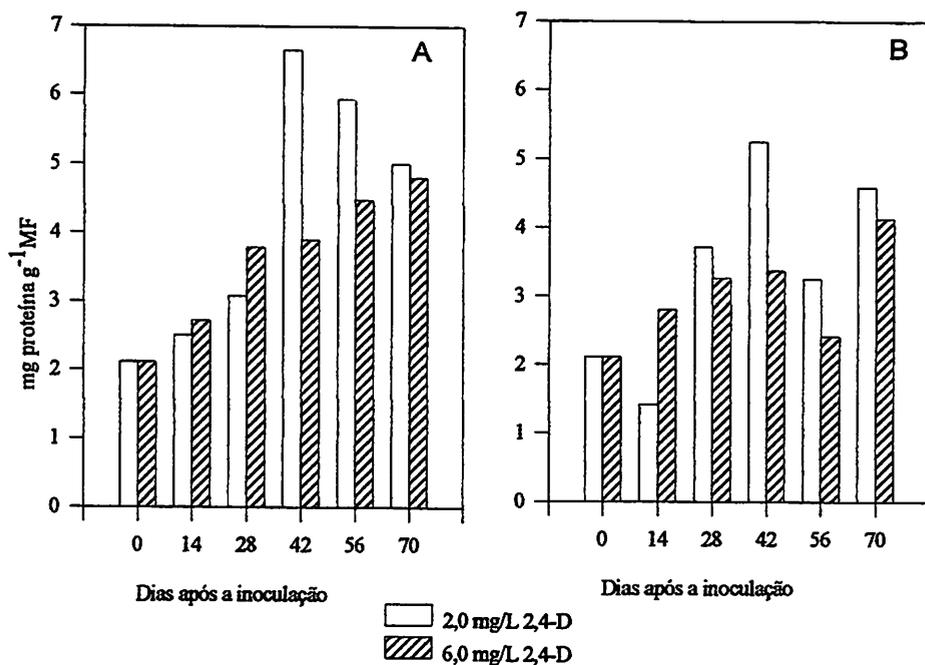


FIGURA 12 Teores de proteínas totais do explante e de calos de lechiera (*Litchi chinensis* Sonn.), formados a partir de segmentos foliares inoculados, *in vitro*, em meio MS, suplementado com 2,0mg/L e 6,0mg/L de 2,4-D, na presença (A) ou ausência de luz (B).UFLA, Lavras/MG, 1999.

Na presença de luz (Figura 12A) observa-se diferença quanto aos teores de proteínas, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L, quando comparados com calos cultivados com 6,0 mg/L 2,4-D. Em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D, observa-se um aumento nos teores de proteínas até o 42º dia após a inoculação, em calos, porém, cultivados na presença de 6,0 mg/L, foi verificado um aumento crescente nos teores de proteínas até os 70 dias após a inoculação.

O teor máximo de proteínas (6,6ug) foi observado aos 42 dias após a inoculação, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L (Figura 12A). Aos 42 dias após a inoculação observou-se um ganho de 70%, nos teores de proteínas, em calos desenvolvidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D, em comparação aos calos mantidos na presença de 6,0 mg/L. O teor máximo de proteína (4,8ug) em calos mantidos na presença de 6,0 mg/L foi observado aos 70 dias após a inoculação.

Na ausência de luz (Figura 12B), também foi observado uma diferença quanto aos teores de proteínas, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L, quando comparados aos calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D.

O teor máximo de proteínas (5,25ug) foi observado aos 42 dias após a inoculação, em calos mantidos na presença de 2,0 mg/L 2,4-D. Observa-se ao final dos 42 dias de inoculação um ganho em torno de 60% para calos mantidos na presença de 2,0mg/L, em comparação aos calos mantidos na presença de 6,0 mg/L. O teor máximo de proteína (4,1ug) foi observado aos 70 dias após a inoculação, para calos mantidos na presença de 6,0 mg/L 2,4-D.

Resultados obtidos por Paiva Neto (1996) demonstraram o acúmulo máximo de proteínas solúveis totais, em explantes foliares de moreira, inoculados *in vitro*, aos 20 dias após a inoculação. Lal et al. (1993) observaram um aumento no teor de proteínas, durante a fase de crescimento de calos de cana

de açúcar e posterior decréscimo desses teores durante a fase de diferenciação de calos.

Segundo Serra (1999), o aumento do teor de proteína e aminoácido, até o 30º dia após a inoculação, coincide com a fase Lag, da curva de crescimento de calos de Castanha do Brasil, sendo que essa elevação expressa a síntese de novas proteínas e aminoácidos formados a partir da degradação de carboidratos, a qual é necessária à produção de energia, a ser utilizada na fase exponencial de crescimento, onde ocorre uma maior divisão celular e, conseqüentemente, maior taxa de crescimento.

## **6 CONCLUSÕES**

**Teores mais elevados de açúcares solúveis totais (AST) são observados em calos de lechieira, obtidos a partir de segmentos foliares, inoculados em meio MS, na presença de 6,0 mg/L 2,4-D e mantidos na presença de luz.**

**Açúcares redutores (AR) foram observados em maiores teores, em calos de lechieira, obtidos a partir de segmentos foliares, inoculados em meio MS, na presença de 2,0 mg/L 2,4-D e mantidos na ausência de luz.**

**Maiores teores de aminoácidos totais e proteínas totais, são observados em calos de lechieira, obtidos a partir de segmentos foliares, inoculados em meio MS, na presença de 2,0 mg/L 2,4-D e mantidos na presença de luz.**

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos em trabalhos desenvolvidos com a lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), através da inoculação de segmentos foliares, obtidos de plantas jovens em meio "MS", acrescido de 2,0mg/L de 2,4-D. O comportamento, *in vitro*, dos calos obtidos foi superior, quando mantidos na presença de luz, sendo que a repicagem deve ser realizada aos 63 dias após a inoculação. As diferentes concentrações de BAP, TDZ e Cimetina não foram suficientes para promoverem organogênese indireta. Através das análises dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos e proteínas totais, obtidos dos calos de lechieira, observa-se ausência de anormalidades durante o seu desenvolvimento, havendo o acúmulo e redução dos mesmos em fases distintas.

Para o estabelecimento, *in vitro*, de segmentos nodais sugere-se o uso de explantes obtidos de plantas jovens.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- CASTRO, P.R.C. Bases fisiológicas da produção e da estimulação de *Hevea brasiliensis*. In: BERNARDES, M.S. Sangria da seringueira. Piracicaba: ESALQ/USP-FEALQ, 1990. p.1-25.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, J.M.; GEORGE, H.J. **Plant culture media: commentary and analysis**. England: Exegetics, 1988. 420p.
- LAL, N.; CHANDRA, P.; SINGH, J.; SINGH, H.N. Changes in nucleic acid and protein contents during plant regeneration from callus in sugarcane. **Indian Journal of Plant Physiology**, Indian, v. 35, n.4, p.389-392, 1992.
- LEMOS, G.B. de. **Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio**. Lavras: UFLA, 1996. 56p. (Dissertação- Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- LIMA, D.U. de. **Avaliação sazonal da produção de borracha e do metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais**. Lavras:UFLA, 1998. 71p. (Dissertação- Mestrado em Fisiologia Vegetal).

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v.31, p.426-428, 1959.

PAIVA NETO, V.B. de. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras:UFLA, 1998. 33p.(Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

PHAND, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of *in vitro* culture of plants; problems and applications, comparison of soluble contents, marker enzymes between explant and cell suspension culture. **Experimental Biological**, v.46, n.3, p.58, 1987.

PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223p.

SACCHI, G.A.; MORGUTTIS.; ABRUZZESE, A. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Berkeley, v.106, n.1, p.107-113, Mar. 1995.

SERRA, A.G.P. **Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. Lavras:UFLA, 1999. 72p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesday, v. 176, p.367-372, 1948.

**TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.**

**TUPY, J. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Biologia Plantarum*, Copenhagen, 1985. p.51-64.**

**YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, London, p.508-514, 1954.**

## ANEXOS

	ANEXO	Página
TABELA 1A	Composição básica do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)	64
TABELA 2A	Análise de variância das médias das repetições dos Segmentos foliares de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn) para descontaminação.	65
TABELA 3A	Análise de variância das médias das repetições dos pesos da curva de crescimento de calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn).	65
TABELA 4A	Análise de variância das médias das repetições dos pesos da curva de crescimento de calos, obtidos a partir de Segmentos foliares de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn).	66
TABELA 5A	Análise de variância das médias das repetições dos teores de pesos proteína, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, determinados em calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn), inoculados em meio MS acrescido de 2,0 mg/L 2,4-D.	66
TABELA 6A	Análise de variância das médias das repetições dos teores de pesos proteína, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, determinados em calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn), inoculados em meio MS acrescido de 6,0 mg/L 2,4-D.	67
TABELA 7A	Análise de variância das médias das repetições do comprimento médio da parte aérea, obtida a partir de sementes de lechieira ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn).	67

## ANEXOS

TABELA 1A Composição básica do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

SAIS	CONCENTRAÇÃO FINAL Mg/L
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{.EDTA}$	37,2
MIO-INOSITOL	100
TIAMINA.HCl	1,0
PIRIDOXINA.HCl	0,5
ÁC.NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0

TABELA 2A Análise de variância das médias das repetições dos segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn) para descontaminação. UFLA, Lavras/MG 1999.

Características	QM trat.	QM res.	CV(%)
Descontaminação	4.525**	0.30833	12.48

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade de F;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de F;

ns= não significativo

TABELA 3A Análise de variância das médias das repetições dos pesos da curva de crescimento de calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn). UFLA, Lavras/MG 1999

Característica	QM trat. (2,0mg/L de 2,4-D)	QM res.	CV(%)
Tempo	0.02465 **	0.0008250	17.00
Luminosidade	0.05466 **		
T X L	0.01047 **		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade de F;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de F;

ns= não significativo

**TABELA 4A** Análise de variância das médias das repetições dos pesos da curva de crescimento de calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn). UFLA, Lavras/MG 1999

Característica	QM trat. (6,0mg/L de 2,4-D)	QM res.	CV(%)
Tempo	0.01083 **	0.00077	18.00
Luminosidade	0.02066 **		
T X L	0.00257 **		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade de F;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de F;

ns= não significativo

**TABELA 5A** Análise de variância das médias das repetições dos teores de pesos proteína, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, determinados em calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn), inoculados em meio MS, acrescido de 2,0 mg/L 2,4-D. UFLA, Lavras/MG 1999

Característica	QM (2,0mg/L de 2,4-D)			
	Proteína	Aas	AST	AR
Variáveis				
Tempo	10.20 **	191387**	305464**	37.76**
Luminosidade	3.95 **	302661**	13303n.s.	10.78**
T X L	1.35 **	56786*	101870**	6.22**
Residuo	0.16	18455	13199	0.47
CV(%)	10.00	26.00	19.00	20.00

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade de F;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de F;

ns= não significativo

**TABELA 6A** Análise de variância das médias das repetições dos teores de pesos proteína, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores, determinados em calos, obtidos a partir de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn), inoculados em meio MS, acrescido de 6,0 mg/L 2,4-D. UFLA, Lavras/MG 1999

Característica	QM (6,0mg/L de 2,4-D)			
	Proteína	Aas	AST	AR
Variáveis				
Tempo	2.61 **	113809**	445057**	17.83**
Luminosidade	2.18 *	27567*	376426**	12.30**
T X L	0.59 n.s.	12180*	156460**	3.44**
Residuo	0.57	4255	6460	0.37
CV(%)	22.00	15.00	9.00	19.00

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade de F;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de F;

ns= não significativo

**TABELA 7A** Análise de variância das médias das repetições do comprimento médio, da parte aérea, obtida a partir de sementes de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn). UFLA, Lavras/MG 1999

Característica	QM
Variáveis	Compr.
Doses	10.70**
Tempo	6.28**
D X T	1.60n.s.
Residuo	1.05
CV(%)	30.00

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade de F;

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de F;

ns= não significativo